

Doctorado en Ciencia Animal

Tesis

Escherichia coli verotoxigénico: identificación de clones
nativos circulantes y caracterización de su virulencia
como indicadores moleculares del potencial riesgo en
salud pública

Por: Jimena Soledad Cadona

Facultad de Ciencias Veterinarias

U.N.C.P.B.A.



2019

Doctorado en Ciencia Animal

Tesis

Escherichia coli verotoxigénico: identificación de clones nativos
circulantes y caracterización de su virulencia como indicadores
moleculares del potencial riesgo en salud pública

Por: Jimena Soledad Cadona

Facultad de Ciencias Veterinarias
U.N.C.P.B.A.

Director:

Dra. Andrea Mariel Sanso

Co-director:

Dra. Ana Victoria Bustamante

Miembros del Jurado:

Dra. Fabiana Moredo

Dra. Marta Mollerach

Dra. Carolina Ceriani

Agradecimientos

Principalmente a mis directoras de Tesis, la Dra. Mariel Sanso y la Dra. Ana Bustamante, por su enseñanza y acompañamiento diario, en lo personal y en lo profesional, por su dedicación, confianza y apoyo absoluto.

A todo el grupo del Laboratorio de Inmunoquímica y Biotecnología. A la Facultad de Ciencias Veterinarias por brindarme el lugar de trabajo.

A la Comisión de Doctorado y la Secretaría de Posgrado de la FCV. A Inés, especialmente, por su acompañamiento y predisposición siempre.

A CONICET por otorgarme una beca para realizar este doctorado y a FONCYT, CIC, SECAT-UNCPBA Y CONICET por el financiamiento de este proyecto.

A mis amigas “del lab”, las Julis, Ro y Vitori, por ser incondicionales, por las risas, los llantos, los enojos y el acompañamiento de todos los días. Juli “G” para vos un agradecimiento especial porque compartir este camino juntas fue de lo más lindo.

A mis amigas de siempre y a aquellas que encontré en este camino universitario, en especial a las chicas de “boxes” y “no boxes”, Ale, Mery, Lauri, Juli, Sabi. A Belucha, mi amiga de rutas internacionales.

A Juli Burgán, Ale Krüger y Laura Maté por su apoyo, ayuda y tiempo desinteresado siempre que lo necesité.

Finalmente, mi mayor agradecimiento a mis papás, a mis hermanos y mi familia, y muy especialmente, a Juan por respetarme, confiar en mí y acompañarme cada día.

RESUMEN

Escherichia coli verotoxigénico (VTEC) es un patógeno asociado a enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) que causa infecciosas severas en los humanos como diarrea, colitis hemorrágica (CH) y síndrome urémico hemolítico (SUH). El SUH afecta mayormente a niños menores de 5 años, es la principal causa de insuficiencia renal aguda, una de las más importantes de insuficiencia renal crónica, y puede causar la muerte. Argentina posee la mayor incidencia a nivel mundial de SUH y una alta prevalencia de VTEC en bovinos y alimentos derivados. El ganado bovino y los alimentos cárnicos son el principal reservorio y fuente de infección de VTEC, respectivamente.

Las verotoxinas son el principal carácter de virulencia pero existen otros factores asociados a la patogénesis por VTEC, algunos de ellos codificados en islas de patogenicidad (PAI). La evaluación de los genes de virulencia contenidos en las PAI es una nueva herramienta para determinar el potencial riesgo de estas cepas en la salud pública, ya que éstas desempeñan un papel importante en la patogénicidad de la VTEC. Una evaluación de riesgo molecular (MRA) basada en la evaluación del contenido de genes *nle* se ha utilizado para predecir qué cepas representan un riesgo para los seres humanos.

La clasificación de VTEC utilizando métodos filogenéticos ha mostrado que algunos serotipos se agrupan de acuerdo a su impacto en salud pública. Uno de estos métodos es la tipificación de secuencias de múltiples *loci* o MLST, el cual puede contribuir a establecer el riesgo que algunos aislamientos pueden presentar para la salud pública. Por otro lado, la identificación de los clones/linajes es importante ya que varias características, entre ellas la propensión a causar enfermedades, varía con el origen filogenético de VTEC. En relación a la diversidad filogenética y a la similitud con clones existentes en otras partes del mundo, asociados a enfermedad en seres humanos, no hay estudios previos realizados en cepas VTEC nativas, por lo cual, se desconocen qué clones de VTEC, especialmente no-O157:H7, están circulando en Argentina.

El objetivo de esta tesis fue caracterizar la diversidad genética de las cepas VTEC no-O157:H7 nativas aisladas de diversas fuentes, principalmente ganado bovino y alimentos, identificar qué clones están circulando en el país para determinar las relaciones filogenéticas entre las cepas y compararlas con cepas de diferentes orígenes geográficos, especialmente con aquellas de casos clínicos en humanos, y evaluar las características relacionadas con virulencia

de los mismos, con el fin de identificar el potencial riesgo que estas cepas pudieran tener para la salud pública.

Para llevar a cabo este objetivo, se determinó el secuenciotipo (ST) de 59 aislamientos VTEC pertenecientes a 42 serotipos mediante MLST. Por otro lado, se determinó la distribución de genes ubicados en las PAI OI-36 (*nleB2*, *nleC*, *nleD*, *nleH1-1*), OI-57 (*nleG2-3*, *nleG5-2*, *nleG6-2*), OI-71 (*nleA*, *nleF*, *nleG*, *nleG2-1*, *nleG9*, *nleH1-2*), y OI-122 (*nleB*, *nleE*, *ent/espL2*, Z4321, Z4326, Z4332, Z4333) en 204 aislamientos de bovinos, alimentos y seres humanos pertenecientes a 52 serotipos no-O157:H7 y, en las cepas que resultaron positivas para el gen *nleB*, se determinaron sus niveles de expresión mediante reacciones de cuantificación relativa por PCR en tiempo real.

En cuanto a la caracterización de los genes codificados en PAI, se encontraron diferencias en la frecuencia de los marcadores genéticos y una gran diversidad de perfiles de virulencia. En la mayoría de las cepas *eae*-negativas, solo estuvo presente el módulo 1 (Z4321) de OI-122. Sin embargo, se detectaron algunas cepas *eae*-negativas inusuales, que presentaron además de Z4321 otros genes de las PAI estudiadas. El análisis de agrupamiento, sin tener en cuenta los aislamientos que resultaron negativos para todos los genes, definió dos grupos principales: i) aislamientos *eae*-negativos (caracterizado por incluir serotipos -SPT- D, E o sin determinación, y aislamientos de origen bovino o alimentos); ii) *eae*-positivos (principalmente caracterizado por incluir aislamientos pertenecientes a SPT B, C, o no determinado).

El análisis de MLST utilizando la base de datos EcMLST identificó 38 ST, de los cuales 17 (45%) fueron nuevos (algunos de ellos con alelos aún no registrados), en 18 serotipos. Quince de los 38 ST identificados se agruparon en 11 grupos clonales (CG) y 23 no fueron agrupados en ninguno de los CG definidos. En algunos serotipos, se determinaron diferentes ST. Los resultados mostraron un alto grado de heterogeneidad filogenética entre las cepas estudiadas, que varios de los aislamientos de bovino y alimentos pertenecieron a los mismos ST que comúnmente se asocian con casos clínicos en humanos en diversas áreas geográficas y la presencia de numerosos linajes emergentes en la región.

De acuerdo a los análisis de expresión basal relativa del gen *nleB* se encontraron niveles de expresión heterogéneos entre las cepas estudiadas. No se encontraron diferencias significativas en los niveles de expresión asociadas al origen de los aislamientos (bovino y humano) ni al serotipo pero si entre el grupo proveniente de SUH y el no-SUH. Por otro lado, aislamientos no-O157:H7 pertenecientes a los serotipos O145:NM (bovino y humano) y

O146:H21 (bovino) presentaron niveles de expresión de *nleB* superiores al control, una cepa O157:H7 aislada de un niño con SUH.

En base al esquema de MRA analizado, los aislamientos *eae*-positivos con mayor potencial de virulencia fueron aquellos pertenecientes a los serotipos O5:NM, O26:H11, O38:H39, O111:H2, O118:H2/H16, O121:H19, O145:NM, O146:H21 y O165:NM. En relación a los aislamientos *eae*-negativos, se plantea la necesidad de utilizar marcadores adicionales que permitan predecir el potencial riesgo de causar enfermedad en seres humanos.

VTEC representa un grave problema para la salud pública. Argentina tiene la mayor incidencia de SUH en el mundo y este estudio proporciona los primeros datos sobre los clones VTEC no-O157:H7 que están circulando en nuestra región. Los resultados mostraron que algunos de ellos pueden representar un alto riesgo zoonótico y esta información es importante para desarrollar iniciativas en salud pública.

ABSTRACT

Verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) is a pathogen associated with foodborne diseases that causes severe infectious diseases in humans such as diarrhea, hemorrhagic colitis (HC) and haemolytic uraemic syndrome (HUS).

HUS mainly affects children under 5 years old, it is the main cause of acute renal failure, one of the most important causes of chronic renal failure and it can cause death. Argentina has the highest incidence worldwide with high frequency and prevalence of VTEC in bovines and derived foods. Cattle and meat foods are the main reservoir and source of VTEC infection, respectively.

Verotoxins are the main virulence character but there are other factors associated with VTEC pathogenesis, some of them encoded in pathogenicity islands (PAIs). The evaluation of virulence genes in PAIs is a new tool to determine the risk potential of these strains in public health since they are played an important role in the pathogenicity of VTEC. A molecular risk assessment (MRA) based on the evaluation of gene content has been used to predict which strains pose a risk to humans.

The classification of VTEC using phylogenetic methods has shown that some serotypes are grouped according to their impact on public health. One of these methods is the multilocus sequence typing or MLST, which can contribute to establishing the risk that some isolates can present for public health. On the other hand, the identification of clones/lineages is important since several characteristics, among them, the propensity to cause diseases, is related to the phylogenetic origin of VTEC. In this case, there are no previous studies carried out on native VTEC strains, so it is unknown which clones of VTEC, especially non-O157:H7, are circulating in Argentina.

The objective of this thesis was to characterize the genetic diversity of native VTEC non-O157:H7 strains from diverse sources, mainly cattle and food, identify which clones are circulating in the country to determine the phylogenetic relationships between strains, compare them with strains of different geographical origins, especially with clinical cases strains, and evaluate the characteristics related to the virulence of them, in order to identify the potential risk that these strains have for public health.

To carry out our objective, the sequence types (STs) in a total of 59 VTEC isolates belonging to 42 serotypes were determined using MLST. On the other hand, the distribution of genes in PAIs OI-36 (*nleB2*, *nleC*, *nleD*, *nleH1-1*), OI-57 (*nleG2-3*, *nleG5-2*, *nleG6-2*), OI-71

(*nleA*, *nleF*, *nleG*, *nleG2-1*, *nleG9*, *nleH1-2*), and OI-122 (*nleB*, *nleE*, *ent/spL2*, Z4321, Z4326, Z4332, Z4333) were analyzed in 204 isolates of bovines, humans and food belonging to 52 non-O157:H7 serotypes and, in the strains that were positive for the *nleB* gene, their expression levels were determined by means of relative quantification reactions by real-time PCR.

Regarding the characterization of the genes encoded in PAIs, differences in the frequency of genetic markers and a great diversity of virulence profiles were found. In most of the *eae*-negative strains, only module 1 (Z4321) of OI-122 was present. However, some unusual *eae*-negative strains were detected, which presented in addition to Z4321 other genes of the PAIs studied. The cluster analysis, without taking into account the isolates that were negative for all the genes, defined two main groups: i) *eae*-negative isolates (characterized by including seropathotypes -SPTs- D, E or without determination, and bovine or food isolates); ii) *eae*-positive (mainly characterized by including isolates belonging to SPTs B, C, or not determined).

The MLST analysis using the EcMLST database identified 38 STs, of which 17 (45%) were new STs (some of them with alleles not yet registered), in 18 serotypes. Fifteen of the 38 STs identified were grouped into 11 clonal groups (CGs) and 23 were not grouped in any of the CGs defined by the database. In some serotypes, different STs were determined. The results showed a high degree of phylogenetic heterogeneity among the strains studied, that several cattle and food isolates belonged to the same STs that are commonly associated with clinical cases in humans in different geographical areas and demonstrated the presence of numerous emerging lineages in the region.

According to the relative basal expression analyzes of the *nleB* gene, heterogeneous expression levels were found among the strains studied. No significant differences were found in the levels of expression associated with the origin of the isolates (bovine and human) or serotype but did between the group from HUS and non-HUS. On the other hand, isolates non-O157 belonging to the serotypes O145:NM (cattle and human) and O146:H21 (cattle) presented higher *nle* expression levels than the control sample, a strain O157:H7 isolated from a child with HUS.

Based on the MRA scheme analyzed, *eae*-positive isolates with increased virulence potential were those belonging to serotypes O5:NM, O26:H11, O38:H39, O111:H2, O118:H2/H16, O121:H19, O145:NM, O146:H21 y O165:NM. Regarding to *eae*-negative isolates, the need to use additional markers to predict the potential risk of causing disease in humans is proposed.

VTEC represents a serious problem for public health. Argentina has the highest incidence of HUS in the world and this study provides the first data about the non-O157: H7 VTEC clones

that are circulating in our region. The results showed that some of them could represent a high zoonotic risk and this information is important to develop public health initiatives.

PALABRAS CLAVE

Escherichia coli verotoxigénico, islas de patogenicidad, genes de virulencia, niveles de expresión de genes, qPCR, clones circulantes, epidemiología a largo plazo, MLST, bovinos, alimentos cárnicos.

ABREVIATURAS

ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNc	ácido desoxirribonucleico copia
ARN	ácido ribonucleico
CC	complejo clonal (<i>clonal complex</i>)
CH	colitis hemorrágica
Ct	ciclo umbral (<i>Cycle threshold</i>)
dNTP	desoxirribonucleótidos
DMEM	medio de Eagle modificado por Dulbecco (<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>)
DO	densidad óptica
DLV	variación en dos <i>loci</i> (<i>double locus variation</i>)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
EGM	elementos genéticos móviles
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágico
ETA	enfermedades transmitidas por alimentos
Fw	<i>primer forward</i>
Gb3	globotriacilceramida
GC	grupo clonal (<i>clonal group</i>)
H	antígeno flagelar
h	hora
LB	Luria Bertani
LEE	<i>locus</i> de borrado del enterocito
Lesión A/E	lesión de adherencia y borrado del enterocito
LPS	lipopolisacárido
min	minuto
ml	mililitro
MLST	tipificación de secuencias de múltiples <i>loci</i> (<i>multilocus sequence typing</i>)

mM	milimolar
MRA	evaluación del riesgo molecular (<i>molecular risk assessment</i>)
Nle	efectores no codificados en LEE
nm	nanomoles
nM	nanomolar
NT	no tipificable
NM	no móvil
O	antígeno somático
°C	grado centigrado
OI	O-islas genómicas
OMS	Organización Mundial de la Salud
ORF	marco de lectura abierto (<i>open reading frame</i>)
PAI	isla de patogenicidad
pb	pares de bases
PCR	reacción en cadena de la polimerasa (<i>polymerase chain reaction</i>)
pmol	picomoles
qPCR	reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
rpm	revoluciones por minuto
RT	retrotranscripción
Rv	<i>primer reverse</i>
seg	segundo
SLV	variación en un <i>locus</i> (<i>single locus variation</i>)
SSTIII	sistema de secreción tipo III
ST	secuenciotipo (<i>sequence type</i>)
STEC	<i>Escherichia coli</i> productor de toxina Shiga
SUH	síndrome urémico hemolítico
Tir	receptor de intimina translocado
µg	microgramos
µl	microlitros
µM	micromolar
VTEC	<i>Escherichia coli</i> verotoxigénico
VT	verotoxina

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN GENERAL	15
HIPÓTESIS.....	17
OBJETIVO GENERAL.....	17
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17

CAPÍTULO I: CONOCIMIENTO ACTUAL SOBRE LA TEMÁTICA

1.1. <i>Escherichia coli</i>	19
1.2. <i>Escherichia coli</i> verotoxigénico.....	19
1.2.1. Reservorio y transmisión	20
1.2.2. Patogénesis de la infección por VTEC.....	21
1.2.3. Factores de virulencia	22
1.2.3.1. Sistema de secreción de tipo III	23
1.2.3.2. Islas de patogenicidad.....	24
1.2.4. Filogenia y tipificación de VTEC	25

CAPÍTULO II: SECCIONES EXPERIMENTALES

SECCIÓN EXPERIMENTAL I

Detección de genes putativos de virulencia ubicados en Islas de Patogenicidad en cepas de Escherichia coli verotoxigénico no-O157:H7

2.1.1. Introducción	28
2.1.2. Objetivos.....	32
2.1.3. Materiales y métodos.....	32
2.1.3.1. Aislamientos estudiados	32
2.1.3.2. Detección de genes no codificados en LEE (<i>nle</i>)	36
2.1.3.3. Detección de genes asociados a SPT y marcadores de la OI-122	39
2.1.3.4. Análisis de agrupamiento	40
2.1.4. Resultados	40
2.1.5. Discusión.....	47

SECCIÓN EXPERIMENTAL II

Determinación de secuenciotipos (ST), complejos clonales (CC) y relaciones filogenéticas en cepas de Escherichia coli verotoxigénico no-O157:H7

2.2.1. Introducción	51
2.2.2. Objetivos.....	53
2.2.3. Materiales y métodos.....	53
2.2.3.1. Aislamientos estudiados	53
2.2.3.2. Amplificación de los genes <i>housekeeping</i>	54
2.2.3.3. Tipificación de secuencias de múltiples <i>loci</i> (MLST)	54
2.2.3.4. Análisis bioinformático de los datos de MLST	57
2.2.4. Resultados	57
2.2.5. Discusión.....	61

SECCIÓN EXPERIMENTAL III

*Determinación de los niveles de expresión del gen *nleB* (OI-122) en cepas de Escherichia coli verotoxigénico no-O157:H7*

2.3.1. Introducción	65
2.3.2. Objetivo	67
2.3.3. Materiales y métodos.....	67
2.3.3.1. Aislamientos estudiados	67
2.3.3.2. Extracción de ARN total y obtención de ADN copia	68
2.3.3.3. Condiciones para la cuantificación relativa por qPCR	68
2.3.3.4. Método $\Delta\Delta Ct$ y análisis de datos	69
2.3.3.5. Puesta a punto de la curva estándar relativa.....	69
2.3.3.6. Análisis estadístico.....	70
2.3.4. Resultados	71
2.3.5. Discusión.....	77

SECCIÓN EXPERIMENTAL IV

Análisis comparativo de cepas nativas de Escherichia coli verotoxigénico no-O157:H7 en base al contenido genético de diferentes PAI, los perfiles de MLST y los niveles de expresión de genes de virulencia

2.4.1. Objetivo	79
2.4.2. Materiales y métodos.....	79
2.4.3. Resultados y Discusión general	79

CAPITULO III

3.1. Conclusiones generales.....	89
----------------------------------	----

CAPITULO IV

4.1. Referencias bibliográficas.....	92
4.2. Publicaciones y Comunicaciones.....	108
4.2.1. Publicaciones científicas en revistas	108
4.2.2. Comunicaciones a congresos y jornadas	109
4.3. Anexo I. Tabla S1.	112

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de serotipos VTEC dentro de seropatotipos	28
Tabla 2. Aislamientos no-O157:H7 analizados en relación a genes de virulencia ubicados en PAI.....	32
Tabla 3. Genes putativos de virulencia codificados en islas de patogenicidad (PAI) analizadas en este estudio	36
Tabla 4. <i>Primers</i> utilizados para la amplificación de los genes ubicados en PAI.....	37
Tabla 5. Condiciones de termociclado utilizadas para la amplificación de genes <i>nle</i>	38
Tabla 6. Genes asociados a seropatotipos codificados en la OI-122	39
Tabla 7. Condiciones de PCR utilizadas para la amplificación de los genes codificados en OI-122	40
Tabla 8. Prevalencia de genes de virulencia presentes en PAI en serotipos/serogrupo VTEC <i>eae</i> -positivos representados por más de un aislamiento: O5:NM, O26:H11, O103 (O103:NM y O103:H2), O145:NM y O177:NM	44
Tabla 9. Genes <i>housekeeping</i> analizados en el esquema de MLST	55
Tabla 10. Condiciones de PCR utilizadas para la amplificación de los 7 genes <i>housekeeping</i> ..	55
Tabla 11. Perfiles alélicos, secuenciotipos (ST), grupos clonales (GC) y complejos clonales (CC) de los aislamientos VTEC estudiados por MLST	58
Tabla 12. Aislamientos VTEC positivos para la presencia del gen <i>nleB</i> analizados por qPCR .	67

Tabla 13. Niveles de expresión relativa (<i>fold change</i>) del gen <i>nleB</i> obtenidos en los aislamientos estudiados	71
Tabla S1. Aislamientos VTEC no-O157 estudiados y su caracterización correspondiente a los genes ubicados en las PAI estudiadas	113

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Componentes modulares de la OI-122.....	31
Figura 2. Prevalencia de cada uno de los genes de virulencia codificados en las islas de patogenicidad estudiadas (OI-36, OI-57, OI-71, OI-122) en aislamientos VTEC no-O157:H7.....	41
Figura 3. Análisis de agrupamiento en base a los genes asociados a virulencia presentes en las PAI OI-36, OI-57, OI-71 y OI-122, en aislamientos VTEC no-O157 de seres humanos, bovinos, alimentos cárnicos y vegetales	42
Figura 4. Distribución de perfiles de virulencia para cada isla de patogenicidad estudiada en aislamientos VTEC no-O157:H7	45
Figura 5. Presencia de OI-122 de acuerdo a la detección de genes marcadores localizados en los tres módulos	46
Figura 6. MLST y análisis de agrupamiento por eBURST	53
Figura 7. <i>Snapshot</i> de la población de cepas estudiadas mediante MLST	60
Figura 8. Niveles de expresión relativa del gen <i>nleB</i> en los aislamientos positivos para dicho gen (escala logarítmica)	73
Figura 9 (a-c). Comparación de los niveles de expresión basal relativa de <i>nleB</i> , según el origen de las cepas (a), el serotipo (b) y una clasificación basada en los valores de <i>fold change</i> obtenidos (c).....	74
Figura 10 (a,b). Comparación de los niveles de expresión basal relativa del gen <i>nleB</i> , según el origen de las cepas teniendo en cuenta, aislamientos humanos asociados a SUH y no-SUH (a), y aislamientos asociados a SUH, no-SUH y de origen bovino (b).....	76
Figura 11. Análisis de agrupamiento de acuerdo a los genes asociados a virulencia presentes en las PAI, complementado con datos de serotipo, origen, perfil de virulencia, seropatotipo y, en la última columna, datos de ST y CC, cuando los mismos estuvieron disponibles	81

INTRODUCCIÓN GENERAL

Escherichia coli verotoxigénico (VTEC) es un grupo muy diverso de patógenos transmitidos por alimentos (ETA), el cual es responsable de causar enfermedades infecciosas severas en humanos como diarrea, colitis hemorrágica (CH) y síndrome urémico hemolítico (SUH). Numerosos estudios han demostrado que VTEC puede formar parte de la flora del intestino de distintas especies animales. Sin embargo, el ganado bovino es considerado el reservorio más importante de VTEC (Paton y Paton, 1998; Caprioli *et al.*, 2005) y, generalmente, un excretor asintomático de los mismos (Mainil y Daube, 2005).

El SUH afecta mayormente a niños menores de 5 años, es la principal causa de insuficiencia renal aguda, una de las más importantes de insuficiencia renal crónica y puede causar la muerte. Argentina posee la mayor incidencia a nivel mundial de SUH, aproximadamente 400 casos nuevos fueron reportados anualmente, presentando una incidencia de entre 7,8 y 17 casos cada 100.000 niños menores de 5 años (Rivas *et al.*, 2010). Además, existe una alta prevalencia de VTEC en bovinos y alimentos derivados. La transmisión a los humanos ocurre a través de la ingestión de alimentos y/o agua contaminados, el contacto directo con animales o su entorno, o mediante la transmisión de persona a persona (Karmali *et al.*, 2010).

E. coli O157:H7 es el serotipo VTEC predominante en Argentina, los Estados Unidos, Gran Bretaña y Japón (Abu-Ali *et al.*, 2009). Sin embargo, un reporte de Enter-Net revela que, a nivel mundial, las infecciones por VTEC no-O157 han aumentado 60% entre los años 2000 y 2005, mientras que el incremento para las asociadas a O157 fue sólo del 13% (Anonymous, 2005). En particular, múltiples investigaciones han demostrado que los serogrupos VTEC como O26, O91, O103, O111, O113, O118, O121 y O145, con frecuencia se asocian a casos de enfermedad en humanos y han estado implicados en numerosos brotes (Karmali *et al.*, 2003; Abu-Ali *et al.*, 2009; Bettelheim y Goldwater, 2014). Dentro de este grupo no-O157, en Argentina, los serotipos O2:H11, O15:H27, O25:NM, O26:H11, O58:H40; O103:H2, O103:H25, O113:H21, O121:H19, O145:H25, O145:NM, O171:H2, O174:H21 y ONT:NM se han asociado con SUH y/o diarrea sanguinolenta en niños (Rivas *et al.*, 2006).

Las verotoxinas (VT1 y VT2 con sus variantes) son el principal carácter de virulencia pero existen otros factores asociados a la patogénesis por VTEC, algunos codificados en islas de patogenicidad (PAI). La evaluación de los genes de virulencia contenidos en las PAI es una nueva herramienta para determinar el potencial riesgo de estas cepas en la salud pública (Karmali *et al.*, 2003; Coombes *et al.*, 2008). Por otra parte, la diversidad genética de VTEC no

sólo existe entre serotipos, sino también dentro de un mismo serotipo. La clasificación de VTEC utilizando métodos filogenéticos ha demostrado que algunos serotipos se agrupan de acuerdo a su impacto en salud pública. Uno de estos métodos es la tipificación de secuencias de múltiples *loci* o MLST –*multilocus sequence typing*– (Spratt y Maiden, 1999), el cual puede contribuir a establecer el riesgo que algunos aislamientos podrían presentar para la salud pública. En relación a, la diversidad genética de cepas VTEC y su similitud con clones asociados a enfermedad en humanos existentes en otras partes del mundo, no hay estudios previos realizados en cepas VTEC nativas.

Por todo lo expuesto y debido a que: i) VTEC es un grupo muy heterogéneo y no todas las cepas no-O157:H7 y O157:H7 tienen la capacidad de infectar por igual ii) la Organización Mundial de la Salud ha considerado prioritario para la salud pública la identificación rápida, especialmente, de cepas no-O157 virulentas iii) en Argentina existe una alta prevalencia de VTEC, en particular en nuestra región, y el 40% de los casos de infección son debidos a serotipos no-O157:H7 y iv) los últimos brotes de gravedad a nivel mundial han sido ocasionados también por VTEC no-O157, nos proponemos caracterizar la diversidad genética de las VTEC nativas, identificar qué clones están circulando en el país y las características relacionadas con virulencia de los mismos, con el objetivo de identificar el potencial riesgo que éstos pudieran tener para la salud pública.

HIPÓTESIS

Las cepas VTEC nativas i) presentan diversidad genética que puede ser detectada mediante MLST y, a su vez, algunas tienen similitud con clones asociados a enfermedad en humanos, existentes en otras partes del mundo, ii) poseen genes ubicados en islas de patogenicidad, que se hallan en distintas combinaciones, y algunos de estos genes se expresan diferencialmente de acuerdo al serotipo u origen de la cepa.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la diversidad genética de cepas de *Escherichia coli* verotoxigénico (VTEC) aisladas en nuestro país, especialmente en la región pampeana, desde el punto de vista filogenético y de su virulencia, con el fin de determinar el potencial riesgo para la salud pública que representan dichas cepas nativas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Analizar la distribución y combinación de genes *nle* ubicados en islas de patogenicidad que codifican efectores del sistema de secreción tipo III (OI-36, OI-57, OI-71 y OI-122) en cepas VTEC nativas.
- ❖ Analizar la distribución de genes putativos de virulencia, marcadores de la isla de patogenicidad OI-122, para la clasificación de VTEC en seropatotipos.
- ❖ Caracterizar cepas VTEC nativas mediante la asignación de secuenciotipos (ST) y complejos clonales (CC) por MLST.
- ❖ Comparar los secuenciotipos y los complejos clonales de las VTEC nativas con los reportados en las bases de datos internacionales, especialmente con aquellos clones considerados de riesgo en el resto del mundo.
- ❖ Evaluar y comparar los niveles de expresión del gen *nleB* entre aislamientos de distinto origen y serotipo.
- ❖ Comparar las cepas VTEC estudiadas de acuerdo a los perfiles de virulencia de las islas de patogenicidad, los niveles de expresión del gen *nleB* y los ST y CC previamente analizados, y discutir su potencial de virulencia.

CAPÍTULO I
CONOCIMIENTO ACTUAL SOBRE LA TEMÁTICA

1.1. *ESCHERICHIA COLI*

Escherichia coli (*E. coli*) es un bacilo Gram negativo que forma parte de la flora normal del intestino del hombre y de los animales de sangre caliente, siendo el principal microorganismo anaerobio facultativo del colon, en donde se comporta como un comensal. *E. coli* y su hospedador se relacionan entonces de manera simbiótica. Sin embargo, se han reconocido cepas de *E. coli* que, a partir de la adquisición de diferentes factores de virulencia, se han convertido en patógenos de importancia en clínica humana y veterinaria, causantes de un amplio espectro de enfermedades de distribución mundial (Nataro y Kaper, 1998; Kaper *et al.*, 2004).

Las cepas de *E. coli* patógenas asociadas con infecciones gastrointestinales se pueden clasificar, en seis patotipos, de acuerdo a los factores de virulencia que poseen y las enfermedades más comunes asociadas con ellos: *E. coli* enteropatogénico (EPEC), *E. coli* enterotoxigénico (ETEC), *E. coli* verotoxigénico (VTEC), *E. coli* enteroinvasivo (EIEC), *E. coli* enteroagregativo (EAaggEC) y *E. coli* de adherencia difusa (DAEC) (Bettelheim, 2007). Dentro del grupo de VTEC existe un subgrupo denominado *E. coli* enterohemorrágico (EHEC) que incluye a todas las cepas que causan enfermedad en el hombre. El serotipo más importante de este grupo es O157:H7. Debido a esto, es posible clasificar los serotipos de VTEC en dos categorías: O157 y no-O157 (Gyles, 2007).

1.2. *ESCHERICHIA COLI* VEROTOXIGÉNICO

Escherichia coli verotoxigénico (VTEC) representa un grupo importante y heterogéneo de patógenos transmitidos por los alimentos, que puede causar severas enfermedades en los seres humanos, tales como diarreas, colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico (SUH) (Karmali, 1989; Paton y Paton, 1998; Karmali *et al.*, 2010). EL SUH, caracterizado por producir anemia hemolítica, trombocitopenia y falla renal, puede ser causante de muerte, afectando principalmente a niños menores de 5 años, y no existe un tratamiento específico para el mismo (Rivas *et al.*, 2006).

En Argentina, el SUH es endémico y alcanza la mayor incidencia a nivel mundial, entre 7,8 y 17 casos cada 100.000 niños menores de 5 años (10 veces mayor que en cualquier otro país industrializado), y presenta un rango de letalidad de entre el 2% y el 5%. Entre 2000 y 2010, se reportaron aproximadamente 500 casos nuevos de SUH al año (Rivas *et al.*, 2010; Torres *et al.*, 2018). Es la primera causa de insuficiencia renal aguda en niños y la segunda causa de insuficiencia renal crónica y responsable del 20% de los trasplantes renales en niños y

adolescentes (Ferraris *et al.*, 2002; Cobeñas *et al.*, 2007). Por otro lado, también han sido descritos casos graves de infecciones extra intestinales causados por VTEC, por ejemplo en el tracto urinario (Gadea *et al.*, 2012).

