



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



FACULTAD DE
CIENCIAS
UDELAR | fcien.edu.uy



Tesina de grado

Licenciatura en Ciencias Biológicas

Facultad de Ciencias, Universidad de la República

“Expresión de toxinas Shiga en STEC de origen ambiental, clínico y alimentario”

Bach. Juan Silvera

Tutora: Ana Umpiérrez

Departamento de Microbiología

Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable

2026



Índice

RESUMEN.....	4
ABREVIATURAS.....	5
INTRODUCCIÓN.....	7
Generalidades de <i>Escherichia coli</i> y STEC.....	7
Epidemiología de STEC.....	8
Toxinas Shiga de STEC.....	11
Supervivencia, rol en el ambiente e inductores de toxicidad.....	13
Contexto del trabajo final de grado.....	14
OBJETIVO GENERAL Y ESPECÍFICOS.....	15
MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
Aislamientos bacterianos.....	15
Colecta de muestra para aislamiento de STEC en agua de arroyo.....	15
Medios de cultivo.....	16
Viabilidad y supervivencia bacteriana ante variaciones nutricionales.....	17
Concentración Inhibitoria Mínima de la Ciprofloxacina.....	18
Puesta a punto del ensayo de expresión de genes de virulencia.....	19
Expresión de genes de las toxinas Shiga.....	20
RESULTADOS.....	22
Viabilidad y crecimiento bacteriano ante variaciones nutricionales.....	22
Concentración Inhibitoria Mínima de la Ciprofloxacina.....	24
Puesta a punto del ensayo de expresión de genes de virulencia.....	25
Cuantificación de la expresión de genes de virulencia por qPCR.....	27



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



FACULTAD DE
CIENCIAS
UDELAR fcien.edu.uy



Informe final Tesina de grado - Licenciatura en Ciencias Biológicas

Bach. Juan Silvera

DISCUSIÓN.....	35
PERSPECTIVAS.....	40
AGRADECIMIENTOS.....	41
BIBLIOGRAFÍA.....	42
ANEXO.....	49



Índice de tablas

Tabla 1. Concentración Inhibitoria Mínima de la Ciprofloxacina para cada aislamiento.....	25
Tabla 2. Cultivos con una amplificación positiva de <i>stx1</i> o <i>stx2</i> y sus Cq promedio asociados.....	29
Tabla 3. Cuantificación de la expresión de <i>stx1</i> y <i>stx2</i>	32

Índice de figuras

Figura 1. Esquema de trabajo del ensayo de viabilidad y crecimiento.....	17
Figura 2. Esquema de la disposición de cada tubo para CIM.....	19
Figura 3. Esquema ejemplificado para determinación visual de la CIM y CIM/2.....	19
Figura 4. Crecimiento y viabilidad en AP.....	23
Figura 5. Crecimiento y viabilidad en TSB.....	23
Figura 6. Crecimiento y viabilidad en AR.....	23
Figura 7. Crecimiento comparativo individualizando cultivos en AP, TSB y AR.....	24
Figura 8. Puesta a punto del ensayo de expresión.....	27
Figura 9. Expresión positiva.....	28
Figura 10. Curvas de calibración de <i>stx1</i> y <i>stx2</i>	30
Figura 11. Cq promedio de resultados positivos con curvas de calibración.....	31
Figura 12. Expresión de <i>stx1</i> y <i>stx2</i>	33
Figura 13. Tendencias en la expresión de <i>stx1</i>	34
Figura 14. Tendencias en la expresión de <i>stx2</i>	34



Resumen

Escherichia coli productora de toxina Shiga (STEC) conforma un grupo de bacterias patógenas con un fuerte impacto en la salud pública mundial, debido a su asociación con enfermedades entéricas graves como la colitis hemorrágica o el síndrome urémico hemolítico. La expresión de sus toxinas Shiga (Stx1 y Stx2), factores de virulencia asociados a estas enfermedades y codificados por genes transportados por bacteriófagos, es influenciada por dos factores principales: la estructura genética bacteriana y su relación con las condiciones ambientales, siendo esta última, muchas veces subestimada. En este trabajo nos propusimos cuantificar la expresión de toxinas Shiga en cinco aislamientos de STEC obtenidos de cuatro ambientes distintos, utilizando diferentes secuencias involucradas en la producción de las toxinas. Se evaluó la supervivencia y viabilidad bacteriana de los aislamientos en distintas condiciones nutricionales, y se cuantificó la expresión de *stx1* y *stx2* mediante qPCR en presencia y ausencia de Ciprofloxacina (CIP) a una concentración subinhibitoria (CIM/2), la cual se evaluó actuando como inductor. Todos los aislamientos resultaron viables en los distintos medios, remarcando la capacidad de adaptación de STEC a diferentes condiciones nutricionales, aunque con un crecimiento significativamente menor en déficit nutricional. De un total de 30 condiciones evaluadas en el ensayo de expresión, 9 mostraron una amplificación positiva (4 para *stx1* y 5 para *stx2*). En el caso de *stx2*, un único aislamiento de origen alimentario se encontró dentro del rango cuantificable, pero el estudio de la tendencia de amplificación entre los 5 aislamientos mostró variabilidad entre los aislamientos. Por otro lado, la expresión de *stx1* en un aislamiento de origen animal cultivado en superávit nutricional aumentó más de 3 veces en presencia de CIP, confirmando la inducción mediada por este antibiótico. Estos resultados muestran variabilidad entre las cepas en cuanto a la expresión de los genes *stx* y confirman que la exposición a antibióticos es capaz de inducir la sobreexpresión de las toxinas Shiga.



Abreviaturas

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNc: Ácido desoxirribonucleico copia

AP: Agua con peptona y extracto de levadura

APEC: *Escherichia coli* patógenas aviares

AR: Agua de arroyo esterilizada

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

ARNr: Ácido ribonucleico ribosomal

ATCC: *American Type Culture Collection*

CH: Colitis hemorrágica

CIM: Concentración inhibitoria mínima

CLSI: *Clinical & Laboratory Standards Institute*

Cq: *Quantification cycle*

DAEC: *Escherichia coli* de adhesión difusa

EAEC: *Escherichia coli* enteroagregativa

EHEC: *Escherichia coli* enterohemorrágica

EIEC: *Escherichia coli* enteroinvasiva

EPEC: *Escherichia coli* enteropatógena

ETEC: *Escherichia coli* enterotoxigénica

ExPEC: *Escherichia coli* patógenas extraintestinales



Gb3: Globotriaosilceramida

IIBCE: Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable

InPEC: *Escherichia coli* patógenas intestinales

IP: Isla de patogenicidad

LAA: *Locus of Adhesion and Autoaggregation*

LEE: *Locus of Enterocyte Effacement*

NMEC: *Escherichia coli* causante de meningitis neonatal

OMS: Organización Mundial de la Salud

PCR: *Polymerase Chain Reaction*

qPCR: *Quantitative Polymerase Chain Reaction*

STEC: *Escherichia coli* productora de toxina Shiga

Stx1: Toxina Shiga 1

stx1: Gen codificante para toxina Shiga 1

Stx2: Toxina Shiga 2

stx2: Gen codificante para toxina Shiga 2

SUH: Síndrome urémico hemolítico

TSA: *Tryptone soy agar*

TSB: *Tryptone soy broth*

UFC: Unidades formadoras de colonias

UPEC: *Escherichia coli* uropatógenas



Introducción

Generalidades de *Escherichia coli* y STEC

Escherichia coli es una bacteria clasificada como bacilo Gram negativo, de la familia de las Enterobacterias. Fue descrita por primera vez en 1885 en Alemania por Theodor Escherich. Su nicho principal es el tracto gastrointestinal de vertebrados de sangre caliente (Friedmann, 2014; Lincopan et al., 2023), y los humanos representan uno de sus hospederos centrales más estudiados (Lincopan et al., 2023). Según su relación con el oxígeno se clasifica como anaerobio facultativo, lo que le permite pasar de estados de fermentación (sin oxígeno) a respiración (con oxígeno), facilitando su tránsito por el interior del cuerpo de su huésped (Bentancor et al., 2023). En nuestro organismo, *E. coli* forma parte de la microbiota, actúa como probiótico, contribuye a mantener el equilibrio intestinal y participa en la síntesis de vitaminas esenciales como la K2 y la B2 (Nakkarach et al., 2020; Miliwebsky et al., 2023). Su capacidad de adaptación no se limita a organismos vivos. Durante mucho tiempo, la presencia de *E. coli* en cuerpos de agua fue interpretada exclusivamente como un indicador de contaminación fecal reciente, asumiendo que la bacteria no podía sobrevivir prolongadamente en el ambiente. Sin embargo, actualmente se ha comprobado su supervivencia durante largos períodos, así como su potencial reproducción en ambientes extraintestinales. Esta competencia para adaptarse al ambiente resalta la complejidad ecológica de *E. coli* (Bentancor et al., 2023).

Esta especie también presenta una gran versatilidad, visto que existen variantes que causan diversos tipos de enfermedades. Por un lado, y de acuerdo al sitio blanco, se agrupan las cepas con patogenicidad extraintestinal, denominadas ExPEC (*Extraintestinal E. coli*), capaces de colonizar nichos fuera del tracto digestivo. Entre las ExPEC más conocidas podemos encontrar a las UPEC (*Uropathogenic E. coli*), causantes de infecciones urinarias, las NMEC (*Neonatal Meningitis E. coli*), asociadas a meningitis neonatal, y las APEC (*Avian Pathogenic E. coli*), patógenas aviares (Johnson & Russo, 2002; Kathayat et al., 2021). Por otro lado, existen cepas que, aunque se encuentran en el tracto intestinal no forman parte de la microbiota, pero sí causan enfermedad entérica, denominadas InPEC (*Intestinal Pathogenic E. coli*). Dentro de este grupo seis virotipos principales se diferencian entre ellos según



sus mecanismos de virulencia y los cuadros clínicos que desarrollan los individuos infectados: *E. coli* Enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* Enteropatógena (EPEC), *E. coli* Enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* Enteroagregativa (EAEC), *E. coli* de adherencia difusa (DAEC) y finalmente, *E. coli* productora de toxina Shiga y/o enterohemorrágica (STEC o EHEC, respectivamente) (Alhadlaq et al., 2024).

Las STEC se caracterizan por presentar al menos una de sus toxinas, la toxina Shiga Stx1 y la Stx2, codificadas en fagos lisogénicos integrados en el cromosoma bacteriano. Por otro lado, las EHEC se consideran evolutivamente un subgrupo de éstas, que además de las toxinas Shiga portan la isla de patogenicidad LEE (*Locus of Enterocyte Effacement*) (STEC LEE+) (Del Cogliano et al., 2018). Las STEC pueden presentar más de un fago integrado en su cromosoma, e incluso más de un fago de la misma toxina, dando lugar a STEC *stx1*⁺, STEC *stx2*⁺, STEC *stx1*⁺/*stx2*⁺. A su vez, se conocen cuatro subtipos para Stx1 (a, c, d, e) (Probert et al., 2014) y once para Stx2 (a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k) (Yang et al., 2020). Al igual que las variantes Stx1 y Stx2, las cepas de STEC pueden presentar más de un subtipo de cada toxina, lo que les brinda un fuerte componente extra de complejidad a su patogenicidad (Croxen et al., 2013).

Epidemiología de STEC

STEC es un patógeno bacteriano con potencial zoonótico definido. El ganado es su reservorio principal, aunque también se aísla de otros rumiantes y animales silvestres (Tenailon et al., 2010). En función de la relación entre STEC y su hospedero, los bovinos pueden clasificarse en tres categorías: especies reservorio, especies de derrame y especies callejón sin salida (*dead-end hosts*); basándose en las habilidades del animal para transmitir la infección a otras especies y mantener la infección en ausencia de una exposición continua a STEC (Persad & LeJeune, 2014). Las especies reservorio pueden mantener la infección asintomática sin estar expuestas, así como transmitirla a otras especies, mientras que, las especies de derrame pueden transmitirla pero no logran mantener la infección. Finalmente, las especies callejón sin salida no son capaces de mantener ni de transmitir la



infección, por lo que no contribuyen a la diseminación de STEC (Persad & LeJeune, 2014).

Se considera que el ganado es portador asintomático de STEC debido a que las toxinas Shiga requieren del receptor Gb3 en las células de las vellosidades intestinales para ejercer su efecto nocivo, y este receptor no se encuentra presente en la mayoría de los tejidos de bovinos (Keusch et al., 1991). Sin embargo, este es un tema de debate actual, debido a que existen reportes donde se las asocia a enfermedad entérica y riesgo de muerte de terneros (Fernández et al., 2023).

Las infecciones por STEC pueden generar cuadros clínicos complejos en humanos, como colitis hemorrágica (CH) o síndrome urémico hemolítico (SUH) (Tseng et al., 2014). Este último suele causar fallo renal agudo en los grupos etarios más afectados: niños menores de 5 años y adultos mayores con co-morbilidades (Joseph et al., 2020). La gravedad de la infección dependerá de varios factores como la virulencia de la cepa infectiva, las capacidades del sistema sanitario de prevenir brotes y la condición médica de los pacientes infectados, entre otros (Joseph et al., 2020). A esto se le adiciona que el uso de antibióticos es fuertemente desaconsejado debido por un lado al peligro de generar multirresistencia bacteriana y por otro, a que el tratamiento con antimicrobianos puede inducir la producción de las toxinas Shiga a través de una respuesta SOS. Este estrés inducido en las bacterias agrava la infección e incrementa el riesgo de muerte. Adicionalmente, la potencial transferencia horizontal de genes de resistencia a otras especies constituye una amenaza para la salud pública (Davies & Davies, 2010; von Wintersdorff et al., 2016).

Según la OMS, las principales fuentes de contagio de STEC son el consumo de carne picada cruda o poco cocida, frutas, verduras, hortalizas y productos lácteos contaminados por materia fecal, ingesta de agua contaminada, y por el contacto humano-ganado (Nada et al., 2023). A esta gran cantidad de fuentes de contagio, se le suma la antes mencionada emergencia de STEC resistentes a antibióticos de uso humano y veterinario, y la transferencia horizontal genética a otras especies (Nada et al., 2023). Se estima que más de 2,8 millones de personas sufren enfermedades entéricas agudas anualmente, con unos 4000 casos de SUH causados por STEC,



muchos de ellos asociados con muertes (Majowicz et al., 2014). En América Latina, las infecciones por STEC representan casi el 2% de los casos de diarrea aguda y el 20-30% de los casos de diarrea sanguinolenta (Majowicz et al., 2014). En Uruguay, se estima que la incidencia de SUH sería de 4-5 niños cada 100.000 menores de 5 años (Varela et al., 2008), algo menor a Argentina, país endémico para SUH, y con mayor mortalidad en el mundo (Majowicz et al., 2014; ; Brusa et al., 2020).

Existen diversos reportes de brotes causados por STEC asociados a varios serotipos. El más conocido y más caracterizado de ellos es el serotipo O157:H7, con un amplio espectro de brotes reportados en Norteamérica y Europa desde 1982 hasta la actualidad, y asociado a una alta tasa de morbilidad y de mortalidad en los grupos etarios más susceptibles (Reiss et al., 2006). La combinación de los factores edad y hacinamiento hacen que por ejemplo los residenciales para adultos mayores sean un ambiente de alto riesgo para brotes de infección por STEC. El primer reporte de un brote en residencial asociado a O157:H7 se remonta al comienzo de la década de los '80 en Ontario, Canadá, donde 31 de 353 residentes fueron infectados, la fuente: hamburguesas con carne poco cocida. Pocos años después, en 1985, un brote similar ocurrió en otro residencial también en Ontario, asociado a carne cruda, el resultado: 55 de 169 residentes infectados, 12 fueron diagnosticados con SUH, de los cuales 11 fallecieron (Reiss et al., 2006). Posteriormente, en un trabajo de revisión de brotes de O157:H7 en Norteamérica desde los '80 hasta 2003 se reportó que la tasa de mortalidad por infección en la población general variaba entre el 1 y 2%. Además, se estimó que un 6% de los infectados desarrollaría SUH, y de ese porcentaje, la tasa de mortalidad aumentaba al 3-5% (Reiss et al., 2006).

Excluyendo los brotes causados por el serotipo O157:H7, otros serogrupos han paulatinamente cobrado relevancia en los últimos años, asociados a enfermedad severa. Entre éstos, los más prevalentes incluyen a STEC de los serogrupos O26, O45, O103, O111, O121 y O145, los cuales se agrupan en el denominado grupo de las "Big Six" (Alharbi et al., 2022). Al igual que las STEC O157:H7, estas STEC no-O157 se han asociado a numerosos brotes alrededor del mundo, mayoritariamente vinculados a la ingesta de comida o agua contaminada, o al contacto directo con reservorios (Alharbi et al., 2022; Smith et al., 2014). Por otra



parte, uno de los brotes más mortales asociados a STEC ocurrió en 2011 en Alemania, causado por el consumo de coles contaminados por una variante particularmente virulenta del serotipo O104:H4, no perteneciente al “Big Six”. El mismo fue responsable de la muerte de más de 50 personas (Joseph et al., 2020). El serotipo O104:H4 presenta la particularidad de ser un híbrido, ya que contiene características tanto de STEC como de EAEC, por lo que representa un único y altamente virulento patógeno, capaz de causar SUH, que enfatiza la importancia de la detección temprana tanto de las O157 como de las no-O157 (Jandhyala et al., 2013).

Toxinas Shiga de STEC

Las toxinas Shiga son proteínas codificadas por los genes *stx1* y *stx2*, formadas por una subunidad A con actividad ARN-glicosidasa y 5 unidades B idénticas que median la unión a su receptor Gb3 (globotriaosylceramida) presente en las membranas plasmáticas de algunas células eucariotas y en tejidos específicos (Melton-Celsa, 2014). Una vez unida a su receptor, ingresa a la célula e inhibe la síntesis proteica mediante un mecanismo que implica la formación de un complejo y consecuente remoción de un residuo de adenina del ARN ribosómico 28S de la subunidad 60S, modificando así el sitio de acoplamiento del aminoacil-ARNt, impidiendo la adición de aminoácidos a la cadena polipeptídica en formación (Melton-Celsa, 2014). Dicha inhibición de la síntesis proteica conlleva una acumulación de proteínas defectuosas o parcialmente plegadas en el retículo endoplasmático, contribuyendo al estrés del organelo y aumentando considerablemente la liberación de calcio al citosol, que al alcanzar una concentración umbral, abre canales presentes en las mitocondrias que permiten la salida del citocromo C, con la consecuente activación de la vía de las caspasas, mecanismo principal de muerte celular programada o apoptosis (S.-Y. Lee et al., 2008). Los genes codificantes para dichas toxinas se expresan cuando señales de estrés o posible daño inducen la respuesta SOS en la célula, mediando el pasaje de los fagos lisogénicos a la vía lítica, con la concomitante producción y liberación de las toxinas (Connolly & Roe, 2016). En este sentido, un estudio del año 2018



demonstró el efecto tóxico de dicho pasaje del fago, reportando la muerte de ratones a las 72 horas de ser inoculados con una *E. coli* no patogénica con un fago lisogénico portador de los genes codificantes *stx*. Los animales así inoculados mostraron daño histopatológico concordante con daño renal e intestinal, específicos de una infección de STEC (Del Cogliano et al., 2018).

En lo que refiere a la virulencia, Stx2 está correlacionada con más casos clínicos graves que Stx1, en específico del subtipo Stx2a. Se considera que existe una correlación entre la virulencia de STEC y la cantidad de toxinas producidas, especialmente en el caso de Stx2 (Burgán et al., 2020; Donohue-Rolfe et al., 2000; J. E. Lee et al., 2007). Además, se ha reportado que la expresión de las toxinas está relacionada con la fase de crecimiento de la bacteria, siendo relativamente constante para Stx1 pero presentando un incremento al final de la fase exponencial. Para el caso de la expresión de Stx2, la misma presenta un aumento significativo en la transición de fase exponencial tardía a fase estacionaria (Bergholz et al., 2007; Peroutka-Bigus et al., 2024), lo cual podría sugerir una importancia mayor de Stx2 en condiciones de estrés e interacción con el hospedero.

Además de las toxinas Shiga, STEC presenta diversos factores de virulencia. Uno de ellos son las islas de patogenicidad (IP). Entre las IP más estudiadas se encuentra la isla LEE que como se mencionó anteriormente, la encontramos en cepas EHEC (STEC LEE-positivas). La IP-LEE es un segmento de ADN presente en el genoma bacteriano, compuesto por 5 operones codificantes para varios genes que aportan a la virulencia. Entre ellos se destaca a la Intimina (codificada por el gen *eae*), factor involucrado en la unión y adhesión de la bacteria al tejido intestinal del huésped (Vidal et al., 2007). Si bien las STEC LEE-positivas son las más conocidas y mejor caracterizadas, ya que generan un riesgo importante para la salud, en estudios recientes se ha resaltado el potencial de patogenicidad de algunas STEC LEE-negativas, y un aumento de su incidencia a nivel global (Montero et al., 2019). En este sentido, entre las LEE-negativas se ha reportado recientemente la isla de patogenicidad LAA (*Locus of Adhesion and Autoaggregation*) en casos clínicos de STEC (Montero et al., 2017), portadora de varios genes que favorecen la colonización del intestino (Montero et al., 2017). Estos



genes codificantes para adhesinas y otras proteínas de membrana, además de aumentar su virulencia, se ha propuesto que le proveerían mayor persistencia ambiental, favoreciendo la agregación de colonias, formación de biofilms y la adhesión a superficies orgánicas e inorgánicas (Montero et al., 2017). Incluso algunos estudios la presentan como la isla de patogenicidad más prevalente entre las cepas LEE-negativas (Montero et al., 2019), y se sugiere que su adquisición sería un evento de evolución reciente que contribuiría a la gravedad de la emergencia de STEC (Montero et al., 2017).

Supervivencia, rol en el ambiente e inductores de toxicidad

Fuera del hospedero animal, STEC es capaz de sobrevivir en el ambiente por períodos de hasta 13 semanas en cursos de agua (Idland et al., 2022) y 18 semanas en heces (Ahmed et al., 2015), y aún así conservar su competencia para producir toxinas. Esto no hace más que resaltar la capacidad que tienen las bacterias para sobrevivir y aún ser infectivas al encontrarse en el ambiente, no asociadas a organismos. Un claro ejemplo de esto es la interacción entre estas bacterias y algunas amebas de vida libre como *Acanthamoeba sp.* Algunos trabajos han demostrado que las STEC pueden ingresar al interior de estos protozoarios, dentro de los cuales pueden sobrevivir hasta 20 días en un estado quiescente, para luego ser reactivadas por un estímulo de naturaleza aún no registrada (Montalbano Di Filippo et al., 2022). Sumado a esto, dichas bacterias internalizadas mantienen su potencial de virulencia intacto durante este período. Por ello, se ha propuesto que las STEC utilizarían estas amebas como un medio para resistir las condiciones de ambientes que no permitan su supervivencia, ya que dentro de estos protozoarios serían capaces de resistir situaciones de estrés nutricional, ambiental y tratamientos de desinfección de la actividad agrícola-ganadera (Montalbano Di Filippo et al., 2022).

Por otro lado, y en lo que refiere a la virulencia de las toxinas Shiga de STEC, tanto en el ambiente como en los hospederos, se han reportado algunas moléculas que actúan como inductoras de la expresión de las mismas. El contacto con antibióticos constituye el principal ejemplo, razón por la cual la terapia antimicrobiana es



fuertemente desaconsejada para tratar infecciones por STEC. En un trabajo publicado por Ramstad y colaboradores en 2021, el uso de antibióticos como Ciprofloxacina, Meropenem y Rifampicina a la mitad de su concentración inhibitoria mínima (CIM) era capaz de inducir una respuesta SOS de bacterias en fase de crecimiento exponencial tardío, facilitando la transición de los fagos a la vía lítica (Ramstad et al., 2021), lo que termina empeorando el cuadro clínico en los pacientes. Ante estos efectos, algunos antibióticos suelen utilizarse como inductores en estudios experimentales de expresión de genes *stx* (Ramstad et al., 2021). Asimismo, y al igual que los antibióticos, la Mitomicina C (MMC), utilizada en tratamientos anticancerígenos, también induce el ciclo lítico de los fagos (Idland et al., 2022). Esta molécula es un potente inductor de la expresión de la toxina Shiga y también se utiliza como control positivo de la expresión de las Stx (Ramstad et al., 2021).

Contexto del trabajo final de grado

En el contexto actual, la iniciativa “Una salud”, tiene como objetivo implementar la vigilancia de enfermedades infecciosas y evaluar la efectividad de los antimicrobianos dentro de un marco que considera la interacción entre el humano, los animales y el ambiente. Con este enfoque holístico, debemos tratar a las STEC como un único objeto de estudio, abordando el problema desde las perspectivas integradas.

Esta tesina de grado se enmarca en un proyecto de investigación del Departamento de Microbiología del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable. El estudio plantea que variantes genéticas de STEC en terneros circulan en el ambiente y alimentos, causando enfermedades en humanos. Las propiedades de los genomas flexibles de STEC les facilitan adaptarse a distintos ambientes, lo cual puede manifestarse en fenotipos diferenciales. En contraste, el flujo horizontal de genes de resistencia se extiende más allá de las variantes específicas de STEC, resultando en determinantes de resistencia antimicrobiana que no dependen del origen del aislamiento. Para investigar esto, hemos secuenciado cepas de STEC de diversos orígenes en el país y se están evaluando sus fenotipos en cuanto a



resistencia a antibióticos y capacidad de formación de biofilms, entre otras propiedades fenotípicas y genómicas. Basados en esta línea de trabajo, en esta tesina nos propusimos estudiar el efecto de las condiciones de cultivo en la supervivencia de aislamientos de STEC y en la expresión de las toxinas Shiga, así como determinar si dicha expresión se ve afectada por la presencia de Ciprofloxacina.

Objetivo general

Evaluar el efecto del medio de cultivo y del antibiótico Ciprofloxacina en el perfil de expresión de toxinas Shiga en 5 aislamientos de STEC de diversos orígenes y que presentan diferentes características genéticas.

Objetivos específicos

1. Evaluar la supervivencia de los aislamientos en diferentes medios de cultivo.
2. Determinar la capacidad de los aislamientos de expresar los genes *stx1* y *stx2* en distintas condiciones de cultivo, y evaluar si el antibiótico Ciprofloxacina tiene un efecto en dicha expresión

Materiales y métodos

Aislamientos bacterianos

Se evaluaron cinco aislamientos, uno proveniente del cepario del Departamento de Microbiología del IIBCE, obtenido de la muerte de un bovino (cepa MBG10 (Fernández et al., 2023)), positivo para *stx1*. Otro proveniente del cepario de la Unidad de Bacteriología y Virología del Instituto de Higiene, Fac. de Medicina, Udelar, aislado de un caso clínico con CH (cepa 4H (Mota et al., 2020)), positivo para *stx1* y *stx2*. El tercero de origen alimenticio también proveniente del Instituto de Higiene (BZ0742) (Mota et al., 2020), positivo para *stx2*. Por último, se evaluaron dos aislamientos de origen ambiental, uno obtenido por el equipo, en el arroyo Los Chanchos, en Lavalleja (CBVS85) en 2023 (Figueroa et al., 2025) y otro obtenido en el marco de esta tesina (CAVS123), también del arroyo Los Chanchos, ambos



positivos para *stx2*. Como control se utilizó una STEC O26:H11 de referencia ATCC, positiva para todos los genes de interés.

En todo momento se aplicó la técnica aséptica y se trabajó con los cultivos bacterianos en cámaras de bioseguridad con filtros HEPA en el Departamento de Microbiología del IIBCE.

Colecta de muestra para aislamiento de STEC en agua de arroyo

Se realizó un muestreo de agua en una locación previamente estudiada por nuestro grupo en el arroyo Los Chanchos, departamento de Lavalleja, en el marco de un proyecto de investigación en el que participamos. Se recolectaron muestras de agua superficial en bidones de 5 litros, que fueron transportadas al laboratorio para su procesamiento en un lapso no mayor a 10 horas. Las mismas fueron sometidas a un procedimiento de filtración por membrana utilizando filtros estériles de 0,22µm de tamaño de poro, los cuales fueron posteriormente colocados en placas con medio m-FC agar, selectivo y diferencial para coliformes fecales e incubados por 18-24 horas a 42°C. Aquellas colonias con un color azul oscuro, detectadas como coliformes fecales, fueron re-aisladas en medio TSA e incubadas 24 horas a 37°C. Posteriormente, se extrajo el ADN genómico de las mismas por lisis térmica (basada en el uso de altas temperaturas para degradar las membranas celulares y obtener el material genético), y se utilizó el extracto para buscar por PCR los genes de las toxinas *stx1* y *stx2* indicativos de STEC (Figuroa et al., 2025), utilizando ADN extraído de una STEC O26:H11 ATCC del cepario del Departamento de Microbiología como control positivo. A partir de este procedimiento se obtuvo el aislamiento CAVS123 (Figuroa et al., 2025), evaluado en esta tesina.