El serotipo involucrado en la mayoría de los casos de enfermedad es O157:H7. Sin embargo, estudios actuales a nivel mundial han demostrado que el número de infecciones por VTEC no-O157 en algunos casos supera a aquellas producidas por el serogrupo O157 (Gould *et al.*, 2013). Entre los años 2000 y 2005, los casos asociados a VTEC no-O157 aumentaron 60%, mientras que el incremento para los asociados a O157 fue sólo del 13% (Anonymous, 2005). Existen más de 100 serotipos asociados con enfermedades en humanos (Johnson *et al.*, 2006). En Argentina, si bien el serotipo O157:H7 es también el más frecuentemente asociado al SUH, la frecuencia de otros serotipos es muy importante (López *et al.*, 1998; Ibarra *et al.*, 2008). Los últimos brotes de gravedad ocasionados a gran escala a nivel mundial por cepas VTEC no-O157, particularmente los debidos a O103:H25 (Schimmer *et al.*, 2008) y a O104:H4 (Bielaszewska *et al.*, 2011), han puesto de manifiesto la necesidad de conocer más sobre las características de virulencia de las cepas *E. coli* no-O157.

1.2.1. Reservorio y transmisión

El ganado bovino es el principal reservorio de VTEC. En estos animales, la infección por VTEC no produce enfermedades graves como en el hombre y en bovinos infectados no se observan signos de inflamación intestinal, por ser, presumiblemente, menos sensibles a las verocitotoxinas. Se piensa que estas bacterias se han adaptado a un estilo de vida “comensal” en bovinos adultos (Smith *et al.*, 2002). El contagio al hombre es consecuencia, principalmente, de la ingesta de alimentos cárnicos deficientemente cocidos, productos lácteos sin pasteurizar y agua, contaminados directa o indirectamente con heces de ganado (Rivero *et al.*, 2004; Caprioli *et al.*, 2005). Durante la faena, y fundamentalmente durante el desollado y la evisceración de los animales, llegan inevitablemente a la superficie de las reses, cepas de *E. coli* procedentes de la flora intestinal del animal (Blanco *et al.*, 1996; Signorini y Tarabla, 2009).

Numerosos estudios se han focalizado en la detección de VTEC en animales. En Argentina, existe una alta prevalencia de VTEC en bovinos alimentados a pastoreo y a corral, así como una alta proporción de alimentos derivados contaminados con estas cepas. Se han identificado los mismos serotipos en cepas VTEC de alimentos, especialmente de origen cárnico, que en cepas aisladas de bovinos (Sanz *et al.*, 1998; Parma *et al.*, 2000; Gómez *et al.*, 2002; Padola *et al.*, 2004; Sanz *et al.*, 2007; Masana *et al.*, 2010). Precisamente, los productos cárnicos, y en especial, la carne picada y las hamburguesas, registran una gran contaminación con *E. coli*

verotoxigénico (Parma *et al.*, 2000). A nivel regional, Sanz y colaboradores (2007) hallaron que alrededor del 43% de los productos cárnicos para el consumo humano de la ciudad de Tandil estaban contaminados por VTEC.

1.2.2. Patogénesis de la infección por VTEC

En cuanto a los factores de patogenicidad de VTEC, las verotoxinas son el principal carácter de virulencia (Karmali, 1989). Sin embargo, existen otros determinantes de virulencia asociados a la patogénesis de la infección con VTEC, algunos de los cuales están presentes en grandes plásmidos y otros, codificados en islas de patogenicidad (PAI) (Schmidt y Hensel, 2004; Bielaszewska y Karch, 2005). Una de las PAI más importantes es la llamada “*locus* de borrado del enterocito” (LEE -*locus of enterocyte effacement*-), responsable de la lesión de adherencia íntima de la bacteria y borrado del enterocito (A/E) (McDaniel y Kaper, 1997).

El mecanismo de patogénesis de VTEC consiste en la colonización del intestino y producción de daño al hospedador debido a la producción de toxinas, que involucra múltiples procesos y una compleja interacción entre factores bacterianos y del hospedador. Luego de sobrepasar las barreras de defensa del hospedador, la bacteria alcanza el intestino donde se activan los genes de virulencia y VTEC se adhiere a los enterocitos. Algunas cepas VTEC son capaces de colonizar la mucosa intestinal y provocar la lesión A/E (Kaper *et al.*, 2004). La lesión A/E involucra cambios estructurales en la célula epitelial del intestino y una íntima adherencia de la bacteria a la membrana de la célula, incluyendo la formación de un pedestal con acumulación de actina polimerizada por debajo de la bacteria y la pérdida de las microvellosidades (Gyles, 2007). Las proteínas bacterianas necesarias para la formación de A/E están codificadas en la isla de patogenicidad LEE (McDaniel y Kaper, 1997; Guth *et al.*, 2010). Aunque la intimina, codificada en esta isla, no es necesaria para producir SUH (Paton *et al.*, 1999), la gran mayoría de serotipos implicados en estas patologías como los serotipos O157:H7 y O26:H11 son LEE-positivos. Sin embargo, cepas que carecen de LEE también han sido asociadas a enfermedad severa en humanos, por lo que la presencia de la región LEE no sería esencial para la patogénesis (Bettelheim, 2007; Franz *et al.*, 2015). El mecanismo de colonización en las cepas LEE-negativas aún no está esclarecido y, probablemente, sea más de uno debido a que es un grupo genética y filogenéticamente diverso.

Existe una clasificación de VTEC en 5 seropatotipos (SPT), de acuerdo a la asociación de cada uno de los serotipos con brotes y enfermedad grave en humanos. Esta clasificación abarca desde el serotipo más patógeno, O157:H7/NM (SPT A), pasando por serotipos que con frecuencia, ocasionalmente o con poca frecuencia se asocian con enfermedad clínica (SPT B-C-

D), hasta serotipos VTEC que nunca han sido asociados con enfermedad en humanos (SPT E) (Karmali *et al.*, 2003). Debido a la alta variabilidad existente en VTEC, esta clasificación por sí sola no es suficiente para utilizarla como una identificación predictiva del riesgo patogénico de una cepa, por lo cual es importante estudiar también la distribución de los diferentes factores de virulencia que posee cada una de ellas (Franz *et al.*, 2015).

1.2.3. Factores de virulencia

Este grupo de bacterias se denomina verotoxigénico ya que produce toxinas llamadas verotoxinas (VT) o Shiga toxinas (Stx), las cuales tienen efecto citotóxico sobre las células de la línea Vero (células de riñón de mono verde africano). Estos potentes factores de virulencia se encuentran codificados por bacteriófagos integrados al genoma de la bacteria. Las VT pertenecen a dos grupos principales, VT1 y VT2, las cuales pueden ser sintetizadas ambas, en una misma cepa y son un factor de virulencia crítico en el desarrollo del SUH (Karmali, 1989; Paton y Paton, 1998). Sin embargo, la adherencia bacteriana a las células intestinales y la posterior colonización del epitelio intestinal, también son pasos críticos en la patogénesis de VTEC. El proceso de infección en el hombre involucra la colonización del intestino y el daño por acción de las toxinas, las cuales producen inhibición de la síntesis proteica en las células de varios tejidos, principalmente en las células del endotelio renal (Kaper y Karmali, 2008). La colonización es el proceso por el cual VTEC supera las defensas del huésped y se establece en el intestino, constituyendo el primer paso en la patogénesis (Gyles, 2007). La intimina, una proteína de membrana externa, es otro de los principales factores de virulencia de VTEC. Esta proteína está codificada en el gen *eae*, marcador del *locus* LEE, y es la encargada de mediar, junto con su receptor translocado (Tir), la adherencia de la bacteria al enterocito produciendo la lesión intestinal A/E (Jerse *et al.*, 1990).

Existe una fuerte asociación entre la presencia de LEE y la capacidad de VTEC de causar enfermedad en el hombre, pero su presencia no es esencial para causar enfermedad. Por lo tanto, sin el LEE, las cepas VTEC *eae*-negativas deben adherirse al epitelio intestinal por medios distintos al complejo intimina/Tir. Se han descrito otros factores de virulencia presentes en cepas *eae*-negativas y asociados a patogénesis, como la proteína Saa (“adhesina aglutinante de STEC”), descrita por primera vez en una cepa O113:H21 aislada de un caso de SUH (Paton *et al.*, 2001), y la enterohemolisina, EhxA (Schmidt y Beutin, 1995), ambas codificadas en un megaplásmido. Otras adhesinas putativas existentes en VTEC son una fimbria polar larga, Lpf (Doughty *et al.*, 2002) y las proteínas de autotransporte EhaA (Wells *et al.*, 2008) y Sab (Herold *et al.*, 2009), involucradas ambas en la formación de *biofilms*. Por otra parte, además de las

verotoxinas, se han descrito otras toxinas que también aportarían a la patogénesis de VTEC. Entre ellas se encuentra SubAB, una citotoxina subtilasa que induce la muerte celular, descrita por Paton *et al.* (2004) y CDT-V, una toxina que distiende el citoesqueleto (Janka *et al.*, 2003; Bielaszewska *et al.*, 2004).

1.2.3.1. Sistema de secreción de tipo III

El complejo mecanismo de adherencia y lesión A/E está gobernado, como se dijo, por la isla de patogenicidad LEE. En LEE están codificados el sistema de secreción de tipo III (SSTIII), proteínas translocadas por éste, y el sistema de adherencia constituido por la proteína de membrana externa, intimina, y su receptor Tir.

El SSTIII abarca tres membranas celulares, las membranas interna y externa de la bacteria y la membrana de la célula hospedadora eucariota, lo cual permite que la bacteria transloque proteínas efectoras a las células hospedadoras, en las cuales se afectan las funciones celulares, contribuyendo a la supervivencia y colonización bacteriana. Los efectores secretados varían en número y función entre las especies bacterianas (Deng *et al.*, 2017). Particularmente en VTEC, es un factor génico determinante de la colonización y persistencia de la bacteria en los reservorios animales y de la virulencia en humanos después de la transmisión zoonótica (Coombes *et al.*, 2008).

Este sistema de secreción funciona como un complejo macromolecular que crea un aparato similar a una jeringa, el cual se extiende desde el citoplasma bacteriano hasta la célula huésped y distribuye proteínas y factores de virulencia bacterianos (efectores) dentro de la célula (Wickham *et al.*, 2007), y es utilizado tanto por *E. coli* enteropatógeno (EPEC) como por VTEC (Zhang *et al.*, 2004). Las proteínas secretadas activan una cascada de señales que resultan en modificaciones de la estructura de la célula intestinal y cambios en la fisiología celular. Entre las proteínas translocadas se encuentra Tir que se inserta en la membrana celular del enterocito y actúa como receptor de la intimina, permitiendo la adherencia íntima entre la bacteria y la célula blanco (Deng *et al.*, 2017).

La secreción de proteínas tiene un papel fundamental en la interacción entre las bacterias y su entorno. La virulencia de VTEC, como se dijo antes, está asociada con la producción del SSTIII y sus proteínas efectoras están altamente conservadas en patógenos que producen la lesión A/E. Sin embargo, existe un amplio conjunto de efectores no codificados en LEE, denominados Nle, que están presentes en diferentes combinaciones en estos patógenos. La secuenciación de genomas ha demostrado que, por ejemplo, la cepa Sakai de EHEC presenta alrededor de 50 genes que codifican efectores secretados por el SSTIII. Entre los Nle, se ha

demostrado que NleA y NleB, en particular, son esenciales para la virulencia de los patógenos asociados a la lesión A/E, los cuales median la adherencia de VTEC al epitelio intestinal y modulan diversas funciones de la célula hospedadora, como el transporte de iones, la permeabilidad epitelial, y la inflamación (García-Angulo *et al.*, 2012; Deng *et al.*, 2017). Los genes codificantes de estos efectores Nle, denominados *nle*, están ubicados en diferentes PAI distribuidas en el cromosoma bacteriano (Deng *et al.*, 2004; Tobe *et al.*, 2006; Wickham *et al.*, 2006).

1.2.3.2. Islas de patogenicidad

Las islas de patogenicidad (PAI) son un subgrupo de islas genómicas que portan genes de virulencia y están presentes en los genomas de bacterias patógenas pero ausentes en los de especies no patógenas. Las PAI constituyen un pool génico dinámico, contribuyen a la evolución y a la virulencia de los microorganismos y pueden ser usadas como “marcas” genéticas de patógenos emergentes. Estas regiones genómicas albergan uno o más genes que están vinculados a la virulencia y asociados a elementos genéticos móviles, como los elementos de inserción, y contienen genes de movilidad, como los de integrasas, que frecuentemente se encuentran al principio de la isla (Schmidt y Hensel, 2004; Coombes *et al.*, 2008). En cepas VTEC se han encontrado, además del LEE, otras PAI potenciales, como por ejemplo OI-36, OI-57, OI-122 y OI-71. En las mismas se encuentran genes “efectores no codificados en LEE” (*nle*) que codifican sustratos translocados del SSTIII (Coombes *et al.*, 2008; Konczy *et al.*, 2008; Bugarel *et al.*, 2010a). El *screening* genético de los efectores secretados por el SSTIII indica que algunos de los Nle contribuyen a la colonización y persistencia en el ganado tanto de VTEC O157 como no-O157 (Dziva *et al.*, 2004; van Diemen *et al.*, 2005). Esta información tiene importantes implicancias en lo que a salud pública se refiere ya que la persistencia de cepas en la población animal, aumenta las posibilidades de transmisión zoonótica y ambiental (Coombes *et al.*, 2008). Estos autores (*l. cit.*) identificaron 14 genes que son más prevalentes en cepas asociadas con enfermedad en humanos e informaron sobre el efecto aditivo de los genes *nle* para contribuir a la severidad de la enfermedad.

Durante muchos años, y debido a que gran parte de las cepas VTEC asociadas a enfermedad, incluyendo las O157, portan la isla de patogenicidad LEE, se ha considerado la presencia de la misma, en particular del gen *eae*, como factor de riesgo, o marcador de cepas de mayor virulencia. Sin embargo, un gran número de cepas VTEC que carecen de LEE (denominadas LEE-negativas) son capaces de causar enfermedad severa como, por ejemplo, las pertenecientes a los serotipos O91:H21, O113:H21 y O174:H21 que han sido aisladas en brotes

y casos esporádicos de SUH (Girardeau *et al.*, 2005; Gyles, 2007; Bielaszewska *et al.*, 2011). Debido a esto, actualmente se considera que la presencia de la región LEE no sería esencial para la patogénesis, o bien, sus funciones estarían reemplazadas por otros factores en cepas LEE-negativas.

En la actualidad, los estudios de comparación genómica junto con la evaluación del contenido de las islas de patogenicidad y la identificación de los genes de virulencia que estas islas codifican, han ofrecido una nueva herramienta que permite determinar el potencial riesgo para la salud pública asociado a las cepas de VTEC. Basándose en esto último, Coombes *et al.* (2008) han propuesto el concepto de "Evaluación del Riesgo Molecular" (MRA -*molecular risk assessment*-) como estrategia para identificar cepas de VTEC que poseen un alto riesgo para la salud pública, debido a que, hasta ahora, no es posible diferenciar con certeza serotipos VTEC de alto riesgo, de aquellos que no serían riesgosos para el hombre (Coombes *et al.*, 2008). Ello ha quedado demostrado en el último gran brote causado por VTEC, que comenzó en el norte de Alemania y se extendió a otros 15 países de Europa en 2011, generado a partir del consumo de brotes de fenogreco contaminados con *E. coli* perteneciente al serotipo O104:H4 (Blaser, 2011).

1.2.4. Filogenia y tipificación de VTEC

En las poblaciones bacterianas se producen intercambios genéticos, que involucran movilización y recombinación de segmentos del genoma entre linajes y especies. La contribución relativa de la recombinación en la generación de nuevos genotipos bacterianos varía entre las poblaciones bacterianas y, a medida que aumenta, la clonalidad de una población dada disminuye. El análisis de aislamientos bacterianos, que representan a la población natural, mediante la determinación de la secuencia de nucleótidos de múltiples *loci housekeeping*, proporciona información que puede utilizarse tanto para investigar la estructura poblacional como para caracterizar molecularmente a los aislamientos (Spratt, 1999).

La caracterización de aislamientos patógenos es fundamental para muchos aspectos de la epidemiología bacteriana, la cual tiene como objetivo responder dos tipos de preguntas principales. Por un lado, responder a preguntas epidemiológicas a corto plazo, por ejemplo, determinar las relaciones entre aislamientos provenientes de un brote. Y, por otro lado, en relación a la epidemiología global o a largo plazo, responder sobre cómo las cepas que causan enfermedad en un área geográfica se relacionan a aquellas aisladas en el resto del mundo. En este último caso, el objetivo es la identificación de grupos poblacionales, abordando las relaciones entre cepas aisladas durante largos períodos de tiempo y, a menudo, en un rango geográfico amplio. A este nivel, la epidemiología debe ser capaz de trazar la dispersión de líneas

clonales geográfica y temporalmente, distinguiendo las diferencias que van surgiendo en el proceso de dispersión. En este caso se requieren de métodos altamente discriminativos que analicen variaciones que se acumulan lentamente en los genomas. Uno de estos métodos es la tipificación de secuencias de múltiples *loci* o MLST, el cual estudia variaciones alélicas en genes *housekeeping* (Spratt, 1999; Spratt y Maiden, 1999; Vázquez y Berrón, 2004).

Por otro lado, la transferencia genética horizontal (TGH) entre bacterias también juega un rol muy importante en la generación de variabilidad genética y la evolución de bacterias patógenas, lo que permite a las especies sobrevivir y adaptarse rápidamente a variaciones ambientales. En esta transferencia están involucrados plásmidos y otros elementos genéticos móviles que contienen, por ejemplo, genes de resistencia a antibióticos o genes de virulencia. La diseminación de los genes de virulencia mediante este mecanismo les permite a las cepas no virulentas evolucionar a la variante patogénica, por ejemplo, a través de la adquisición de islas de patogenicidad (Kelly *et al.*, 2009). La aparición de resistencia a un antibiótico y de mutantes que evitan la inmunidad inducida por una vacuna son fenómenos evolutivos que ocurren en poblaciones bacterianas. Comprender la estructura y dinámica de estas poblaciones permite el diseño de políticas de salud pública efectivas (Spratt y Maiden, 1999).

La diversidad genética de VTEC no sólo existe entre serotipos, sino también dentro de un mismo serotipo. La clasificación de serotipos VTEC utilizando métodos filogenéticos ha mostrado, además, que algunos serotipos se agrupan de acuerdo a su impacto en salud pública (Whittam, 1998). Uno de estos métodos es MLST, el cual se basa en el análisis de secuencias de genes que codifican enzimas relacionadas con el metabolismo celular. El uso de estos genes, no sometidos a presión selectiva, permite detectar variaciones neutras que definen líneas clonales relativamente estables (Foley *et al.*, 2009). MLST es una técnica molecular de aplicación en epidemiología global o a largo plazo, y si bien, no puede ser recomendado como un test definitivo para predecir virulencia, sí puede contribuir a establecer el riesgo que pueden presentar algunos aislamientos para la salud pública, antes de que puedan realizarse análisis más detallados en relación a sus factores de virulencia (Ziebell *et al.*, 2008).

CAPÍTULO II

SECCIONES EXPERIMENTALES

SECCIÓN EXPERIMENTAL I

Detección de genes putativos de virulencia ubicados en Islas de Patogenicidad en cepas de Escherichia coli verotoxigénico no-O157:H7

2.1.1. INTRODUCCIÓN

Como ya se describió previamente, el serotipo VTEC mayormente asociado con enfermedad en seres humanos es O157:H7, pero hay más de cien serotipos no-O157 que también pueden estar asociados con casos clínicos. Algunos pueden causar brotes y enfermedad grave, mientras que otros sólo se asocian con una secuela leve o no poseen ninguna relación con enfermedad en el hombre (Coombes *et al.*, 2008; Gould *et al.*, 2013). Esta observación dio como resultado una clasificación de VTEC en seropatotipos (SPT), propuesta por Karmali *et al.* (2003), la cual se basa en la asociación del serotipo con enfermedades como el SUH y brotes en seres humanos. Los serotipos responsables de CH y SUH, O157:H7 y O157:NM, fueron asignados al SPT A. Cepas pertenecientes al SPT B (O26:H11, O103:H2, O111:NM, O121:H19 y O145:NM) tienen una fuerte asociación con brotes y SUH, pero con menor frecuencia que aquellas del SPT A. Serotipos del SPT C (O91:H21, O104:H21, O113:H21, O5:NM, O121:NM y O165:H25) se asocian con casos esporádicos de SUH pero no con brotes. El SPT D se asocia con diarrea pero no con SUH y/o brotes. Los serotipos del SPT E comprenden cepas VTEC que nunca se han asociado con enfermedades en seres humanos y que han sido aisladas sólo de animales (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación de serotipos VTEC dentro de seropatotipos (extraído y adaptado de Karmali *et al.*, 2003).

SPT	Incidencia relativa	Frecuencia de aislamiento en brotes	Asociación con enfermedad severa ^a	Serotipos
A	Alta	Frecuente	Si	O157:H7, O157:NM
B	Moderada	Poco frecuente	Si	O26:H11, O103:H2, O111:NM, O121:H19, O145:NM
C	Baja	Raro	Si	O91:H21, O104:H21, O113:H21, otros
D	Baja	Raro	No	Múltiples
E	Sólo cepas no-humanas	N.A. ^b	N.A.	Múltiples

^a SUH o CH.

^b N.A., no aplica.

La composición genética de muchos microorganismos es muy variable, incluso dentro de una misma especie, debido en parte a la transferencia horizontal de genes. Estas diferencias pueden ser usadas para distinguir cepas entre sí o subtipificarlas. Múltiples genes, como los asociados con virulencia y con resistencia a antimicrobianos, pueden analizarse mediante PCR. La presencia o ausencia de genes, analizada como datos binarios, permite generar perfiles de virulencia y llevar a cabo análisis genéticos (Foley *et al.*, 2009).

Los factores de virulencia bacteriana están predominantemente codificados o asociados con elementos genéticos móviles (EGM), tales como fagos, plásmidos, elementos de inserción o transposones. Un importante número de estos factores se encuentran codificados dentro de islas de patogenicidad (PAI), que pueden intercambiarse entre diferentes especies bacterianas, y ser estabilizadas por presión selectiva, lo que lleva a variantes patógenas (Schmidt y Hensel, 2004). Muchos estudios demuestran que las diferencias en la virulencia entre cepas bacterianas patógenas y no patógenas pueden atribuirse, en parte, a genes de virulencia ubicados en las PAI (Karmali *et al.*, 2003; Ju *et al.*, 2013). Algunas cepas de *Escherichia coli* patógenas utilizan el sistema de secreción de tipo III (SSTIII), codificado en la isla de patogenicidad LEE, para translocar un amplio repertorio de proteínas efectoras dentro de la célula huésped con el fin de alterar las cascadas de señalización celular y promover la colonización y supervivencia bacteriana. Los genes que codifican para el SSTIII están ubicados en la isla LEE y dispersos en el cromosoma. Pero además de estos genes, existe una gran cantidad de efectores que no están codificados en LEE (genes *nle*, codificantes del SSTIII), sino en otras PAI, los cuales se han identificado en cepas responsables de infecciones humanas (Deng *et al.*, 2004; Tobe *et al.*, 2006; Wickham *et al.*, 2006). Estos genes están involucrados en diversas funciones dentro de la célula huésped, contribuyendo a la colonización y a la virulencia de estas bacterias patógenas, incluidas actividades antiapoptóticas, interrupción de la respuesta inmune innata del huésped, aumento de la permeabilidad celular, bloqueo de la división celular, desorganización del citoesqueleto (microtúbulos) e inhibición de la fagocitosis, entre otros (García-Angulo *et al.*, 2012). Una evaluación del riesgo molecular (MRA), propuesta por Coombes *et al.* (2008) y basada en la evaluación del contenido de los genes *nle*, es utilizada para predecir e identificar aquellas cepas VTEC que presentan un riesgo significativo para la salud humana (Coombes *et al.*, 2008; Konczyk *et al.*, 2008; Bugarel *et al.*, 2010a; 2010b).

Además de la producción de VT, el fenotipo de adhesión y borrado codificado en LEE y

la presencia de otras O-islas genómicas (OI) diferentes de LEE, como OI-57, OI-71 y OI-122, están significativamente asociadas a tipos de VTEC involucrados en brotes y casos de colitis hemorrágica y SUH (Karmali *et al.*, 2003; Coombes *et al.*, 2008; Konczy *et al.*, 2008; Bugarel *et al.*, 2010b).

La OI-57 contiene los genes *nleG2-3*, *nleG5-2* y *nleG6-2* en EDL933 (Coombes *et al.*, 2008; Imamovic *et al.*, 2010). Las proteínas NleG son ubiquitina ligasas. Aunque las funciones exactas de las proteínas NleG2-3, NleG5-2 y NleG6-2 no se conocen con exactitud, se han identificado proteínas similares como efectores que suprimen la respuesta inmune del huésped (Wu *et al.*, 2010).

La OI-122 consiste en diferentes módulos (Figura 1), separados por elementos genéticos móviles, y se encuentra ausente en cepas de *E. coli* no patógenas (Wickham *et al.*, 2006; Konczy *et al.*, 2008). Esta isla de patogenicidad tiene, al menos, seis marcos de lectura abiertos (ORF), que muestran una homología significativa con genes de virulencia ya descritos. El ORF Z4321 es homólogo a *pagC* de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium; ORF Z4326 es homólogo al gen *sen* de *Shigella flexneri*; los ORFs Z4328 y Z4329 son homólogos a los genes efectores no-LEE (*nle*), *nleB* y *nleE* de *Citrobacter rodentium*; y los ORF Z4332 y Z4333 son homólogos a factores de adherencia de *E. coli* enterohemorrágico (EHEC) codificados en los genes *efal* y *efa2* identificados en O157:H7 (Karmali *et al.*, 2003; Morabito *et al.*, 2003; Konczy *et al.*, 2008). Wickham *et al.* (2006) han descrito una disposición modular de los genes de OI-122 en cepas VTEC no-O157 en función de su asociación a SUH: el módulo 1 contiene Z4318, *pagC* y Z4322; el módulo 2 contiene Z4323, *sen*, *nleB* y *nleE*; y el módulo 3 contiene el grupo de genes *efa*. La presencia de transposasas putativas en OI-122 ha llevado a la hipótesis de que sus elementos se adquieren o se pierden de manera modular. Se demostró que, mientras *pagC*, Z4322, *sen*, *nleB*, *nleE* y *efal* individualmente fueron más prevalentes en VTEC no-O157 asociado a SUH, la presencia simultánea de todos estos genes fortaleció la asociación con enfermedad grave (Buvens y Piérard, 2012).

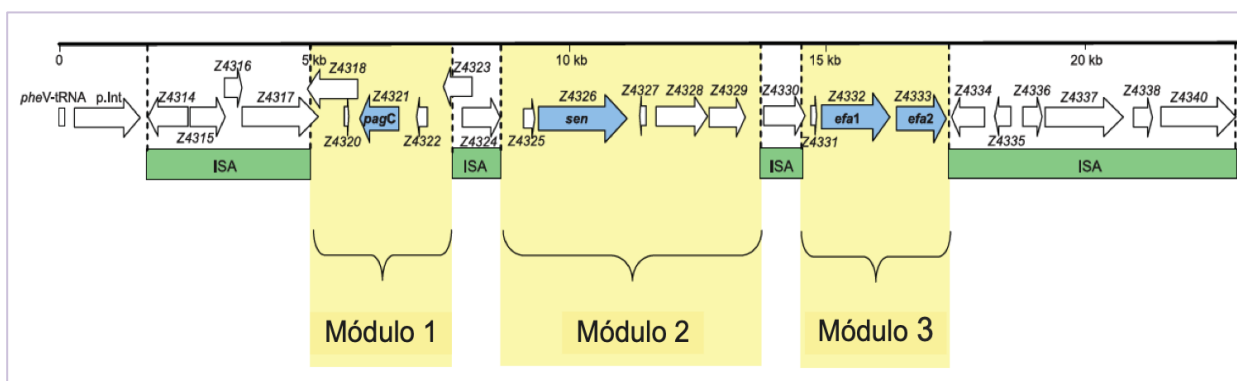


Figura 1. Componentes modulares de la OI-122. ISA, elementos genéticos asociados a secuencias de inserción (o transposasas putativas) entre los tres módulos. Los genes marcadores de la presencia de los módulos se indican en color azul (extraído y adaptado de Konczy *et al.*, 2008).

La red EFSA (*European Food Safety Authority*) concluyó recientemente que la clasificación en SPT no define a una cepa VTEC como patógena ni proporciona una lista exhaustiva de los serotipos patógenos (Franz *et al.*, 2015). Esto se relaciona, principalmente, con lo complejo que resulta designar cepas individuales como patógenos, debido a la gran variedad de serotipos y del contenido genético asociado con enfermedad. Existe evidencia que sugiere que la patogénesis de la infección de VTEC implica muchos factores de virulencia adicionales además de las VT y del LEE, incluyendo efectores codificados en islas de patogenicidad diferentes del LEE (Coombes *et al.*, 2008; Bolton, 2011). Además, existen diferencias considerables en la distribución geográfica de los serogrupos de cepas VTEC patógenas y falta de conocimiento sobre la distribución de los factores de virulencia entre los aislamientos (Franz *et al.*, 2015). Por lo cual, la naturaleza dinámica de la virulencia de VTEC en tiempo y espacio presenta una limitación en la clasificación en SPT como un indicador predictivo único del riesgo microbiano (Coombes *et al.*, 2011). En relación a esto, Karmali *et al.* (2003) propusieron agrupar las cepas de VTEC en los 5 SPT de acuerdo, no sólo con sus frecuencias reportadas en enfermedades humanas, su asociación con brotes y enfermedad grave, sino también con la presencia de las islas de patogenicidad LEE y OI-122. Si bien, casi todas las cepas O157:H7/H- portan una OI-122 completa (COI-122), se observó una disminución progresiva de la prevalencia de los genes de esta isla en cepas VTEC no-O157 pertenecientes a los SPT del B al E, con una asociada disminución de la patogenicidad.

Hasta la fecha, pocos estudios han investigado la presencia de PAI diferentes de LEE en VTEC. Dado que las PAI pueden servir como marcadores útiles para distinguir cepas altamente virulentas de cepas menos virulentas, el objetivo de este estudio fue investigar la prevalencia y la distribución de cuatro PAI en aislamientos VTEC nativos obtenidos de casos clínicos, de

alimentos y de bovino.

2.1.2. OBJETIVOS

- Analizar la distribución y combinación de genes *nle* ubicados en islas de patogenicidad que codifican efectores del sistema de secreción tipo III (OI-36, OI-57, OI-71 y OI-122) en cepas VTEC nativas.

- Analizar la distribución de genes putativos de virulencia, marcadores de la isla de patogenicidad OI-122 para la clasificación de VTEC en seropatotipos.

2.1.3. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1.3.1. Aislamientos estudiados

Un total de 204 aislamientos VTEC pertenecientes a 52 serotipos no-O157 fueron caracterizados en relación a la distribución de genes de virulencia presentes en PAI. Los aislamientos, almacenados a -70 °C con un 20% v/v de glicerol, forman parte de la colección de cepas del Laboratorio de Inmunoquímica y Biotecnología (FCV-UNCPBA), y fueron aislados en Argentina, entre 1995 y 2014. Doce aislamientos se obtuvieron de casos clínicos, 73 de alimentos cárnicos + dos de vegetales y 117 de ganado bovino. Todos fueron previamente caracterizados en nuestro laboratorio en relación a genes codificantes de verotoxinas 1 y 2 (*vtx₁* y *vtx₂*), intimina (*eae*), enterohemolisina (*ehxA*), adhesina autoaglutinante (*saa*) y citotoxina subtilasa (*subA*) (Sanz *et al.*, 1998; Parma *et al.*, 2000; Blanco *et al.*, 2004; Padola *et al.*, 2004; Lucchesi *et al.*, 2006; Sanz *et al.*, 2007; Rivero *et al.*, 2010; Sanso *et al.*, 2015; González *et al.*, 2017) (Tabla 2). Los aislamientos fueron clasificados en seropatotipos (SPT), del A al E, según su serotipo, de acuerdo al criterio descripto por Karmali *et al.* (2003) y en base a información disponible en publicaciones previas (Karmali *et al.*, 2003; Toma *et al.*, 2004; Ju *et al.*, 2013).

Tabla 2. Aislamientos no-O157:H7 analizados en relación a genes de virulencia ubicados en PAI.