Medios de cultivo

En este trabajo se utilizaron tres medios líquidos diferentes, los aislamientos fueron cultivados por triplicado en matraces con cada uno de los siguientes medios: agua de arroyo esterilizada (AR), colectada en el arroyo Los Chanchos; medio nutriente líquido TSB (Oxoid) y en un tercer medio compuesto por una solución del agua de arroyo esterilizada suplementada con 5% de peptona y 5% extracto de levadura

(mayor concentración de nutrientes que TSB) (AP). El objetivo de este último medio fue generar un gradiente nutricional entre medios, teniendo al TSB como el método de cultivo estándar, al agua con peptona y levadura como el medio con excedente de nutrientes y al agua esterilizada como el déficit de los mismos.

Previo a su utilización, el agua de arroyo se filtró para eliminar bacterias usando filtros de membrana de $0,22\ \mu\text{m}$ y posteriormente se esterilizó mediante el uso de calor húmedo a 121°C durante 15 minutos, a una presión de 1,05 atm (autoclave) para eliminar posibles fagos que pasen por el filtro.

Viabilidad y supervivencia bacteriana ante variaciones nutricionales

Con el fin de confirmar la viabilidad y supervivencia de las cepas, a partir de cultivos frescos en placas de TSA se realizaron suspensiones bacterianas en suero fisiológico, ajustadas a una concentración de 0,5 McFarland (medida en densitómetro Den-1), equivalente a $1,5 \times 10^8$ células/mL y se inoculó con 1 mL de cada suspensión bacteriana en 9 mL de cada uno de los tres medios (Fig. 1). Los cultivos se incubaron a 37°C de forma estática y transcurridas 24 horas (basado en ensayos previos realizados en nuestro laboratorio) se tomaron alícuotas, las cuales fueron diluidas serialmente en base 10, para realizarles recuentos por siembra en superficie en placas de TSA, a aquellas diluciones que esperábamos fueran cuantificables (-6, -7, -8), por duplicado (Fig. 1).

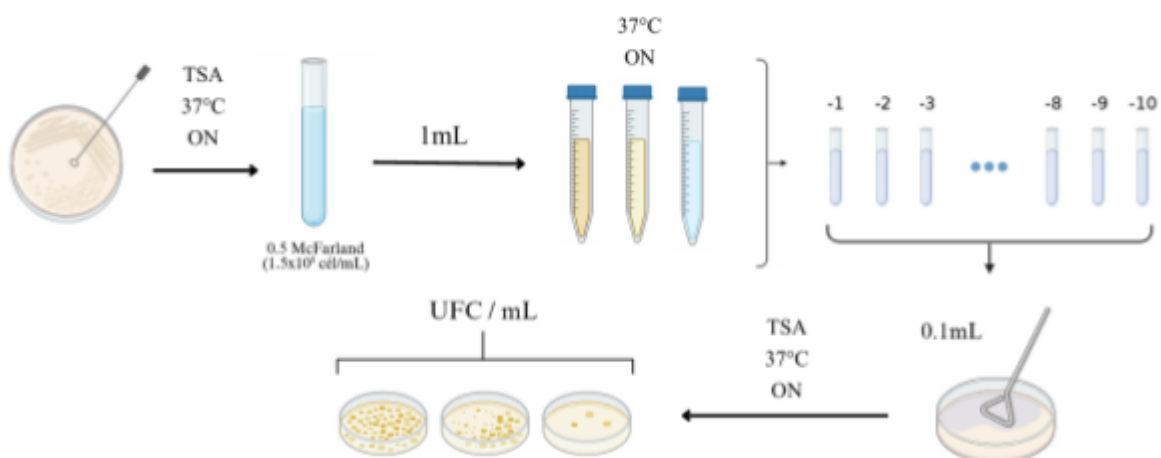


Figura 1. Esquema de trabajo del ensayo de viabilidad y supervivencia bacteriana ante variaciones nutricionales



Con el fin de determinar si existían diferencias en el crecimiento dependiendo de los nutrientes disponibles, se realizó un análisis estadístico utilizando el programa RStudio (edición 2024.09.0+375) el cual constó de tres pasos: linealización de las unidades a $\log_{10}(\text{UFC/mL})$, ANOVA para evaluar diferencias significativas dentro de cada grupo de estudio (aislamientos en cada medio de cultivo) y por último, en los casos afirmativos, un test Post Hoc Tukey HSD para comparar entre cada par de muestras y determinar si había diferencias significativas en el crecimiento microbiano de cada aislamiento según la disponibilidad nutricional. Se consideró diferencia estadística un p-valor $< 0,05$.

Concentración Inhibitoria Mínima de la Ciprofloxacina

Para determinar la CIM de la Ciprofloxacina para cada cepa se siguió un protocolo del CLSI (*Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically: Approved Standard, 2012*) con algunas modificaciones. Primeramente, se tomaron 20 tubos de vidrio estériles de 10 mL y se repartió 1 mL de TSB en cada uno. Al tubo inicial se le agregó 1 mL de CIP (*Ciproion, Laboratorio Ion S.A.*) diluida en agua destilada estéril, a una concentración de 0,1 mg/mL y luego se realizaron diluciones seriadas al $\frac{1}{2}$ hasta el tubo número 20, mediante la resuspensión y pasaje de 1 mL entre tubos, descartando 1 mL del último tubo. Paralelamente, se prepararon suspensiones bacterianas de las cepas de STEC partiendo de cultivos frescos en placa de TSA, las cuales se ajustaron a una escala 0,5 McFarland en suero fisiológico y luego diluyeron 1/100, para obtener suspensiones con una concentración final de 10^6 células por mL. Finalmente, cada uno de los tubos con antibiótico fue inoculado con 1 mL de las suspensiones bacterianas. El resultado: 20 tubos con concentraciones de TSB y suspensión bacteriana constantes, y un gradiente descendiente al $\frac{1}{2}$ de Ciprofloxacina (Fig. 2). La misma aproximación experimental se adaptó tanto para el medio AP como para AR.

Los tubos finales fueron incubados a 37°C y transcurridas 24 horas se determinó el crecimiento bacteriano como turbidez detectable visualmente. La concentración

inhibitoria mínima del antibiótico para cada cepa fue la presente en el último tubo sin crecimiento, mientras que la CIM/2 (utilizada en el ensayo de expresión), fue la presente en el primer tubo con crecimiento bacteriano (Fig. 3). Como controles, se utilizaron un tubo con caldo TSB y suspensión bacteriana (positivo, sin antibiótico), y uno con caldo TSB y antibiótico (negativo).

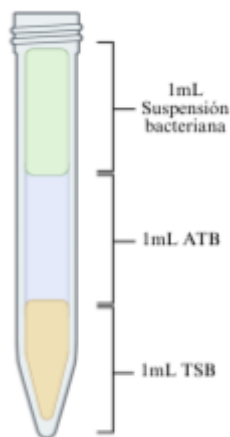


Figura 2. Esquema de la disposición de cada tubo para CIM

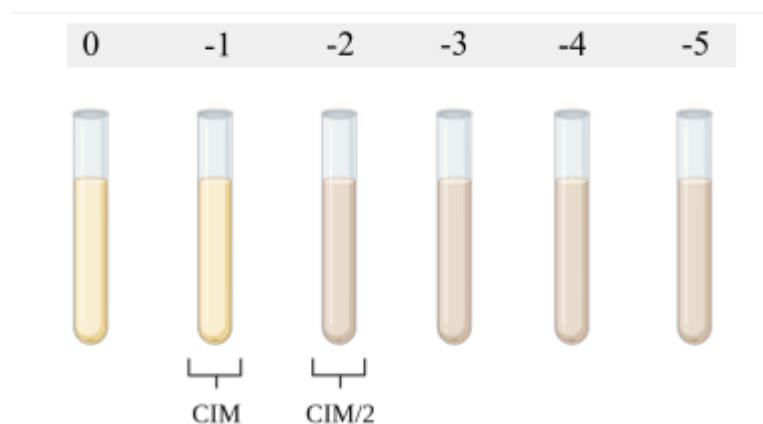


Figura 3. Esquema ejemplificado para determinación visual de la CIM y CIM/2

Puesta a punto del ensayo de expresión de genes de virulencia

La cuantificación de ADNc de los genes de las toxinas Shiga por qPCR se puso a punto utilizando el aislamiento 4H de origen humano, el cual presenta los genes de ambas toxinas: *stx1* y *stx2*. Se utilizaron los *primers* previamente diseñados para el gen *stx2* (Gonzalez Revello, 2020; Figueroa et al., 2025), y tres concentraciones diferentes del antibiótico Ciprofloxacina: CIM, CIM/2 y CIM/4.

Se generó un esquema de trabajo, con una serie de pasos y colecta de alícuotas para usar como “puntos de control”. El primer punto de control fue la extracción del material genético, a partir de 3 suspensiones obtenidas tras realizar un ensayo de CIM con el aislamiento 4H en caldo TSB (concentraciones CIM, CIM/2 y CIM/4, buscando abarcar todo el rango de posible sobreexpresión), tal como se menciona anteriormente. Para la misma se utilizó el kit PurePrep Pathogens de MOLGEN (basado en la separación magnética de fases) que coextrae ARN y ADN, y se



realizó de forma automatizada, en el servicio del Laboratorio de Bioseguridad del IIBCE. El material genético extraído se cuantificó en nanodrop y se ajustó su concentración para que todos los tubos tuvieran aproximadamente 100ng/ μ L.

El segundo punto de control fue cuando se realizó la digestión con DNAsa. La digestión enzimática se realizó siguiendo los protocolos y reactivos del kit comercial *TURBO DNA-free Kit (Invitrogen)*, basado en el uso de una DNAsa de alta eficiencia y un reactivo de inactivación de la misma. Finalmente, el tercer punto de control se realizó en la retrotranscripción del ARN. En esta etapa se utilizó el kit y protocolo del *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems)*, basado en una enzima transcriptasa inversa que retrotranscribe ARN a ADNc. para obtener una porción representativa del ARNm codificante para *stx*, en forma de ADNc.

Todas las alícuotas obtenidas en los puntos de control se utilizaron como molde en la reacción de qPCR, utilizando el fluoróforo SYBR Green, siguiendo el protocolo previamente puesto a punto en el laboratorio (Gonzalez Revello, 2020; Figueroa et al., 2025) y mejor detallado en el Anexo. En el proceso de la qPCR, se utilizó ADN de una STEC O26:H11 ATCC como control positivo. Además, se amplificó el gen que codifica para el ADNr 16S por qPCR siguiendo un protocolo adaptado y utilizado previamente en el laboratorio (Evans, 2006), para corroborar la correcta amplificación esperada en el primer y tercer punto de control (post extracción y post retrotranscripción), así como la no amplificación del segundo punto (post DNAsa).

Expresión de genes de las toxinas Shiga

Los 5 aislamientos fueron cultivados a 37°C, agregando 1 mL de suspensión ajustada a 0,5 McFarland de cada uno, en matraces estériles conteniendo 9 mL de cada uno de los tres medios (AR, TSB y AP). Además, se incorporaron réplicas de los cultivos a los cuales se agregó Ciprofloxacina a una concentración equivalente a la mitad de su CIM (CIM/2 en AR, CIM/2 en TSB, CIM/2 en AP). Transcurridas las 24 horas de incubación basadas en experimentos previos del laboratorio donde se evaluó expresión, se extrajeron alícuotas de 3mL de cada cultivo para proceder con las etapas de extracción, digestión enzimática, retrotranscripción y qPCR. Primero, se realizó la extracción de ARN total con el kit utilizado en la puesta a punto, y el



mismo fue cuantificado en Nanodrop. Posteriormente, se procedió con el tratamiento con *DNAse*, utilizando 1 μ L de dicha enzima cada 100 ng/ μ L de ácidos nucleicos, buscando eliminar cualquier contaminante de ADN en la muestra. Por último, se realizó la retrotranscripción del ARN, transformando ese ARNm celular en ADNc. El ADNc total extraído fue cuantificado en Nanodrop.

Previo a la cuantificación del ADNc de aquellas muestras que entraron en la curva se realizó un BLAST para definir cuántas copias del gen *stx1* y del gen *stx2* presentaba cada aislamiento (Altschul et al., 1990). Se compararon los genomas de los cinco aislamientos cuantificables (genomas disponibles en nuestro laboratorio, Figueroa et al., datos no publicados), con secuencias de referencia para todas las variantes conocidas de *stx1* y *stx2* (Scheutz et al., 2024). Utilizando el lenguaje de programación Python, se filtró cada coincidencia de cualquier variante de *stx1* y/o *stx2* en un rango de 1000 pares de bases, para contabilizarlas como una única copia del gen, independientemente de la variante o de posibles mutaciones/cortes en la secuencia.

Para el ensayo de qPCR se utilizaron *primers* específicos para las toxinas Shiga 1 y 2 (Gonzalez Revello, 2020), siguiendo protocolos previamente establecidos en el laboratorio (Figueroa et al., 2025). Para cada corrida de qPCR se generaron curvas de calibración para cuantificar los genes de interés, utilizando ADN genómico de la cepa de referencia ATCC STEC O26:H11 (*stx1*⁺/*stx2*⁺), utilizando triplicados de 8 diluciones que abarcaron concentraciones desde $2,5 \times 10^6$ hasta $3,2 \times 10^1$ UFC/mL. Se utilizaron triplicados de la cepa de referencia ATCC STEC O26:H11 (*stx1*⁺/*stx2*⁺) como controles positivos y triplicados del mix de qPCR sin ADN agregado como controles negativos. Finalmente, se amplificó cada punto de la curva de calibración por triplicado en las qPCR de *stx1* y *stx2*, y se registró su C_q (número de ciclos necesarios para detectar una señal de material genético en una qPCR), con el fin de cuantificar la expresión del ARNm (copias de ADNc/mL) presente en las muestras, que fueron amplificadas en la misma qPCR, empleando un volumen constante de 2 μ L de ADNc.



Resultados

Viabilidad y supervivencia bacteriana ante variaciones nutricionales

En primer lugar, y luego de contar las UFC/mL, se determinó que los cinco aislamientos resultaron viables y cultivables en los tres medios de interés, independientemente de su origen (Fig. 4, 5 y 6).

A continuación, se analizó cada medio individualmente y se graficó según la media y desvío estándar obtenidos. En el agua suplementada con peptona y extracto de levadura (AP), el crecimiento del aislamiento 4H (SUH humano) fue significativamente mayor al de BZ0742 (alimento), mientras que el resto de los aislamientos (dos ambientales y el clínico de origen animal) no presentaron diferencias significativas con ninguno de estos dos ni entre ellos (Fig. 4). En el medio TSB, no se encontraron diferencias significativas en el crecimiento entre ningún aislamiento (Fig. 5). Por otro lado, en agua esterilizada (AR) hubo un crecimiento significativamente mayor en el aislamiento de origen ambiental CBVS85, respecto de los aislamientos clínicos 4H (SUH humano) y MBG10 (ternero muerto por enfermedad entérica) (Fig. 6). A su vez, los recuentos del otro aislamiento originario del arroyo (CAVS123) no presentaron diferencias significativas con los del de origen alimentario (Fig. 6)

Recuentos a 24 horas en AP

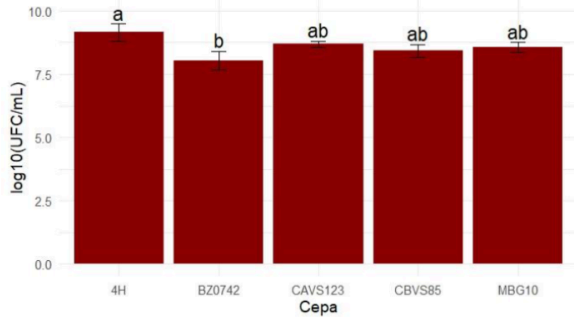


Figura 4. Crecimiento y viabilidad de las cinco cepas cultivadas en agua con peptona y extracto de levadura (AP). Logaritmo en base 10 de las UFC/mL de cada aislamiento a las 24 horas. Test estadístico ANOVA ($p < 0,05$) y prueba post hoc de Tukey HSD ($p < 0,05$). Letras compartidas indican que no hay diferencias significativas.

Recuentos a 24 horas en TSB

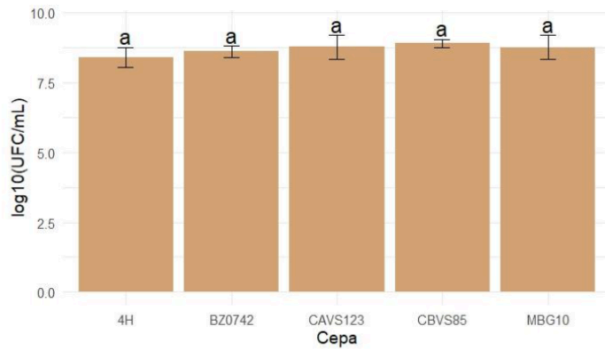


Figura 5. Crecimiento y viabilidad de las cinco cepas cultivadas en *Tryptone Soy Broth* (TSB). Logaritmo en base 10 de las UFC/mL de cada aislamiento a las 24 horas. Test estadístico ANOVA ($p < 0,05$) y prueba post hoc de Tukey HSD ($p < 0,05$). Letras compartidas indican que no hay diferencias significativas.

Recuentos a 24 horas en AR

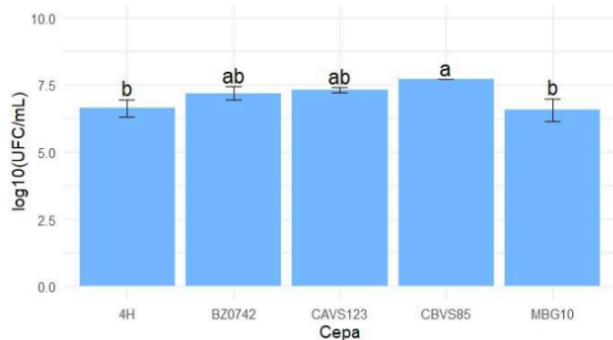


Figura 6. Crecimiento y viabilidad de las cinco cepas cultivadas en agua de arroyo esterilizada. Logaritmo en base 10 de las UFC/mL de cada aislamiento a las 24 horas. Test estadístico ANOVA ($p < 0,05$) y prueba post hoc de Tukey HSD ($p < 0,05$). Letras compartidas indican que no hay diferencias significativas.

Por último, se realizó un análisis estadístico para determinar diferencias significativas entre el crecimiento de cada aislamiento en los tres medios (Fig. 7). Para las 5 cepas de STEC se obtuvo que el recuento en agua esterilizada (AR) fue significativamente menor que en AP y TSB. No se encontraron diferencias significativas entre los valores de UFC/mL en TSB y AP para ninguna cepa.

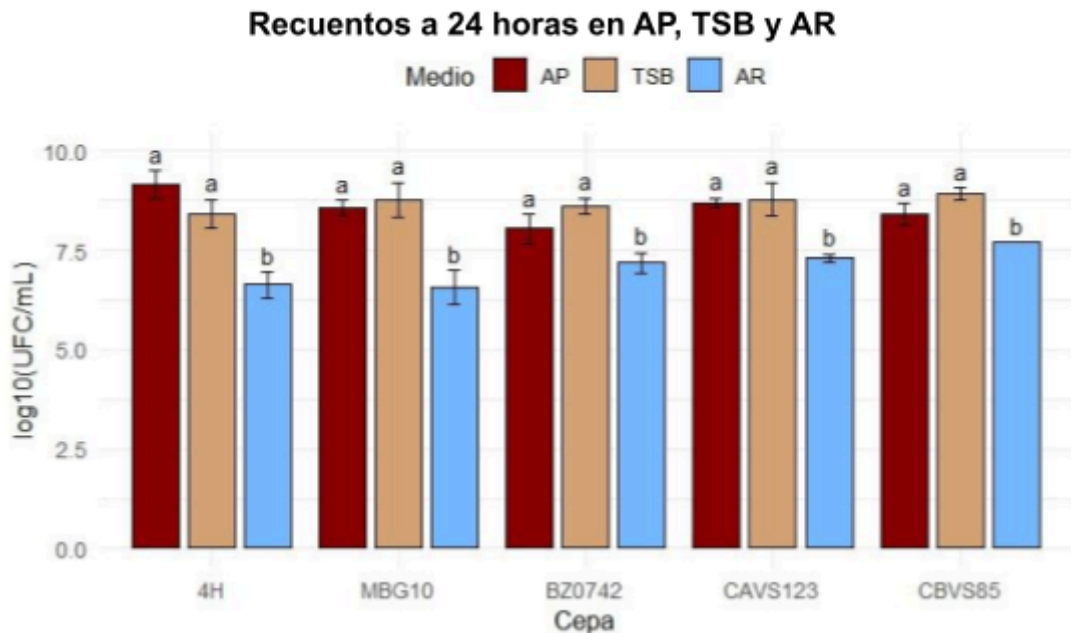


Figura 7. Crecimiento comparativo individualizando cultivos en AP, TSB y AR para cada cepa a las 24 horas.

Logaritmo en base 10 de las UFC/mL de cada aislamiento a las 24 horas.

Test estadístico ANOVA ($p < 0,05$) y prueba post hoc de Tukey HSD ($p < 0,05$).

Letras compartidas indican que no hay diferencias significativas dentro de cada aislamiento.

Concentración inhibitoria mínima de la Ciprofloxacina

Una vez finalizado el tiempo de incubación y visualizando la turbidez en los tubos con distintas diluciones de antibiótico, se determinó la CIM de la Ciprofloxacina para cada uno de los aislamientos y medios de cultivo (Tabla 1). Se buscó conocer cuál dilución, desde la 0 a la -20, corresponde a la CIM para utilizar la siguiente como CIM/2. Es decir, si la última suspensión sin crecimiento bacteriano corresponde a la dilución -12, esa será la CIM, por lo que tomamos la dilución -13 como la CIM/2. A partir de las mismas, se tomaron 3 mL de la CIM/2 de cada muestra, los cuales fueron utilizados para el ensayo de expresión.



Tabla 1. Concentración Inhibitoria Mínima de la Ciprofloxacina para cada aislamiento cultivado a 37°C en agua suplementada con peptona y extracto de levadura (AP), *Tryptone Soy Broth* (TSB) y agua de arroyo esterilizada (AR).

Aislamiento	Medio	Dilución CIM
BZ0742	AP	-2
BZ0742	TSB	-11
BZ0742	AR	-19
4H	AP	0
4H	TSB	-9
4H	AR	-19
MBG10	AP	0
MBG10	TSB	-1
MBG10	AR	-19
CAVS123	AP	0
CAVS123	TSB	-4
CAVS123	AR	-19
CBVS85	AP	-1
CBVS85	TSB	-3
CBVS85	AR	-19

Puesta a punto del ensayo de expresión de genes de virulencia

Una de las estrategias para cuantificar la expresión de un gen de interés es la PCR cuantitativa a partir de ADNc (RT-qPCR). En esta estrategia, se cuantifica indirectamente la cantidad de ARNm de dicho gen en una condición o momento dado, a diferencia de la PCR a tiempo final, que solo permite detectar presencia o ausencia del gen. Debido a que la enzima utilizada en esta reacción no es capaz de copiar en ARN, es necesaria una reacción de retrotranscripción previa del ARNm



obtenido en ADNc, así como la eliminación del ADN contaminante mediante el uso de la DNAsa.

El ensayo de RT-qPCR realizado con las alícuotas tomadas en los tres puntos de control confirmó que la extracción de ARN. El tratamiento con DNAsa y la retrotranscripción se realizaron correctamente y los kits efectivamente estaban en condiciones de uso (Fig. 8). Se observó un pico de amplificación luego de la extracción automatizada (el kit coextrajo ADN/ARN), ausencia de amplificación en la alícuota post digestión enzimática (la enzima degradó efectivamente el ADN) y luego nuevamente un pico de amplificación en la qPCR (corroborando la retrotranscripción del ARN) (Fig. 8).

En paralelo, se confirmó la inducción de la expresión mediada por la Ciprofloxacina, ya que se obtuvo la expresión esperada (amplificación positiva, con observación de un pico a la temperatura esperada, post extracción; negativa post DNAsa y nuevamente positiva post retrotranscripción) del gen *stx2* en los cultivos tratados con CIM/2 y CIM/4 para cada uno de los puntos de control (Fig. 8).

Sumado a esto, se obtuvo la amplificación esperada (igual a la mencionada en el párrafo anterior) del gen que codifica al ADNr 16S en los puntos de control, corroborando que el proceso se realizó correctamente (similar a la mostrada en la Figura 8, datos no mostrados).

Puesta a punto del ensayo de expresión

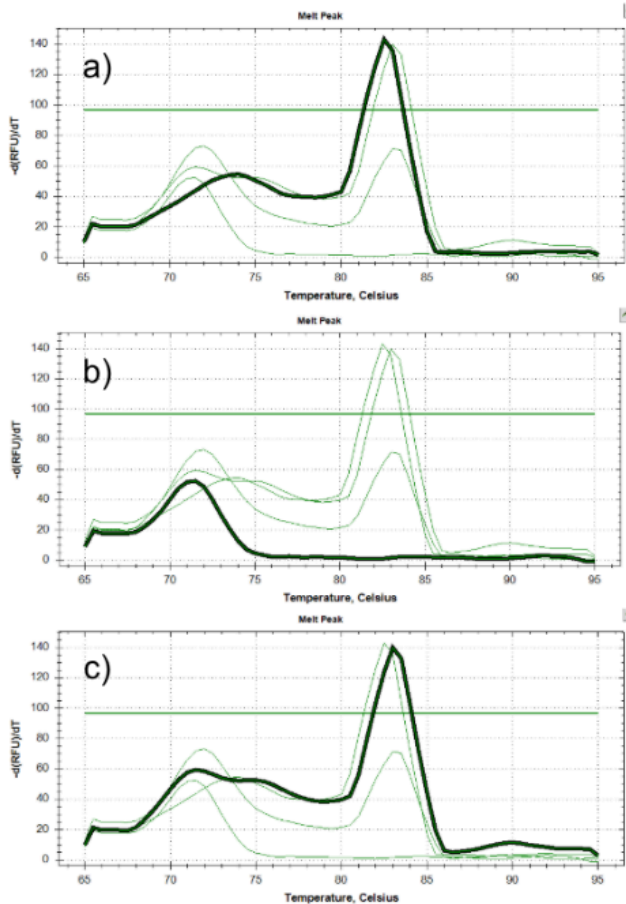


Figura 8. Resultados de puntos de control de la puesta a punto del ensayo de expresión Obtenidos mediante el software de análisis de qPCR: *CFX Maestro Software for Bio-Rad CFX Real-Time PCR Systems*.

- a) Alícuota post extracción ARN; resultado positivo, indica que kit coextrae ADN
- b) Alícuota post tratamiento con DNAsa; resultado negativo, indica digestión correcta del ADN presente
- c) Alícuota post Retrotranscripción, resultado positivo, indica correcto pasaje de ARN a ADNc y confirma inducción por Ciprofloxacina a la mitad de su CIM

Cuantificación de la expresión de genes de virulencia por qPCR

Una vez que se estableció el protocolo se procedió a evaluar la expresión de las toxinas Shiga a las 24 horas de incubación en los distintos aislamientos y condiciones de interés (en total 30: 5 aislamientos / 3 medios / 2 condiciones: con y sin antibiótico). Se obtuvieron 9 positivos mediante la observación de sus curvas de *melting* (Fig. 9), 4 correspondientes a *stx1* y 5 a *stx2* (Tabla 2).

Para el caso del gen *stx1*, se observó una expresión asociada sólo a aislamientos clínicos. Por un lado, el aislamiento clínico humano 4H en AP y TSB antibiótico y por otro lado, en los dos cultivos del aislamiento clínico animal MBG10 en AP, con y sin antibiótico (AP/Atb+) y (AP/Atb-) (Fig. 9).

Por otro lado, para el gen *stx2*, los cultivos en los que se observó una expresión fueron los siguientes: dos cultivos de STEC de origen alimenticio: BZ0742, (AP/Atb+) y BZ0742 (TSB/Atb+), las STEC ambientales CAVS123 (AP/Atb+) y CBVS85 (AP/Atb-) y por último, el aislamiento clínico 4H (TSB/Atb+) (Fig. 9).

Para ninguno de los genes se observó expresión en aislamientos cultivados en agua de arroyo esterilizada (AR).