SEROTIPO	AISLAMIENTO	Nro. de aislamiento	ORIGEN ^a	Año de aislamiento	Perfil de virulencia ^b
02:H5	AM 166-1	1	Bovino M	1996	<i>vtx₂, saa, subA</i>
02:NM	HT 6-15	2	Hamburguesa	1997	<i>vtx₂</i>
05:NM	T 246-5	3	Ternero	1995-1996	<i>vtx₁, eae, ehxA</i>
05:NM	T 68-1	4	Ternero	1995-1996	<i>vtx₁, eae, ehxA</i>
05:NM	T 249-5	5	Ternero	1995-1996	<i>vtx₁, eae, ehxA</i>
05:NM	T 250-5	6	Ternero	1995-1996	<i>vtx₁, eae, ehxA</i>

08:H16	CM 15-2	7	Carne picada	1998	<i>vtx1, saa</i>
08:H16	CM 15-1	8	Carne picada	1998	<i>vtx1, saa</i>
08:H16	FO 164	9	Bovino F	2001	<i>vtx1, saa</i>
08:H19	03M	10	Carne picada	2003	<i>vtx1, vtx2, ehxA</i>
08:H19	07M	11	Carne picada	2003	<i>vtx2, ehxA</i>
08:H19	30M	12	Carne picada	2003	<i>vtx2, ehxA</i>
08:H19	33M	13	Carne picada	2003	<i>vtx2, ehxA</i>
08:H19	44M	14	Carne picada	2003	<i>vtx2, ehxA</i>
08:H19	47M	15	Carne picada	2003	<i>vtx2, ehxA</i>
08:H19	48M	16	Carne picada	2003	<i>vtx2, ehxA</i>
08:H19	51M	17	Carne picada	2003	<i>vtx2, ehxA</i>
08:H19	CM 2-4	18	Carne picada	1998	<i>vtx2, ehxA</i>
015:H21	FB 11	19	Bovino F	2000	<i>vtx2</i>
020:H7	AM 216-1	20	Bovino M	1996	<i>vtx1, vtx2</i>
020:H7	AM 209-1	21	Bovino M	1996	<i>vtx1, vtx2</i>
020:H19	HT 6-2	22	Hamburguesa	1997	<i>vtx2</i>
020:H19	T 22-1	23	Ternero	1995-1996	<i>vtx1, vtx2</i>
020:H19	HT 1-6	24	Hamburguesa	1997	<i>vtx1, vtx2, ehxA, saa, subA</i>
020:H19	AM 114-1	25	Bovino M	1996	<i>vtx1, vtx2, ehxA, saa, subA</i>
020:H19	AP 28-1	26	Bovino P	1995	<i>vtx2, ehxA, saa, subA</i>
020:H19	FO 112	27	Bovino F	2001	<i>vtx1, vtx2, ehxA, saa, subA</i>
020:H19	T 22-2	28	Ternero	1995-1996	<i>vtx1, vtx2, ehxA, saa</i>
020:HNT	T 250-4	29	Ternero	1995-1996	<i>vtx1, eae, ehxA</i>
022:H8	36M	30	Carne picada	2003	<i>vtx2</i>
022:H8	HW 1-3	31	Hamburguesa	1997	<i>vtx1, vtx2, ehxA, saa</i>
022:H8	HW 1-15	32	Hamburguesa	1997	<i>vtx1, vtx2, ehxA, saa</i>
025:H19	FB 68	33	Bovino F	2000	<i>vtx2, ehxA</i>
026:H11	224.2.2	34	Humano CH	2002-2009	<i>vtx1, eae, ehxA</i>
026:H11	323.5.1	35	Humano SUH	2002-2009	<i>vtx1, eae, ehxA</i>
026:H11	T 246-6	36	Ternero	1995-1996	<i>vtx1, eae, ehxA</i>
026:H11	T 130-1	37	Ternero	1995-1996	<i>vtx1, eae, ehxA</i>
026:H11	T 129-1	38	Ternero	1995-1996	<i>vtx1, eae, ehxA</i>
026:H11	T 125-1	39	Ternero	1995-1996	<i>vtx1, eae, ehxA</i>
026:H11	T 59-2	40	Ternero	1995-1996	<i>vtx2, eae, ehxA</i>
026:H11	T 8-1	41	Ternero	1995-1996	<i>vtx2, eae, ehxA</i>
038:H39	T 246-1	42	Ternero	1995-1996	<i>vtx1, eae, ehxA</i>
039:H49	AM 169-3	43	Bovino M	1996	<i>vtx1, vtx2, ehxA, saa, subA</i>
039:H49	AM 165-1	44	Bovino M	1996	<i>vtx2, ehxA, saa, subA</i>
039:H49	AM 162-1	45	Bovino M	1996	<i>vtx2, ehxA, saa, subA</i>
079:H19	16M	46	Carne picada	2003	<i>vtx2, ehxA, saa, subA</i>
079:H19	27M	47	Carne picada	2003	<i>vtx2, ehxA, saa, subA</i>
079:H19	AM 168-3	48	Bovino M	1996	<i>vtx2, ehxA, saa, subA</i>
088:H21	HW 1-7	49	Hamburguesa	1997	<i>vtx1, vtx2, ehxA, saa</i>
091:H21	HAB 14	50	Hamburguesa	1997	<i>vtx2, ehxA, saa</i>
091:H21	AP 16-1	51	Bovino P	1995	<i>vtx2, ehxA, saa</i>
091:H21	FO 135	52	Bovino F	2001	<i>vtx2, ehxA, saa</i>
091:H21	FO 130	53	Bovino F	2001	<i>vtx2, ehxA, saa</i>
0103:NM	AM 202-2	54	Bovino M	1996	<i>vtx2, eae, ehxA</i>
0103:NM	T 46-6	55	Ternero	1995-1996	<i>vtx1, vtx2, eae, ehxA</i>
0103:H2	FB 94	56	Bovino F	2000	<i>vtx1, eae, ehxA</i>
0111:H2	73.2.2	57	Humano D	2002-2009	<i>vtx1, eae, ehxA</i>
0111:NM	T 9-1	58	Ternero	1995-1996	<i>vtx1, eae, ehxA</i>
0112:H2	02M	59	Carne picada	2003	<i>vtx2</i>
0113:NM	15M	60	Carne picada	2003	<i>vtx2</i>
0113:NM	17M	61	Carne picada	2003	<i>vtx2</i>
0113:NM	18M	62	Carne picada	2003	<i>vtx2</i>
0113:NM	19M	63	Carne picada	2003	<i>vtx2</i>
0113:NM	20M	64	Carne picada	2003	<i>vtx2</i>
0113:NM	22M	65	Carne picada	2003	<i>vtx2</i>

0113:NM	23M	66	Carne picada	2003	<i>vtx₂</i>
0113:NM	24M	67	Carne picada	2003	<i>vtx₂</i>
0113:NM	25M	68	Carne picada	2003	<i>vtx₂</i>
0113:NM	28M	69	Carne picada	2003	<i>vtx₂</i>
0113:H21	HT 7-14	70	Hamburguesa	1997	<i>vtx₂</i>
0113:H21	FO 165	71	Bovino F	2001	<i>vtx₂</i>
0113:H21	FC 103	72	Bovino F	2001	<i>vtx₂</i>
0113:H21	05M	73	Carne picada	2003	<i>vtx₂, ehxA, saa, subA</i>
0113:H21	BE 2-3	74	Bandeja de eviscerado	1995	<i>vtx₂, ehxA, saa, subA</i>
0113:H21	AP 97-3	75	Bovino P	1995	<i>vtx₂, ehxA, saa, subA</i>
0116:H21	CM 3-18	76	Carne picada	1998	<i>vtx₂, ehxA, saa</i>
0117:H7	08M	77	Carne picada	2003	<i>vtx₂</i>
0117:H7	01M	78	Carne picada	2003	<i>vtx₂</i>
0117:H7	HT 2-2	79	Hamburguesa	1997	<i>vtx₂</i>
0117:H7	AP 32-1	80	Bovino P	1995	<i>vtx₂</i>
0117:H7	FC 146	81	Bovino F	2001	<i>vtx₂</i>
0117:H7	AM 214-1	82	Bovino M	1996	<i>vtx₂</i>
0117:H7	FT 156	83	Bovino F	2002	<i>vtx₂</i>
0117:H7	FC 149	84	Bovino F	2002	<i>vtx₂</i>
0118:H2	306.10.3	85	Humano D	2002-2009	<i>vtx₁, eae, ehxA, subA</i>
0118:H16	T 250-2	86	Ternero	1995-1996	<i>vtx₁, eae, ehxA</i>
0120:H19	FS 151	87	Bovino F	2002	<i>vtx₂, ehxA, saa</i>
0121:H19	299	88	Humano CH	2002-2009	<i>vtx₂, eae, ehxA, subA</i>
0128:NM	430.3.3	89	Humano portador	2002-2009	<i>vtx₂, eae, ehxA</i>
0141:H7	AM 167-1	90	Bovino M	1996	<i>vtx₁, vtx₂, ehxA, saa, subA</i>
0141:H8	AP 31-1	91	Bovino P	1995	<i>vtx₁, vtx₂, ehxA, saa</i>
0141:H8	AP 21-1	92	Bovino P	1995	<i>vtx₂, ehxA, saa, subA</i>
0145:NM	3.1.2	93	Humano CH	2002-2009	<i>vtx₂, eae, ehxA</i>
0145:NM	74.2	94	Humano SUH	2002-2009	<i>vtx₂, eae, ehxA</i>
0145:NM	181.2.4	95	Humano CH	2002-2009	<i>vtx₂, eae, ehxA</i>
0145:NM	355	96	Humano D	2002-2009	<i>vtx₂, eae, ehxA</i>
0145:NM	506.1.5.2	97	Humano CH	2002-2009	<i>vtx₂, eae, ehxA</i>
0145:NM	512.4.5.1	98	Humano CH	2002-2009	<i>vtx₂, eae, ehxA</i>
0145:NM	FB 97	99	Bovino F	2000	<i>vtx₁, eae, ehxA</i>
0145:NM	FB 73	100	Bovino F	2000	<i>vtx₁, eae, ehxA</i>
0145:NM	FB 5	101	Bovino F	2000	<i>vtx₂, eae, ehxA</i>
0145:NM	FB 13	102	Bovino F	2000	<i>vtx₂, eae, ehxA</i>
0145:NM	FB 79	103	Bovino F	2000	<i>vtx₁, eae, ehxA</i>
0145:NM	FB 67e	104	Bovino F	2000	<i>vtx₁, eae, ehxA</i>
0145:NM	FB 87	105	Bovino F	2000	<i>vtx₂, eae, ehxA</i>
0145:NM	FB 92	106	Bovino F	2000	<i>vtx₂, eae, ehxA</i>
0145:NM	FB 78	107	Bovino F	2000	<i>vtx₁, eae</i>
0145:NM	FB 91	108	Bovino F	2000	<i>vtx₂, eae, ehxA</i>
0145:NM	FB 81e	109	Bovino F	2000	<i>vtx₂, eae</i>
0145:NM	AMB 166	110	Bovino M	1996	<i>vtx₂, eae, ehxA</i>
0146:NM	FB 32	111	Bovino F	2000	<i>vtx₂, eae, ehxA</i>
0146:H21	FB 12	112	Bovino F	2000	<i>vtx₂, eae</i>
0162:H7	EN 1-4	113	Hamburguesa	1997	<i>vtx₂</i>
0165:NM	T 83-1	114	Ternero	1995-1996	<i>vtx₂, eae, ehxA</i>
0171:HNT	10M	115	Carne picada	2003	<i>vtx₂</i>
0171:H2	CM 20-7	116	Carne picada	1998	<i>vtx₂</i>
0171:H2	FO 140	117	Bovino F	2001	<i>vtx₂</i>
0171:H2	FB 38	118	Bovino F	2000	<i>vtx₂</i>
0171:H2	FB 27	119	Bovino F	2000	<i>vtx₂</i>
0171:H2	AM 203-3	120	Bovino M	1996	<i>vtx₂</i>
0171:H2	AM 217-1	121	Bovino M	1996	<i>vtx₂</i>
0171:H2	FB 58	122	Bovino F	2000	<i>vtx₂</i>
0171:H2	AM 200-2	123	Bovino M	1996	<i>vtx₂</i>
0171:H2	FB 8	124	Bovino F	2000	<i>vtx₂</i>

0171:H2	FB 49	125	Bovino F	2000	<i>vtx₂</i>
0171:H2	AM 174-1	126	Bovino M	1996	<i>vtx₂</i>
0171:NM	FB 1	127	Bovino F	2000	<i>vtx₂</i>
0171:NM	FB 21	128	Bovino F	2000	<i>vtx₂</i>
0171:NM	45M	129	Carne picada	2003	<i>vtx₂</i>
0171:NM	49M	130	Carne picada	2003	<i>vtx₂</i>
0174:H21	53M	131	Carne picada	2003	<i>vtx₂</i>
0174:H21	54M	132	Carne picada	2003	<i>vtx₂</i>
0174:H21	55M	133	Carne picada	2003	<i>vtx₂</i>
0174:H21	56M	134	Carne picada	2003	<i>vtx₂</i>
0174:H21	57M	135	Carne picada	2003	<i>vtx₂</i>
0174:H21	CM 25-12	136	Carne picada	1998	<i>vtx₂</i>
0174:H21	FB 10	137	Bovino F	2000	<i>vtx₂</i>
0174:H21	FC 101	138	Bovino F	2001	<i>vtx₂</i>
0174:H21	FO 122	139	Bovino F	2001	<i>vtx₂</i>
0174:H21	FB 31	140	Bovino F	2000	<i>vtx₁</i>
0174:H21	FB 33	141	Bovino F	2000	<i>vtx₂</i>
0174:H21	AM 178-2	142	Bovino M	1996	<i>vtx₂</i>
0174:H21	AM 174-2	143	Bovino M	1996	<i>vtx₂</i>
0174:H21	AM 170-3	144	Bovino M	1996	<i>vtx₁, vtx₂, ehxA, saa</i>
0174:H21	T 186-3	145	Ternero	1995-1996	<i>vtx₂</i>
0175:H8	FB 40	146	Bovino F	2000	<i>vtx₂</i>
0175:H8	FB 46	147	Bovino F	2000	<i>vtx₂</i>
0177:NM	T 186-6	148	Ternero	1995-1996	<i>vtx₂, eae, ehxA</i>
0177:NM	FB 15	149	Bovino F	2000	<i>vtx₂, eae, ehxA</i>
0177:NM	FO 127-3	150	Bovino F	2001	<i>vtx₂, eae, ehxA</i>
0178:H19	RE1-5	151	Remolacha	2014	<i>vtx₂, ehxA, subA</i>
0178:H19	11M	152	Carne picada	2003	<i>vtx₂</i>
0178:H19	13M	153	Carne picada	2003	<i>vtx₂</i>
0178:H19	14M	154	Carne picada	2003	<i>vtx₂</i>
0178:H19	FC 104	155	Bovino F	2001	<i>vtx₂</i>
0178:H19	FO 143	156	Bovino F	2001	<i>vtx₂</i>
0178:H19	41M	157	Carne picada	2003	<i>vtx₂, ehxA, saa, subA</i>
0178:H19	42M	158	Carne picada	2003	<i>vtx₂, ehxA, saa, subA</i>
0185:H7	CM 22-1	159	Carne picada	1998	<i>vtx₂</i>
ONT:H7	38M	160	Carne picada	2003	<i>vtx₂</i>
ONT:H7	39M	161	Carne picada	2003	<i>vtx₂</i>
ONT:H7	52M	162	Carne picada	2003	<i>vtx₂</i>
ONT:H7	58M	163	Hamburguesa	2003	<i>vtx₂</i>
ONT:H7	43M	164	Carne picada	2003	<i>vtx₂, ehxA, saa, subA</i>
ONT:H8	AM 159-1	165	Bovino M	1996	<i>vtx₁</i>
ONT:H8	HW 1-2	166	Hamburguesa	1997	<i>vtx₁, vtx₂, ehxA, saa, subA</i>
ONT:H19	29M	167	Carne picada	2003	<i>vtx₂, ehxA, saa</i>
ONT:H19	64M	168	Carne picada	2003	<i>vtx₁, vtx₂, ehxA, saa</i>
ONT:H19	40M	169	Carne picada	2003	<i>vtx₂, ehxA, saa</i>
ONT:H21	09M	170	Carne picada	2003	<i>vtx₂</i>
ONT:H21	65M	171	Carne picada	2003	<i>vtx₂</i>
ONT:H21	CM 6-3F	172	Carne picada	1998	<i>vtx₂</i>
ONT:H21	AM 219-1	173	Bovino M	1996	<i>vtx₂</i>
ONT:H21	AM 173-1	174	Bovino M	1996	<i>vtx₂</i>
ONT:H21	AM 212-1	175	Bovino M	1996	<i>vtx₂</i>
ONT:H21	FO 120	176	Bovino F	2001	<i>vtx₂</i>
ONT:H21	FB 7	177	Bovino F	2000	<i>vtx₂</i>
ONT:H21	FB 16	178	Bovino F	2000	<i>vtx₂</i>
ONT:H21	FB 64	179	Bovino F	2000	<i>vtx₂</i>
ONT:H21	T 85-1	180	Ternero	1995-1996	<i>vtx₂</i>
ONT:H21	T 84-3	181	Ternero	1995-1996	<i>vtx₂</i>
ONT:H21	V 1-1	182	Bandeja de eviscerado	1995	<i>vtx₂, ehxA, saa</i>
ONT:H21	FO 111	183	Bovino F	2001	<i>vtx₁, vtx₂, ehxA, saa</i>

ONT:HNT	06M	184	Carne picada	2003	<i>vtx₂</i>
ONT:HNT	46M	185	Carne picada	2003	<i>vtx₂</i>
ONT:HNT	59M	186	Hamburguesa	2003	<i>vtx₂, ehxA, saa, subA</i>
ONT:HNT	HAB 5	187	Hamburguesa	1997	<i>vtx₂, ehxA, saa</i>
ONT:NMT	AM 210-1	188	Bovino M	1996	<i>vtx₂</i>
ONT:NMT	AM 204-1	189	Bovino M	1996	<i>vtx₂</i>
ONT:NMT	AM 207-2	190	Bovino M	1996	<i>vtx₂</i>
ONT:NMT	AM 197-1	191	Bovino M	1996	<i>vtx₂</i>
ONT:NMT	AM 198-1	192	Bovino M	1996	<i>vtx₂</i>
ONT:NMT	AM 215-1	193	Bovino M	1996	<i>vtx₂</i>
ONT:NMT	FB 50	194	Bovino F	2000	<i>vtx₂</i>
ONT:NMT	FB 86	195	Bovino F	2000	<i>vtx₂</i>
ONT:NMT	FB 56	196	Bovino F	2000	<i>vtx₂</i>
ONT:NMT	FB 17	197	Bovino F	2000	<i>vtx₂</i>
ONT:NMT	FB 70	198	Bovino F	2000	<i>vtx₂</i>
ONT:NMT	FB 6	199	Bovino F	2000	<i>vtx₂</i>
ONT:NMT	FB 82	200	Bovino F	2000	<i>vtx₂</i>
ONT:NMT	FB 65	201	Bovino F	2000	<i>vtx₂</i>
ONT:NMT	FB 45	202	Bovino F	2000	<i>vtx₂</i>
ONT:NMT	FT 155	203	Bovino F	2002	<i>vtx₂</i>
ONT:NMT	RE 1-3	204	Remolacha	2014	<i>vtx₁, vtx₂</i>

^a Bovino M, bovino adulto de matadero; Bovino P, bovino adulto de pastoreo; Bovino F, bovino adulto de *feedlot*; Humano: CH, diarrea con sangre; D, diarrea; SUH, síndrome urémico hemolítico.

^b Perfil de virulencia de acuerdo a los siguientes genes: *vtx₁*, *vtx₂*, *eae*, *ehxA*, *saa*, *subA*.

2.1.3.2. Detección de genes no codificados en LEE (*nle*)

Se amplificaron por PCR 16 genes efectores marcadores de virulencia codificados en 4 islas de patogenicidad diferentes a LEE: *nleB2*, *nleC*, *nleD*, *nleH1-1* (codificados en OI-36), *nleG2-3*, *nleG5-2*, *nleG6-2* (OI-57), *nleA*, *nleF*, *nleG*, *nleG2-1*, *nleG9*, *nleH1-2* (OI-71), y *nleB*, *nleE*, *ent/espL2* (OI-122) (Tabla 3).

Tabla 3. Genes putativos de virulencia codificados en las islas de patogenicidad (PAI) analizadas en este estudio.

PAI	Target	Proteína codificada o familia del efector ^a
OI-36	<i>nle B2</i>	Efector Nle de tipo III
	<i>nle C</i>	Inmunomodulación, zinc-metaloproteasa
	<i>nle H1-1</i>	Inmunomodulación
	<i>nle D</i>	Inmunomodulación, zinc-metaloproteasa
OI-57	<i>nle G2-3</i>	Ubiquitina ligasa
	<i>nle G5-2</i>	Ubiquitina ligasa
	<i>nle G6-2</i>	Ubiquitina ligasa
OI-71	<i>nle A</i>	Interrupción de uniones y del tráfico de proteínas

	<i>nle F</i>	Interrupción del tráfico de proteínas
	<i>nle G</i>	Ubiquitina ligasa
	<i>nle G2-1</i>	Ubiquitina ligasa
	<i>nle G9</i>	Ubiquitina ligasa
	<i>nle H1-2</i>	Inmunomodulación
OI-122	<i>nle B</i>	Inmunomodulación
	<i>nle E</i>	Inmunomodulación
	<i>ent/espL2</i>	Factor de agregación de actina-F y de formación de microcolonias

^a Descriptos por Coombes *et al.* (2008), Konczy *et al.* (2008) y Franz *et al.* (2015).

Las secuencias de los *primers* utilizados para la amplificación fueron las propuestas por Coombes *et al.* (2008) (Tabla 4). Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 25µl que contenía una solución de *buffer* 1x, 2 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTP, 6,25 pmol de cada *primer*, 0,5 U de ADN *Taq* polimerasa (InBio, Highway) y 3 µl de ADN. En la Tabla 7 se muestran las condiciones de termociclado utilizadas para la amplificación de los *nle*, las cuales fueron determinadas en Coombes *et al.* (2008). Luego de la corrida electroforética llevada a cabo en geles de agarosa, al 1,5% y 2%, teñidos con bromuro de etidio. Los productos de PCR se visualizaron por transiluminación con luz UV.

Tabla 4. *Primers* utilizados para la amplificación de los genes ubicados en PAI.

PAI	Gen target	Secuencia de <i>primers</i> 5'-3'	Tamaño del amplímero (pb)
OI-36	<i>nle B2</i>	Fw GTTAATACTAAGCAGCATCC RvCCATATCAAGATAGATACACC	475
	<i>nle C</i>	Fw ACAGTCCAACCTTCAACTTTTCC RvATCGTACCCAGCCTTTTCG	777
	<i>nle H1-1</i>	Fw GTTACCACCTTAAGTATCC Rv GTTCTCATGAACACTCC	456
	<i>nle D</i>	Fw GGTATTACATCAGTCATCAAGG RvTTGTGGAAAACATGGAGC	426
OI-57	<i>nle G2-3</i>	Fw GGATGGAACCATACTGG Rv CGCAATCAATTGCTAATGC	551
	<i>nle G5-2</i>	Fw TGGAGGCTTTACGTCATGTCTG Rv CCGGAACAAAGGTTTCACG	504
	<i>nle G6-2</i>	Fw CGGGTCAGTGGATGATATGAGC Rv AAGTAGCATCTAGCGGTCGAGG	424

OI-71	<i>nle A</i>	Fw ATGAACATTCAACCGACCATAC Rv GACTCTTGTCTTCTGGATTATATCAAA	1296
	<i>nle F</i>	Fw ATGTTACCAACAAGTGGTTCTTC Rv ATCCACATTGTAAAGATCCTTTGTT	567
	<i>nle G</i>	Fw ATGTTATCGCCCTCTTCTATAAAT Rv ACTTAATACTACACTAATAAGATCCA	902
	<i>nle G2-1</i>	Fw ACCAGAAACCTGACTTCG Rv CAGCATCTTCATATACTACAGC	406
	<i>nle G9</i>	Fw GTTCGTGCCCCGAATTGTAGC Rv CACCAACCAAACGAGAAAATG	409
	<i>nle H1-2</i>	Fw AACGCCTTATATTTTACC Rv AGCACAATTATCTCTTCC	589
OI-122	<i>nle B</i>	Fw GGAAGTTTGTTTACAGAGACG Rv AAAATGCCGCTTGATACC	297
	<i>nle E</i>	Fw GTATAACCAGAGGAGTAGC Rv GATCTTACAACAAATGTCC	260
	<i>ent/espL2</i>	Fw GAATAACAATCACTCCTCACC Rv TTACAGTGCCCGATTACG	233
	Z4321 (<i>pagC</i>)	Fw ATGAGTGGTTCAAGACTGG Rv CCAACTCCAACAGTAAATCC	521
	Z4326 (<i>sen</i>)	Fw GGATGGAACCATACCTGG Rv CGCAATCAATTGCTAATGC	551
	Z4332 (<i>efa1</i>)	Fw CTCCAGAGATAATTTTGAGG Rv CAACTGTATGCGAATAGTACTC	504
	Z4333 (<i>efa2</i>)	Fw CTGTCAGACGATGACATTGG Rv GAAGGATGGGCATTGTGTC	547

Tabla 5. Condiciones de termociclado utilizadas para la amplificación de genes *nle*.

Gen <i>target</i>	Temp./Tiempo de desnaturalización inicial (min)	Ciclos Temp./Tiempo (min)	Cantidad de ciclos	Temp./Tiempo de elongación final (min)
<i>nleB2, nleH1-2, nleE, ent/espL2</i>	94°C/05:00	Desnat. 94°C/00:30 Annealing 52°C/01:00 Elong. 72°C/02:30	30	72°C/10:00
<i>nleC, nleH1-1, nleD, nleG5-2, nleG6-2, nleG, nleG2-1, nleG9</i>	94°C/05:00	Desnat. 94°C/00:30 Annealing 55°C/01:00 Elong. 72°C/02:30	30	72°C/10:00
<i>nleG2-3</i>	94°C/05:00	Desnat. 94°C/00:30 Annealing 56°C/01:00 Elong. 72°C/02:30	30	72°C/10:00

<i>nleA, nleF, nleB</i>	94°C/05:00	Desnat. 94°C/00:30 Annealing 58°C/01:00 Elong. 72°C/02:30	30	72°C/5:00
-------------------------	------------	---	----	-----------

2.1.3.3. Detección de genes asociados a SPT y marcadores de la OI-122

Todos los aislamientos fueron analizados para determinar la presencia de la OI-122, de acuerdo a la evaluación de cuatro genes marcadores ubicados en 3 módulos de la isla, Z4321 (*pagC*), Z4326 (*sen*), Z4332 (*efa1*), y Z4333 (*efa2*) (Tabla 6). Los *primers* y las condiciones de termociclado fueron las descritas en Karmali *et al.* (2003) (Tablas 4 y 7, respectivamente). Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 25µl que contenía una solución 1x de buffer, 2 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTP, 25 pmol de cada *primer*, 0,5 U de ADN *Taq* polimerasa (InBio, Highway) y 2 µl de extracto de ADN. Se utilizó como control positivo de las reacciones la cepa EDL933. Luego de la corrida electroforética en geles de agarosa, al 2% teñidos con bromuro de etidio, los productos de PCR se visualizaron por transiluminación con luz UV.

De acuerdo con la propuesta de Karmali *et al.* (2003), la presencia de los cuatro *loci* putativos de virulencia fue indicativo de la presencia completa de la OI-122 (COI-122). La ausencia de uno o más de los genes propuestos determinó la presencia incompleta de esta isla (OI-122 incompleta), o su ausencia, en el caso en que todos los genes resultaron negativos (OI-122 ausente).

Tabla 6. Genes asociados a seropatotipos codificados en la OI-122.

PAI	Target	Proteína codificada o familia del efector ^a
OI-122	Z4321 (<i>pagC</i>)	Similitud con el gen C activado por Pho-P de <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium
	Z4326 (<i>sen</i>)	Similitud con la enterotoxina 2 de <i>Shigella flexneri</i>
	Z4332 (<i>efa1</i>)	Factor de adherencia de EHEC
	Z4333 (<i>efa2</i>)	Factor de adherencia de EHEC

^a Descriptos por Karmali *et al.* 2003.

Tabla 7. Condiciones de PCR utilizadas para la amplificación de los genes codificados en OI-122.

Termociclado	Temp.	Tiempo
Desnat. inicial	94°C	5 min
Desnat.	94°C	30 seg
Annealing	56°C	1 min
Elong.	72°C	2,5 min
Ciclos	30	
Elong. final	72°C	5 min

2.1.3.4. Análisis de agrupamiento

En base a los perfiles de virulencia asociados a PAI, se realizó un análisis de agrupamiento mediante el software BioNumerics v.6.6 (Applied Maths NV, Saint-Martens-Latem, Bélgica).

2.1.4. RESULTADOS

Las PAI son regiones de ADN que están presentes en el genoma de las bacterias patógenas pero están ausentes en cepas no patógenas de la misma especie o especies relacionadas. En este estudio se analizó la distribución de 16 genes *nle* y cuatro genes de virulencia putativos codificados en cuatro PAI (OI-36, OI-57, OI-71, OI-122), en una colección de cepas VTEC no-O157.

Se detectaron diferentes frecuencias de los marcadores genéticos analizados y una gran diversidad de perfiles de virulencia entre las cepas VTEC estudiadas.

Las prevalencias individuales de los genes de virulencia se muestran en la Figura 2. Entre todas las cepas, el gen Z4321 (*pagC*) codificado en la OI-122 resultó ser el más prevalente, detectándose tanto en los aislamientos *eae*-positivos como en los *eae*-negativos. Por otro lado, *nleC* codificado en la OI-36 fue el menos prevalente y se encontró sólo en cuatro aislamientos pertenecientes a los serotipos O26:H11 (aislado de humano), O145:NM (n=2, aislados de humano) y O165:NM (de bovino).

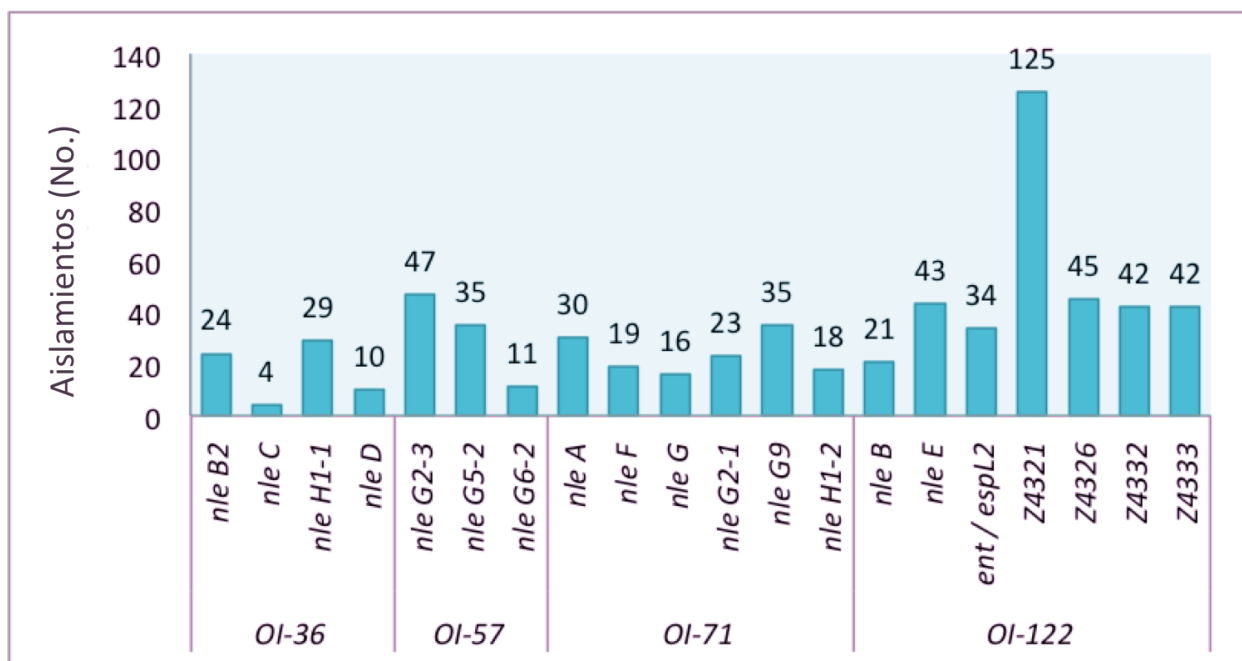


Figura 2. Prevalencia de cada uno de los genes de virulencia codificados en las islas de patogenicidad estudiadas (OI-36, OI-57, OI-71, OI-122) en aislamientos VTEC no-O157:H7.