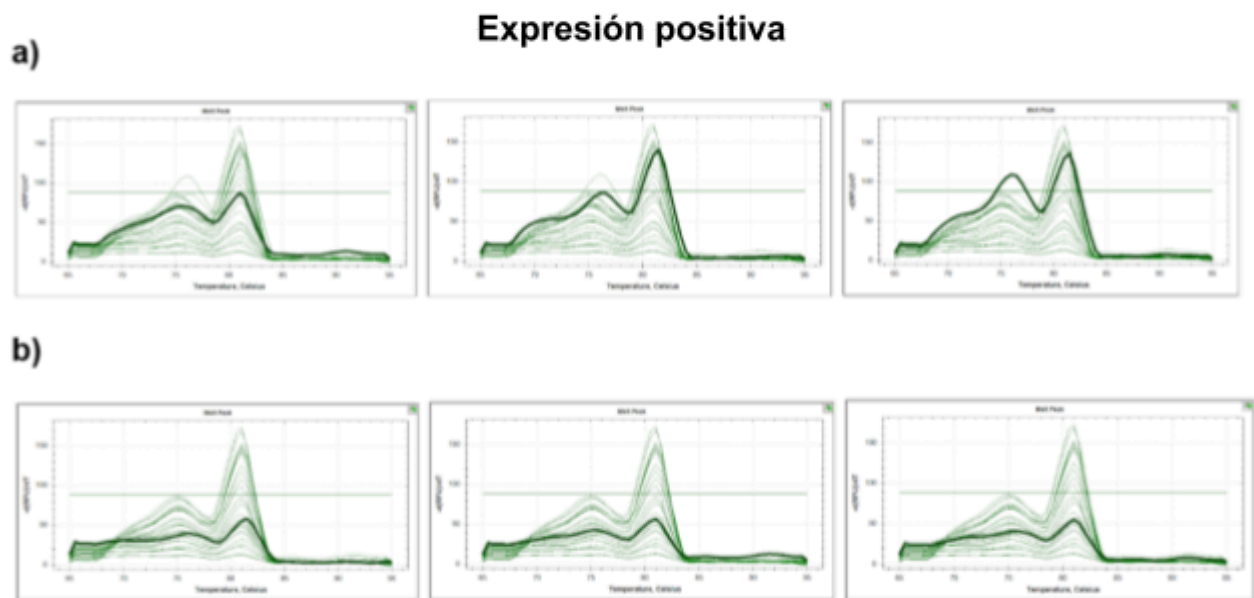


Figura 9.

a) Curva de *melting* de triplicados MBG10 / AP / Atb+. **b)** Curva de *melting* de triplicados MBG10 / AP / Atb-. En todos los casos el eje Y representa y el eje X representa la temperatura en grados Celsius Obtenidas mediante software de análisis de qPCR: *CFX Maestro Software for Bio-Rad CFX Real-Time PCR Systems*



Tabla 2. Cultivos con una expresión positiva de los genes *stx1* o *stx2* y sus Cq promedio asociados.

Se indican medios: agua suplementada con peptona y extracto de levadura (AP) y *Tryptone Soy Broth* (TSB). CIM/2 de CIP: indica la presencia o ausencia de Ciprofloxacina a la mitad de su Concentración Inhibitoria Mínima en el medio, como inductor de la expresión.

Aislamiento	Medio	CIM/2 de CIP	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	Cq promedio
4H	TSB	-	X		35,37
4H	AP	-	X		36,27
MBG10	AP	-	X		33,75
MBG10	AP	+	X		28,89
CBVS85	AP	-		X	38,97
BZ0742	TSB	+		X	37,83
4H	TSB	+		X	37,405
BZ0742	AP	+		X	34,39
CAVS123	AP	+		X	36,29

A partir de los valores de Cq y utilizando el software de análisis de qPCR: *CFX Maestro Software for Bio-Rad CFX Real-Time PCR Systems* se obtuvo la curva de calibración para cada gen (Fig. 10). Las mismas fueron realizadas utilizando ADN genómico de la cepa de referencia ATCC STEC O26:H11 (*stx1*⁺/*stx2*⁺).

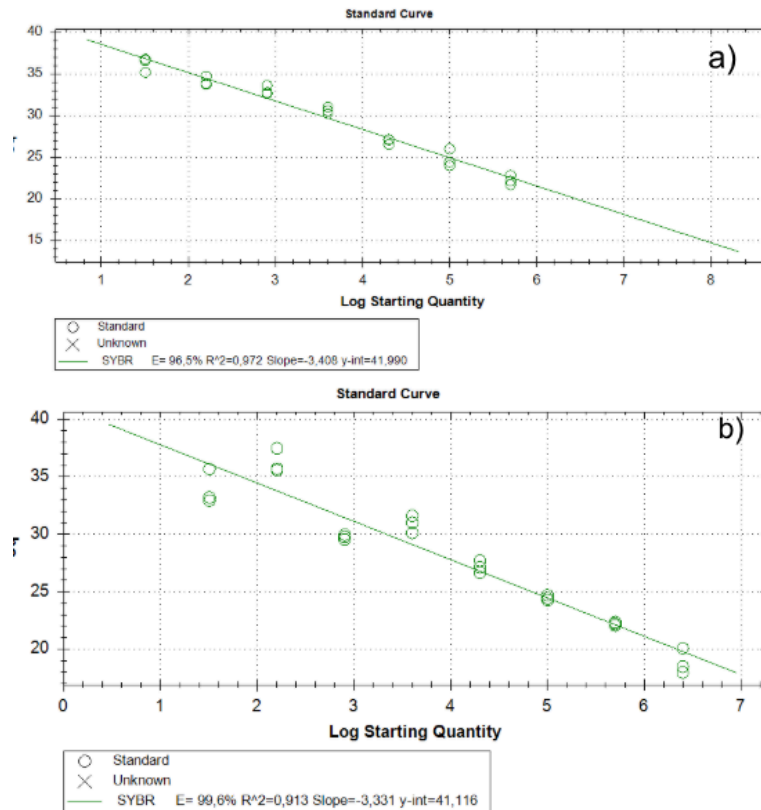


Figura 10. Curvas de calibración para *stx1* (a) y *stx2* (b).
Generadas a partir de ADN genómico de STEC.

Las curvas de calibración obtenidas tanto para el gen *stx1* como para el gen *stx2* presentaron una eficiencia de amplificación superior al 90% (Fig. 10), confirmando que el ensayo de qPCR se realizó correctamente y que la cuantificación absoluta mediante la interpolación de los Cq de las muestras a sus respectivas curvas otorgaría resultados certeros.

A continuación, se ubicó el Cq promedio de las tres réplicas de cada muestra positiva en su curva de calibración correspondiente, con el fin de ilustrar la distribución de la expresión de las diferentes muestras (Fig. 11). Partiendo de los valores obtenidos de Cq, se pudo encontrar una tendencia a aumentar la expresión en el caso de *stx1*. Para el aislamiento clínico de origen animal MBG10, cultivado en agua suplementada con peptona y extracto de levadura (AP), se obtuvo una amplificación poco menos de 5 ciclos antes en el tratamiento con Ciprofloxacina,

comparado con el cultivo sin antibiótico (Tabla 2). En el caso de 4H (AP/Atb+) y 4H (TSB/Atb+), la expresión de *stx1* fue muy baja, aunque ingresó dentro del rango de la curva. Por otro lado, en el rango de la curva de *stx2* ingresó un único cultivo: BZ0742 (AP/Atb+) (Fig. 11).

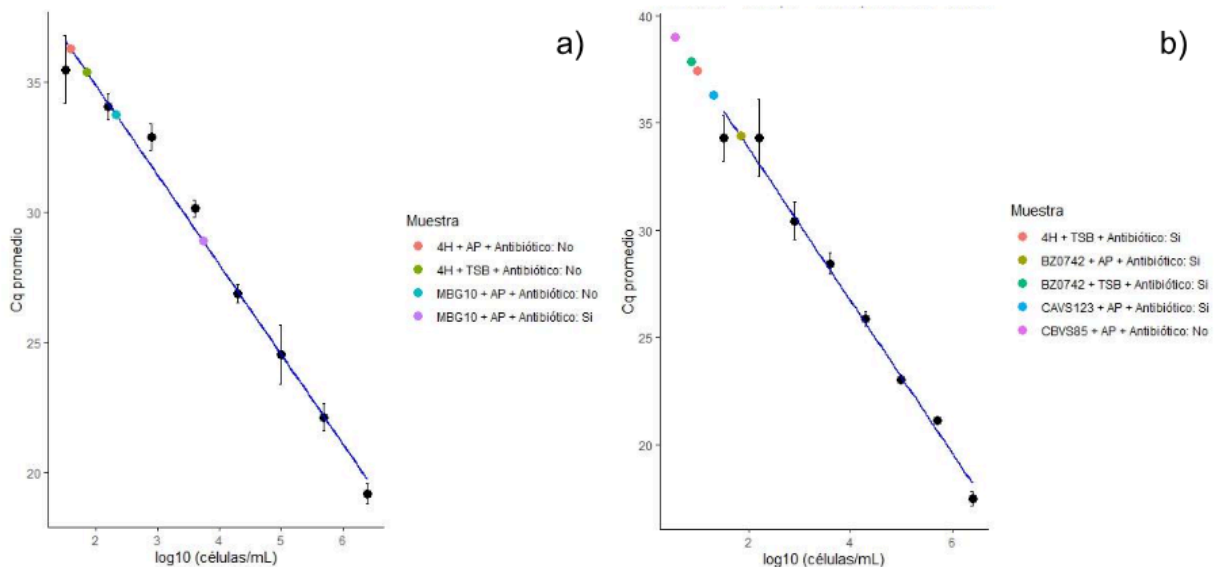


Figura 11. Cq promedio de resultados positivos en la expresión de *stx1* (a) y *stx2* (b) en sus respectivas curvas estándar

Los resultados obtenidos en el BLAST realizado con el fin de definir cuántas copias del gen *stx1* y del gen *stx2* presentaba cada aislamiento fueron los siguientes: dos copias para 4H (una de *stx1* y otra *stx2*), una copia de *stx1* para MBG10 y finalmente, una copia de *stx2* para BZ0742, CAVS123 y CBVS85.

Una vez confirmado que cada genoma presentaba una única copia para cada gen, lo que equivale a una única copia por célula, fue posible cuantificar la expresión de las toxinas. Se interpoló el Cq de cada muestra que ingresó al rango cuantificable usando la ecuación de la curva, y se expresó dicho valor en copias del gen por mL (Tabla 3).

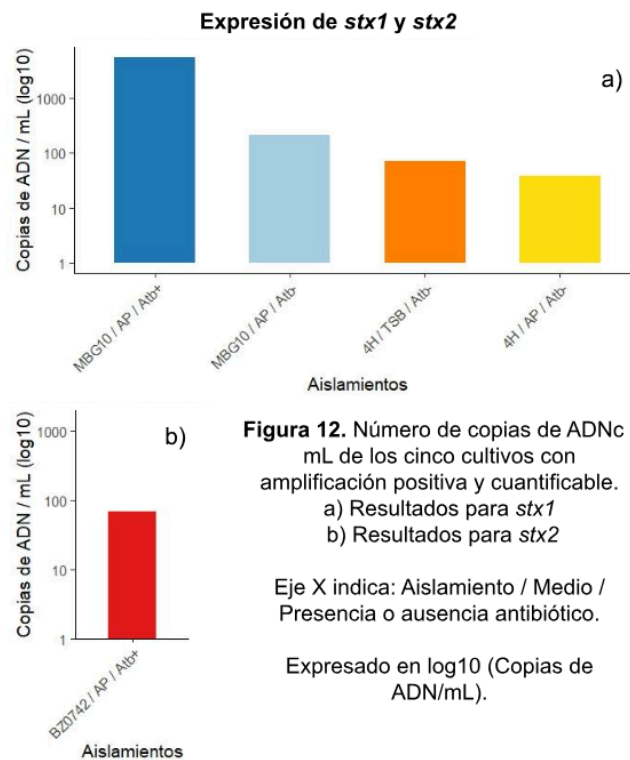


Tabla 3. Cuantificación de la expresión de *stx1* y *stx2* de las muestras que ingresaron en el rango de la curva de calibración. Muestras expresadas como aislamientos en agua suplementada con peptona y extracto de levadura (AP) y en *Tryptone Soy Agar* (TSA), en presencia (Atb+) o ausencia (Atb-) del antibiótico CIP. Valores expresados en copias de ADN / mL.

Gen	Muestra	Cq promedio	Copias ADNc / mL
<i>stx1</i>	MBG10 (AP/Atb+)	28,89	5463,6
<i>stx1</i>	MBG10 (AP/Atb-)	33,75	210,7
<i>stx1</i>	4H (TSB/Atb-)	35,36	71,5
<i>stx1</i>	4H (AP/Atb-)	36,27	38,9
<i>stx2</i>	BZ0742 (AP/Atb+)	34,39	67,83

Para el caso del gen *stx1* sólo hubo expresión cuantificable en los aislamientos clínicos, presentando el aislamiento de origen animal (MBG10) un mayor número de copias del gen que el aislamiento humano (4H) (Tabla 3). Ninguno de los aislamientos ambientales ni el alimentario fue cuantificable. En lo que refiere a la inducción por la adición de Ciprofloxacina, los resultados mostraron una expresión 25 veces mayor del gen *stx1* en la muestra MBG10 (AP/Atb+) que en su contraparte sin antibiótico, MBG10 (AP/Atb-) (Tabla 3; Fig. 12), lo que indicó que la expresión de la toxina Shiga en esta cepa se indujo mediante el uso de la CIP a la mitad de su CIM. Por otra parte, en los cultivos de la STEC clínica humana (4H) sin antibiótico, se observaron diferencias en cuanto al medio de cultivo, presentando la muestra incubada en el medio intermedio (TSB) menos que el doble de copias de ADNc/mL que la incubada en el medio más rico (AP). En ambos casos, la expresión fue baja (Tabla 3; Fig. 12).

Por otro lado, en el caso del gen *stx2*, el único aislamiento con una expresión cuantificable fue el de origen alimentario (BZ0742), aunque con una expresión considerablemente baja (Tabla 3; Fig. 12).



Finalmente, y a modo de explotar los resultados utilizamos los valores de Cq correspondientes a todos los cultivos que expresaron algunas de las toxinas, incluso los que no ingresaron en la curva de calibración, para intentar identificar tendencias dentro de las muestras analizadas. Con el fin de visualizar la distribución y de comparar los valores se representaron los Cq de los nueve cultivos donde se observó expresión (*stx1* y *stx2*) mediante boxplots (Fig. 13; Fig. 14).

Para el caso del gen *stx1*, las muestras humanas 4H (AP/Atb-) y 4H (TSB/Atb-) presentaron un Cq con medias similares entre ellas y similar a la muestra clínica animal MBG10 (AP/Atb-), por lo que los tres cultivos sin antibiótico presentaron medias similares (Fig. 13). Por otro lado, al comparar los dos cultivos de MBG10 en AP, a pesar de no detectarse diferencias significativas, se pudo observar una tendencia a aumentar la expresión de *stx1* (p valor = 0,08), cuando se adicionó el antibiótico (Cq casi 5 veces inferior en MBG10 con antibiótico respecto de sin antibiótico) (Fig. 13).

Por otro lado, en el caso del gen *stx2*, el cultivo de la cepa alimentaria BZ0742 (AP/Atb+), presentó un boxplot con la media más baja (caja amarilla) respecto de los otros cultivos que amplificaron pero que quedaron fuera de la curva de calibración (Fig. 14). En este caso particular, se comparó la expresión del gen *stx2* entre los medios de cultivo (AP y TSB) en presencia del antibiótico CIP. Pudimos observar que la cepa alimentaria tiene una expresión significativamente mayor (p-valor = 0,2) en el medio más rico (AP) que en el intermedio (TSB) (caja verde, amplificación de casi 3 ciclos más alta que su contraparte amarilla) (Fig. 14). Además, la tendencia de expresión de los cultivos clínico 4H (TSB/Atb+) y ambiental CAVS123 (AP/Atb+) fue intermedia, mientras que el cultivo con la tendencia más baja fue el ambiental, CBVS85 (AP/Atb-), alcanzando un Cq de aproximadamente 39 ciclos (Fig. 14).

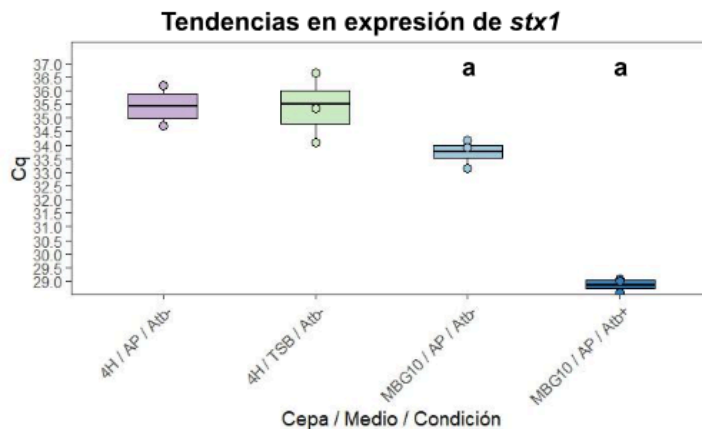


Figura 13. Tendencias en la expresión de aislamientos positivos para *stx1* en el ensayo de RT-qPCR.

Resultados expresados como valores de ciclo umbral (Cq). Cada boxplot corresponde a la distribución de los valores obtenidos en cada condición experimental. Test Mann–Whitney U para evaluar diferencias significativas ($p < 0,05$) entre MBG10 / AP con y sin antibiótico. Letras de significancia iguales indican que no hay diferencias significativas.

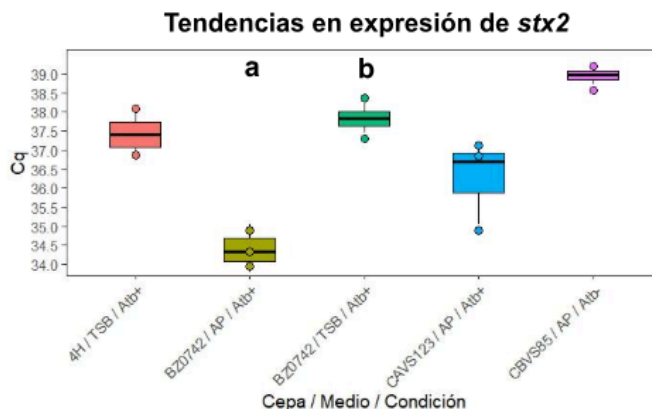


Figura 14. Tendencias en la expresión de aislamientos positivos para *stx2* en el ensayo de RT-qPCR.

Resultados expresados como valores de ciclo umbral (Cq). Cada boxplot corresponde a la distribución de los valores obtenidos en cada condición experimental. Test Mann–Whitney U para evaluar diferencias significativas ($p < 0,05$) entre BZ0742 / Atb+ en AP y TSB.

Letras de significancia diferentes indican que hay diferencias significativas.



Discusión

STEC representa un grupo de patógenos transmitidos por alimentos con fuerte impacto en la salud pública a nivel mundial, tanto por la frecuencia con la que causan infecciones, como por el desenlace, en muchos casos fatal, en el que pueden resultar (Alhadlaq et al., 2024; Majowicz et al., 2014). La ausencia de un tratamiento antibiótico específico hace que la resolución de dichas infecciones dependa, en gran parte, de la capacidad intrínseca de las bacterias de producir y liberar las toxinas (Joseph et al., 2020; Melton-Celsa, 2014), lo cual resalta la importancia de establecer una base sólida sobre cómo varía dicha expresión.

La expresión de los factores de virulencia de STEC es un proceso altamente vinculado a la estructura genética de las mismas y al contexto ambiental en el cual estas bacterias se desarrollan, con el potencial de afectar la vida cotidiana de las personas que entran en contacto con ellas (Montero et al., 2019; Bergholz et al., 2007). En este trabajo, se abordó este aspecto desde una perspectiva integral, conjugando cepas de diversidad de orígenes, con diferentes genes codificantes de toxinas Shiga, y evaluándolas frente a cambios en la disponibilidad de nutrientes y ante la inducción por antibióticos.

En primer lugar, se pudo comprobar la viabilidad y supervivencia bacteriana en los tres medios evaluados, factor que resalta la flexibilidad de adaptación de estos microorganismos a gradientes nutricionales así como la capacidad de persistir y reproducirse en una diversidad de ambientes. En segundo lugar, al analizar el ensayo de viabilidad aislamiento por aislamiento, vimos que todos se desarrollaron mejor en los medios más ricos, mientras que los recuentos brindaron un resultado inferior en el agua de arroyo esterilizada (AR), lo cual indicaría que ninguno de los cinco aislamientos se destaca en bajas frente a altas concentraciones nutricionales, aunque esto no implica que se vean favorecidos por altas concentraciones. Por otro lado, entre el medio más nutritivo (AP) y el intermedio (TSB), no hubo diferencias. Esto puede explicarse debido a una saturación del medio, en el cual, a altas concentraciones de nutrientes, la tasa de crecimiento se estanca, actuando como una función hiperbólica (Allen & Waclaw, 2019; Monod, 1949). También, esto podría



deberse a cambios en las vías metabólicas de las bacterias, inducidos por un exceso de azúcares, sales, etc., que resultan en un crecimiento menor al esperado o en la síntesis de inhibidores del mismo (Vemuri et al., 2006; Kazan et al. 1995)

Sin embargo, al analizar los recuentos por medio y no por cepa, se pudieron observar algunas diferencias significativas. El aislamiento de origen humano (4H) se desarrolló mejor que el aislamiento de carne (BZ0742) en el medio con superávit de nutrientes, algo que se ha observado en bacterias sometidas a condiciones similares, donde se registra la pérdida y/o adquisición de características de supervivencia metabólicas y fenotípicas (Adade et al., 2025; Wu et al., 2022). Esto podría reflejar una adaptación de 4H al interior del cuerpo humano, un ambiente altamente nutritivo, mientras que BZ0742, como aislamiento de origen alimenticio, pudo haber estado expuesto a procesamiento industrial, cadena de frío y otras condiciones de la industria cárnica, resultando en una adaptación evolutiva a ambientes estresantes.

Por otro lado, en el medio con déficit de nutrientes se destacó uno de los aislamientos de agua (CBVS85) por encima del humano (4H) y el animal (MBG10). Podríamos atribuir este último resultado a alguna posible adaptación de CBVS85 al estrés nutricional, que, al ser originaria de un curso de agua, carece del excedente de nutrientes que presentan 4H y MBG10 en su ambiente.

Por último, el hecho de no encontrar diferencias significativas en tres STEC en el medio rico AP (CAVS123, CBVS85 y MBG10), en ninguno en TSB y dos en AR (BZ0742 y CAVS123), es una muestra de la enorme variabilidad y adaptabilidad que pueden presentar las STEC, las cuales podrían ser fuertemente influenciadas por el ambiente del cual son extraídas, afectando su supervivencia y tasa de crecimiento (Jang et al., 2017).

Para el ensayo de expresión de los genes de virulencia, se determinó la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de la Ciprofloxacina para cada uno de los 30 aislamientos y se logró la puesta a punto del ensayo unificando los tres kits utilizados para la extracción de ARN, digestión con DNAsa y retrotranscripción en un único protocolo estandarizado conformado por cuatro pasos secuenciales



independientes (extracción, DNAsa, retrotranscripción y qPCR), sentando un precedente para futuras investigaciones.

Los resultados obtenidos en el ensayo de expresión de genes de virulencia indican que, en primer lugar, todos los aislamientos presentaron al menos condición con expresión en las qPCR con *primers* específicos para los genes *stx1* y/o *stx2*, por lo tanto, podemos afirmar que, a pesar de la baja expresión, cada uno de estos aislamientos presenta la producción de toxinas Shiga *in vitro*. De 30 condiciones, solo se obtuvo expresión en 9 de ellas, resultado que pone un énfasis en la fuerte dependencia del origen del aislamiento, así como de su contexto ambiental para la expresión de las toxinas Shiga. Asimismo, consideramos que las condiciones del experimento podrían haber tenido una influencia en estos resultados. En otros estudios similares donde se evaluó la expresión de los genes de las toxinas Shiga *stx1* y *stx2* diferencialmente, se observaron diferencias dependiendo de la fase de crecimiento bacteriana. La mayor expresión del gen *stx1* se observó al final de la fase exponencial (4 horas), y a principio de la fase de latencia para el gen *stx2* (0-1 horas) (Peroutka-Bigus et al., 2024). Debido a esto, consideramos que la baja cantidad de condiciones en las que se observó expresión (30% de las condiciones) podría estar asociado al tiempo de cultivo de 24 horas analizado en este trabajo.

Para el caso del gen *stx1*, se observó su expresión exclusivamente en aislamientos clínicos, tanto de origen animal (MBG10) como humano (4H), mientras que en ninguno de los aislamientos ambientales ni de alimento se obtuvo expresión. Este resultado podría estar vinculado a alguna diferencia en la regulación de la expresión de *stx1* al presentarse en hospedadores, la cual no se haría presente o no sería necesaria al encontrarse fuera de organismos. Un estudio del año 2012 aborda esta temática tomando al hierro como un regulador negativo de la expresión de *stx1*. El hierro se encuentra en mayor disponibilidad en el ambiente, debido a que en el cuerpo se encuentra secuestrado, unido a proteínas como la hemoglobina. Por ello, la ausencia de este elemento dispararía la expresión del gen *stx1*, pero sin afectar la expresión de *stx2* (Pacheco & Sperandio, 2012).



El aumento de más de 25 veces en la expresión de *stx1* en el aislamiento animal MBG10 (AP/Atb+) en comparación con su contraparte sin antibiótico, al igual que la tendencia observada en sus Cq, confirman el efecto inductor de antibióticos como la CIP a concentraciones subinhibitorias en la expresión de las toxinas Shiga en las condiciones experimentales de este trabajo, reforzando el peligro que conlleva el tratamiento antibiótico de infecciones o enfermedades causadas por STEC (Ramstad et al., 2021).

Ambos aislamientos clínicos presentaron comportamientos similares. Sin embargo, el de origen humano (4H) presentó una mayor expresión en el tratamiento sin antibiótico que con el agregado de CIP, algo opuesto a lo planteado por Ramstad *et al.* (2021) y corroborado en esta tesina, por lo que sería un buen tratamiento comparativo a repetir en futuros estudios.

La expresión del gen *stx2* fue mayormente baja. El aislamiento alimentario BZ0742 (AP/Atb+) fue el único cuantificable y amplificó casi 3 ciclos antes que su contraparte en TSB/Atb+. Si consideramos que la producción de Stx es una respuesta a condiciones adversas para la célula y que, en el ensayo de viabilidad BZ0742 mostró el crecimiento más bajo en AP, puede inferirse que este aislamiento se encuentra desfavorecido en ambientes ricos en nutrientes. Tal y como se vio en estudios previos, esto podría deberse a adaptaciones adquiridas por este aislamiento durante su procesamiento dentro de la industria cárnica (Adade et al., 2025; Wu et al., 2022). Sumado a esto, no se encontraron grandes diferencias entre la tendencia de la expresión de CAVS123 (AP/Atb+), BZ0742 (TSB/Atb+) y 4H (TSB/Atb+). Sin embargo, el aislamiento CBVS85 (AP/Atb-) amplificó algunos ciclos más tarde que el resto de los aislamientos. Esto puede haberse debido dos factores: en primer lugar, el hecho de que el cultivo que más tardó en amplificar sea el único sin antibiótico agregado refuerza la idea de la Ciprofloxacina como un inductor de la expresión. En segundo lugar, la expresión diferencial de los dos aislamientos ambientales, más allá de la posible inducción por antibiótico, es una muestra de la variabilidad que pueden presentar las STEC.



Cabe destacar que todos los resultados positivos en el qPCR se observaron con las STEC cultivadas en los medios AP o TSB, mientras que ninguno se detectó en AR, el medio nutricionalmente más desafiante. Esto resulta llamativo, considerando que la producción de toxinas Shiga suele inducirse por señales de estrés ambiental.

En primer lugar, el medio AR se considera suficientemente estresante, ya que el agua de arroyo filtrada y esterilizada, carece completamente de factores nutricionales y de crecimiento. Sin embargo, la temperatura de cultivo utilizada (37 °C), generalmente favorable para el crecimiento bacteriano, podría no reflejar adecuadamente las condiciones ambientales donde se manifestaría dicho estrés nutricional. Por otro lado, las mediciones de ADN mediante Nanodrop, realizadas tras la retrotranscripción, mostraron concentraciones de entre 2 y 10 ng/μL, considerablemente menores que las empleadas en estudios similares, que oscilan entre 80 y 100 ng/μL (Ramstad et al., 2021), lo cual podría explicar la baja expresión para esta variante de la toxina Shiga.

Referido a este último ensayo, el mismo presentó algunas limitaciones. Tanto el servicio de extracción de ARN, como el uso de los kits utilizados para la digestión con DNAsa y la retrotranscripción implican un alto costo económico, un largo procesamiento y un mantenimiento adecuado, cualidades que acotaron el número de condiciones experimentales, réplicas y repeticiones del ensayo posibles en esta tesina de grado.