Un grupo de 46 aislamientos resultó negativo para la presencia de todos los genes estudiados. Cuarenta y cuatro cepas (bovinos, alimentos cárnicos y vegetales) de este grupo fueron *eae*-negativas, tal como se esperaba, pero, llamativamente, un aislamiento resultó ser *eae*-positivo, perteneciente al serotipo O145:NM (#95) y aislado de un niño con CH. Los serotipos con ausencia de todos los genes estudiados fueron: O8:H19, O20:H7, O20:H19, O25:H19, O79:H19, O117:H2, O120:H19, O141:H7, O175:H8 y ONT:H19.

Un segundo grupo compuesto por 106 aislamientos (todos *eae*-negativos) solo resultó positivo para el gen Z4321 (ver Anexo 1, Tabla S1). Los serotipos de estas cepas Z4321-positivas se detallan en la leyenda de la Figura 3.

En la mayoría de las cepas *eae*-negativas, sólo estuvo presente el módulo 1 (Z4321) de OI-122. Sin embargo, excepcionalmente, en seis aislamientos *eae*-negativos se detectaron genes adicionales a Z4321: *nleH1-1*, *nleG2-3*, *nleG9*, Z4326, Z4332, y Z4333. El gen *nleH1-1* se detectó en cepas que pertenecieron a los serotipos O8:H16 (#7) y O39:H49 (#43), los cuales también presentaron Z4332 y Z4333; *nleG9* se detectó en cepas pertenecientes a los serotipos O141:H8 (#91), O171:H2 (#116) y O171:NM (#129); y *nleH1-1* + *nleG2-3* + *nleG9*, en un aislamiento O162:H7 (#113) (ver Figura 3).



Figura 3. Análisis de agrupamiento en base a los genes asociados a virulencia presentes en las PAI OI-36, OI-57, OI-71 y OI-122, en aislamientos VTEC no-O157 de humanos, bovinos, alimentos cárnicos y vegetales. Los cuadrados negros indican la presencia de los genes estudiados y los cuadrados blancos, la ausencia. Aquellos aislamientos que resultaron negativos para todos los genes se excluyeron del agrupamiento. En color rojo se indican los aislamientos *eae*-negativos; la rama del árbol correspondiente al aislamiento #62 representa todos los aislamientos con el perfil Z4321-positivo (n = 106), O2:H5 (1), O2:NM (1), O8:H16 (2), O15:H21 (1), O20:H19 (1), O22:H8 (3), O39:H49 (2), **O88:H21** (1), **O91:H21** (5), **O113:NM** (10: cepa #62 + 9), O113:H21 (5), **O116:H21** (1), O117:H7 (6), **O171:HNT**, O171:H2 (9), O171:NM (1), **O174:H21** (14), O178:H19 (4), **O185:H7** (1), **ONT:H7** (5), **ONT:H8** (2), ONT:H21 (13), ONT:HNT (1), y **ONT:NM** (16). Todos ellos fueron aislados de bovino o alimentos cárnicos. Los aislamientos estudiados pertenecientes a los serotipos destacados en negrita presentaron el mismo perfil. Los colores restantes indican aislamientos *eae*-positivos.

Los aislamientos del serotipo O26:H11 se agruparon entre las cepas que presentaron el mayor número de genes de virulencia. Se detectaron en este grupo desde 14 a 18 genes de los 20 estudiados. Aquellos aislamientos con más genes detectados (entre 16 y 18) fueron obtenidos de seres humanos. El aislamiento que presentó 18 genes sólo resultó negativo para *nleD* y Z4321 (las OI-57 y OI-71 estuvieron completas). En particular, dos aislamientos de bovino pertenecientes a los serotipos O118:H16 y O165:NM fueron positivos para 16 de los 20 genes estudiados, con presencia de genes en cada una de las cuatro PAI.

En la Tabla 8 se detallan las prevalencias de los genes por PAI, determinados en cinco serotipos/serogrupo VTEC *eae*-positivos, los cuales estuvieron representados por más de un aislamiento. Dependiendo del serotipo, algunos genes resultaron ausentes en todos los aislamientos, por ejemplo, *nleB2*, *nleC*, *nleG5-2*, *nleG6-2*, *nleF* y *nleB* en O5:NM; y *nleH1-1*, *nleG6-2*, *nleH1-2* y Z4321 en O145:NM.

Tabla 8. Prevalencia de genes de virulencia presentes en PAI en serotipos/serogrupo VTEC *eae*-positivos representados por más de un aislamiento: O5:NM, O26:H11, O103 (O103:NM y O103:H2), O145:NM y O177:NM.

Porcentaje de aislamientos positivos para cada gen						
PAI	Gen	O5:NM (n=4)	O26:H11 (n=8)	O103 (n=3)	O145:NM (n=18)	O177:NM (n=3)
O-Isla 36	<i>nle B2</i>	0	25	66,7	88,9	0
	<i>nle C</i>	0	12,5	0	11,1	0
	<i>nle H1-1</i>	100	100	66,7	0	100
	<i>nle D</i>	25	12,5	0	11,1	100
O-Isla 57	<i>nle G2-3</i>	100	100	100	94,4	100
	<i>nle G5-2</i>	0	100	0	88,9	100
	<i>nle G6-2</i>	0	100	0	0	0
O-Isla 71	<i>nle A</i>	25	100	0	83,3	33,3
	<i>nle F</i>	0	37,5	0	61,1	33,3
	<i>nle G</i>	75	87,5	0	5,5	0
	<i>nle G2-1</i>	100	87,5	0	38,9	0
	<i>nle G9</i>	100	87,5	33,3	44,4	100
	<i>nle H1-2</i>	75	62,5	0	0	100
O-Isla 122	<i>nle B</i>	0	25	0	61,1	66,7
	<i>nle E</i>	100	100	100	88,9	100
	<i>ent/espL2</i>	25	100	0	88,9	100
	Z4321 (<i>pagC</i>)	100	0	66,7	0	0
	Z4326 (<i>sen</i>)	100	100	100	88,9	100
	Z4332 (<i>efa1</i>)	100	100	100	88,9	0
	Z4333 (<i>efa2</i>)	100	100	100	88,9	0

completa (O111:H2 y O121:H19 de humano, y O146:H21 de bovino). Todos éstos pertenecieron a serotipos *eae*-positivos.

Particularmente, en relación a la OI-122, su presencia fue determinada por siete genes marcadores localizados en diferentes regiones de la misma. De los 204 aislamientos estudiados, 157 (77%) fueron positivos para al menos un gen de la isla, de los cuales 45 aislamientos fueron *eae*+ y 112 *eae*-. Entre los aislamientos que carecen de *eae*, se obtuvieron tres perfiles: Z4321 (n = 110) (módulo 1); Z4321/Z4326 (n = 1) (módulos 1 y 2); y Z4321/Z4332/Z4333 (módulos 1 y 3) (n = 1). Analizando OI-122 de forma modular, el módulo 1 estuvo presente (con al menos la presencia de un gen) en el 61,3% de los aislamientos; el módulo 2 estuvo presente en el 22,5%; y el módulo 3 estuvo presente en el 20,6% de los aislamientos (Figura 5).

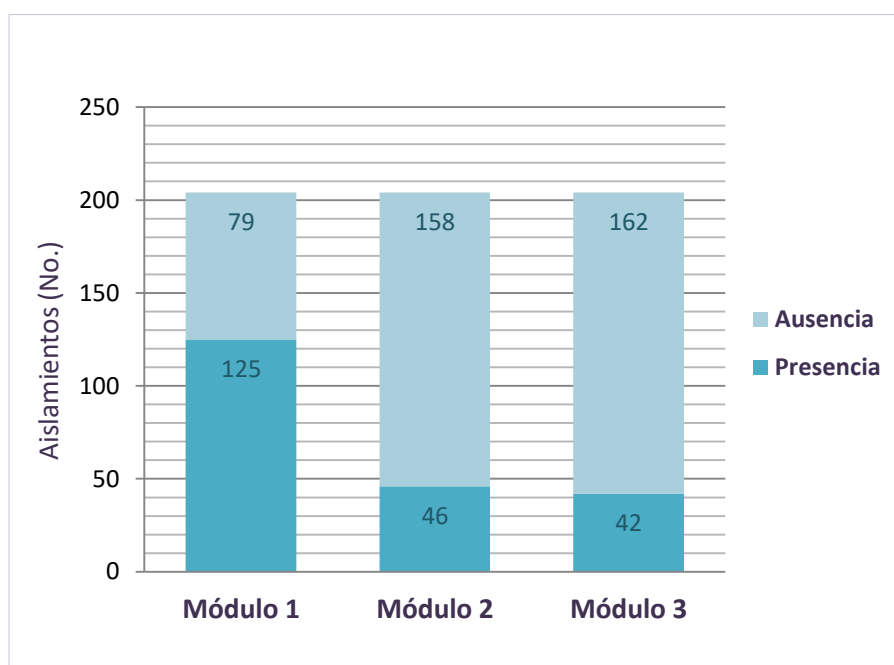


Figura 5. Presencia de la OI-122 de acuerdo a la detección de genes marcadores localizados en los tres módulos. Módulo 1: Z4321; módulo 2: *nleB*, *nleE*, *ent/espL2*, Z4326; y módulo 3: Z4332, Z4333. La presencia de cada módulo se consideró al detectar al menos un marcador de la misma.

De acuerdo con el criterio propuesto por Karmali *et al.* (2003), basado en la detección de la isla OI-122 completa (COI-122) mediante la evaluación de la presencia de cuatro genes putativos de virulencia (Z4321, Z4326, Z4332, Z4333), 13 de los 204 aislamientos estudiados (6,4%) presentaron una COI-122, 143 (70,1%), una OI-122 incompleta, y en 48 aislamientos la OI-122 (23,5%) no se detectó.

El análisis de agrupamiento (sin incluir los aislamientos en los que no se detectaron genes), presentado en la Figura 3, dividió el conjunto de aislamientos estudiados en dos grupos principales: (A) *eae*-negativos y (B) *eae*-positivos. Dentro del grupo *eae*-negativo (identificado

en la Figura 3 en color rojo) se ubicaron los aislamientos pertenecientes a los SPT D, E, o no determinado (ND), todos aislamientos provenientes de bovinos o alimentos cárnicos. Dentro del grupo *eae*-positivo, se ubicaron principalmente aislamientos identificados como SPT B, C o ND. Excepcionalmente, dos aislamientos se caracterizaron como SPT D (O146:H21 y O146:NM, ambos de bovino). Dentro del grupo de aislamientos *eae*-positivos, se pudieron diferenciar cuatro ramas principales (representadas en la Figura 3 en cuatro tonos diferentes de verde): (B1) aislamientos O145:NM (+ O121:H19 + O146:H21/NM); (B2) aislamientos O26:H11 (+ O38:H39 + O118:H16 + O165:NM); (B3) serogrupos O5, O103, O111 (+ O20:HNT + O118:H2); y (B4) aislamientos O177:NM.

2.1.5. DISCUSIÓN

Para predecir los riesgos clínicos y de salud pública asociados con cepas VTEC, se ha utilizado un esquema que permite clasificar a estas cepas en cinco seropatotipos, desde el SPT A (alto riesgo) hasta los SPT D y E (riesgo mínimo). Esta clasificación puede ser útil, pero no es concluyente debido a que no todas las infecciones causadas por VTEC están completamente caracterizadas ni se complementan con información clínica confiable. Los brotes causados por nuevas cepas híbridas desafían continuamente la comprensión del potencial virulento de las cepas y pueden dar lugar a una incorrecta clasificación de SPT. La incorporación de factores de virulencia móviles en VTEC juega un rol importante en su evolución y virulencia. Por ello, el concepto de seropatotipo por sí solo se ve cuestionado, y resulta imprescindible identificar nuevos factores de virulencia que predigan el potencial riesgo de una cepa VTEC de causar enfermedad en humanos (Scheutz, 2014).

Estudios previos mostraron que los genes de virulencia ubicados en las PAI pueden utilizarse para identificar bacterias patógenas nuevas y emergentes (Karmali *et al.*, 2003; Ju *et al.*, 2013). En particular, la presencia de genes *nle* y el número de estos genes presentes en una cepa de *E. coli* son criterios importantes para estimar su potencial virulencia (Coombes *et al.*, 2008). En este estudio, 18 aislamientos presentaron más del 60% de los 20 genes analizados, ubicados en PAI. Estos aislamientos pertenecen a los serotipos O5:NM, O26:H11, O38:H39, O118:H2/H16, O121:H19, O145:NM, O146:H21 y O165:NM. Dentro de este grupo, cuatro aislamientos, dos O26:H11 de humanos, uno O118:H16 y otro O165:NM, ambos de bovino, se clasificaron en el “*top ranking* de virulencia”, presentando entre el 80 y el 90% de los genes. En relación a las cepas O26:H11, estos resultados no llaman la atención ya que éste es un serotipo clásico asociado a EHEC, con un alto potencial de virulencia para los humanos.

Los resultados mostraron varios perfiles génicos para cada PAI, especialmente en diferentes serotipos, y que uno o más genes de virulencia pueden estar ausentes en VTEC no-O157. Postulamos entonces, coincidiendo con Ju *et al.* (2013; 2014), que las PAI pueden ser inestables en VTEC. Sin embargo, como se muestra en los resultados resumidos en la Tabla 8, la presencia o ausencia intra-serotipo de algunos genes particulares no es aleatoria.

A pesar de que el *locus* LEE es importante, no es esencial para la patogénesis de VTEC, y muchos casos esporádicos y brotes de VTEC han sido causados por cepas LEE-negativas (Chui *et al.*, 2015). Si bien la ausencia del gen *eae* se asoció con la ausencia de muchos de los genes de virulencia analizados en este capítulo, a diferencia de publicaciones anteriores, tales como la de Franz *et al.* (2015), detectamos algunas cepas *eae*-negativas inusuales, provenientes de bovinos y alimentos y pertenecientes a los serotipos O8:H16, O39:H49, O141:H8, O162:H7 y O171:H2/NM, que poseyeron los genes *nleH1-1*, *nleG2-3*, *nleG9*, Z4326, Z4332 o Z4333. Tales cepas, a diferencia de otras cepas LEE-negativas, podrían causar enfermedades en humanos. De hecho, algunos de estos serotipos, por ejemplo, O171:H2 y O171:NM, se han asociado con casos de SUH y/o diarrea sanguinolenta en niños de Argentina (Rivas *et al.*, 2006). Por lo tanto, el riesgo que representan estas cepas para la salud pública debe ser monitoreado. Por el contrario, una cepa *eae*-positiva O145:NM (#95) aislada de un niño con CH, careció de todos los genes de las PAI estudiados.

Se ha propuesto y acordado que las cepas COI-122 positivas pertenecen a SPT asociados con brotes (SPT A y B) y con SUH (SPT A, B y C) (Karmali *et al.*, 2003; Wickham *et al.*, 2006; Buvens y Piérard, 2012). Sin embargo, detectamos algunas cepas que, si bien presentaron la OI-122 completa, se clasificaron con diferentes SPT o ellos no pudieron ser determinados, tales como dos cepas de bovino de los serotipos O20:HNT (SPT no determinado) y O146:H21 (SPT D), y dos cepas de humano O111:H2 y O118:H2 (SPT no determinado). Además, en relación con la OI-122, y coincidentemente con los resultados de Konczy *et al.* (2008), confirmamos que cuando el LEE estuvo ausente, sólo el módulo 1 (gen Z4321) estuvo presente. Estas cepas que presentan el gen *pagC* exclusivamente (módulos 2 y 3 ausentes) tendrían una sustitución no sinónima (His→Gln) (Konczy *et al.*, 2008). Wickham y colaboradores (2006) postularon que había una asociación significativa entre la presencia de una combinación de marcadores OI-122, genes *pagC*, *sen*, *nleB* y *efa-1*, y la ocurrencia de SUH después de la infección con *E. coli* no-O157. De acuerdo con esto, encontramos que cuatro cepas, tres aisladas de humanos (O111:H2, O118:H2 y O121:H19), e interesantemente también una cepa O146:H21 aislada de bovino, tuvieron ese perfil.

Newton *et al.* (2010) propusieron que NleE y NleB (OI-122) contribuyen a la patogénesis mediante la inhibición de una respuesta inflamatoria inicial del huésped (suprimiendo las vías de señalización innata) para permitir que las bacterias persistan en las primeras etapas de la infección. NleE parece obstruir la translocación nuclear de los activadores transcripcionales de la familia Rel, al tiempo que permite la importación nuclear del represor atranscripcional, lo que resulta en la supresión de la expresión de IL8. NleB evita la translocación al núcleo celular del factor nuclear activador kappa de las células B activadas (NF-kB). El gen *nleB* se detectó en cepas O26:H11, O111:H2, O118:H2, O121:H19, O128:NM, y O145:NM aisladas de pacientes, y en cepas O145:NM, O146:H21, O165:NM y O177:NM aisladas de bovino. Las cepas O26:H11 de humanos presentaron *nleB* y *nleE*, mientras que las cepas O26:H11 provenientes de ganado presentaron solamente *nleE*.

A diferencia del estudio de Karmali *et al.* (2003), en el cual se postula que en los casos en que un serotipo esté representado por más de una cepa, todas ellas presentarían un idéntico perfil de genes para la OI-122, encontramos diferentes perfiles de virulencia para la OI-122 en aislamientos pertenecientes a un mismo serotipo (ver Figura 3). Un objetivo del siguiente capítulo de esta tesis fue determinar si para un mismo serotipo se detectan diferentes secuenciotipos analizados por MLST y si, además, éstos se corresponden con diferentes perfiles de virulencia de las PAI.

De acuerdo a los resultados de Ju y colaboradores (2013), algunos de los genes *nle* ubicados en las islas OI-122 y OI-57 (*nleB*, *nleG2-3*, *nleG5-2* y *nleG6-2*) se asociaron principalmente a cepas VTEC *eae*-positivas y a SPT causantes de enfermedad grave (SPT A, B, C), ofreciendo una base importante para la evaluación del riesgo molecular (MRA) en VTEC. Pero, en el contexto de MRA, que utiliza genes *nle* como marcadores únicos, todas las cepas VTEC *eae*-negativas virulentas, incluidas aquellas asociadas a SUH de los serotipos O113:H21 y O91:H21, se clasificarían como inofensivas para el hombre. Algo similar sucede en relación a la detección de las regiones marcadoras de la isla OI-122 asociadas a SPT. Todos los aislamientos *eae*-negativos presentaron sólo el módulo I o tuvieron ausente la isla, es decir, que en este sentido, se clasificarían como cepas sin potencial patológico.

Por lo expuesto, concluimos que son necesarios marcadores adicionales, especialmente en cepas VTEC *eae*-negativas, para poder predecir el potencial de una cepa VTEC para causar enfermedad. En este contexto, recientemente, se ha propuesto una nueva PAI denominada *locus* de adhesión y autoagregación (LAA -*Locus of Adhesion and Autoaggregation*-), presente exclusivamente en el subgrupo de cepas VTEC LEE-negativas, que incluye serotipos relevantes desde el punto de vista clínico, como O91:H21, O113:H21 y O174:H21. En LAA están

codificados factores de virulencia, entre ellos Hes, que participan en fenotipos asociados a la colonización, y a la adhesión y autoagregación como Pag-C, Iha y Agn43 (Montero *et al.*, 2017). Futuros estudios, que involucren la detección de esta PAI en cepas originarias de distintas regiones geográficas, determinarán si los marcadores de virulencia propuestos están presentes en la mayoría de las cepas VTEC LEE-negativas.

SECCIÓN EXPERIMENTAL II

Determinación de secuenciotipos (ST), complejos clonales (CC) y relaciones filogenéticas en cepas de Escherichia coli verotoxigénico no-O157:H7

2.2.1. INTRODUCCIÓN

La capacidad de distinguir con precisión entre cepas patógenas es crucial para un análisis epidemiológico y de vigilancia eficiente. Éste estudia las fuentes primarias de contaminación bacteriana, la estructura, dinámica y distribución de patógenos en la población microbiana, con el fin de desarrollar mejores estrategias de control en salud pública. Para promover tales objetivos, existen múltiples métodos de tipificación molecular que pueden identificar aislamientos en todo el mundo (epidemiología global) y/o en brotes de enfermedades localizadas (epidemiología local) (Foley *et al.*, 2009).

Los genomas microbianos pueden variar debido a mutaciones o a recombinación. La variabilidad de secuencia dentro de genes particulares se puede usar en esquemas de tipificación molecular para determinar la relación entre las bacterias. Uno de los métodos utilizados en epidemiología global es la tipificación de secuencias de múltiples *loci* (MLST), en el cual se comparan las secuencias de múltiples genes *housekeeping* en base a cambios nucleotídicos (Maiden *et al.*, 1998; Spratt, 1999). Desde 1998, la introducción de MLST ha tenido un importante impacto tanto en la vigilancia epidemiológica como en la biología de poblaciones microbianas y ha revolucionado el análisis de la estructura clonal de las poblaciones bacterianas (Feil y Enright, 2004; Maiden, 2006). Los datos de MLST son muy informativos, universalmente comparables, fácilmente validados, accesibles a través de Internet y transferibles. Además, actualmente no sólo se utilizan en investigaciones epidemiológicas, sino también en estudios de dinámica poblacional de patógenos, de patogenicidad y de evolución molecular (Pérez-Losada *et al.*, 2017).

Los genes *housekeeping* (genes involucrados en el metabolismo basal de la célula) están presentes en todos los aislamientos dentro de una especie y no están sometidos a presión selectiva que pueda conducir a cambios en la secuencia relativamente rápidos. Sin embargo, estos genes suelen tener suficiente variabilidad como para presentar alelos distintos en diferentes cepas, lo cual permite detectar variaciones neutras que se acumulan lentamente y que definen líneas clonales relativamente estables (Maiden *et al.*, 1998). El proceso de selección de los genes, así como de sus fragmentos internos (450-500 pb) no es universal, sino que debe ser realizado para cada especie bacteriana en particular. Existen regiones específicas de los genes

que son las responsables de la mayor parte de la variabilidad, mientras que el resto del *locus* presenta un alto grado de conservación. Esto permite definir en cada esquema de MLST qué fragmento interno de cada gen se debe analizar para que el nivel de variabilidad alcanzado entre todos los genes utilizados proporcione un alto grado de discriminación (Enright y Spratt, 1999; Urwin y Maiden, 2003).

La combinación de los alelos correspondientes a cada uno de los genes secuenciados determina un genotipo o secuenciotipo específico (ST) para cada cepa. Para una gran cantidad de especies bacterianas, se han establecido bases de datos internacionales para MLST en Internet (www.mlst.net), lo cual facilita el intercambio rápido de resultados y la comparación con otros ST disponibles en ellas (Feil, 2004). Aquellos aislamientos que tienen ST idénticos se definen como clonales por MLST y se asume que comparten un ancestro común (Spratt, 1999). Por otro lado, los resultados de MLST se pueden analizar utilizando técnicas de agrupamiento. Uno de los métodos más comunes es el uso del algoritmo eBURST, que puede agrupar aislamientos en complejos clonales (CC), según su ST. Un complejo clonal comprende bacterias genéticamente relacionadas, pero no idénticas. Usando este agrupamiento, los aislamientos con altos niveles de similitud genética (por ej. que compartan seis de siete alelos), se agrupan como miembros de un CC (Urwin y Maiden, 2003; Feil, 2004). Por lo tanto, los aislamientos dentro de CC diferentes están menos relacionados entre sí que aquellos dentro del mismo CC (Figura 6).

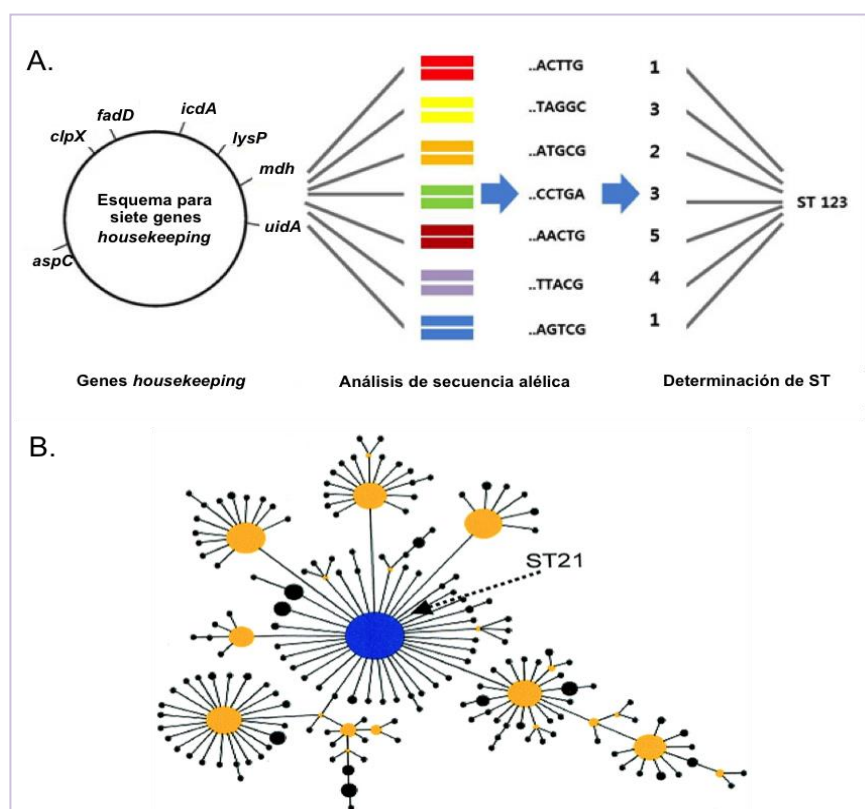


Figura 6. MLST y análisis de agrupamiento por eBURST. (A) Esquema de MLST hipotético utilizando siete genes *housekeeping*. (B) Diagrama resultante de un análisis por eBURST hipotético en el cual están representadas las relaciones entre los aislamientos dentro de un complejo clonal (CC 21, en azul). El ST 21, fue determinado como el ST fundador del CC, mientras que aquellos que se relacionan a él pueden formar además subgrupos de ST relacionados (en amarillo).

2.2.2. OBJETIVOS

- Caracterizar cepas VTEC nativas mediante la asignación de secuenciotipos (ST) y complejos clonales (CC) por MLST.
- Comparar los secuenciotipos y los complejos clonales de las cepas VTEC nativas con los reportados en las bases de datos internacionales, especialmente con aquellos clones considerados de riesgo en el resto del mundo.

2.2.3. MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.3.1. Aislamientos estudiados

Se seleccionaron 59 aislamientos VTEC pertenecientes a 42 serotipos diferentes de la colección de cepas disponibles en el Laboratorio de Inmunoquímica y Biotecnología (CIVETAN, FCV-UNCPBA, Argentina), los cuales estaban almacenados a -70°C con un 20% v/v de glicerol. Todos fueron aislados en Argentina, entre 1998 y 2003, de alimentos ($n = 21$),

bovinos (n = 37) y humanos (n = 1) y se analizaron previamente en relación a la presencia de genes codificantes de factores de virulencia: verocitotoxinas 1 y 2 (*vtx*₁ y *vtx*₂), intimina (*eae*), enterohemolisina (*ehxA*), adhesina autoaglutinante de STEC (*saa*) y citotoxina subtilasa (*subA*) (Parma *et al.*, 2000; Padola *et al.*, 2004; Lucchesi *et al.*, 2006; Sanz *et al.*, 2007; Sanso *et al.*, 2015) (Tabla 3). La estrategia de selección consistió en elegir uno o dos aislamientos (cuando fue posible) de cada serotipo disponible, y en este último caso, preferentemente de origen y/o perfil de virulencia diferentes.

2.2.3.2. Amplificación de los genes *housekeeping*

Se amplificaron por PCR fragmentos internos de siete genes *housekeeping* propuestos por la base de datos EcMLST para *E. coli* patógeno (administrada por el Centro STEC en la Universidad Estatal de Michigan-<http://shigatox.net/new/tools/ecmlst.html>): *aspC* (aspartato aminotransferasa), *clpX* (proteasa caseinolítica), *fadD* (acil-CoA sintetasa), *icdA* (isocitrato deshidrogenasa), *lysP* (lisina permeasa específica), *mdh* (malatodeshidrogenasa) y *uidA* (beta-D-glucuronidasa). El ADN para las reacciones se obtuvo a partir de células bacterianas congeladas a -70°C que fueron suspendidas en 500 µl de agua estéril y hervidas durante 10 minutos. La secuencia de los *primers* y los tamaños de los respectivos amplímeros se detallan en la Tabla 9. Las condiciones de PCR y termociclado luego de la puesta a punto resultaron iguales para todos los genes (Tabla 10). El tamaño de los amplímeros se verificó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,5% teñidos con bromuro de etidio y se visualizaron por transiluminación con luz UV. Los productos de PCR se enviaron a secuenciar -una o ambas hebras de ADN- (Macrogen, Corea).

2.2.3.3. Tipificación de secuencias de múltiples *loci* (MLST)

Los datos provenientes de la secuenciación de fragmentos internos de los siete genes *housekeeping* fueron analizados usando la base de datos EcMLST. Luego de obtener el perfil alélico de cada aislamiento, a cada secuencia única para cada gen se le asignó el número de alelo correspondiente según las bases de datos. Los perfiles genéticos, llamados secuenciotipo (ST), se determinaron en base a las combinaciones de los alelos de los siete *loci* estudiados también de acuerdo a la base de datos (Qi *et al.*, 2004). Los complejos clonales se determinaron por el agrupamiento de aislamientos que compartían los alelos en al menos 6 de los 7 genes. El análisis filogenético de los datos se llevó a cabo mediante el algoritmo BURST (Feil *et al.*, 2004). Por otro lado, los perfiles MLST de las cepas nativas se compararon con aquellos de cepas de distintos orígenes depositados en la base de datos EcMLST (Qi *et al.*, 2004).

Tabla 9. Genes *housekeeping* analizados en el esquema de MLST.

Gen	Proteína codificada	Secuencia de <i>primers</i> 5' - 3'	Tamaño del amplímero (pb)	Tamaño de la secuencia alélica (pb) ^a
<i>aspC</i>	Aspartato aminotransferasa	Fw GTTTCGTGCCGATGAACGTC Rv AAACCCTGGTAAGCGAAGTC	594	513
<i>clpX</i>	Proteasa caseinolítica	Fw CTGGCGGTGCGGGTATACAA Rv GACAACCGGCAGACGACCAA	672	567
<i>fadD</i>	Acil-CoA sintetasa	Fw GCTGCCGCTGTATCACATTT Rv GCGCAGGAATCCTTCTTCAT	580	492
<i>icdA</i>	Isocitrato deshidrogenasa	Fw CTGCGCCAGGAAGTGGATCT Rv ACCGTGGGTGGCTTCAAACA	669	567
<i>lysP</i>	Lisina permeasa específica	Fw CTTACGCCGTGAATTAAAGG Rv GGTTCCCTGGAAAGAGAAGC	628	477
<i>mdh</i>	Malato deshidrogenasa	Fw GTCGATCTGAGCCATATCCCTAC Rv TACTGACCGTCGCCTTCAAC	650	549
<i>uidA</i>	Beta-D-glucuronidasa	Fw CATTACGGCAAAGTGTGGGTCAAT Rv CCATCAGCACGTTATCGAATCCTT	658	588

^a La secuencia alélica usada en EcMLST se obtiene alineando la secuencia consenso con la secuencia de referencia en K-12 y luego recortando la secuencia hasta la longitud de alineación.

Tabla 10. Condiciones de PCR utilizadas para la amplificación de los 7 genes *housekeeping*.

Reacción de PCR	ul por reacción
ADN	6
<i>buffer</i> de PCR 10x	5
dNTP (2 mM de cada uno)	0,4
MgCl ₂ (25 mM)	4
<i>Primer</i> Fw (10 uM)	1
<i>Primer</i> Rv (10 uM)	1
<i>Taq</i> ADN polimerasa (InBio, Highway)	0,2
ddH ₂ O	32,4
Volumen final (ul)	50

Termociclado	Temp.	Tiempo
Desnat. inicial	94°C	10 min
Desnat.	92°C	1 min
Annealing	58°C	1 min
Elong.	72°C	30 seg
Ciclos	35	
Elong. final	72°C	5 min

2.2.3.4. Análisis bioinformático de los datos de MLST

De acuerdo al agrupamiento realizado por la base de datos EcMLST, los ST se asignaron a grupos clonales (GC) (Qi *et al.*, 2004).