A pesar de limitar el alcance de este proyecto, encuentro este último punto como una enorme oportunidad para abordar futuros estudios vinculados a la expresión de los genes de virulencia de STEC, habiendo sentado una base sólida, mediante la puesta a punto de la extracción de ARN, digestión con DNAsa y tratamiento con retrotranscriptasa, generando un protocolo que contempla y vincula estos tres ensayos secuenciales independientes y su posterior análisis por qPCR, para usos futuros en estudios similares.



PERSPECTIVAS

Entre las perspectivas más fuerte de este trabajo se destaca ampliar la cantidad de aislamientos de cada origen, para aumentar la complejidad y valor estadístico del ensayo, así como presentar una mayor cantidad de réplicas biológicas, lo cual implicaría una inversión mayor en extracciones y tratamientos para un mismo cultivo. Sumado a esto, un planteo inicial para esta tesina que fue desestimado por lo previamente explicitado, era utilizar diferentes temperaturas de cultivo, pasando por los 20°C y descendiendo hasta temperaturas reales de los cursos de agua donde podrían persistir las STEC.

Asociado al punto anterior, una de las ideas planteadas que, personalmente, considero la más desafiante y que promete resultados interesantes implica estudiar la expresión de las toxinas Shiga a diferentes y menores tiempos de incubación (fase de latencia (0 horas), exponencial media (2 horas) y exponencial tardía (4 horas)). Basándonos en trabajos previos (Peroutka-Bigus et al., 2024), donde se observa una expresión diferencial de las variantes *stx1* y *stx2* en dichas fases, se esperaría encontrar una asociación de *stx1* a la fase exponencial tardía y de *stx2* a la latencia, lo cual podría ayudarnos a dilucidar qué rol cumple cada una en las distintas etapas del crecimiento bacteriano. Previo a esto sería importante determinar las curvas de crecimiento de los aislamientos, con el fin de conocer los tiempos de cada fase de crecimiento para cada aislamiento.

Por último, como perspectivas más generales se plantean el uso de medios intermedios con más o menos nutrientes de los utilizados, la utilización de otros antibióticos inductores de la producción como Meropenem o Rifampicina y el uso de otras moléculas inductoras más generales como la Mitomicina C, usada en una gran diversidad de estudios, buscando obtener resultados más robustos que contribuyan al conocimiento de STEC y su relación con el ambiente.



Agradecimientos

A Ana Umpiérrez y Yamila Figueroa, por darme la oportunidad de formar parte de este grupo de trabajo y realizar este proyecto, por la enorme ayuda y apoyo que me dieron y por todo lo que aprendí durante este proceso.

A todo el Departamento de Microbiología del IIBCE, por abrirme las puertas, por darme una mano cuando lo necesité, por las charlas y los almuerzos compartidos.

A Loreley Castelli y Karina Antúnez por su colaboración en la puesta a punto de los protocolos de digestión enzimática y retrotranscripción, y a Gabriela Martínez de la Escalera por su ayuda en la interpretación de los resultados.

A los investigadores de la Unidad de Bacteriología y Virología del Instituto de Higiene por ceder las cepas 4H y BZ0742.

A mis amigos y compañeros de Facultad, por formar parte y ser la mejor compañía que podría pedir durante toda esta etapa. Así como a los docentes y ayudantes con los que compartí proyectos.

A mis amigos de la vida, que desde un lado u otro, fueron y van a seguir siendo fundamentales en todo lo que siga haciendo.

A Fer por el amor y compañía incondicional, por bajarme a tierra y hacer que las cosas parezcan siempre más fáciles.

A mi familia por bancarme siempre, por el optimismo, por ayudarme y darme para adelante en cada paso.

Gracias.



Bibliografía

Adade, N. E., Ahator, S. D., García-Romero, I., Algarañás, M., Appiah, V., Valvano, M. A., & Duodu, S. (2025). Stress adaptation under evolution influences survival and metabolic phenotypes of clinical and environmental strains of *E. coli*. *Microbiology Spectrum*, 13(3), e0121124.

Ahmed, W., Gyawali, P., & Toze, S. (2015). Quantitative PCR measurements of *Escherichia coli* including Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) in animal feces and environmental waters. *Environmental Science & Technology*, 49(5), 3084–3090.

Alhadlaq, M. A., Aljurayyad, O. I., Almansour, A., Al-Akeel, S. I., Alzahrani, K. O., Alsalman, S. A., Yahya, R., Al-Hindi, R. R., Hakami, M. A., Alshahrani, S. D., Alhumeed, N. A., Al Moneea, A. M., Al-Seghayer, M. S., AlHarbi, A. L., Al-Reshoodi, F. M., & Alajel, S. (2024). Overview of pathogenic *Escherichia coli*, with a focus on Shiga toxin-producing serotypes, global outbreaks (1982–2024) and food safety criteria. *Gut Pathogens*, 16(1), 57.

Alharbi, M. G., Al-Hindi, R. R., Esmael, A., Alotibi, I. A., Azhari, S. A., Alseghayer, M. S., & Teklemariam, A. D. (2022). The “Big Six”: Hidden Emerging Foodborne Bacterial Pathogens. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 7(11), 356.

Allen, R. J., & Waclaw, B. (2019). Bacterial growth: a statistical physicist’s guide. *Reports on Progress in Physics*, 82(1), 016601.

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403–410.

Bergholz, T. M., Wick, L. M., Qi, W., Riordan, J. T., Ouellette, L. M., & Whittam, T. S. (2007). Global transcriptional response of *Escherichia coli* O157:H7 to growth transitions in glucose minimal medium. *BMC Microbiology*, 7, 97.

Bentancor, A., Blanco Crivelli, X., Piccini, C., & Trueba, G. (2023). New concepts on domestic and wild reservoirs and transmission of *E. coli* and its environment. En A. G. Torres (Ed.), *Trending topics in Escherichia coli research: The Latin American perspective* (2nd ed., pp. 55–78). Springer.



Brusa, V., Costa, M., Padola, N. L., Etcheverría, A., Sampedro, F., Fernandez, P. S., Leotta, G. A., & Signorini, M. L. (2020). Quantitative risk assessment of haemolytic uremic syndrome associated with beef consumption in Argentina. *PloS One*, 15(11), e0242317.

Burgán, J., Krüger, A., & Lucchesi, P. M. A. (2020). Comparable *stx* expression and phage production levels between Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from human and bovine origin. *Zoonoses and Public Health*, 67(1), 44–53.

Colello, R., Vélez, M. V., González, J., Montero, D. A., Bustamante, A. V., Del Canto, F., Etcheverría, A. I., Vidal, R., & Padola, N. L. (2018). First report of the distribution of Locus of Adhesion and Autoaggregation (LAA) pathogenicity island in LEE-negative Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from Argentina. *Microbial Pathogenesis*, 123, 259–263.

Clinical and Laboratory Standards Institute. (2012). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically: Approved Standard*.

Connolly, J. P. R., & Roe, A. J. (2016). Intracellular d-Serine Accumulation Promotes Genetic Diversity via Modulated Induction of RecA in Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 198(24), 3318–3328.

Croxen, M. A., Law, R. J., Scholz, R., Keeney, K. M., Wlodarska, M., & Finlay, B. B. (2013). Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(4), 822–880.

Davies, J., & Davies, D. (2010). Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74(3), 417–433.

Del Cogliano, M. E., Pinto, A., Goldstein, J., Zotta, E., Ochoa, F., Fernández-Brando, R. J., Muniesa, M., Ghiringhelli, P. D., Palermo, M. S., & Bentancor, L. V. (2018). Relevance of Bacteriophage 933W in the Development of Hemolytic Uremic Syndrome (HUS). *Frontiers in Microbiology*, 9, 3104.

Donohue-Rolfe, A., Kondova, I., Oswald, S., Hutto, D., & Tzipori, S. (2000). *Escherichia coli* O157:H7 strains that express Shiga toxin (Stx) 2 alone are more neurotoxic for gnotobiotic



piglets than are isotypes producing only Stx1 or both Stx1 and Stx2. *The Journal of Infectious Diseases*, 181(5), 1825–1829.

Evans, J. D. (2006). Beepath: An ordered quantitative-PCR array for exploring honey bee immunity and disease. *Journal of Invertebrate Pathology* 93, 135–139.

Fernández, M., Casaux, M. L., Fraga, M., Vignoli, R., Bado, I., Zunino, P., & Umpiérrez, A. (2023). Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STEC) Associated with Calf Mortality in Uruguay. *Microorganisms*, 11(7), 1704.

Figuroa, Y., Stoletniy, C., Michelacci, V., Montero, D., Silvera, J., Martínez de la Escalera, G., Bertoglio, F., Croci, C., Lepillanca, F., Coitiño, H., Zunino, P., Vidal, R. M., Morabito, S., Piccini, C., & Umpiérrez, A. (2025). STEC in the natural environment of Uruguay: genomic surveillance and environmental circulation in the framework of One Health. *Microbiology Spectrum*, 14(1), e0315325.

Friedmann, H. C. (2014). *Escherich and Escherichia*. *EcoSal Plus*, 6(1).

González Revello, A. (2020.). Generación de métodos basados en genómica para detectar microorganismos nocivos en sistemas acuáticos. Tesis de maestría. Universidad de la República (Uruguay). Facultad de Ciencias.

Idland, L., Bø-Granquist, E. G., Aspholm, M., & Lindbäck, T. (2022). The Ability of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* to Grow in Raw Cow's Milk Stored at Low Temperatures. *Foods*, 11(21).

Jandhyala, D. M., Vanguri, V., Boll, E. J., Lai, Y., McCormick, B. A., & Leong, J. M. (2013). Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4: an emerging pathogen with enhanced virulence. *Infectious Disease Clinics of North America*, 27(3), 631–649.

Jang, J., Hur, H.-G., Sadowsky, M. J., Byappanahalli, M. N., Yan, T., & Ishii, S. (2017). Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications-a review. *Journal of Applied Microbiology*, 123(3), 570–581.

Johnson, J. R., & Russo, T. A. (2002). Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: “the other bad *E coli*.” *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 139(3), 155–162.



Joseph, A., Cointe, A., Mariani Kurkdjian, P., Rafat, C., & Hertig, A. (2020). Shiga Toxin-Associated Hemolytic Uremic Syndrome: A Narrative Review. *Toxins*, 12(2).

Kathayat, D., Lokesh, D., Ranjit, S., & Rajashekara, G. (2021). Avian Pathogenic (APEC): An Overview of Virulence and Pathogenesis Factors, Zoonotic Potential, and Control Strategies. *Pathogens*, 10(4).

Kazan, D., Çamurdan, A. & Hortaçsu, A. (1995). The effect of glucose concentration on the growth rate and some intracellular components of a recombinant *E. coli* culture. *Process Biochemistry*, 30(3), 269–273.

Keusch, G. T., Jacewicz, M., Mobassaleh, M., & Donohue-Rolfe, A. (1991). Shiga toxin: intestinal cell receptors and pathophysiology of enterotoxic effects. *Reviews of Infectious Diseases*, 13(Suppl 4), S304–S310.

Lee, J. E., Reed, J., Shields, M. S., Spiegel, K. M., Farrell, L. D., & Sheridan, P. P. (2007). Phylogenetic analysis of Shiga toxin 1 and Shiga toxin 2 genes associated with disease outbreaks. *BMC Microbiology*, 7, 109.

Lee, S.-Y., Lee, M.-S., Cherla, R. P., & Tesh, V. L. (2008). Shiga toxin 1 induces apoptosis through the endoplasmic reticulum stress response in human monocytic cells. *Cellular Microbiology*, 10(3), 770–780.

Lincopan, N., Fuentes-Castillo, D., Espinoza-Muñoz, M., Gonzales-Zubiate, F., Gonzales-Escalante, E., Maturrano, L., Vignoli, R., Di Conza, J., & Gutkind, G. (2023). WHO critical priority *Escherichia coli* in Latin America: A One Health challenge for a post-pandemic world. En A. G. Torres (Ed.), *Trending topics in Escherichia coli research: The Latin American perspective* (2nd ed., pp. 1–32). Springer.

Majowicz, S. E., Scallan, E., Jones-Bitton, A., Sargeant, J. M., Stapleton, J., Angulo, F. J., Yeung, D. H., & Kirk, M. D. (2014). Global incidence of human Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections and deaths: a systematic review and knowledge synthesis. *Foodborne Pathogens and Disease*, 11(6), 447–455.

Melton-Celsa, A. R. (2014). Shiga Toxin (Stx) Classification, Structure, and Function. *Microbiology Spectrum*, 2(4), EHEC-0024-2013.



Miliwebsky, E., Jure, M. Á., Farfan, M. J., & Palermo, M. S. (2023). Interactions of pathogenic *Escherichia coli* with gut microbiota. En A. G. Torres (Ed.), *Trending topics in Escherichia coli research: The Latin American perspective* (2nd ed., pp. 277–302). Springer.

Monod, J. (1949). The growth of bacterial cultures. *Annual Review of Microbiology*, 3(1), 371–394.

Montalbano Di Filippo, M., Boni, A., Chiani, P., Marra, M., Carollo, M., Cristofari, L., Minelli, F., Knijn, A., & Morabito, S. (2022). Exploring the nature of interaction between Shiga toxin producing *Escherichia coli* (STEC) and free-living amoeba - sp. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12, 926127.

Montero, D. A., Canto, F. D., Velasco, J., Colello, R., Padola, N. L., Salazar, J. C., Martin, C. S., Oñate, A., Blanco, J., Rasko, D. A., Contreras, C., Puente, J. L., Scheutz, F., Franz, E., & Vidal, R. M. (2019). Cumulative acquisition of pathogenicity islands has shaped virulence potential and contributed to the emergence of LEE-negative Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains. *Emerging Microbes & Infections*, 8(1), 486–502.

Montero, D. A., Velasco, J., Del Canto, F., Puente, J. L., Padola, N. L., Rasko, D. A., Farfán, M., Salazar, J. C., & Vidal, R. (2017). Locus of Adhesion and Autoaggregation (LAA), a pathogenicity island present in emerging Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* strains. *Scientific Reports*, 7(1), 7011.

Mota, M. I., Vázquez, S., Cornejo, C., D'Alessandro, B., Braga, V., Caetano, A., Betancor, L., & Varela, G. (2020). Does Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* Contribute Significantly to the Burden of Antimicrobial Resistance in Uruguay? *Frontiers in Veterinary Science*, 7, 583930.

Nada, H. G., El-Tahan, A. S., El-Didamony, G., & Askora, A. (2023). Detection of multidrug-resistant Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in some food products and cattle faeces in Al-Sharkia, Egypt: one health menace. *BMC Microbiology*, 23(1), 127.

Nakkarach, A., Foo, H. L., Song, A. A.-L., Nitisinprasert, S., & Withayagiat, U. (2020). Promising discovery of beneficial *Escherichia coli* in the human gut. *3 Biotech*, 10(7), 296.