Por otro lado, para la obtención de los complejos clonales (CC), se generó un *snapshot* poblacional a partir de los ST identificados en esta tesis y los ST de cepas VTEC estrechamente relacionadas disponibles en la base de datos EcMLST (Nº aislamientos = 1296; consultada el 10 de octubre de 2015). Este agrupamiento, basado en el algoritmo BURST, se llevó a cabo utilizando el software eBURSTv3 (Feil *et al.*, 2004), disponible en <http://eburst.mlst.net>. Los datos de entrada utilizados por eBURST son los ST y sus perfiles alélicos. El primer paso es dividir los datos de entrada (por ejemplo, todos los aislamientos dentro de una base de datos MLST) en grupos de ST. Estos grupos de ST relacionados se agruparon en CC para lo cual se utilizó la definición de grupo mas estricta (aislamientos que compartían alelos en al menos seis de los siete genes). Para cada CC, eBURST identificó el ST que más probablemente represente su genotipo fundador. El *software* incluye un procedimiento de *bootstrap* simple que estima el grado de soporte para el genotipo fundador predicho en un complejo clonal, así como para los fundadores de subgrupos. Los valores de confianza *bootstrap* se basaron en 1000 repeticiones. Aquellos ST que no se pudieron asignar a ningún grupo se denominaron *singletons*; por ejemplo, un ST que difiere en dos o más alelos de cualquier otro ST en la población. Los datos de salida se muestran como un diagrama radial, centrado en el genotipo fundador predicho. Como segundo paso se incluyó un segundo *input* que contenía los datos de ST y perfiles alélicos de los aislamientos estudiados, los cuales se incluyen en el diagrama diferenciados por color de aquellos pertenecientes a la base de datos.

2.2.4. RESULTADOS

El esquema MLST basado en el análisis de 7 genes *housekeeping* permitió asignarle ST a las 59 cepas VTEC pertenecientes a diferentes serotipos, aisladas principalmente de bovinos y alimentos en Argentina. Se compararon los ST obtenidos con aquellos incluidos en la base de datos EcMLST, y se identificaron un total de 38 ST entre el conjunto de aislamientos analizados. De los 38 ST, 17 (45%) fueron ST nuevos, determinados en 18 de los 42 serotipos estudiados (Tabla 11). Los serotipos restantes presentaron ST que ya habían sido registrados en la base de datos. En los perfiles de los 17 ST nuevos, se detectaron nueve alelos nuevos en cinco genes (*aspC*, *clpX*, *fadD*, *mdh* y *uidA*). Los ST y alelos nuevos se informaron y registraron en la base de datos. La red filogenética determinada por eBURST (Figura 7) estableció las relaciones entre los ST disponibles en la base de datos al momento del análisis para el esquema de 7 genes, que incluyó ST de cepas de diferentes países, la mayoría de humanos, y los ST determinados en este estudio.

De acuerdo al agrupamiento realizado por EcMLST, 15 de los 38 ST identificados se agruparon en 11 GC diferentes (Tabla 11). De estos GC, seis de ellos agruparon cepas con características similares y fueron identificados en la base de datos como GC34 (STEC-1) que incluye los serotipos O91:H21 y O174:H21, GC30 (STEC-2) que incluye a O113:NM, O113:H21 y O116:H21, GC12 (STEC-12) a O145:NM, O146:NM y O146:H21, GC11 (EHEC-1) a O157:H7, GC14 (EHEC-2) a O111:NM, y GC17 (EPEC-2) el cual incluye al serogrupo O103 (NM y H2). Los otros cinco GC están conformados por cepas con "rasgos no comunes", según la base de datos. Una excepción fue el GC31 que incluyó diferentes serogrupos, habitualmente asociados con antígenos flagelares H7 o H8, tales como O20:H7, O22:H8, O117:H7, O175:H8 y O185:H7. Los 23 ST restantes, incluidos todos los nuevos, no se agruparon en ninguno de los GC definidos.

El algoritmo eBURST agrupó los *inputs* (ST) en grupos (Figura 7), utilizando la definición de grupo más estricta (6/7 alelos compartidos). Los aislamientos agrupados en un grupo definido se consideraron pertenecientes a un complejo clonal único (CC). En este estudio, se tuvieron en cuenta sólo aquellos CC con un *bootstrapping* superior al 70% (nº de re-muestreos para *bootstrapping* = 1000). Veinticuatro de los 38 STs fueron asignados a siete CC diferentes por eBURST. Los ST restantes formaron parte de grupos con *bootstrap* inferior al 35% o fueron agrupados en *clusters* sin genotipo fundador definido o agrupados en ST no relacionados, como *singletons*. Los complejos clonales definidos fueron: CC230, el cual agrupó 15 de los 24 ST determinados en este estudio, pertenecientes a 17 serotipos (O8:H19, O20:H7, O20:H19, O22:H8, O39:H49, O91:H21, O113:H21, O113:NM, O116:H21, O117:H7, O141:H7, O141:H8,

O162:H7, O174:H21, O175:H8, O178:H19, O185:H7); CC66 (O157:H7); CC106 (O26:H11, O111:NM, O118:H16); CC119 (O103:H2, O103:NM); CC850 (O5:NM, O177:NM); CC78 (O145:NM, O146:NM, O146:H21); y CC150 (O174:H21).

Los aislamientos que pertenecieron al CC230 presentaron heterogeneidad en sus perfiles de virulencia, pero ninguno resultó positivo para el gen *eae*. Los aislamientos O157:H7 que pertenecieron al CC66 presentaron el mismo perfil de virulencia (*vtx₂/eae/ehxA*) y fueron aislados de ganado y humano. Todos los aislamientos agrupados en el CC106 presentaron el mismo perfil de virulencia (*vtx₁/eae/ehxA*) y fueron aislados de terneros. Los tres aislamientos pertenecientes al CC119 presentaron tres perfiles de virulencia diferentes (*vtx₁/eae/ehxA*, *vtx₂/eae/ehxA* y *vtx₁/vtx₂/eae/ehxA*) y fueron aislados de bovinos adultos y terneros. Los aislamientos agrupados en el CC850 tuvieron dos perfiles de virulencia diferentes (*vtx₁/eae/ehxA* y *vtx₂/eae/ehxA*) y fueron aislados de bovinos adultos y terneros. Aquellos aislamientos pertenecientes al CC78 presentaron dos perfiles de virulencia diferentes (*vtx₂/eae/ehxA* y *vtx₂/eae*) y se aislaron de bovinos adultos. Sólo un aislamiento perteneciente al CC150 presentó el perfil de virulencia *vtx₁/vtx₂/ehxA/saa*.

Tabla 11. Perfiles alélicos, secuenciotipos (ST), grupos clonales (GC) y complejos clonales (CC) de los aislamientos VTEC estudiados por MLST.

SEROTIPO	AISLAMIENTO	ORIGEN	Perfil de virulencia ^a	Perfil alélico ^b	ST ^c	GC ^d	CC ^d
O2:H5	AM 166-1	Bovino adulto	<i>vtx₂,saa,subA</i>	21,24,10,2,1,11,5	1179	n.a.	<i>singleton</i>
O5:NM	T 249-5	Ternero	<i>vtx₁,eae,ehxA</i>	20,19,13,4,1,12,1	175	42	850
O8:H16	CM 15-2	Carne picada	<i>vtx₁,saa</i>	32,5,2,206,1,8,12	1066	n.a.	<i>singleton</i>
O8:H16	FO 164	Bovino adulto	<i>vtx₁,saa</i>	32,5,2,206,1,8,12	1066	n.a.	<i>singleton</i>
O8:H19	3M	Carne picada	<i>vtx₁,vtx₂,ehxA</i>	4,5,2,111,1,5,1	379	63	230
O8:H19	7M	Carne picada	<i>vtx₂,ehxA</i>	7,5,77,4,1,13,23	1177	n.a.	230
O15:H21	FB 11	Bovino adulto	<i>vtx₂</i>	178,187 ,13,15,1,1,40	1156	n.a.	<i>singleton</i>
O20:H7	AM 216-1	Bovino adulto	<i>vtx₁,vtx₂</i>	7,5,2,2,1,13,1	140	31	230
O20:H19	HT 1-6	Hamburguesa	<i>vtx₁,vtx₂,ehxA,saa,subA</i>	7,5,5,4,3,5,23	92	88	230
O20:H19	AP 28-1	Bovino adulto	<i>vtx₂,ehxA,saa,subA</i>	179 ,5,5,4,3,5,23	1157	n.a.	230
O20:HNT	T 250-4	Ternero	<i>vtx₁,eae,ehxA</i>	10, 188 ,46,39,1,5,5	1169	n.a.	<i>singleton</i>
O22:H8	36M	Carne picada	<i>vtx₂</i>	5,5,2,2,1,13,23	145	31	230
O22:H8	HW 1-15	Hamburguesa	<i>vtx₁,vtx₂,ehxA,saa</i>	5,5,2,2,1,13,23	145	31	230
O25:H19	FB 68	Bovino adulto	<i>vtx₂,ehxA</i>	7,5,77,4,1,8,84	1170	n.a.	<i>singleton</i>
O26:H11	T 246-6	Ternero	<i>vtx₁,eae,ehxA</i>	7,8,65,4,1,5, 275	1158	n.a.	106
O26:H11	T 8-1	Ternero	<i>vtx₂,eae,ehxA</i>	7,8,2,4,122,5,250	943	n.a.	<i>singleton</i>
O38:H39	T 246-1	Ternero	<i>vtx₁,eae,ehxA</i>	11,190,231,208,19,112,263	1102	n.a.	<i>singleton</i>
O39:H49	AM 169-3	Bovino adulto	<i>vtx₁,vtx₂,ehxA,saa,subA</i>	7,5,2,101,1,5,1	1138	n.a.	230
O39:H49	AM 165-1	Bovino adulto	<i>vtx₂,ehxA,saa,subA</i>	7,5,2,101,1,5,1	1138	n.a.	230
O79:H19	27M	Carne picada	<i>vtx₂,ehxA,saa,subA</i>	7,5,5,2,1,8,3	1171	n.a.	n.a.
O79:H19	AM 168-3	Bovino adulto	<i>vtx₂,ehxA,saa,subA</i>	7,5,5,2,1,8,3	1171	n.a.	n.a.
O88:H21	HW 1-7	Hamburguesa	<i>vtx₁,vtx₂,ehxA,saa</i>	7,5,13,2,1,5,3	1172	n.a.	<i>singleton</i>

O91:H21	HAB 14	Hamburguesa	<i>vtx2,ehxA,saa</i>	5,5,5,2,3,5,5	89	34	230
O91:H21	AP 16-1	Bovino adulto	<i>vtx2,ehxA,saa</i>	5,5,5,2,3,5,5	89	34	230
O103:NM	AM 202-2	Bovino adulto	<i>vtx2,eeA,ehxA</i>	4,2,2,2,1,2,2	119	17	119
O103:NM	T 46-6	Ternero	<i>vtx1,vtx2,eeA,ehxA</i>	4,2,2,2,1,2,2	119	17	119
O103:H2	FB 94	Bovino adulto	<i>vtx1,eeA,ehxA</i>	4,2,2,2,1,2,2	119	17	119
O111:NM	T 9-1	Ternero	<i>vtx1,eeA,ehxA</i>	7,8,2,4,1,5,8	106	14	106
O112:H2	2M	Carne picada	<i>vtx2</i>	5, 196 ,2,2,1, 203 ,3	1159	n.a.	<i>singleton</i>
O113:NM	15M	Carne picada	<i>vtx2</i>	5,6,71,2,1,8,1	223	30	230
O113:H21	5M	Carne picada	<i>vtx2,ehxA,saa,subA</i>	5,6,71,2,1,8,1	223	30	230
O113:H21	AP 97-3	Bovino adulto	<i>vtx2,ehxA,saa,subA</i>	5,6,71,2,1,8,1	223	30	230
O116:H21	CM 3-18	Carne picada	<i>vtx2,ehxA,saa</i>	5,6,71,25,1,8,1	230	30	230
O117:H7	HT 2-2	Hamburguesa	<i>vtx2</i>	5,5,2,2,1,5,80	147	31	230
O117:H7	AP 32-1	Bovino adulto	<i>vtx2</i>	5,5,2,2,1,5,80	147	31	230
O118:H16	T 250-2	Ternero	<i>vtx1,eeA,ehxA</i>	7,8,2,2,1,5,8	1173	n.a.	106
O120:H19	FS 151	Bovino adulto	<i>vtx2,ehxA,saa</i>	7,5,5,2,1,8,3	1171	n.a.	n.a.
O141:H7	AM 167-1	Bovino adulto	<i>vtx1,vtx2,ehxA,saa,subA</i>	5,5,5,2,1,5,1	144	36	230
O141:H8	AP 31-1	Bovino adulto	<i>vtx1,vtx2,ehxA,saa</i>	5,6,71,2,1,5,1	1174	n.a.	230
O141:H8	AP 21-1	Bovino adulto	<i>vtx2,ehxA,saa,subA</i>	5,5,5,2,1,5,1	144	36	230
O145:NM	FB 5	Bovino adulto	<i>vtx2,eeA,ehxA</i>	11,13,12,14,9,16,40	78	12	78
O145:NM	AMB 166	Bovino adulto	<i>vtx2,eeA,ehxA</i>	11,13,12,14,9,16,40	78	12	78
O146:H21	FB 12	Bovino adulto	<i>vtx2,eeA</i>	11,13,12,14,9,16,40	78	12	78
O146:NM	FB 32	Bovino adulto	<i>vtx2,eeA,ehxA</i>	11,13,12,14,9,16,40	78	12	78
O157:H7	FB 22	Bovino adulto	<i>vtx2,eeA,ehxA</i>	1,1,4,3,2,4,4	66	11	66
O157:H7	GAL 26	Humano	<i>vtx2,eeA,ehxA</i>	1,1,4,3,2,4,4	66	11	66
O162:H7	EN 1-4	Hamburguesa	<i>vtx2</i>	5, 197 ,2,2,1,5,80	1160	n.a.	230
O165:NM	T 83-1	Ternero	<i>vtx2,eeA,ehxA</i>	68,19, 244 ,39,1,17,94	1161	n.a.	253
O171:HNT	10M	Carne picada	<i>vtx2</i>	4,6,2,2,1,2,5	1175	n.a.	n.a.
O171:H2	CM 20-7	Carne picada	<i>vtx2</i>	4,6,2,40,1,2,5	130	n.a.	n.a.
O171:H2	AM 217-1	Bovino adulto	<i>vtx2</i>	4,6,2,40,1,2,5	130	n.a.	n.a.
O171:NM	45M	Carne picada	<i>vtx2</i>	4,6,2,40,1,2,5	130	n.a.	n.a.
O174:H21	CM 25-12	Carne picada	<i>vtx2</i>	5,5,5,2,3,5,5	89	34	230
O174:H21	AM 170-3	Bovino adulto	<i>vtx1,vtx2,ehxA,saa</i>	59,5,64,40,1,5,1	1178	n.a.	150
O175:H8	FB 40	Bovino adulto	<i>vtx2</i>	5,5,2,2,1,5,23	146	31	230
O177:NM	FO 127-3	Bovino adulto	<i>vtx2,eeA,ehxA</i>	60,19,13,4,1,12,1	850	n.a.	850
O178:H19	FC 104	Bovino adulto	<i>vtx2</i>	7,5,5,2,1,72,1	1176	n.a.	<i>singleton</i>
O178:H19	41M	Carne picada	<i>vtx2,ehxA,saa,subA</i>	179 ,5,5,4,3,5,23	1157	n.a.	230
O185:H7	CM 22-1	Carne picada	<i>vtx2</i>	5,5,2,2,1,5,80	147	31	230

^a Perfil de virulencia de acuerdo a los siguientes genes: *vtx1*, *vtx2*, *eeA*, *ehxA*, *saa*, *subA*.

^b Perfil alélico de MLST basado en 7 genes *housekeeping* (*aspC*, *clpX*, *fadD*, *icdA*, *lysP*, *mdh*, *uidA*). Los números de alelos resaltados en negrita representan los alelos nuevos determinados en este estudio.

^c Los números resaltados en negrita indican los ST nuevos asignados en este estudio. Estas secuencias fueron cargadas en la base de datos EcMLST con el nombre con el cual figuran en la columna "Aislamiento".

^d n.a., no asignado.

2.2.5. DISCUSIÓN

Con el objetivo de estudiar qué clones VTEC circulan en Argentina, establecer las relaciones filogenéticas entre las cepas y evaluar el riesgo potencial de infección humana que éstas representan, analizamos, mediante MLST, un conjunto de aislamientos pertenecientes a 42 serotipos diferentes. Aunque VTEC utiliza factores de virulencia similares, este grupo está compuesto por líneas filogenéticamente diferentes que varían en su capacidad para causar enfermedades en los seres humanos (Abu-Ali *et al.*, 2009).

Las diferentes combinaciones de alelos en los siete *loci* analizados por MLST se utilizaron para definir 38 genotipos o ST entre los 59 aislamientos. En el diagrama filogenético, observamos que algunas de las cepas estudiadas estuvieron estrechamente relacionadas con otras cepas del mismo ST o diferente serotipo de estudios previos, mientras que, otras mostraron ST nuevos.

Whittam (1998) informó que las cepas VTEC que se asocian con brotes y/o SUH correspondían a cuatro grupos clonales relacionados denominados EHEC-1, EHEC-2, STEC-1 y STEC-2. Estos cuatro grupos difieren en su virulencia y distribución global (<http://shigatox.net/new/about-stec-center/clonal-analysis-of-stec.html>).

Según la base de datos EcMLST, los aislamientos VTEC estudiados se incluyeron en 11 grupos clonales (GC), entre ellos dos grupos EHEC y un grupo EPEC.

EHEC-1 incluye el serotipo O157:H7, cepas relacionadas no móviles y su ancestro inferido O55:H7. Las cepas O157:H7 (origen bovino y humano) estudiadas se agruparon en GC11, al igual que las cepas de la base de datos EcMLST, que en su mayoría fueron aisladas de seres humanos en EE.UU. y Alemania.

EHEC-2 es el grupo más común de cepas VTEC no-O157. Incluye cepas de varios serotipos como O111:H8 y cepas relacionadas no móviles, O26:H11 y O111:H11. Estas cepas se agruparon en GC14, al igual que las incluidas en la base de datos, aisladas de seres humanos en EE.UU. y Alemania.

STEC-1 (GC34) incluye muchos tipos de O diferentes, generalmente asociados con el antígeno flagelar H21. Estas cepas típicamente no poseen la isla de patogenicidad LEE y, por lo tanto, no expresan la intimina. Las cepas O91:H21 y O174:H21 estudiadas pertenecieron a este grupo y la mayoría de las cepas presentes en EcMLST se aislaron de pacientes y ganado en EE.UU. y Canadá.

Las cepas del grupo STEC-2 pertenecen al GC30. Según la base de datos, este GC está compuesto por cepas O113:H21, que se aislaron en diferentes países, principalmente EE.UU. y

Canadá, y la mayoría proviene de casos clínicos. En este estudio, además de las cepas O113:H21, cepas O113:NM y O116:H21 también pertenecieron a este GC.

Por otro lado, y coincidentemente con los resultados de Isiko *et al.* (2015), tres aislamientos VTEC de ganado pertenecieron al GC17 (denominado EPEC-2), que no se asocia comúnmente con cepas VTEC, específicamente dos aislamientos O103:NM y uno O103:H2. En este grupo se incluyen muchas cepas de *E. coli* enteropatógenas con antígeno H2, aisladas de seres humanos en EE.UU. y Alemania.

El GC12, denominado STEC-12 incluye cepas O145 aisladas de pacientes en EE.UU. y Alemania pero, en este estudio, el aislamiento bovino O146:NM también perteneció a este GC.

El algoritmo BURST utiliza un modelo de evolución bacteriana en el cual el genotipo ancestral (o fundador) aumenta en frecuencia en la población para convertirse en un clon predominante y luego comienza a diversificarse para producir un "complejo clonal" (Feil *et al.*, 2004; Spratt *et al.*, 2004). Los miembros de un clon emergente inicialmente serán indistinguibles (el mismo ST) pero con el tiempo se diversificarán para producir una serie de variantes que presentan mutaciones en uno o dos *loci* (variantes de locus simples o dobles [SLV o DLV]). Se espera que el ST fundador sea relativamente frecuente en la población, y probablemente tenga una distribución geográfica más amplia, en comparación con sus variantes derivadas SLV y DLV. Los complejos clonales jóvenes, tales como CC66, típicamente tendrán un ST fundador previsible, un número de SLV y tal vez uno o dos DLV. Los complejos clonales más antiguos se habrán diversificado y es probable que tengan una estructura menos simple. En tales casos, la identificación del fundador del complejo clonal puede ser menos clara, ya que tanto el genotipo fundador como los fundadores del subgrupo pueden tener un soporte de *bootstrap* suficiente como para ser el fundador principal (Spratt *et al.*, 2004). El CC230 proporciona un ejemplo de un complejo clonal grande y diversificado, con un 77% de soporte de *bootstrap* fundador y sus SLV vinculados, algunos de los cuales han prevalecido y se han diversificado para formar fundadores de subgrupos. De hecho, la mayoría de los 24 ST agrupados en CC en este estudio se relacionaron dentro de CC230.

Con respecto a los 17 nuevos ST identificados, 10 estuvieron estrechamente relacionados con ST previamente identificados, de los cuales 6 están incluidos en complejos clonales relevantes, ST 1157, 1160, 1174 y 1177 agrupados en CC230 (GC30, STEC-2) y ST 1158 y 1173 agrupados en CC106 (GC14, EHEC-2). En particular, el ST1174 (identificado en O141:H8) estuvo estrechamente relacionado con el ST223 (fundador del subgrupo), y solo se diferenció en uno de los siete *loci* MLST (SLV).

El ST223 incluye cepas O113:H21 aisladas de seres humanos en Canadá. En el caso de los ST1173 (identificado en O118:H16) y 1158 (identificado en O26:H11) tuvieron perfiles alélicos que difirieron en uno y dos de los siete *loci*, respectivamente, del ST106 (fundador primario), el cual incluye cepas de los serogrupos O26 y O111 aisladas principalmente de pacientes y ganado bovino (EE.UU. y Alemania).

Entre los aislamientos estudiados, se encontraron diferentes ST en un mismo serotipo. Los aislamientos O8:H19 pertenecieron a dos secuenciotipos, a ST379 y a uno nuevo, ST1177; los aislamientos O20:H19 pertenecieron a ST92 y a uno nuevo, ST1157; los aislamientos O26:H11, a ST943 y a uno nuevo, ST1158; los aislamientos O141:H8 a ST144 y a uno nuevo, ST1174; los aislamientos O174:H21, a ST89 y a uno nuevo, ST1178; los aislamientos O178:H19, a ST 1157 y 1176, ambos ST nuevos.

No pudimos determinar una asociación entre el origen y el ST. Siete ST (ST1157, ST1171, ST1066, ST89, ST223, ST147 y ST130) se detectaron simultáneamente en cepas VTEC aisladas de alimentos y ganado. El ST66 se asignó a ambos aislamientos O157:H7, una cepa humana y una de ganado. Por lo tanto, y como se observó en estudios anteriores (Eichhorn *et al.*, 2015; Isiko *et al.*, 2015), no existe una asociación evidente entre ST y huéspedes, particularmente en poblaciones VTEC no-O157, es decir, el mismo clon está presente tanto en humanos como en ganado o alimentos.

En concordancia también con estudios anteriores (Abu-Ali *et al.*, 2009; Eichhorn *et al.*, 2015), los resultados de MLST revelaron que las cepas de los cinco serogrupos VTEC no-O157 más prevalentes presentaron una estrecha relación; O26, O111 y O118 se agruparon juntos dentro de CC106 y, O91 y O113 se agruparon dentro de CC230. Particularmente, con respecto a los dos aislamientos O26:H11, no se agruparon juntos (uno de ellos resultó un *singleton*) y ninguno se asignó a ST106, un ST comúnmente asociado con este serotipo (Ziebell *et al.*, 2008; Abu-Ali *et al.*, 2009; Contreras *et al.*, 2011). La diversidad genética de O26:H11 también ha sido demostrada en estudios previos, en los cuales se analizaron diferentes regiones genómicas (Zhang *et al.*, 2000; Bonanno *et al.*, 2015; Krüger *et al.*, 2015).

Recientemente, Palanisamy y colaboradores (2017), utilizando el mismo esquema de MLST que el utilizado en esta tesis, identificaron diferentes ST en cepas VTEC aisladas de pacientes con gastroenteritis y de bovinos en Qatar. En los aislamientos EHEC de seres humanos, los secuenciotipos mas prevalentes fueron los ST 171, 303, 27 y 243. En nuestro estudio, ninguno de estos genotipos fue identificado. Sin embargo, los ST 1138 y 119 (identificados en aislamientos de bovino y ser humano, respectivamente), identificados por estos

autores, concuerdan con ST asociados a cinco cepas de bovinos de Argentina (serotipos O39:H49 y O103:H2/NM).

La técnica de MLST ha sido usada para estudiar aparición de zoonosis, detectar brotes de enfermedades, estimar las tasas de prevalencia y los orígenes de los factores de virulencia (transmisión vertical u horizontal), entre otros (Pérez-Losada *et al.*, 2017). Por lo tanto, las bases de datos de MLST proporcionan una plataforma sumamente importante para las investigaciones epidemiológicas y evolutivas. El aumento del número de especies para las que se dispone de datos de secuencias multilocus ha ayudado a rastrear la propagación de clones patógenos y examinar cómo han evolucionado. Desde hace ya varios años, se ha propuesto que la implementación de nuevos algoritmos y metodologías de secuenciación facilitarán aún más estudios acerca de cómo las bacterias evolucionan para convertirse en virulentas y desarrollan resistencia a los antibióticos (Feil y Enright, 2004).

Este trabajo es el primer estudio que analiza, mediante el método de MLST, cepas VTEC de diferentes serotipos aisladas en Argentina. Por lo tanto, proporciona los primeros datos sobre cuáles son los clones que están circulando en el país. Los resultados mostraron que algunos aislamientos VTEC obtenidos de ganado bovino y alimentos cárnicos de Argentina pertenecen a los mismos ST que son asociados con cepas de casos clínicos aisladas en diferentes regiones geográficas. La identificación de cepas VTEC de alto riesgo es importante para desarrollar iniciativas en salud pública. Nuestros datos muestran que muchos de los aislamientos estudiados podrían representar un riesgo zoonótico grave. Sin embargo, el riesgo potencial real estará definido además por los perfiles de virulencia, los cuales pueden diferir entre aislamientos que pertenecen al mismo ST.

SECCIÓN EXPERIMENTAL III

Determinación de los niveles de expresión del gen *nleB* (OI-122) en cepas de *Escherichia coli* verotoxigénico no-O157:H7

2.3.1. INTRODUCCIÓN

La patogenicidad de las cepas VTEC *eae*-positivas, depende en gran parte, de la presencia del *locus* LEE, el cual codifica el sistema de secreción de tipo III (SSTIII), un aparato macromolecular similar a una jeringa que transloca dentro de la célula huésped factores de virulencia conocidos como efectores. Los genes *nle*, como ya se describió anteriormente, codifican parte de estas proteínas efectoras translocadas. Diferentes estudios sugieren que la detección de un alto número de estos genes efectores, en cepas VTEC pertenecientes a serotipos O157:H7 y no-O157 causantes de enfermedad en humanos, supone una ventaja de virulencia en estas cepas, en comparación con la menor prevalencia encontrada en cepas que no causan enfermedad (Wickham *et al.*, 2006; Mingle *et al.*, 2012).

Actualmente, han sido identificados más de 30 tipos diferentes de efectores (Coombes *et al.*, 2008; Yen *et al.*, 2016). Algunas de estas proteínas interfieren en la respuesta inmune del hospedador durante la infección con VTEC, resultando clave en la virulencia en humanos luego de la transmisión zoonótica. El *screening* genético de los efectores secretados por SSTIII (Nle) indica que algunos de ellos contribuyen a la colonización y persistencia de VTEC en el ganado, aumentando las posibilidades de transmisión zoonótica y ambiental (Dziva *et al.*, 2004; van Diemen *et al.*, 2005; Coombes *et al.*, 2008). Wickham y colaboradores (2006) y Kelly y colaboradores (2006) demostraron que, bacterias mutadas de *Citrobacter rodentium* (perteneciente a la familia de patógenos bacterianos que producen la lesión A/E) que tenían deletado, en particular, el gen *nleB*, produjeron una colonización reducida mediante infecciones simples e hiperplasia colónica disminuida en ratones, proponiendo a NleB como un factor de virulencia esencial de este patógeno. Además, plantearon la hipótesis de que NleB podría ser una de las moléculas que contribuyan a la baja dosis infectiva de VTEC (Wickham *et al.*, 2006). Recientemente, otros investigadores, demostraron también en estudios *in vivo* que NleA, NleB y NleF son importantes para la colonización y la patología en el modelo de infección por *C. rodentium* (Yen *et al.*, 2016).

En cuanto al rol de estos efectores en la virulencia de VTEC, los patógenos que producen la lesión A/E, mediada por el *locus* LEE, utilizan los efectores dependientes del SSTIII para alterar la detección por parte del huésped y la consiguiente activación de respuestas

inflamatorias, evitando así la eliminación del patógeno del hospedador. Los efectores NleB, NleC, NleE, NleH1 y Tir son supresores de la ruta NF- κ B interviniendo en las respuestas proinflamatorias del huésped. NleB, específicamente, inhibe la respuesta inflamatoria de la célula huésped al prevenir la translocación del regulador inmunitario NF- κ B al núcleo celular (Newton *et al.*, 2010; Stevens y Frankel, 2014; Yen *et al.*, 2016).

Teniendo en cuenta el rol que podrían tener estos efectores en la patogenicidad de VTEC, no solo es importante detectar la presencia de los genes codificantes sino también evaluar sus niveles de expresión. Durante mucho tiempo, la expresión de genes dentro de poblaciones clonales fue considerada como un proceso relativamente homogéneo. Sin embargo, en la última década se ha demostrado que la variabilidad de la expresión génica, debida a diferentes mecanismos, desempeña un papel importante, particularmente, en las poblaciones clonales (de Sablet *et al.*, 2008; de Gouw *et al.*, 2014; Staley y Harwood, 2014; Aas *et al.*, 2018). Estos mecanismos van desde variaciones inherentes al proceso bioquímico de la expresión génica hasta las respuestas individuales a las variaciones en el microentorno local, un fenómeno llamado plasticidad fenotípica. En este caso, una señal ambiental es directamente responsable del cambio en la expresión génica y el fenotipo. Además, estudios recientes han demostrado que, incluso, variaciones genotípicas dentro de las poblaciones clonales, causadas por la evolución clonal, pueden contribuir a la variabilidad de la expresión génica. Estas variaciones genotípicas, pueden ser causadas por mutaciones y diferencias en el número de copias de una determinada secuencia génica (Roberfroid *et al.*, 2016).

En cuanto a las metodologías utilizadas en el estudio de la expresión génica, la PCR cuantitativa (qPCR) se ha convertido en una técnica *gold* estándar para la evaluación precisa, sensible y rápida de los niveles de expresión de genes, mediante la cuantificación de ADN copia (ADNc) sintetizado a partir de ARN mensajero (ARNm) (Derveaux *et al.*, 2010). Este tipo de cuantificación analiza los cambios relativos de expresión basal de un gen de interés versus un gen de expresión constante que actúa como control endógeno, llamado gen de referencia, comparando la expresión de ambos genes en una muestra problema frente a una muestra control (Pfaffl, 2001; Smith y Osborn, 2009).

Siguiendo con el concepto de MRA propuesto por Coombes y colaboradores (2008), que tiene como objetivo discriminar entre cepas VTEC no-O157 que constituyen un riesgo para la salud humana de aquellas que no están asociadas con enfermedades graves y epidémicas, y teniendo en cuenta que *nleB* es uno de los principales genes efectores propuesto como marcador de virulencia que está involucrado en la acción del SSTIII durante la patogénesis de VTEC,

nuestro objetivo fue evaluar los niveles de expresión relativa de este gen, mediante PCR cuantitativa.

2.3.2. OBJETIVO

- Evaluar y comparar los niveles de expresión del gen *nleB* entre aislamientos de distinto origen y serotipo.

2.3.3. MATERIALES Y MÉTODOS

2.3.3.1. Aislamientos estudiados

De la colección de aislamientos no-O157 estudiados (todos ellos pertenecientes al Laboratorio de Inmunoquímica y Biotecnología - CIVETAN, FCV-UNCPBA, Argentina), se seleccionaron para este análisis aquellos que resultaron positivos para la presencia del gen *nleB*, codificado en la isla de patogenicidad OI-122 (ver Tabla S1 en Anexo I, correspondiente a los resultados presentados en la sección experimental I, cap. II). Además, se analizaron tres aislamientos O157:H7 de origen humano y de alimentos, uno de los cuales fue usado como muestra control (Tabla 12). En total se analizaron 24 aislamientos VTEC pertenecientes a 10 serotipos (O157:H7 y no-O157), y a diferentes orígenes (humano, bovino y alimentos cárnicos).

Tabla 12. Aislamientos VTEC positivos para la presencia del gen *nleB* analizados por qPCR.

AISLAMIENTO	SEROTIPO	ORIGEN ^a	Perfil de virulencia ^b
224.2.2	O26:H11	humano CH	<i>vtx1; eae; ehxA</i>
323.5.1	O26:H11	humano SUH	<i>vtx1; eae; ehxA</i>
73.2.2	O111:H2	humano D	<i>vtx1; eae; ehxA</i>
306.10.3	O118:H2	humano D	<i>vtx1; eae; ehxA; subA</i>
299	O121:H19	humano CH	<i>vtx2; eae; ehxA; subA</i>
430	O128:NM	humano portador	<i>vtx2; eae; ehxA</i>
355	O145:NM	humano D	<i>vtx2; eae; ehxA</i>
74.2	O145:NM	humano SUH	<i>vtx2; eae; ehxA</i>
FB 78	O145:NM	bovino <i>feedlot</i>	<i>vtx1; eae</i>
FB 79	O145:NM	bovino <i>feedlot</i>	<i>vtx1; eae; ehxA</i>
FB 91	O145:NM	bovino <i>feedlot</i>	<i>vtx2; eae; ehxA</i>
3.1.2	O145:NM	humano CH	<i>vtx2; eae; ehxA</i>
506.1.5.2	O145:NM	humano CH	<i>vtx2; eae; ehxA</i>
FB 67e	O145:NM	bovino <i>feedlot</i>	<i>vtx1; eae; ehxA</i>
FB 87	O145:NM	bovino <i>feedlot</i>	<i>vtx2; eae; ehxA</i>
FB 92	O145:NM	bovino <i>feedlot</i>	<i>vtx2; eae; ehxA</i>
FB 81e	O145:NM	bovino <i>feedlot</i>	<i>vtx2; eae</i>
FB 12	O146:H21	bovino <i>feedlot</i>	<i>vtx2; eae</i>

34*	O157:H7	humano SUH	<i>vtx2; eae; ehxA</i>
GAL 26	O157:H7	humano SUH	<i>vtx2; eae; ehxA</i>
HT 2-15	O157:H7	hamburguesa	<i>vtx2; eae; ehxA</i>
T 83-1	O165:NM	bovino	<i>vtx2; eae; ehxA</i>
FO 127-3	O177:NM	bovino <i>feedlot</i>	<i>vtx2; eae; ehxA</i>
FB 15	O177:NM	bovino <i>feedlot</i>	<i>vtx2; eae; ehxA</i>

^a CH, diarrea con sangre; D, diarrea; SUH, síndrome urémico hemolítico.

^b Perfil de virulencia de acuerdo a los siguientes genes: *vtx1*, *vtx2*, *eae*, *ehxA*, *saa*, *subA*.

* Cepa utilizada como control en los ensayos de cuantificación relativa.

2.3.3.2. Extracción de ARN total y obtención de ADN copia

Las bacterias se cultivaron *overnight* a 37 °C en caldo Luria-Bertani (LB) con agitación. Cada cultivo *overnight* se diluyó 50 veces en DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) y se volvió a cultivar a 37 °C, con CO₂ al 5 % y en agitación, aproximadamente 90 min, hasta llegar a una densidad óptica a 600 nm (DO₆₀₀) de 0,6. El DMEM es un medio ampliamente utilizado en ensayos de expresión (Rosenshine *et al.*, 1996; Roe *et al.*, 2007; Kudva *et al.*, 2012, 2015). Luego de este crecimiento, se procedió a la extracción de ARN.

El ARN total (ARNt) fue purificado utilizando el *kit SV Total RNA Isolation System* (Promega, Madison, WI) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La calidad y la cantidad de ARN se evaluó mediante electroforesis, en geles de agarosa al 0,8 %, y espectrofotometría (estimación de la pureza del ARN mediante la relación A260/A280, asumiendo un valor óptimo de este índice mayor a 1,7). Se realizó un tratamiento adicional con DNasa I (Roche Diagnostics GmbH) para eliminar posibles restos de ADN genómico. Para esto, se incubaron 1 µg de ARNt con 20 U de DNasa I durante 1 h a 37 °C, seguido de 12 min a 72 °C para su inactivación. Posteriormente, se llevó a cabo la síntesis de ADN copia (ADNc) mediante la retrotranscripción (RT) de 1 µg de ARNt utilizando el *kit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA), en reacciones de 20 µl de volumen final. Para asegurar que la amplificación observada en las posteriores reacciones de qPCR fuera atribuible a ADNc y no a ADN genómico contaminante, se llevaron a cabo controles para cada muestra en las mismas condiciones, pero sin transcriptasa reversa. Las condiciones de termociclado para las reacciones de RT fueron: 25 °C durante 10 min seguido de 120 min a 37 °C y 5 min a 85 °C. Los ADNc obtenidos se almacenaron a -20 °C hasta su posterior uso.

2.3.3.3. Condiciones para la cuantificación relativa por qPCR

Los niveles de expresión del gen *nleB* se evaluaron mediante ensayos de cuantificación relativa por PCR en tiempo real (qPCR) utilizando *SYBR Green*, fluoróforo intercalante de ADN.

Los *primers* específicos utilizados para el gen de interés, *nleB*, codificado en OI-122, fueron los descritos por Bugarel *et al.* (2010a) (NleB Fw 5'-CATGTTGAAGGCTGGAASTTTGT-3' y NleB Rv 5'-CCGCTACAGGGCGATATGTT-3'). En los ensayos se utilizó como gen de referencia o control endógeno el gen *tufA* (TufAqF 5'-TGGTTGATGACGAAGAGCTG-3' y TufAqR 5'-GCTCTGGTTCCGGAATGTAA-3'), gen *housekeeping* de *E. coli* (de Sablet *et al.*, 2008).

Las reacciones de qPCR se llevaron a cabo por triplicado en placas de 96 pocillos en un equipo *OneStep Plus Real-Time PCR System* (Applied Biosystems). Cada reacción contuvo 4 µl de ADNc diluido 1/10 de cada muestra, 10 µl de master mix 2X *SYBR Green* (*FastStart Universal SYBR Green Master*, Roche), 300 nM de cada *primer nleB*, y 300 nM de cada *primer tufA*, en un volumen final de 20 µl. Las condiciones de termociclado fueron: 95 °C durante 10 min seguido de 40 ciclos de 15 seg a 95 °C y 1 min a 60 °C, seguido de una etapa final, desde 60 °C a 95 °C, para la obtención de las curvas de *melting* necesarias para descartar la formación de productos inespecíficos. Las condiciones del ensayo, la elección del gen de referencia y la confección de las curvas estándares fueron optimizadas durante el transcurso de la tesis.

2.3.3.4. Método $\Delta\Delta C_t$ y análisis de datos

La cuantificación relativa, luego de la amplificación de ambos genes en todos los aislamientos, se realizó en comparación a la expresión basal de *nleB* en una cepa O157:H7 aislada de un niño con SUH (aislamiento "34"). El *fold change* (veces de cambio) respecto a la cepa control se calculó mediante el método comparativo delta delta C_t ($\Delta\Delta C_t$) utilizando las eficiencias de amplificación de los genes *target* y endógeno (Pfaffl, 2001). Para ello se elaboraron las curvas estándar relativas de ambos genes.

2.3.3.5. Puesta a punto de la curva estándar relativa

En los ensayos de qPCR para medir expresión génica, es necesario corregir la variación entre las muestras. En este proceso se compara la expresión del gen de interés en dos muestras diferentes pero cada una de ellas en relación a un gen de referencia, el cual, teóricamente, se expresa de forma constante en ambas muestras. Los resultados obtenidos se normalizan con ayuda de este control, el gen de referencia. Generalmente, este control es un gen que debe expresarse constante e independientemente de las condiciones experimentales, del tratamiento de las muestras, así como en los diferentes tejidos o tipos celulares. Para normalizar la expresión génica, a partir de ensayos de cuantificación relativa, existen algunos métodos y modelos que

consideran la eficiencia de la amplificación para determinar los niveles de expresión, como por ejemplo, el método comparativo de Ct ($2^{-\Delta\Delta C_t}$), en el cual se requiere que la eficiencia de amplificación (E) sea la misma para el gen de interés y el gen de referencia o endógeno (Livak y Schmittgen, 2001), o el modelo de Pfaffl (2001) para las eficiencias que no resultan iguales.

Para la normalización y determinación de los niveles de la expresión relativa de *nleB*, se evaluaron los productos de expresión constitutiva de dos genes para ser usados como controles endógenos y se seleccionó *tufA*, un gen *housekeeping* de *E. coli*. Se construyó luego, para cada uno de los genes, el de interés *nleB* y el gen endógeno *tufA*, una curva estándar a partir de diluciones seriadas (1/5) de un *pool* de ADNc de diferentes cepas VTEC positivas para el gen *target*. Se prepararon las reacciones de qPCR para la amplificación de cada uno de los puntos de la curva (de 6 a 7 diluciones) para ambos genes, por triplicado. Estas dos curvas determinaron las eficiencias de amplificación de ambos genes necesarias para la posterior obtención de los valores de *fold change*. Las eficiencias individuales de cada gen fueron determinadas por el programa REST© (*Relative Expression Software Tool*) a partir de los promedios de los puntos de cada una de las curvas (Pfaffl *et al.*, 2002). Se consideró una correcta eficiencia cuando la curva arrojó un valor entre 90% y 110%, lo que corresponde a una pendiente de entre -3,6 y -3,1. Otro parámetro crítico para la evaluación de la eficiencia de la PCR es el Coeficiente de correlación (R^2). Este coeficiente refleja la linealidad de la curva, $R^2 > 0,99$ es el valor aceptable.

2.3.3.6. Análisis estadístico

Las diferencias de expresión se evaluaron con respecto a la significancia estadística utilizando el software InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2018). Una vez comprobada la normalidad, independencia y homocedasticidad (homogeneidad de varianza) de los datos por grupos, se evaluaron los valores de *fold change* estadísticamente mediante análisis de varianza (ANOVA) de un factor. El análisis estadístico ANOVA se llevó a cabo para comparar los niveles de expresión de acuerdo, por un lado, al origen de los aislamientos (bovino y humano) y al serotipo (en el caso de aquellos serotipos que estuvieron representados por mas de un aislamiento), y por otro lado, a tres categorías arbitrarias establecidas según los valores de *fold change* obtenidos: aquellas cepas que presentaron un nivel de expresión por encima del control (*fold change* >1); las que presentaron valores iguales o menores al control ($1 \geq \text{fold change} \geq 0,5$); y, por último, aquellas cepas que tuvieron un nivel de expresión menor a la mitad del control (*fold change* <0,5). En las pruebas de comparación de las medias de los transcriptos *nleB* entre grupos se hizo una transformación logarítmica de los datos para cumplir con el supuesto de una distribución normal para todos los análisis estadísticos. La significancia estadística fue considerada para un p-

valor $\leq 0,05$. Cuando el ANOVA tuvo un resultado significativo y el análisis involucró a más de dos grupos, se realizó una prueba de Duncan para medir diferencias específicas entre pares de medias.

2.3.4. RESULTADOS

Se determinó mediante PCR en tiempo real la expresión basal del gen efector *nleB*, ubicado en la OI-122, en 24 cepas VTEC aisladas de seres humanos, bovinos y alimentos, relativa a una cepa O157:H7 aislada de un niño que desarrolló SUH.

En cuanto a la normalización de las reacciones de cuantificación relativa, a partir de la construcción de las curvas estándar para el gen *target* y el gen endógeno, se obtuvieron mediante el *software* REST, las eficiencias de amplificación de cada gen, 98,8% (*nleB*) y 93,6% (*tuf*).

La cuantificación relativa se realizó en comparación, como se dijo anteriormente, a la expresión del mismo gen en una cepa O157:H7 de origen humano (“34”). Se consideraron para el análisis de expresión todos los aislamientos con un valor de Ct (para *nleB*) $\leq 35,92$ (valor obtenido a partir de la validación de la curva estándar relativa). Aquellos aislamientos que mostraron valores por encima de este número fueron considerados negativos. Los resultados de la expresión relativa de cada aislamiento expresados como valores de *fold change* se presentan en la Tabla 13.

Tabla 13. Niveles de expresión relativa (*fold change*) del gen *nleB* obtenidos en los aislamientos estudiados.

Cepa	Serotipo	Ct X NLEB	Ct X TUF	ΔCt^1	$\Delta \Delta Ct^2$	<i>Fold change</i> ³	Clasificación ⁴
224.2.2	O26:H11 ^h	25,09305	17,52110	7,57195	0,94618	0,52654	II
323.5.1	O26:H11 ^h	26,05541	19,38123	6,67419	0,04842	0,95740	II
73.2.2	O111:H2 ^h	27,24693	20,03893	7,20800	0,58223	0,65709	II
306.10.3	O118:H2 ^h	27,31407	18,52985	8,78422	2,10330	0,23397	III
299	O121:H19 ^h	29,78696	18,04047	11,74649	5,06557	0,03043	III
430	O128:NM ^h	37,05211**	19,26666	17,78545	11,10453	-	-
355	O145:NM ^h	34,00747	18,34473	15,66274	9,03697	0,00187	III
74.2	O145:NM ^h	24,48488	16,41887	8,06601	-0,17682	1,14935	I
FB 78	O145:NM ^b	25,65421	16,73557	8,91865	0,67582	0,63552	II
FB 79	O145:NM ^b	26,86724	17,70832	9,15892	0,91609	0,53219	II
FB 91	O145:NM ^b	26,34391	18,76171	7,58221	-0,66062	1,56132	I
3.1.2	O145:NM ^h	26,15351	17,93101	8,22251	1,59674	0,33437	III
506.1.5.2	O145:NM ^h	27,48597	20,21963	7,26634	0,64057	0,62980	II
FB 67e	O145:NM ^b	28,02897	19,90210	8,12686	1,44595	0,36245	III
FB 87	O145:NM ^b	27,74895	19,05491	8,69404	2,01312	0,24746	III
FB 92	O145:NM ^b	28,56320	20,01844	8,54476	1,86385	0,27122	III
FB 81e	O145:NM ^b	26,07932	18,99349	7,08583	0,46006	0,69398	II

FB 12	O146:H21^b	27,16010	19,05183	8,10828	-0,13456	1,08203	I
34*	O157:H7^h	26,10569	17,86285	8,24283	0	1	R
GAL 26	O157:H7^h	28,35739	20,29552	8,06187	-0,18096	1,10093	I
HT 2-15	O157:H7^a	36,17679	20,58543	15,59136	8,96559	0,00192	III
T 83-1	O165:NM^b	26,46121	18,85245	7,60876	0,98299	0,50530	II
FO 127-3	O177:NM^b	27,65038	17,86149	9,78889	1,54606	0,34384	III
FB 15	O177:NM^b	29,66723	21,61592	8,05130	1,42554	0,34540	III

* Cepa utilizada como muestra control para el cálculo de los niveles de expresión relativa.

** Valor por fuera de la curva estándar.

^h origen humano

^b origen bovino

^a origen alimento

¹ $\Delta Ct = Ct_{\text{gen}_{\text{target}}} - Ct_{\text{gen}_{\text{endógeno}}}$

² $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{muestra}} - \Delta Ct_{\text{control}}$

³ Valores de *fold change* (veces de cambio) obtenidos por el método de Pfaffl *et al.* (2002), con eficiencias para el gen *target* y el gen endógeno de 98,8% y 93,6%, respectivamente.

⁴ Clasificación arbitraria establecida de acuerdo a los valores de *fold change* de cada aislamiento: I, *fold change* >1; II, $1 \leq \text{fold change} < 0,5$; III, *fold change* <0,5; R, cepa control.

Se detectaron niveles de expresión de *nleB* heterogéneos entre las cepas estudiadas. La mayoría de los aislamientos presentaron niveles de expresión detectables. Sin embargo, una cepa del serotipo O128:NM ("430"), de origen humano, se consideró negativa para la detección de expresión en las condiciones del ensayo estudiadas, ya que sus valores de Ct resultaron por fuera de los establecidos por la curva estándar.

Los resultados mostraron que 4 aislamientos de origen humano y bovino, pertenecientes a los serotipos O145:NM, O146:H21 y O157:H7, presentaron niveles de expresión del gen *nleB* por encima del control. Por el contrario, dos cepas de los serotipos O121:H19 ("299") y O145:NM ("355"), ambas de origen humano, y una cepa O157:H7 ("HT 2-15") de alimento, presentaron niveles de expresión considerablemente inferiores a la cepa control.

En la Figura 8 se muestra el nivel de expresión relativa del gen *nleB* en las cepas estudiadas.

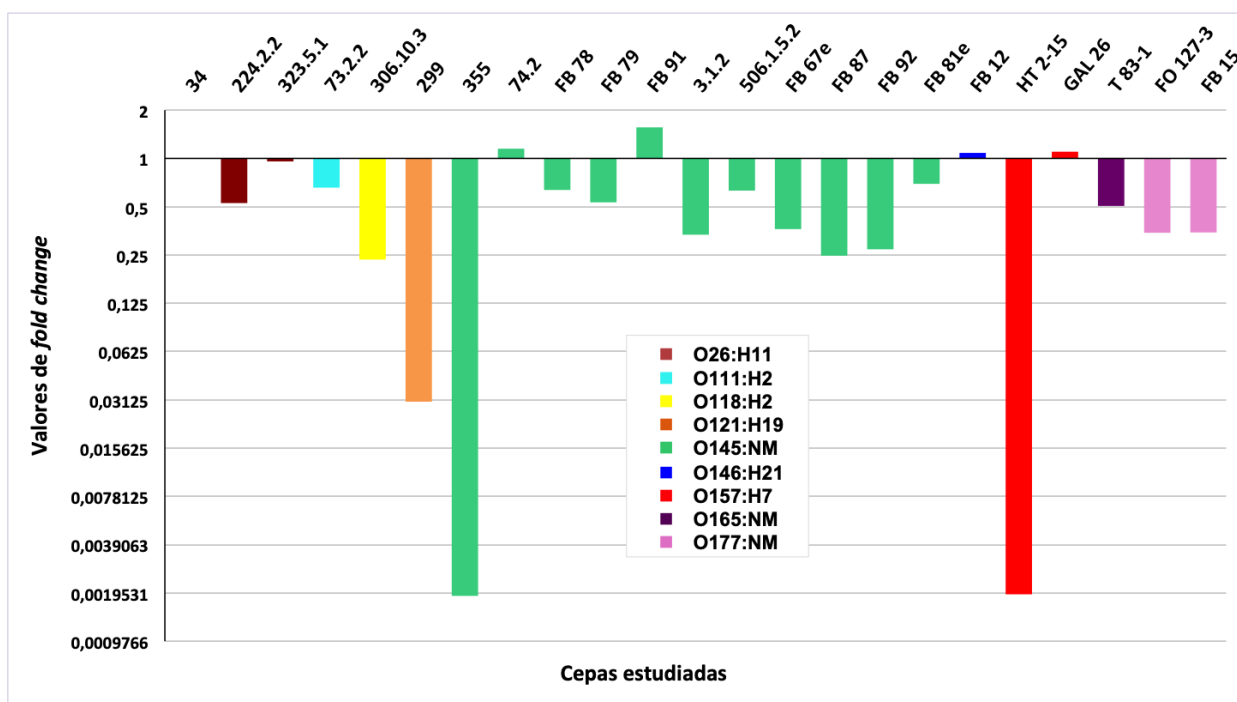


Figura 8. Niveles de expresión relativa del gen *nleB* en los aislamientos positivos para dicho gen (escala logarítmica). El aislamiento "34" (serotipo O157:H7) se utilizó como control para el cálculo de los niveles de expresión relativa. Aquellos aislamientos con valores de *fold change* >1 presentan niveles de expresión mayores al control y, aquellos por debajo de 1, niveles de expresión menores. No se incluyó el aislamiento O128:NM ("430"), debido a que no se detectó expresión de *nleB*, en las condiciones de ensayo estudiadas.

Mediante un análisis de varianza (ANOVA), se compararon los niveles de expresión de acuerdo al origen de las cepas, al serotipo y a una clasificación arbitraria establecida según los valores de *fold change* obtenidos para cada cepa. Para cumplir con los supuestos estadísticos y poder comparar los grupos de cepas mediante este análisis, los tres aislamientos que presentaron niveles de expresión considerablemente menores a la cepa control (valores de *fold change* <0,1, lo que equivale a 10 veces menos que el control), no se incluyeron en el conjunto de datos.

En relación a la comparación realizada de acuerdo al origen de los aislamientos, se tuvieron en cuenta sólo dos grupos, bovino y humano, debido a que, en el conjunto de cepas estudiadas sólo una fue aislada de alimentos. Los resultados mostraron que no existen diferencias significativas entre las medias de los valores de *fold change* de las cepas de bovinos y las de humanos, por lo tanto no se estableció asociación entre los niveles de expresión de *nleB* y el origen de los aislamientos (Fig. 9a).

De acuerdo al serotipo de las cepas estudiadas, se muestran los resultados obtenidos a partir de la comparación entre las medias de los niveles de expresión de cuatro serotipos en la Figura 9b. Se tuvieron en cuenta para este análisis aquellos serotipos que estuvieron representados por más de un aislamiento, O26:H11, O145:NM, O157:H7 y O177:NM. Los

resultados también mostraron que no hubo diferencias significativas entre los valores de *fold change* de las cepas de diferentes serotipos y, por lo tanto, tampoco se estableció asociación entre los niveles de expresión de *nleB* y el serotipo de los aislamientos. A pesar que las medias de los valores de *fold change* de los serotipos O26:H11 y O157:H7 resultaron mas altos que los otros dos serotipos, las diferencias entre los grupos no fueron estadísticamente significativas.

Por otro lado, de acuerdo a la comparación entre los grupos con niveles de expresión basal similares (clasificación arbitraria establecida según los valores de *fold change*), los resultados mostraron que existen diferencias significativas entre las tres categorías definidas: el grupo "I" (*fold change* >1), incluyó aislamientos de los serotipos O145:NM, O146:H21 y O157:H7; el grupo "II" ($1 \geq \text{fold change} \geq 0,5$), al cual pertenecieron aislamientos de los serotipos O26:H11, O111:H2, O145:NM y O165:NM; y por último el grupo "III" (*fold change* <0,5), incluyó serotipos O118:H2, O145:NM y O177:NM. Los tres grupos estuvieron representados por cepas aisladas tanto de bovino como de humano. Por otro lado, este análisis también demostró que el grupo "III" presentó niveles de expresión significativamente menores al control y a los otros dos grupos, mientras los grupos "I" y "II" presentaron los niveles más altos de expresión, sin existir diferencias significativas entre cada uno de ellos y el control, pero sí entre ellos (Fig. 9c).

Fig. 9(a)

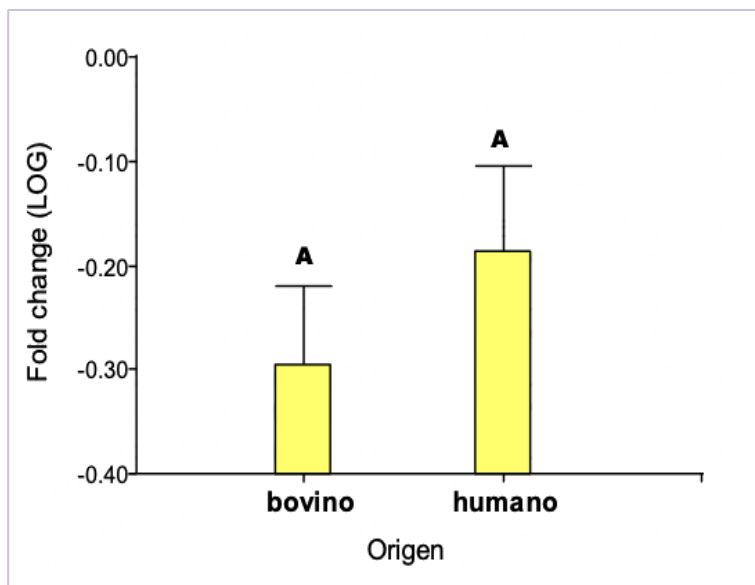


Fig. 9(b)

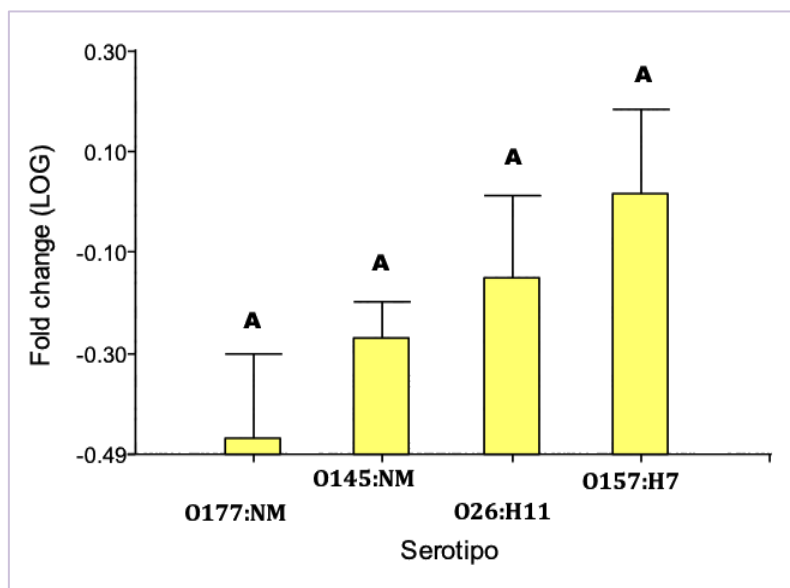


Fig. 9(c)

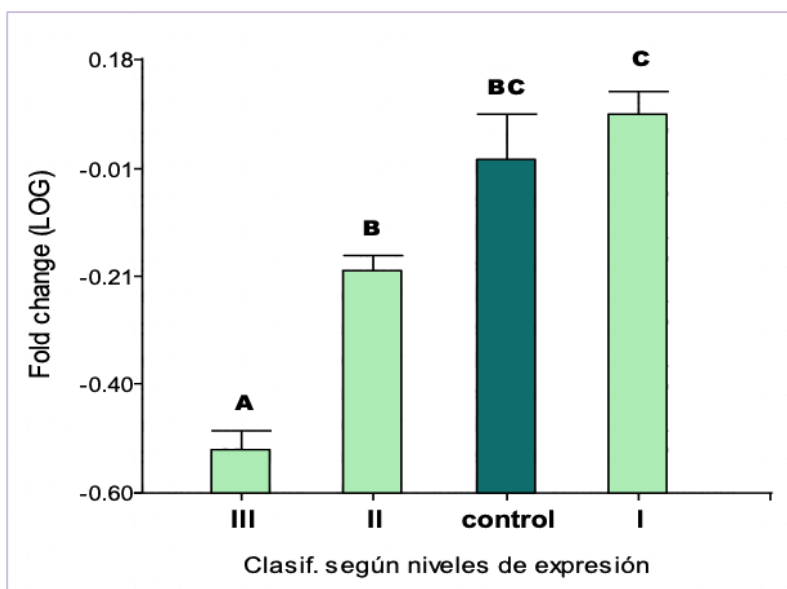


Figura 9 (a-c). Comparación de los niveles de expresión basal relativa de *nleB*, según el origen de las cepas (a), el serotipo (b) y una clasificación basada en los valores de *fold change* obtenidos (c). Las figuras muestran las medias establecidas para cada grupo y en todas las figuras el eje-y representa la expresión basal de *nleB* relativa a la expresión basal en una cepa O157:H7 aislada de un caso clínico (SUH), expresadas en valores de *fold change*. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre los grupos (p -valor $\leq 0,05$), y las medias con la misma letra indican que no son estadísticamente diferentes.

Teniendo en cuenta la manifestación clínica causada por las cepas de origen humano, se realizó, específicamente, un análisis de varianza entre los aislamientos obtenidos de SUH y aquellos aislados de enfermedad leve (no-SUH). Los resultados revelaron que existen diferencias significativas entre los aislamientos asociados a SUH y aquellos no-SUH (Fig. 10a). Además,

por otro lado, se pudo establecer que los aislamientos no-SUH y los de origen bovino no fueron estadísticamente diferentes, pero si las cepas de bovino presentaron diferencias significativas con el grupo de cepas aisladas de SUH (Fig. 10b).

Fig. 10(a)

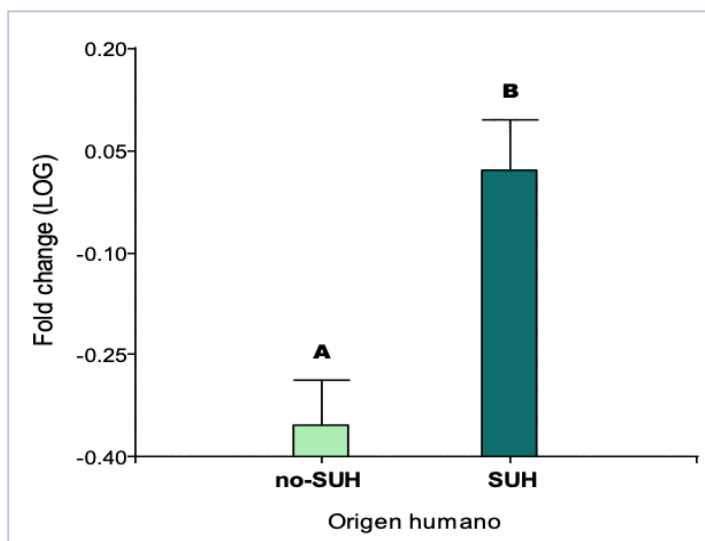


Fig. 10(b)

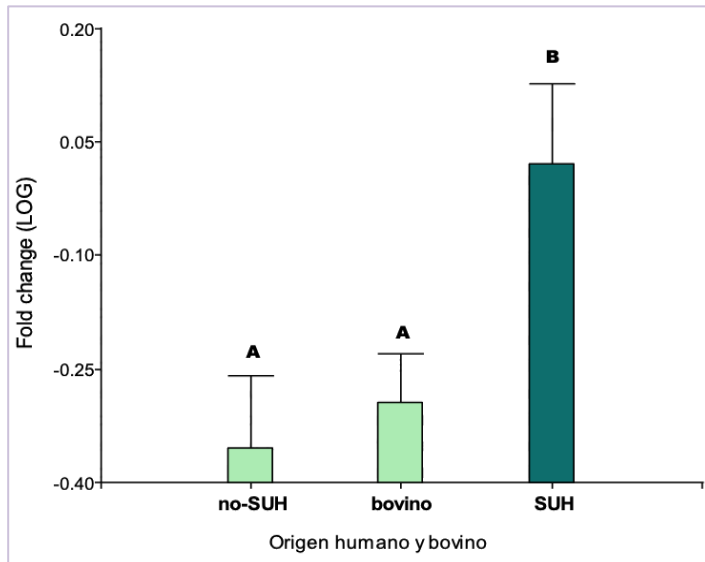


Figura 10 (a,b). Comparación de los niveles de expresión basal relativa del gen *nleB*, según el origen de las cepas teniendo en cuenta, aislamientos humanos asociados a SUH y no-SUH (a), y aislamientos asociados a SUH, no-SUH y de origen bovino (b). Las figuras muestran las medias establecidas para cada grupo y en ambas figuras el eje-y representa la expresión basal de *nleB* relativa a la expresión basal en una cepa O157:H7 aislada de un caso clínico (SUH), expresadas en valores de *fold change*. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre los grupos ($p\text{-valor} \leq 0,05$), y las medias con la misma letra indican que no son estadísticamente diferentes.

2.3.5. DISCUSIÓN

El control de la expresión de la virulencia en EHEC y factores del medio ambiente, tales como la microbiota del intestino del hospedador, podrían tener un rol crítico en la inflamación de la mucosa inducida por la bacteria. La regulación del SSTIII es energéticamente costoso y EHEC es versátil en la capacidad de sensar una gran variedad de estímulos del medio ambiente y adaptarse a microambientes del intestino para usar eficientemente este sistema de secreción (Carlson-Banning y Sperandio, 2016).