Peroutka-Bigus, N., Nielsen, D. W., Trachsel, J., Mou, K. T., Sharma, V. K., Kudva, I. T., & Loving, C. L. (2024). Phenotypic and genomic comparison of three human outbreak and one cattle-associated Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. *Microbiology Spectrum*,



12(10), e0414023.

Persad, A. K., & LeJeune, J. T. (2014). Animal Reservoirs of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. *Microbiology Spectrum*, 2(4), EHEC-0027-2014.

Probert, W. S., McQuaid, C., & Schrader, K. (2014). Isolation and identification of an *Enterobacter cloacae* strain producing a novel subtype of Shiga toxin type 1. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(7), 2346–2351.

Ramstad, S. N., Taxt, A. M., Naseer, U., Wasteson, Y., Bjørnholt, J. V., & Brandal, L. T. (2021). Effects of antimicrobials on Shiga toxin production in high-virulent Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Microbial Pathogenesis*, 152, 104636.

Reiss, G., Kunz, P., Koin, D., & Keeffe, E. B. (2006). *Escherichia coli* O157:H7 infection in nursing homes: review of literature and report of recent outbreak. *Journal of the American Geriatrics Society*, 54(4), 680–684.

Scheutz, F., Nielsen, C. H., & von Mentzer, A. (2024). Construction of the ETECFinder database for the characterization of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) and revision of the VirulenceFinder web tool at the CGE website. *Journal of Clinical Microbiology*.

Smith, J. L., Fratamico, P. M., & Gunther, N. W., 4th. (2014). Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Advances in Applied Microbiology*, 86, 145–197.

Tenaillon, O., Skurnik, D., Picard, B., & Denamur, E. (2010). The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 8(3), 207–217.

Tseng, M., Fratamico, P. M., Manning, S. D., & Funk, J. A. (2014). Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in swine: the public health perspective. *Animal Health Research Reviews*, 15(1), 63–75.

Varela, G., Chinen, I., Gadea, P., Miliwebsky, E., Mota, M. I., González, S. & Schelotto, F. (2008). Detección y caracterización de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga a partir de casos clínicos y de alimentos en Uruguay. *Revista argentina de microbiología*, 40(2), 93-100.



Vemuri, G. N., Altman, E., Sangurdekar, D. P., Khodursky, A. B., & Eiteman, M. A. (2006). Overflow metabolism in *Escherichia coli* during steady-state growth: transcriptional regulation and effect of the redox ratio. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(5), 3653–3661.

Vidal, J. E., Canizález-Román, A., Gutiérrez-Jiménez, J., & Navarro-García, F. (2007). Molecular pathogenesis, epidemiology and diagnosis of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Salud Publica de Mexico*, 49(5), 376–386.

von Wintersdorff, C. J. H., Penders, J., van Niekerk, J. M., Mills, N. D., Majumder, S., van Alphen, L. B., Savelkoul, P. H. M., & Wolffs, P. F. G. (2016). Dissemination of Antimicrobial Resistance in Microbial Ecosystems through Horizontal Gene Transfer. *Frontiers in Microbiology*, 7, 173.

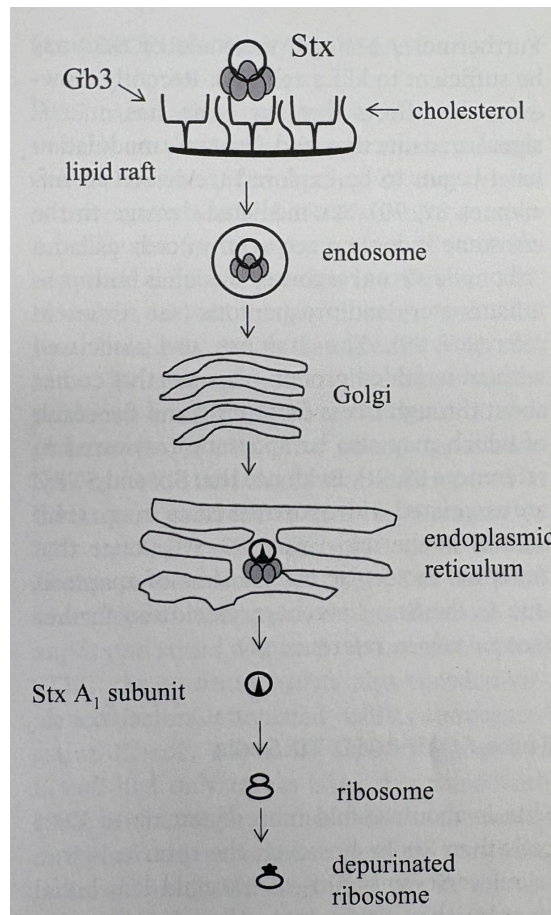
Wu, J., NicAogáin, K., McAuliffe, O., Jordan, K., & O'Byrne, C. (2022). Phylogenetic and phenotypic analyses of a collection of food and clinical *Listeria monocytogenes* isolates reveal loss of function of sigma B from several clonal complexes. *Applied and Environmental Microbiology*, 88(6), e00051-22.

Yang, X., Bai, X., Zhang, J., Sun, H., Fu, S., Fan, R., He, X., Scheutz, F., Matussek, A., & Xiong, Y. (2020). *Escherichia coli* strains producing a novel Shiga toxin 2 subtype circulate in China. *International Journal of Medical Microbiology*, 310(1), 151377.

Anexo

Mecanismo de acción de las toxinas Shiga

Extraído de: Enterohemorrhagic *Escherichia coli* and Other Shiga Toxin-Producing *E. coli*, Sperandio and Hovde. ASM Press. (2015)





Aislamientos a estudiar

Aislamiento	Origen	Serotipo	stx1	stx2	Referencia
MBG10	Animal (Bovino)	O119:H11	Si	No	Fernández <i>et al.</i> 2023
4H	Humano	O26:H11	Si	Si	Mota <i>et al.</i> 2020
BZ0742	Alimento (Carne)	O157:H7	No	Si	Mota <i>et al.</i> 2020
CAVS123	Agua	O91:H7	No	Si	Figueroa <i>et al.</i> 2025
CBVS85	Agua	O116:H49	No	Si	Figueroa <i>et al.</i> 2025



Ensayo de viabilidad y supervivencia bacteriana: Recuentos a las 24 horas

Aislamiento	Medio	Réplica 1 (UFC/mL)	Réplica 2 (UFC/mL)	Réplica 3 (UFC/mL)	Promedio réplicas
4H	AP	$6,3 \times 10^8$	$1,5 \times 10^9$	$3,0 \times 10^9$	$1,7 \times 10^9$
MBG10	AP	$2,6 \times 10^8$	$5,0 \times 10^8$	-	$3,8 \times 10^8$
BZ0742	AP	$6,0 \times 10^7$	$2,0 \times 10^8$	-	$1,3 \times 10^8$
CAVS123	AP	$4,0 \times 10^8$	$6,0 \times 10^8$	-	$5,0 \times 10^8$
CBVS85	AP	$1,7 \times 10^8$	$4,0 \times 10^8$	-	$2,9 \times 10^8$
4H	TSB	$3,4 \times 10^8$	$5,0 \times 10^8$	$1,0 \times 10^8$	$3,1 \times 10^8$
MBG10	TSB	$2,3 \times 10^8$	$3,0 \times 10^8$	$9,0 \times 10^8$	$4,8 \times 10^8$
BZ0742	TSB	$3,0 \times 10^8$	$3,3 \times 10^8$	$7,0 \times 10^8$	$4,4 \times 10^8$
CAVS123	TSB	$2,1 \times 10^8$	$3,9 \times 10^8$	$8,0 \times 10^8$	$4,7 \times 10^8$
CBVS85	TSB	$5,5 \times 10^8$	$1,0 \times 10^9$	$1,0 \times 10^9$	$8,5 \times 10^8$
4H	AR	$2,5 \times 10^6$	$7,3 \times 10^6$	-	$4,9 \times 10^6$
MBG10	AR	$1,8 \times 10^6$	$7,2 \times 10^6$	-	$4,5 \times 10^6$
BZ0742	AR	$1,1 \times 10^7$	$1,1 \times 10^7$	$3,0 \times 10^7$	$1,7 \times 10^7$
CAVS123	AR	$1,6 \times 10^7$	$2,6 \times 10^7$	$2,0 \times 10^7$	$2,1 \times 10^7$
CBVS85	AR	$5,0 \times 10^7$	$5,0 \times 10^7$	-	$5,0 \times 10^7$



Protocolo de qPCR para genes codificantes para *stx1* y *stx2*

	Concentración		Volumen una determinación (uL)
	Reactivos	En mix	
H2O estéril	-	-	9,5
PowerSYBR Green PCR Master Mix	2X	0,776X	7,76
Primer <i>stx</i> (1-2) F	25nM	3nM	0,12
Primer <i>stx</i> (1-2) R	25nM	3nM	0,12
BSA	30mg/mL	15uL/mL	0,5
ADN	50 ng/uL	5 ng/uL	2
Volumen Final	-	-	20



Cuantificación en Nanodrop: ADNc total extraído post retrotranscripción

Condición	ng/uL	Condición	ng/uL
BZ0742 (TSB)	12,4	BZ0742 (TSB+CIP)	25,3
4H (TSB)	19,6	4H (TSB+CIP)	42,5
MBG10 (TSB)	34,0	MBG10 (TSB+CIP)	54,2
CAVS123 (TSB)	57,6	CAVS123 (TSB+CIP)	8,8
CBVS85 (TSB)	25,6	CBVS85 (TSB+CIP)	8,2
BZ0742 (AP)	53,7	BZ0742 (AP+CIP)	119,2
4H (AP)	71,7	4H (AP+CIP)	113,5
MBG10 (AP)	81,8	MBG10 (AP+CIP)	93,5
CAVS123 (AP)	744,4	CAVS123 (AP+CIP)	77,0
CBVS85 (AP)	175,2	CBVS85 (AP+CIP)	77,5
BZ0742 (AR)	12,1	BZ0742 (AR+CIP)	3,1
4H (AR)	3,1	4H (AR+CIP)	3,1
MBG10 (AR)	11,4	MBG10 (AR+CIP)	3,2
CAVS123 (AR)	2,4	CAVS123 (AR+CIP)	24,1
CBVS85 (AR)	2,5	CBVS85 (AR+CIP)	3,2



Curvas de calibración

stx1					
Dilución	Cq réplica 1	Cq réplica 2	Cq réplica 3	Cq promedio	Copias ADNc/mL
0	18,79	19,21	19,56	19,19	2,5 x 10 ⁶
1/5	22,07	21,62	22,70	22,13	5,0 x 10 ⁵
1/10	24,32	23,53	25,75	24,53	1,0 x 10 ⁵
1/15	27,07	26,45	27,08	26,87	2,0 x 10 ⁴
1/20	29,78	30,45	30,18	30,14	4,0 x 10 ³
1/25	32,63	32,51	33,45	32,87	8,0 x 10 ²
1/30	33,81	33,69	34,65	34,05	1,6 x 10 ²
1/35	34,12	35,58	36,70	35,47	3,2 x 10 ¹
stx2					
Dilución	Cq réplica 1	Cq réplica 2	Cq réplica 3	Cq promedio	Copias ADNc/mL
0	17,59	17,09	17,69	17,46	2,5 x 10 ⁶
1/5	21,06	21,15	21,18	21,13	5,0 x 10 ⁵
1/10	23,22	23,05	22,83	23,03	1,0 x 10 ⁵
1/15	25,93	26,12	25,47	25,84	2,0 x 10 ⁴
1/20	29,00	28,18	28,14	28,44	4,0 x 10 ³
1/25	30,88	30,99	29,42	30,43	8,0 x 10 ²
1/30	32,34	34,87	34,71	33,97	1,6 x 10 ²
1/35	35,23	34,21	35,39	34,94	3,2 x 10 ¹



Resultados ensayo de expresión

stx1				
Condición	Cq réplica 1	Cq réplica 2	Cq réplica 3	Cq promedio
4H (TSB)	35,50	34,09	36,50	35,36
MBG10 (TSB)	37,53	N/A	34,94	36,24
4H (AP)	36,34	37,94	34,54	36,27
MBG10 (AP)	33,31	34,18	33,76	33,75
4H (AR)	38,62	37,81	37,20	37,88
MBG10 (AR)	37,60	39,05	38,70	38,45
4H (TSB+CIP)	32,10	31,00	30,03	31,04
MBG10 (TSB+CIM)	25,54	26,26	24,71	25,50
4H (AP+CIP)	13,53	N/A	16,70	15,12
MBG10 (AP+CIM)	29,23	28,59	28,85	28,89
4H (AR+CIP)	20,01	N/A	15,63	17,82
MBG10 (AR+CIM)	34,75	37,86	37,20	36,60



stx2				
Condición	Cq réplica 1	Cq réplica 2	Cq réplica 3	Cq promedio
BZ0742 (TSB)	N/A	N/A	N/A	N/A
4H (TSB)	N/A	N/A	39,60	39,60
CAVS123 (TSB)	N/A	38,66	36,93	37,80
CBVS85 (TSB)	34,84	38,94	38,87	37,55
BZ0742 (AP)	39,56	34,91	38,08	37,52
4H (AP)	N/A	39,28	N/A	39,28
CAVS123 (AP)	36,32	37,90	37,72	37,31
CBVS85 (AP)	38,73	38,37	39,21	38,77
BZ0742 (AR)	N/A	N/A	N/A	N/A
4H (AR)	N/A	36,88	N/A	36,88
CAVS123 (AR)	N/A	34,59	N/A	34,59
CBVS85 (AR)	34,62	N/A	N/A	34,62
BZ0742 (TSB+CIP)	38,21	37,45	39,84	38,50
4H (TSB+CIP)	38,08	34,43	36,73	36,41
CAVS123 (TSB+CIP)	N/A	35,24	39,25	37,25
CBVS85 (TSB+CIP)	35,32	35,69	N/A	35,51
BZ0742 (AP+CIP)	35,03	34,33	33,81	34,39
4H (AP+CIP)	N/A	N/A	N/A	N/A
CAVS123 (AP+CIP)	35,04	37,13	36,70	36,29
CBVS85 (AP+CIP)	N/A	34,91	N/A	34,91
BZ0742 (AR+CIP)	34,55	N/A	N/A	34,55
4H (AR+CIP)	22,18	20,59	22,29	21,69
CAVS123 (AR+CIP)	38,06	39,50	N/A	38,78
CBVS85 (AR+CIP)	N/A	N/A	34,76	34,76