Muchas cepas no-O157:H7 estudiadas en esta tesis tienen el potencial de expresar efectores para infectar/colonizar al huésped (Tabla S1, en anexo). Sin embargo, se detectó que algunas cepas que poseen el gen *nleB* no lo expresan, al menos en condiciones basales. Ello no significa que ante la presencia de algún estímulo externo dichas cepas expresen, en este caso, el gen *nleB*. Se ha postulado que existen reguladores transcripcionales específicos en una cepa que podrían tener un gran impacto sobre la expresión génica diferencial entre aislamientos (de Gouw *et al.*, 2014). Por otra parte, ciertos polimorfismos en el ADN también podrían ser la causa de la expresión diferencial entre los aislamientos VTEC estudiados. Si estuvieran disponibles las secuencias completas de cada genoma de las cepas estudiadas, quizás se podría asociar las diferencias encontradas en la expresión del gen *nleB* a polimorfismos específicos de cada aislamiento.

Como se comentó anteriormente, además de los factores intrínsecos de la bacteria, la expresión génica puede estar influenciada por factores extrínsecos. Diferentes situaciones del microambiente pueden ser responsables de la aparición de diferentes fenotipos en una población clonal (Roberfroid *et al.*, 2016). Roe *et al.* (2007) evaluaron la expresión y regulación de diferentes Nle, particularmente NleA, en bacterias O157:H7 crecidas en DMEM y en MEM-HEPES, un medio conocido como inductor de la vía de secreción del SSTIII en EHEC, usando un *microarray* de ADN. Estos autores encontraron que muchos de ellos mostraron un nivel de transcripción desde 2 a 9 veces mayor cuando el cultivo se realizó en MEM-HEPES. El estudio de los niveles de la expresión basal de un gen, como el realizado en esta tesis, es una primera evaluación que nos permite tener conocimientos acerca de si la expresión en un grupo bacteriano es homogénea, sin presencia de inductores, o si, por el contrario, varía de acuerdo a origen o serotipo. Los niveles de expresión significativamente diferentes encontrados entre algunas cepas mostrarían que, en este experimento, las diferencias podrían ser explicadas en relación a diferencias en los promotores o a polimorfismos en la secuencia del gen específicos de cada cepa.

Los niveles similares de transcripción de *nleB* hallados entre los grupos de aislamientos de bovinos y humanos (sin considerar si proviene o no de un caso de SUH) y entre los de distintos serotipos mostraría que, asignarle a una cepa cierto potencial patógeno de acuerdo a su origen o a su serotipo, por lo menos para este gen efector, no sería útil. En el conjunto de resultados, fue muy llamativo hallar cepas (grupos I y II) con niveles de transcripción de *nleB* similares o superiores al de la cepa control (aislada de un paciente con SUH). Particularmente, es de destacar la cepa O145:NM aislada de bovino de *feedlot* que expresó aproximadamente dos veces el valor del control. Aas y colaboradores (2018) compararon transcriptomas de cepas VTEC no-O157 aisladas de SUH y de otras aisladas de pacientes asintomáticos o con enfermedad leve, con el propósito de investigar si las diferencias en el potencial patógeno podrían estar asociadas con la regulación y la expresión de los genes de virulencia. Identificaron varios genes que se expresaron diferencialmente entre el grupo de cepas SUH (en mayor nivel) y el no-SUH (menor). Estos resultados concuerdan con los obtenidos en esta tesis, en la cual se detectaron diferencias significativas en los niveles de expresión del gen *nleB* entre el conjunto de aislamientos asociados a SUH y aquellos aislados de enfermedad leve en seres humanos o de bovinos. Por otro lado, y llamativamente, la cepa O128:NM, que resultó negativa para la detección de la expresión de *nleB* en las condiciones del ensayo estudiadas, fue aislada de un niño portador.

El papel en la enfermedad de la amplia colección de proteínas Nle, ya sea individualmente o en conjunto, puede depender, como se discutió anteriormente, de al menos dos aspectos diferentes: el repertorio genético de cada cepa y las características del huésped. Será un gran desafío dilucidar los mecanismos moleculares que subyacen a la expresión y función coordinadas en la patogénesis y la enfermedad de un repertorio tan extenso de proteínas efectoras (García-Angulo *et al.*, 2008). Los resultados mostraron una expresión heterogénea en relación a *nleB* y que, independientemente de las características del origen del que fueron aisladas o del serotipo, distintas cepas VTEC no-O157, particularmente aquellas obtenidas de humano y bovino, presentaron niveles de expresión similares. Sin embargo, si se detectó expresión diferencial entre cepas aisladas de SUH y cepas aisladas de bovinos o de seres humanos con enfermedad leve.

SECCIÓN EXPERIMENTAL IV

Análisis comparativo de cepas nativas de Escherichia coli verotoxigénico no-O157:H7 en base al contenido genético de diferentes PAI, los perfiles de MLST y los niveles de expresión de genes de virulencia

2.4.1. OBJETIVO

- Comparar las cepas VTEC estudiadas de acuerdo a los perfiles de virulencia de las islas de patogenicidad, los niveles de expresión del gen *nleB* y los ST y CC previamente analizados, y discutir su potencial de virulencia.

2.4.2. MATERIALES Y MÉTODOS

Teniendo en cuenta los resultados presentados en las secciones experimentales anteriores, se realizó un análisis comparativo de las cepas VTEC estudiadas, mediante el software BioNumerics v.6.6 (Applied Maths NV, Saint-Martens-Latem, Bélgica), con el objetivo de discutir cuáles cepas presentan mayor potencial patogénico. Este agrupamiento se realizó en base al contenido de genes ubicados en PAI (sólo se tuvieron en cuenta aquellos aislamientos que resultaron positivos para al menos un gen codificado en PAI), en el contexto de los datos de seropatótipos, los perfiles de MLST (ST y CC) y los niveles de expresión del gen *nleB* obtenidos por qPCR, teniendo en cuenta los resultados resumidos en las tablas 11, 13 y S1 (anexo).

2.4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN GENERAL

La emergencia de nuevas cepas VTEC es una clara evidencia del genoma dinámico que poseen las bacterias de *E. coli* patógeno y su capacidad para transferir o adquirir importantes factores de virulencia. En los últimos años, numerosos estudios han evaluado la aparición de cepas emergentes y su relación con los reservorios naturales, y señalado la importancia de la identificación de genotipos de relevancia clínica, factores de virulencia y su rol en la patogénesis de VTEC. La caracterización molecular de los aislamientos es una herramienta importante para analizar la diversidad genética y su distribución en diferentes regiones geográficas (Torres *et al.*, 2018).

El rol de las cepas VTEC no-O157 en muchos países se encuentra subestimado, ya que la mayoría de los laboratorios ha priorizado la detección de cepas O157:H7 y no realizan análisis de rutina para el resto de las cepas. En el ganado bovino y otros animales que actúan como

reservorios se encuentran múltiples serogrupos, y de acuerdo con estudios previos, desde 1983 a 2002, alrededor del 70% de las infecciones por VTEC no-O157 fueron causadas por 6 de ellos, O26, O45, O103, O111, O121 y O145 (en la actualidad denominados "*Big Six*") (Brooks *et al.*, 2005). Los esfuerzos coordinados de los ministerios y profesionales de la salud en muchos países han tratado de mejorar el aislamiento, el diagnóstico, el tratamiento y la inocuidad de los alimentos. A pesar de estos esfuerzos, durante 2016, en Argentina se reportaron alrededor de 400 casos de SUH, con una incidencia de 8,4 casos cada 100.000 niños menores de cinco años (Torres *et al.*, 2018).

En este contexto, se planteó el objetivo de la presente tesis, caracterizar la diversidad genética de cepas de *Escherichia coli* verotoxigénico (VTEC) no-O157 nativas, particularmente provenientes de ganado y alimentos, desde el punto de vista filogenético y de su virulencia, para poder predecir el potencial patogénico de dichas cepas. En la figura 11 se comparan las cepas en base a los distintos caracteres estudiados (mostrándose sólo aquellas que resultaron positivas para al menos algún gen de las PAI estudiadas). De acuerdo a los resultados obtenidos, podemos resaltar, al igual que diversas investigaciones que hemos citado, que las características de virulencia de las cepas VTEC no-O157 son muy heterogéneas, presentando diversos perfiles alélicos y de virulencia, así como niveles de expresión basal diferencial en genes efectores (*nleB*), tanto inter como intra-serotipo.

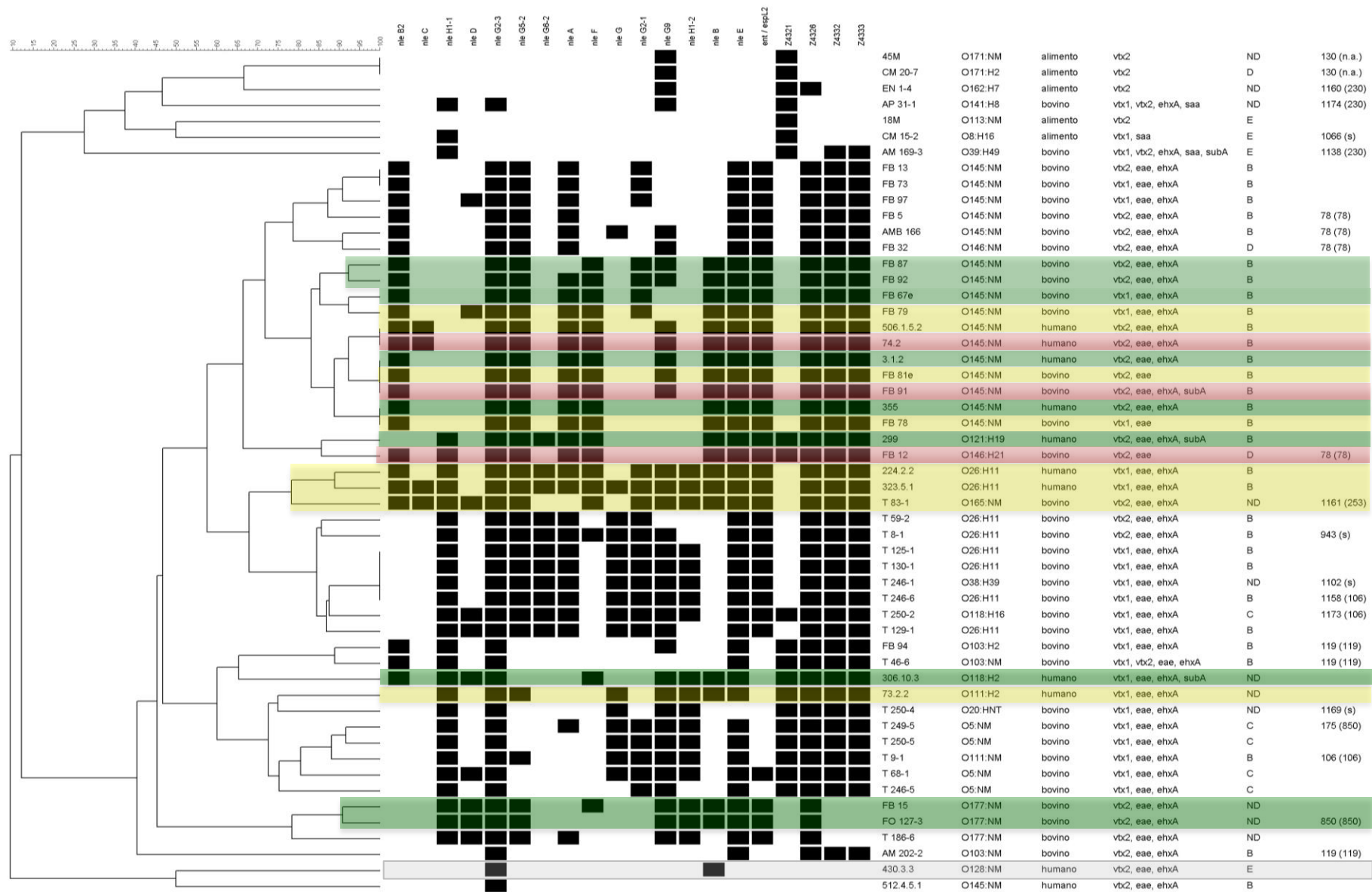


Figura 11. Análisis de agrupamiento de acuerdo a los genes asociados a virulencia presentes en las PAI, complementado con datos de serotipo, origen, perfil de virulencia, seropatotipo y, en la última columna, datos de ST y CC, cuando los mismos estuvieron disponibles. Los cuadrados negros indican la presencia de los genes estudiados y los cuadrados blancos, la ausencia. Aquellos aislamientos que resultaron negativos para todos los genes se excluyeron del agrupamiento. la rama del árbol correspondiente al aislamiento "18M" representa todos los aislamientos con el perfil Z4321-positivo (n = 106). En el caso de las cepas *nleB*-positivas, 3 colores diferentes desplegados horizontalmente identifican los 3 grupos de expresión diferencial de acuerdo a la clasificación establecida en la Tabla 13 (I en rojo; II en amarillo; III en verde), y en gris se resalta el aislamiento que resultó negativo para la expresión del gen *nleB* en las condiciones de ensayo estudiadas.

En esta tesis se analizaron dos *sets* de datos con tasas de evolución diferentes. Por un lado, datos de MLST que muestran diferencias en el *core* (o esqueleto) de los genomas. Se supone que los genes analizados en los esquemas de MLST se heredan presumiblemente en forma vertical y no están sujetos a presiones selectivas, por lo que los cambios nucleotídicos ocurren aleatoriamente, en forma lenta y continua. Por otro lado, un grupo diferente de genes, aquellos ubicados en islas de patogenicidad, que pueden transmitirse en forma horizontal y su presencia compartida entre cepas no necesariamente indica proximidad filogenética entre dichas cepas. Analizando los datos obtenidos en conjunto, es claro que los serotipos y la distribución de PAI no están asociados a un determinado linaje.

Franz y colaboradores (2015) cuestionaron el uso de los genes *nle* como marcadores adicionales de virulencia, especialmente en cepas *eae*-negativas, debido a que estos marcadores se correlacionaron fuertemente con el gen *eae*, lo cual concuerda con los resultados expuestos en esta tesis. Pero, analizando otro tipo de datos, detectamos que muchas de las cepas *eae*-negativas estudiadas, a pesar de carecer de los efectores *nle*, pertenecieron a complejos clonales, como el CC230 (GC30, STEC-2), asociados a patogenicidad en otros países. Además, particularmente una gran cantidad de ellas, fueron identificadas como clones emergentes, pertenecientes a ST nuevos.

No sólo se detectó diversidad clonal dentro de un mismo serotipo, sino que en algunos de ellos, además, se detectaron clones emergentes, como se dijo previamente, representados con secuenciotipos nuevos, como en el caso de los serotipos O20:H19, O26:H11, O141:H8, O174:H21 y O178:H19. Este último serotipo incluyó dos linajes nuevos.

El potencial patogénico de una cepa varía dentro de una misma especie como resultado, entre otros factores, del intercambio de genes por transferencia horizontal. La asociación entre la presencia de determinados factores de virulencia y una mayor capacidad de las cepas de infectar o permanecer en sus sitios de colonización ha sido estudiada en numerosas investigaciones. Sin embargo, ningún factor de virulencia, por sí solo, puede designarse como responsable de la infección. En particular, el conocimiento de las islas de patogenicidad, no sólo es importante para comprender la evolución bacteriana y la interacción del patógeno con las células hospedadoras, sino que también pueden tener importantes implicaciones prácticas. Los genes ubicados en las PAI han sido utilizados como marcadores de diagnóstico para la identificación de patógenos en una muestra clínica y para la diferenciación de cepas patógenas de aquellas estrechamente relacionados pero no patógenas (Schmidt y Hensel, 2004). Específicamente, la relación entre serotipos y la presencia de PAI específicas como la OI-122 se ha asociado con diferencias en la virulencia de VTEC (Karmali *et al.*, 2003; Wickham *et al.*, 2006). Sin embargo,

ninguno de estos factores ha sido suficiente como para identificar de manera confiable las cepas que causan enfermedad grave. Uno de los principales problemas es, como dijimos anteriormente, la gran heterogeneidad genética de VTEC, en general y dentro de los diferentes patotipos, y otro, menos estudiado, es el conjunto de factores del huésped que hace que una persona sea susceptible a enfermarse por VTEC.

En relación a las PAI estudiadas, los resultados obtenidos en esta tesis concuerdan con las observaciones planteadas por diferentes autores, particularmente, Ju y colaboradores (2013), quienes demostraron que muchos de los efectores *Nle* se asocian principalmente con cepas VTEC *eae*-positivas. Otros estudios de MRA designaron perfiles de virulencia específicos como marcadores de cepas VTEC de alto riesgo.

En relación al potencial patógeno de las cepas no-O157:H7 *eae*-positivas, identificamos 18 aislamientos que presentaron más del 60% de los 20 genes de las PAI analizadas. Estos aislamientos pertenecen a los serotipos O5:NM, O26:H11, O38:H39, O111:H2, O118:H2/H16, O121:H19, O145:NM, O146:H21 y O165:NM. Dentro de este grupo, podemos ubicar en el “*top ranking* de virulencia” a cuatro aislamientos, dos O26:H11 de humanos, uno O118:H16 y otro O165:NM, ambos de bovino, los cuales presentaron entre el 80 y el 90% de los genes. Bugarel y colaboradores (2010a) concluyeron que la presencia de un conjunto de factores de virulencia como *eae*, *ent/espL2*, *nleB*, *nleE* y *nleH1-2* es clave para que una cepa EHEC sea patógena. Entre las cepas estudiadas, el aislamiento bovino O165:NM y dos aislamientos O26:H11 de origen humano incluidos dentro del *top ranking* de virulencia, además de dos aislamientos O177:NM (bovinos), presentaron ese perfil. Por otro lado, Wickham *et al.* (2006) encontraron una asociación significativa entre la presencia de una combinación de marcadores OI-122, *pagC*, *sen*, *nleB* y *efa1*, y la ocurrencia de SUH después de la infección con *E. coli* no-O157. De acuerdo con esto, cuatro cepas, tres aisladas de humanos (O111:H2, O118:H2 y O121:H19) y una cepa O146:H21 aislada de bovino, tuvieron ese perfil, con la diferencia que ninguno de los tres aislamientos de humanos fue asociado a SUH.

La naturaleza modular de OI-122 puede explicarse por la presencia de secuencias de inserción entre los módulos, lo que permite la adquisición o pérdida de módulos individuales o en grupo, mediante transferencia horizontal. Diferentes módulos de OI-122 más el gen *eae* estuvieron presentes en diferentes linajes nativos. Las correlaciones entre el grupo clonal, el SPT y el contenido de OI-122, además de la presencia del *locus* LEE proporcionan información sobre el papel de las islas genómicas en la evolución de VTEC. Konczy y colaboradores (2008) realizaron un análisis genético poblacional, relacionando perfiles de MLST y el contenido de las islas de patogenicidad LEE y OI-122 en cepas clasificadas en STP A-E. Ellos obtuvieron como

resultado una amplia distribución de LEE y de los módulos de OI-122 entre los grupos clonales obtenidos por MLST, corroborando su hipótesis de que existe transferencia horizontal de ambas PAI.

En las cepas carentes del *locus* LEE, se detectó sólo el módulo 1 de la OI-122. Esto puede deberse a que en este módulo no se encuentran efectores de tipo III asociados a LEE. Por otra parte, comprobamos, al igual que Konczy y colaboradores (2008), que dentro de un serotipo las cepas suelen tener el mismo perfil de virulencia OI-122. Todos los aislamientos O5:NM presentaron la isla completa; los aislamientos O26:H11 y O145:NM presentaron un perfil incompleto (con ausencia del módulo 1) mientras que los aislamientos O177:NM poseyeron sólo el módulo 2.

En las cepas no-O157, la presencia de LEE y los módulos de OI-122 es variable dentro de los diferentes complejos clonales. Las cepas pertenecientes al SPT B se asociaron a tres CC, CC78, CC119 y CC106, todos ellos incluidos dentro de GC asociados a cepas aisladas de humanos en otros países (GC 12, 17 y 14). Los aislamientos de este SPT son *eae*-positivos y presentaron una OI-122 completa o incompleta (con ausencia solo del módulo 1). Por otra parte, las cepas de SPT C, D y E se agruparon en varios CC, la mayoría de ellos sin un grupo clonal asignado.

De acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio se podría asignar a los serotipos O118:H2 y O111:H2 (con seropatotipo no determinado hasta ahora), el SPT D, ya que presentaron la OI-122 completa, más del 60% de los genes de PAI estudiados y, además, fueron aisladas de dos niños con diarrea. Los demás aislamientos con SPT no determinado podrían asignarse al SPT E ya que fueron aislados de bovinos. Otros serotipos que, llamativamente, presentaron un potencial de virulencia importante fueron O165:NM (T 83-1), con SPT ND, ST nuevo, 16 genes efectores en el perfil de PAI y niveles de expresión de *nleB* similares al control, y O146:H21 (FB 12), SPT D, linaje asociado a casos clínicos (CC78), 13 genes en el perfil de PAI y niveles de expresión superiores a la cepa O157:H7 aislada de SUH. Ambos serotipos estuvieron representados por aislamientos de origen bovino.

A pesar del avance que ha habido en relación a los conocimientos sobre la patogenia de VTEC, el diagnóstico actual de la infección se ve obstaculizado por la incapacidad de distinguir de manera confiable entre las cepas VTEC que tienen el potencial de causar SUH de aquellas cepas que causan enfermedad leve o nula. Esto es importante en el contexto del diagnóstico y tratamiento, así como en el control de infecciones. Un estudio genómico comparativo realizado en una colección heterogénea de cepas VTEC no-O157 aisladas de casos clínicos, demostró que no hubo diferencias significativas en el contenido de genes o variantes genéticas entre cepas de

pacientes con o sin SUH, y que diferentes linajes genéticos parecían haber adquirido independientemente los factores de virulencia necesarios para causar una enfermedad grave (Haugum *et al.*, 2014). Sin embargo, es posible que las diferencias observadas en el potencial patogénico no se encuentren relacionadas con el contenido genético de VTEC, sino con la regulación y expresión de los genes de virulencia. En este sentido, muchas cepas no-O157:H7 estudiadas en esta tesis tienen el potencial de expresar efectores para infectar/colonizar al huésped. Los niveles similares de transcripción de *nleB* hallados en diferentes orígenes y serotipos mostraría que, asignarle a una cepa cierto potencial patógeno de acuerdo a origen o serotipo, por lo menos en relación a este efector, no sería útil. Por ejemplo, algunas cepas a las que no se le asignó un SPT por pertenecer a serotipos no asociados a enfermedad, presentaron niveles de expresión similares a aquellos identificados con STP asociados a brotes y SUH como los SPT B y C. Por otro lado, al igual que Aas y colaboradores (2018), sí detectamos expresión diferencial entre las cepas asociadas a SUH y las asociadas a enfermedad leve (o bovinos).

Como dijimos anteriormente, ciertas cepas VTEC *eae*-negativas, como las pertenecientes a los serotipos O91:H21, O113:H21 y O174:H21, a pesar de no poseer el LEE, son capaces de causar enfermedad severa, y han sido aisladas de brotes y casos esporádicos de SUH (Girardeau *et al.*, 2005; Gyles, 2007; Bielaszewska *et al.*, 2011). Dentro de este grupo de los aislamientos *eae*-negativos estudiados, una gran mayoría perteneció al CC230 (GC30, STEC-2), un linaje que incluye cepas asociadas a casos clínicos en otros países. Muchas de las cepas nativas incluidas en este CC presentaron además ST nuevos, lo que muestra la existencia de linajes emergentes en nuestro país que se encuentran asociados a un complejo clonal grande y diversificado, como el CC230, o se presentan como genotipos sin CC asignado (*singleton*). La mayoría de los marcadores ubicados en las PAI estudiadas se encontraron asociados a la presencia del gen *eae*. En consecuencia, estas cepas VTEC *eae*-negativas, incluidas las asociadas a SUH, se clasificarían, en base a estos marcadores, como inofensivas para el humano. Por este motivo, y coincidiendo con otras investigaciones, planteamos la necesidad de encontrar marcadores adicionales, que permitan distinguir cepas VTEC, particularmente *eae*-negativas, de alto riesgo de aquellas de baja virulencia o inofensivas. En relación a esto, recientemente, se ha reportado una nueva PAI denominada *locus* de adhesión y autoagregación (LAA -*Locus of Adhesion and Autoaggregation*-), presente exclusivamente en el subgrupo de cepas VTEC LEE-negativas, de serotipos relevantes desde el punto de vista clínico, O91:H21, O113:H21 y O174:H21. Debido a que esta isla se encontró asociada a cepas aisladas de seres humanos con enfermedad grave, se postuló que las proteínas codificadas en LAA podrían ser importantes en la patogénesis de las cepas LEE-negativas. En ausencia de LEE, la isla LAA podría conferir un mecanismo de

adhesión alternativo, agregativo, durante la colonización intestinal en humanos (Montero *et al.*, 2017; Colello *et al.*, 2018). Por otro lado, y tratando de explicar los posibles mecanismos utilizados por las cepas LEE-negativas para colonizar la mucosa intestinal, Bondí y colaboradores (2017) evaluaron el rol del gen *tia*, un determinante de la invasión celular, en cepas VTEC LEE-negativas que poseen la PAI codificante de una variante de la citotoxina subtilasa denominada SE-PAI (*subtilase-encoding pathogenicity island*) (Michelacci *et al.*, 2013). Estos autores determinaron que la mutación del gen dio lugar a una reducción del fenotipo invasivo, y, por otro lado, que en bacterias que invaden en forma activa las monocapas celulares, la expresión de *tia* fue mucho mayor, lo que demostraría que este gen participa en la capacidad de invadir monocapas de células epiteliales en cepas VTEC SE-PAI-positivas.

Para finalizar, podemos decir que, entre las cepas VTEC no-O157, el seropatotipo y la distribución de genes de las distintas islas de patogenicidad estudiadas no están restringidos a líneas clonales específicas. Los genes efectores *nle* y los componentes modulares de la OI-122, y sus distintas combinaciones (completa, incompleta o ausente), están presentes o ausentes de forma variable en diferentes linajes y seropatotipos.

CAPÍTULO III

3.1. CONCLUSIONES GENERALES

Esta tesis permitió:

- Determinar los perfiles de virulencia de genes ubicados en PAI en cepas VTEC nativas no-O157 pertenecientes a diferentes serotipos.
- Asignar ST y CC mediante MLST a dichas cepas y establecer relaciones filogenéticas de los clones circulantes en la región.
- Evaluar los niveles de expresión basal relativa del gen de virulencia *nleB*, ubicado en la OI-122, mediante qPCR.
- Comparar las cepas en base a los resultados previos y discutir su potencial de virulencia.

Las conclusiones más importantes fueron:

❖ La mayoría de los genes putativos de virulencia estudiados se asociaron principalmente con aislamientos VTEC *eae*-positivos y con SPT causantes de enfermedad grave (B, C), ofreciendo una base importante para la evaluación del riesgo molecular (MRA) en VTEC.

❖ En base al esquema de MRA analizado, los aislamientos *eae*-positivos con mayor potencial de virulencia fueron aquellos pertenecientes a los serotipos O5:NM, O26:H11, O38:H39, O111:H2, O118:H2/H16, O121:H19, O145:NM, O146:H21 y O165:NM.

❖ Todas las cepas VTEC *eae*-negativas potencialmente virulentas, incluidas aquellas asociadas a SUH de los serotipos O113:H21 y O91:H21, en el contexto de MRA, que utiliza genes *nle* como marcadores únicos, se clasificarían como inofensivas para el ser humano. Por lo tanto, para este grupo de cepas VTEC, se requieren marcadores adicionales que permitan predecir el potencial riesgo de causar enfermedad en el hombre.

❖ Se detectó un alto grado de heterogeneidad filogenética entre las cepas estudiadas, tanto entre los diferentes serotipos como dentro de un mismo serotipo, y varios de los aislamientos de bovinos y alimentos pertenecieron a los mismos ST que comúnmente se asocian con casos clínicos de humanos en diferentes áreas geográficas.

❖ Los datos filogenéticos también señalaron la presencia de varios linajes emergentes en nuestra región.

❖ Se determinaron diferentes niveles de expresión del gen efector *nleB*. No se encontraron diferencias significativas en la expresión entre los grupos de origen bovino y humano, ni entre serotipos, pero sí resultaron significativamente diferentes los niveles de expresión entre las cepas asociadas a SUH y aquellas no-SUH.

❖ Los seropatotipos y la distribución de las diferentes PAI estudiadas no estuvieron asociados a un determinado linaje.

❖ Este estudio proporciona los primeros datos sobre los clones VTEC no-O157 que están circulando en nuestra región y muestra que algunos de ellos pueden representar un alto riesgo zoonótico, siendo importante esta información para desarrollar iniciativas en salud pública.

CAPÍTULO IV

4.1. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aas, C. G., Drablos, F., Haugum, K. y Afset, J. E. (2018) 'Comparative transcriptome profiling reveals a potential role of type VI secretion system and Fimbriae in virulence of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli*', *Frontiers in Microbiology*, 9, pp. 1–14.
- Abu-Ali, G. S., Lacher, D. W., Wick, L. M., Qi, W. y Whittam, T. S. (2009) 'Genomic diversity of pathogenic *Escherichia coli* of the EHEC 2 clonal complex', *BMC Genomics*, 10, pp. 1–16.
- Anonymous. (2005) European Commission Annual Report 2005: surveillance of enteric pathogens in Europe and beyond; 1786/2002/EC. International surveillance network for the enteric infections–*Salmonella*, VTEC O157 and *Campylobacter*. European Commission, Brussels, Belgium.
- Bettelheim, K. A. (2007) 'The non-O157 shiga-toxigenic (verocytotoxigenic) *Escherichia coli*. Underated pathogens', *Clinical Reviews in Microbiology*, 33, pp. 67-87.
- Bettelheim, K. A. y Goldwater, P. N. (2014) 'Serotypes of Non-O157 Shigatoxigenic *Escherichia coli* (STEC)', *Advances in Microbiology*, 4, pp. 377–389.
- Bielaszewska, M. y Karch, H. (2005) 'Consequences of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* infection for the vascular endothelium', *Thromb. Haemost.*, 94, pp. 12-18.
- Bielaszewska, M., Fell, M., Greune, L., Prager, R., Fruth, A., Tschape, H., Schmidt, M. A., Karch, H. y Tscha, H. (2004) 'Characterization of cytolethal distending toxin genes and expression in shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains of non-O157 serogroups', *Infect Immun*, 72(3), pp. 1812–1816.
- Bielaszewska, M., Mellmann, A., Zhang, W., Kock, R., Fruth, A., Bauwens, A., Peters, G., Karch H. (2011) 'Characterisation of the *Escherichia coli* strain associated with an outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, 2011: a microbiological study', *Lancet Infect. Dis.*, 11, pp. 671-676.
- Blanco, M., Blanco, J. E., Blanco, J., Gonzalez, E. A., Alonso, M. P., Maas, H. y Jansen, W. H. (1996) 'Prevalence and characteristics of human and bovine verotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated in Galicia (north-western Spain)', *European Journal of Epidemiology*, 12(1), pp. 13–19.

Blanco, M., Padola, N. L., Krüger, A., Sanz, M. E., Blanco, J. E., Gonzalez, E. A., Dahbi, G., Mora, A., Bernardez, M. I., Etcheverria, A. I., Arroyo, G. H., Lucchesi, P. M. A., Parma, A. E. y Blanco, J. (2004) 'Virulence genes and intimin types of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle and beef products in Argentina', *International Microbiology*, 7(4), pp. 269–276.

Blaser, M. J. (2011) Deconstructing a lethal foodborne epidemic, *The New Engl. J. Medic.*, 365, pp. 1835-36.

Bolton, D. J. (2011) 'Verocytotoxigenic (Shiga toxin-producing) *Escherichia coli*: virulence factors and pathogenicity in the farm to fork paradigm.', *Foodborne pathogens and disease*, 8(3), pp. 357–65.

Bonanno, L., Loukiadis, E., Mariani-Kurkdjian, P., Oswald, E., Garnier, L., Michel, V. y Auvray, F. (2015) 'Diversity of shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) O26:H11 strains examined via *stx* subtypes and insertion sites of Stx and EspK bacteriophages', *Applied and Environmental Microbiology*, 81(11), pp. 3712–3721.

Bondí, R., Chiani, P., Michelacci, V., Minelli, F., Caprioli, A. y Morabito, S. (2017) 'The gene *tia*, harbored by the subtilase-encoding pathogenicity island, is involved in the ability of locus of enterocyte effacement-negative Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains to invade monolayers of epithelial cells', *Infection and Immunity*, 85(12).

Brooks, J. T., Sowers, E. G., Wells, J. G., Greene, K. D., Griffin, P. M., Hoekstra, R. M. y Strockbine, N. A. (2005) 'Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in the United States, 1983–2002', *Journal of Infectious Diseases*, 192, pp. 1422-1429.

Bugarel, M., Beutin, L. y Fach, P. (2010a) 'Low-density macroarray targeting non-locus of enterocyte effacement effectors (*nle* genes) and major virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC): A new approach for molecular risk assessment of STEC isolates', *Applied and Environmental Microbiology*, 76(1), pp. 203–211.

Bugarel, M., Beutin, L., Martin, A., Gill, A. y Fach, P. (2010b) 'Micro-array for the identification of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) seropathotypes associated with Hemorrhagic Colitis and Hemolytic Uremic Syndrome in humans', *International Journal of Food Microbiology*, 142(3), pp. 318–329.

Buven, G. y Piérard, D. (2012) 'Virulence Profiling and Disease Association of Verocytotoxin-Producing *Escherichia coli* O157 and Non-O157 Isolates in Belgium', *Foodborne Pathogens and Disease*, 9(6), pp. 530–535.

Caprioli, A., Morabito, S., Brugère, H., Oswald, E. (2005) Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission, *Vet. Res.*, 36, pp. 289-311.

Carlson-Banning, K. M. y Sperandio, V. (2016) 'Catabolite and oxygen regulation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* virulence', *mBio*, 7(6), pp. 1–19.

Chui, L., Li, V., Fach, P., Delannoy, S., Malejczyk, K., Patterson-Fortin, L., Poon, A., King, R., Simmonds, K., Scott, A. N. y Lee, M. C. (2015) 'Molecular profiling of *Escherichia coli* O157:H7 and non-O157 strains isolated from humans and cattle in Alberta, Canada', *Journal of Clinical Microbiology*, 53(3), pp. 986–990.

Cobeñas, C. J., Alconcher, L. F., Spizzirri, A. P. y Rahman, R. C. (2007) 'Long-term follow-up of Argentinean patients with hemolytic uremic syndrome who had not undergone dialysis', *Pediatric Nephrology*, 22(9), pp. 1343–1347.

Colello, R., Vélez, M. V., González, J., Montero, D. A., Bustamante, A. V., Del Canto, F., Etcheverría, A. I., Vidal, R. y 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, pp. 259–263.

Contreras, C. A., Ochoa, T. J., Ruiz, J., Lacher, D. W., Rivera, F. P., Saenz, Y., Chea-Woo, E., Zavaleta, N., Gil, A. I., Lanata, C. F., Huicho, L., Maves, R. C., Torres, C., DebRoy, C. y Cleary, T. G. (2011) 'Phylogenetic relationships of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from Peruvian children', *Journal of Medical Microbiology*, 60(5), pp. 639–646.

Coombes, B. K., Gilmour, M. W. and Goodman, C. D. (2011) 'The evolution of virulence in non-o157 shiga toxin-producing *Escherichia coli*', *Front Microbiol*, 2(90).

Coombes, B. K., Wickham, M. E., Mascarenhas, M., Gruenheid, S., Finlay, B. B. y Karmali, M. A. (2008) 'Molecular analysis as an aid to assess the public health risk of non-O157 shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains', *Applied and Environmental Microbiology*, 74(7), pp. 2153–2160.

Deng, W., Marshall, N. C., Rowland, J. L., McCoy, J. M., Worrall, L. J., Santos, A. S., Strynadka, N. C. J. y Finlay, B. B. (2017) 'Assembly, structure, function and regulation of type III secretion systems', *Nature Reviews Microbiology*, 15(6), pp. 323–337.

Deng, W., Puente, J. L., Gruenheid, S., Li, Y., Vallance, B. A., Vázquez, A., Barba, J., Ibarra, J. A., O'Donnell, P., Metalnikov, P., Ashman, K., Lee, S., Goode, D., Pawson, T. y Finlay, B. B. (2004) 'Dissecting virulence: systematic and functional analyses of a pathogenicity island.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(10), pp. 3597–602.

Derveaux, S., Vandesompele, J. and Hellemans, J. (2010) 'How to do successful gene expression analysis using real-time PCR', *Methods*, 50(4), pp. 227–230.

Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., Gonzalez, L., Tablada, M., Robledo, C. W. (2018) InfoStat versión 2018. Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>.

Dziva, F., van Diemen, P. M., Stevens, M. P., Smith, A. J. y Wallis, T. S. (2004) Identification of *Escherichia coli* O157:H7 genes influencing colonization of the bovine gastrointestinal tract using signature-tagged mutagenesis, *Microbiol.*, 150, pp. 3631–3645.

Doughty, S., Sloan, J., Bennett-Wood, V., Robertson, M., Robins-Browne, R. M. y Hartland, E. L. (2002) 'Identification of a novel fimbrial gene cluster related to long polar fimbriae in locus of enterocyte effacement-negative strains of enterohemorrhagic *Escherichia coli*', *Infection and Immunity*, 70(12), pp. 6761–6769.

Eichhorn, I., Heidemanns, K., Semmler, T., Kinnemann, B., Mellmann, A., Harmsen, D., Anjum, M. F., Schmidt, H., Fruth, A., Valentin-Weigand, P., Heesemann, J., Suerbaum, S., Karch, H. y Wieler, L. H. (2015) 'Highly virulent non-O157 enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) serotypes reflect similar phylogenetic lineages, providing new insights into the evolution of EHEC', *Applied and Environmental Microbiology*, 81(20), pp. 7041-7047.

Enright, M. C. y Spratt, B. G. (1999) 'Multilocus sequence typing, *Trends in Microbiology*, 7(12), pp. 482-487.

Feil, E. J. (2004) 'Small change: keeping pace with microevolution', *Nature Reviews Microbiology*, 2, pp. 483-495.

Feil, E. J. y Enright, M. C. (2004) 'Analyses of clonality and the evolution of bacterial pathogens', *Current Opinion in Microbiology*, 7(3), pp. 308–313.

Feil, E. J., Li, B., Aanensen, D. M., Hanage, W. P. y Spratt, B.G. (2004) 'eBURST: Inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data', *J. Bacteriol.*, 186, pp. 1518-1530.

Ferraris, J. R., Ramirez, J. A., Ruiz, S., Caletti, M. G., Vallejo, G., Piantanida, J. J., Araujo, J. L. y Sojo, E. T. (2002) 'Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome: Absence of recurrence after renal transplantation', *Pediatric Nephrology*, 17(10), pp. 809–814.

Foley, S. L., Lynne, A. M. and Nayak, R. (2009) 'Molecular typing methodologies for microbial source tracking and epidemiological investigations of Gram-negative bacterial foodborne pathogens', *Infection, Genetics and Evolution*, 9(4), pp. 430–440.

Franz, E., Van Hoek, A. H. A. M., Wuite, M., Van Der Wal, F. J., De Boer, A. G., Bouw, E. I. y Aarts, H. J. M. (2015) 'Molecular hazard identification of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC)', *PLoS ONE*, 10(3), pp. 1–21.

Gadea, M. P., Deza N., Mota, M. I., Carbonari, C., Robatto, M., D'astek, B., Balseiro, V., Bazet, C., Rugnitz, E., Livrelli, V., Schelotto, F, Rivas, M, Varela, G. (2012) 'Two cases of urinary tract infection caused by Shiga toxin- producing *Escherichia coli* 0157:H7 strains', *Rev Argent Microbiol.*, 44 (2), pp. 94-6.

García-Angulo, V. A., Deng, W., Thomas, N. A., Finlay, B. B. y Puente, J. L. (2008) 'Regulation of expression and secretion of NleH, a new non-locus of enterocyte effacement-encoded effector in *Citrobacter rodentium*', *Journal of Bacteriology*, 190(7), pp. 2388–2399.

García-Angulo, V. A., Martínez-Santos, V. I., Villaseñor, T., Santana, F. J., Huerta-Saquero, A., Martínez, L. C., Jiménez, R., Lara-Ochoa, C., Téllez-Sosa, J., Bustamante, V. H. y Puente, J. L. (2012) 'A distinct regulatory sequence is essential for the expression of a subset of nle genes in attaching and effacing *Escherichia coli*', *Journal of Bacteriology*, 194(20), pp. 5589–5603.

Girardeau, J. P., Dalmasso, A., Bertin, Y., Ducrot, C., Bord, S., Livrelli, V., Vernozzy-Rozand, C. y Martin, C. (2005) 'Association of virulence genotype with phylogenetic background in comparison to different seropathotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*

isolates', *Journal of Clinical Microbiology*, 43(12), pp. 6098–6107.

Gómez, D., Miliwebsky, E., Fernandez Pascua, C., Baschkier, A., Manfredi, E., Zotta, M., Nario, F., Paqin, A., Sanz, M., Etcheberria, A., Padola, N. L., Parma, A. y Rivas, M. (2002) Isolation and characterization of Shiga-toxi-producing *Escherichia coli* from frozen hamburgers and soft cheeses, *Rev. Argent. Microbiol.*, 34, pp. 66-71.

González, J., Cadona, J. S., Sanz, M., Bustamante, A. V. y Sanso, A. M. (2017) 'Molecular characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from vegetables in Argentina', *International Journal of Food Microbiology*, 261, pp. 57–61.

Gould, L. H., Mody, R. K., Ong, K. L., Clogher, P., Cronquist, A. B., Garman, K. N., Lathrop, S., Medus, C., Spina, N. L., Webb, T. H., White, P. L., Wymore, K., Gierke, R. E., Mahon, B. E. y Griffin, P. M. (2013) 'Increased recognition of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in the United States during 2000-2010: epidemiologic features and comparison with *E. coli* O157 infections', *Foodborne pathogens and disease*, 10(5) pp. 453-460.

de Gouw, D., Hermans, P. W. M., Bootsma, H. J., Zomer, A., Heuvelman, K., Diavatopoulos, D. A. y Mooi, F. R. (2014) 'Differentially expressed genes in *Bordetella pertussis* strains belonging to a lineage which recently spread globally', *PLoS ONE*, 9(1).

Guth, B. E. C., Prado, V., Rivas, M. (2010) Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. In: Torres AG, ed. Pathogenic *Escherichia coli* in Latin America. Bentham Science Publishers Ltd: United States, pp. 65-83.

Gyles, C. L. (2007) 'Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview.', *Journal of animal science*, 85(13 Suppl), e45-62.

Haugum, K., Johansen, J., Gabrielsen, C., Brandal, L. T., Bergh, K., Ussery, D. W., Drabløs F., Afset J. E. (2014) 'Comparative genomics to delineate pathogenic potential in non-O157 shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) from patients with and without haemolytic uremic syndrome (HUS) in Norway', *PLoS ONE*, 9, e111788.

Herold, S., Paton, J. C. y Paton, A. W. (2009) 'Sab, a novel autotransporter of locus of enterocyte effacement-negative shiga-toxigenic *Escherichia coli* O113:H21, contributes to adherence and biofilm formation', *Infection and Immunity*, 77(8), pp. 3234–3243.

Ibarra, C., Goldstein, J., Silberstein, C., Zotta, E., Belardo, M., Repetto, H.A. (2008) 'Síndrome urémico hemolítico inducido por *Escherichia coli* enterohemorrágica', *Arch. Argent. Pediatr.* 106, pp. 435-442.

Imamovic, L., Tozzoli, R., Michelacci, V., Minelli, F., Marziano, M. L., Caprioli, A. y Morabito, S. (2010) 'OI-57, a genomic island of *Escherichia coli* O157, is present in other seropathotypes of Shiga toxin-producing *E. coli* associated with severe human disease', *Infection and Immunity*, 78(11), pp. 4697–4704.

Isiko, J., Khaita, M. y Bergholz, T. M. (2015) 'Novel sequence types of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle', *Letters in Applied Microbiology*, 60(6), pp. 552–557.

Janka, A., Bielaszewska, M., Dobrindt, U., Greune, L., Schmidt, M. A. y Karch, H. (2003) 'Cytolethal Distending Toxin Gene Cluster in Enterohemorrhagic', *Microbiology*, 71(6), pp. 3634–3638.

Jerse, A. E., Yu, J., Tall, B. D., Kaper, J. B. (1990) 'A genetic *locus* of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells', *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87(20), pp. 7839–7843.

Johnson, K. E., Thorpe, C. M. y Sears, C. L. (2006) 'The emerging clinical importance of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli*.', *Clinical infectious diseases*, 43(12), pp. 1587–1595.

Ju, W., Rump, L., Toro, M., Shen, J., Cao, G., Zhao, S. y Meng, J. (2014) 'Pathogenicity islands in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26, O103, and O111 isolates from humans and animals.', *Foodborne pathogens and disease*, 11(5), pp. 342–5.

Ju, W., Shen, J., Toro, M., Zhao, S. y Meng, J. (2013) 'Distribution of pathogenicity islands OI-122, OI-43/48, and OI-57 and a high-pathogenicity island in Shiga toxin-producing *Escherichia coli*', *Applied and Environmental Microbiology*, 79(11), pp. 3406–3412.

Kaper, J. B. y Karmali, M. A. (2008) 'The continuing evolution of a bacterial pathogen.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(12), pp. 4535–4536.

Kaper, J. B., Nataro, J. P. y Mobley, H. L. T. (2004) 'Pathogenic *Escherichia coli*', *Nature Reviews Microbiology*, 2(2), pp. 123–140.

Karmali, M. A. (1989) 'Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*', *Clinical Microbiology Reviews*, 2(1), pp. 15–38.

Karmali, M. A., Gannon, V. y Sargeant, J. M. (2010) 'Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC)', *Veterinary Microbiology*, 140, pp. 360–370.

Karmali, M. A., Mascarenhas, M., Shen, S., Ziebell, K., Johnson, S., Reid-Smith, R., Isaac-Renton, J., Clark, C., Rahn, K. y Kaper, J. B. (2003) 'Association of Genomic O Island 122 of *Escherichia coli* EDL 933 with Verocytotoxin-Producing *Escherichia coli* Seropathotypes That Are Linked to Epidemic and/or Serious Disease', *Journal of Clinical Microbiology*, 41(11), pp. 4930–4940.

Kelly, B. G., Vespermann, A. y Bolton, D. J. (2009) 'The role of horizontal gene transfer in the evolution of selected foodborne bacterial pathogens', *Food and Chemical Toxicology*, 47(5), pp. 951–968.

Kelly, M., Hart, E., Mundy, R., Marche`s, O., Wiles, S., Badea, L., Luck, S., Tauschek, M., Frankel, G., Robins-Browne, R. M., y Hartland, E. L. (2006) 'Essential Role of the Type III Secretion System Effector NleB in Colonization of Mice by *Citrobacter rodentium*', *Infection and Immunity*, 74(4), pp. 2328–2337.

Konczy, P., Ziebell, K., Mascarenhas, M., Choi, A., Michaud, C., Kropinski, A. M., Whittam, T. S., Wickham, M., Finlay, B. y Karmali, M. A. (2008) 'Genomic O island 122, locus for enterocyte effacement, and the evolution of virulent verocytotoxin-producing *Escherichia coli*', *Journal of Bacteriology*, 190(17), pp. 5832–5840.

Krüger, A., Lucchesi, P. M. A., Sanso, A. M., Etcheverría, A. I., Bustamante, A. V., Burgán, J., Fernández, L., Fernández, D., Leotta, G., Friedrich, A. W., Padola, N. L. y Rossen, J. W. A. (2015) 'Genetic characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26:H11 strains isolated from animal, food, and clinical samples', *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 5, pp. 1–8.

Kudva, I. T., Griffin, R. W., Krastins, B., Sarracino, D. A., Calderwood, S. B. y John, M. (2012) 'Proteins other than the locus of enterocyte effacement-encoded proteins contribute to

Escherichia coli O157:H7 adherence to bovine rectoanal junction stratified squamous epithelial cells', *BMC Microbiology*, 12(103), pp. 1-11.

Kudva, I. T., Krastins, B., Torres, A. G., Griffin, R. W., Sheng, H., Sarracino, D. A., Hovde, C. J., Calderwood, S. B. y John, M. (2015) 'The *Escherichia coli* O157:H7 cattle immunoproteome includes outer membrane protein A (OmpA), a modulator of adherence to bovine rectoanal junction squamous epithelial (RSE) cells', *Proteomics*, 15(11), pp. 1829–1842.

Livak, K. J. y Schmittgen T. D. (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method, *Methods*, 25, pp.402-408.

López, E. L., Contrini, M. M., De Rosa, M. F. (1998) Epidemiology of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in South America. pp. 30-37. En: Kaper, J.B; O'Brien, A.D. (eds). *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* strains. American Society for Microbiology. Washington D.C.

Lucchesi, P.M.A., Kruger, A., Parma, A. (2006) 'Distribution of *saa* gene variants in verocytotoxigenic *Escherichia coli* isolated from cattle and food', *Research in Microbiol.*, 157, pp. 263-266.

Maiden, M. (2006) 'Multilocus sequence typing of bacteria.', *Annual review of microbiology*, 60(3), pp. 561–588.

Maiden, M. C., Bygraves, J. A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J. E., Urwin, R., Zhang, Q., Zhou, J., Zurth, K., Caugant, D. A., Feavers, I. M., Achtman, M. y Spratt, B. G. (1998) 'Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms.', *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95(6), pp. 3140–3145.

Mainil, J. G. y Daube, G. (2005) 'Verotoxigenic *Escherichia coli* from animals, humans and foods: Who's who?', *Journal of Applied Microbiology*, 98(6), pp. 1332–1344.

Masana, M. O., Leotta, G. A., Del Castillo, L. L., D'Astek, B. A., Palladino, P. M., Galli, L., Vilacoba, E., Carbonari, C., Rodriguez, H. R., Rivas, M. (2010) Prevalence, Characterization, and Genotypic Analysis of *Escherichia coli* O157:H7/NM from Selected Beef Exporting Abattoirs of Argentina. *J. Food Prot.*, 73 (4), pp. 649-656.

McDaniel, T. K. y Kaper, J. B. (1997) 'A cloned pathogenicity island from

enteropathogenic *Escherichia coli* confers the attaching and effacing phenotype on *E. coli* K-12', *Molecular microbiology*, 23(2), pp. 399–407.

Michelacci, V., Tozzoli, R., Caprioli, A., Martínez, R., Scheutz, F., Grande, L., Sánchez, S. y Morabito, S. (2013) 'A new pathogenicity island carrying an allelic variant of the Subtilase cytotoxin is common among Shiga toxin producing *Escherichia coli* of human and ovine origin', *Clinical Microbiology and Infection*, 19(3), e149-146.

Mingle, L. A., Garcia, D. L., Root, T. P., Halse, T. A., Quinlan, T. M., Armstrong, L. R., Chiefari, A. K., Schoonmaker-Bopp, D. J., Dumas, N. B., Limberger, R. J. y Musser, K. A. (2012) 'Enhanced Identification and Characterization of Non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*: A Six-Year Study', *Foodborne Pathogens and Disease*, 9(11), pp. 1028–1036.

Montero, D. A., Velasco, J., Del Canto, F., Puente, J. L., Padola, N. L., Rasko, D. A., Farfán, M., Salazar, J. C. y 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) pp. 7011.

Morabito, S., Tozzoli, R., Oswald, E. y Caprioli, A. (2003) 'A mosaic pathogenicity island made up of the locus of enterocyte effacement and a pathogenicity island of *Escherichia coli* O157:H7 is frequently present in attaching and effacing *E. coli*', *Infection and Immunity*, 71(6), pp. 3343–3348.

Nataro, J. y Kaper, J. (1998) 'Diarrheagenic *Escherichia coli*', *Am Soc Microbiol*, 11(1), pp. 142–201.

Newton, H. J., Pearson, J. S., Badea, L., Kelly, M., Lucas, M., Holloway, G., Wagstaff, K. M., Dunstone, M. A., Sloan, J., Whisstock, J. C., Kaper, J. B., Robins-Browne, R. M., Jans, D. A., Frankel, G., Phillips, A. D., Coulson, B. S. y Hartland, E. L. (2010) 'The type III effectors NieE and NieB from enteropathogenic *E. coli* and Ospz from shigella block nuclear translocation of NF- κ B p65', *PLoS Pathogens*, 6(5), pp. 1–16.

Padola, N. L., Sanz, M. E., Blanco, J. E., Blanco, M., Blanco, J., Etcheverria, A. I., Arroyo, G. H., Usera, M. A. y Parma, A. E. (2004) 'Serotypes and virulence genes of bovine Shigatoxigenic *Escherichia coli* (STEC) isolated from a feedlot in Argentina', *Veterinary Microbiology*, 100(1–2), pp. 3–9.

Palanisamy, S., Chang, Y., Scaria, J., Penha Filho, R. A. C., Peters, K. E., Doiphode, S. H., Sultan, A. y Mohammed, H. O. (2017) 'Genetic Relatedness Among Shiga Toxin–Producing *Escherichia coli* Isolated Along the Animal Food Supply Chain and in Gastroenteritis Cases in Qatar Using Multilocus Sequence Typing', *Foodborne Pathogens and Disease*, 14(6), pp. 318–325.

Parma, A. E., Sanz, M. E., Blanco, J. E., Blanco, J., Viñas, M. R., Blanco, M., Padola, N. L. y Etcheverria, A. I. (2000) 'Virulence genotypes and serotypes of verotoxigenic *Escherichia coli* isolated from cattle and foods in Argentina: Importance in public health', *European Journal of Epidemiology*, 16(8), pp. 757–762.

Paton, A. W., Srimanote, P., Talbot, U. M., Wang, H. y Paton, J. C. (2004) 'A New Family of Potent AB 5 Cytotoxins Produced by Shiga Toxigenic *Escherichia coli*', *J. Exp. Med.*, 200(1), pp. 35–46.

Paton, A. W., Srimanote, P., Woodrow, M. C. y Paton, J. C. (2001) 'Characterization of Saa, a novel autoagglutinating adhesin produced by locus of enterocyte effacement-negative Shiga-toxigenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans', *Infection and Immunity*, 69(11), pp. 6999–7009.

Paton, A. W., Woodrow, M.C., Doyle, R.M., Lanser, J.A., Paton, J.C. (1999) 'Molecular characterization of a Shiga toxigenic *Escherichia coli* O113:H21 strain lacking *eae* responsible for a cluster of cases of hemolytic-uremic syndrome'. *J. Clin Microbiol.*, 37(10), pp. 3357-3361.

Paton, J. C. y Paton, A. W. (1998) 'Pathogenesis and Diagnosis of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Infections', *Clin. Microbiol. Rev.*, 11(3), pp. 450–479.

Pérez-Losada, M., Arenas, M. y Castro-Nallar, E. (2017) 'Multilocus Sequence Typing of Pathogens: Methods, Analyses, and Applications', *Genetics and Evolution of Infectious Diseases*, 16, pp. 383-404.

Pfaffl, M. W. (2001) 'A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR', *Nucleic Acids Research*, 29(9), pp. 2002-2007.

Pfaffl, M. W., Horgan, G. W. y Dempfle, L. (2002) 'Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR.', *Nucleic acids research*, 30(9), pp. e36.

Qi, W., Lacher, D., Bumbaugh, A., Hyma, K., Ouellette, L., Large, T., Tarr, C. L. y Whittam, T.S. (2004) EcMLST: an online database for multi locus sequence typing of pathogenic *Escherichia coli*. In: Proceedings of the Institute of Electrical and Electronics Engineers (IEEE) Computational Systems Bioinformatics Conference, 2004. Washington: IEEE Computer Society.

Rivas, M., Miliwebsky, E., Chinen, I., Deza, N. y Leotta, G. A. (2006) ‘Epidemiología del síndrome urémico hemolítico en Argentina. Diagnóstico del agente etiológico, reservorios y vías de transmisión’, *Medicina*, 66(Suppl 3), pp. 27–32.

Rivas, M., Padola, N.L., Lucchesi, P.M.A., Masana, M. (2010). Diarrheagenic *Escherichia coli* in Argentina. In Pathogenic *Escherichia coli* in Latin America, ed. A.G.T. Torres (Galveston,Texas: Bentham Science Publishers), pp. 348-392.

Rivero, M. A., Padola, N. L., Etcheverría, A. I. y Parma, A. E. (2004) ‘*Escherichia coli* enterohemorrágica y síndrome urémico hemolítico en Argentina’, *Medicina*, 64(4), pp. 352–356.

Rivero, M. A., Passucci, J. A., Rodriguez, E. M. y Parma, A. E. (2010) ‘Role and clinical course of verotoxigenic *Escherichia coli* infections in childhood acute diarrhoea in Argentina’, *Journal of Medical Microbiology*, 59(3), pp. 345–352.

Roberfroid, S., Vanderleyden, J. y Steenackers, H. (2016) ‘Gene expression variability in clonal populations: Causes and consequences’, *Critical Reviews in Microbiology*, 42(6), pp. 969–984.

Roe, A. J., Tysall, L., Dransfield, T., Wang, D., Fraser-Pitt, D., Mahajan, A., Constandinou, C., Inglis, N., Downing, A., Talbot, R., Smith, D. G. y Gally, D. L. (2007) ‘Analysis of the expression, regulation and export of NleA-E in *Escherichia coli* O157:H7’, *Microbiology*, 153, pp. 1350–1360.

Rosenshine, I., Ruschkowski, S., Finlay, B. B., Rosenshine, I. y Ruschkowski, S. (1996) ‘Expression of attaching/effacing activity by enteropathogenic *Escherichia coli* depends on growth phase, temperature, and protein synthesis upon contact with epithelial cells’, *Infection and Immunity*, 64(3), pp. 966–973.

de Sablet, T., Bertin, Y., Vareille, M., Girardeau, J.-P., Garrivier, A., Gobert, A. P. y Martin, C. (2008) ‘Differential expression of *stx2* variants in Shiga toxin-producing *Escherichia*

coli belonging to seropathotypes A and C', *Microbiology*, 154(1), pp. 176–186.

Sanso, A., Bustamante, A., Franci, T., González, J., Cadona, J. y Lucchesi, P. (2015) 'Serotype Distribution of Plasmid-encoded Virulence Profiles, and Identification of *espP* and *subAB* Alleles in Verotoxigenic *Escherichia coli*', *British Microbiology Research Journal*, 5(5), pp. 396–404.

Sanz, M. E., Villalobo, C., Elichiribehety, E. y Arroyo, G. (2007) 'Prevalencia de *Escherichia coli* verotoxigénico en productos cárnicos de la ciudad de Tandil', *La Industria Cárnica Latinoamericana*, 146, pp. 56–58.

Sanz, M. E., Viñas M. R. y Parma A. E. (1998) Prevalence of bovine verotoxin-producing *Escherichia coli* in Argentina, *Eur. J. Epidemiol.*, 14, pp. 399-403.

Scheutz, F. (2014) 'Taxonomy Meets Public Health: The Case of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*', *Microbiology Spectrum*, 2(3), pp. 1–15.

Schimmer, B., Nygard, K., Eriksen, H.M., Lassen, J., Lindstedt, B.A., Brandal, L.T., Kapperud, G. y Aavitsland, P. (2008) 'Outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Norway caused by *stx2*-positive *Escherichia coli* O103:H25 traced to cured mutton sausages', *BMC Infect. Dis.*, 8(41).

Schmidt, H. y Beutin, L. (1995) 'Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain These include : Molecular Analysis of the Plasmid-Encoded Hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 Strain EDL 933', 63(3), pp. 1055–1061.

Schmidt, H. y Hensel, M. (2004) 'Pathogenicity Islands in Bacterial Pathogenesis', *Clinical Microbiology Reviews*, 17(1), pp. 14–56.

Signorini, M. y Tarabla, H. (2009) 'Quantitative risk assessment for verocytotoxigenic *Escherichia coli* in ground beef hamburgers in Argentina', *International Journal of Food Microbiology*, 132(2-3), pp. 153–161.

Smith, C. J. y Osborn, A. M. (2009) 'Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology', *FEMS Microbiology Ecology*, 67(1), pp. 6–20.

Smith, D. G. E., Naylor, S. W. y Gally, D. L. (2002) 'Consequences of EHEC

colonisation in humans and cattle', *International Journal of Medical Microbiology*, 292(3–4), pp. 169–183.

Spratt, B. G. (1999) 'Multilocus sequence typing: Molecular typing of bacterial pathogens in an era of rapid DNA sequencing and the Internet', *Current Opinion in Microbiology*, 2(3), pp. 312–316.

Spratt, B. G., Hanage, W. P., Li, B., Aanensen, D. M. y Feil, E. J. (2004) 'Displaying the relatedness among isolates of bacterial species - The eBURST approach', *FEMS Microbiology Letters*, 241(2), pp. 129–134.

Spratt, B. G. y Maiden, M. C. J. (1999) 'Bacterial population genetics, evolution and epidemiology', *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B*, 354, pp. 701–710.

Staley, C. y Harwood, V. J. (2014) 'Differential Expression of a Sodium-Phosphate Cotransporter Among *Vibrio vulnificus* Strains', *Microbial Ecology*, 67(1), pp. 24–33.

Stevens, M. P. y Frankel, G. M. (2014) 'The Locus of Enterocyte Effacement and Associated Virulence Factors of Enterohemorrhagic *Escherichia coli*', *Microbiology spectrum*, 2(4).

Tobe, T., Beatson, S. A., Taniguchi, H., Abe, H., Bailey, C. M., Fivian, A., Younis, R., Matthews, S., Marches, O., Frankel, G., Hayashi, T. y Pallen, M. J. (2006) 'An extensive repertoire of type III secretion effectors in *Escherichia coli* O157 and the role of lambdoid phages in their dissemination.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(40), pp. 14941–6.

Toma, C., Espinosa, E. M., Song, T., Miliwebsky, E., Chinen, I., Iyoda, S., Iwanaga, M. y Rivas, M. (2004) 'Distribution of putative adhesins in different seropathotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*', *Journal of Clinical Microbiology*, 42(11), pp. 4937–4946.

Torres, A., Amaral, M., Bentancor, L., Galli, L., Goldstein, J., Krüger, A. y Rojas-Lopez, M. (2018) 'Recent Advances in Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Research in Latin America', *Microorganisms*, 6(4), p. e100.

Urwin, R. y Maiden, M. C. J. (2003) 'Multi-locus sequence typing: A tool for global

epidemiology', *Trends in Microbiology*, 11(10), pp. 479–487.

van Diemen, P. M., Dziva, F., Stevens, M.P. y Wallis, T.S. (2005) 'Identification of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26:H- genes required for intestinal colonization in calves', *Infect. Immun.*, 73, pp. 1735–1743.

Vázquez, J. A. y Berrón, S. (2004) 'Multilocus sequence typing: El marcador molecular de la era de Internet', *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 22(2), pp. 113–120.

Wells, T. J., Sherlock, O., Rivas, L., Mahajan, A., Beatson, S. A., Torpdahl, M., Webb, R. I., Allsopp, L. P., Gobius, K. S., Gally, D. L. y Schembri, M. A. (2008) 'EhaA is a novel autotransporter protein of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 that contributes to adhesion and biofilm formation', *Environmental Microbiology*, 10(3), pp. 589–604.

Whittam, T. S. (1998) 'Evolution of *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* strains', p. 195–209. In J. B. Kaper and A. D. O'Brien (ed.), *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* strains. ASM Press, Washington, DC.

Wickham, M. E., Brown, N. F., Boyle, E. C., Coombes, B. K. y Finlay, B. B. (2007) 'Virulence Is Positively Selected by Transmission Success between Mammalian Hosts', *Current Biology*, 17(9), pp. 783–788.

Wickham, M. E., Lupp, C., Mascarenhas, M., Vazquez, A., Coombes, B. K., Brown, N. F., Coburn, B. a, Deng, W., Puente, J. L., Karmali, M. y Finlay, B. B. (2006) 'Bacterial genetic determinants of non-O157 STEC outbreaks and hemolytic-uremic syndrome after infection.', *Journal of infectious diseases*, 194(6), pp. 819–827.

Wu, B., Skarina, T., Yee, A., Jobin, M. C., Dileo, R., Semesi, A., Fares, C., Lemak, A., Coombes, B. K., Arrowsmith, C. H., Singer, A. U. y Savchenko, A. (2010) 'NleG type 3 effectors from enterohaemorrhagic *Escherichia coli* are U-Box E3 ubiquitin ligases', *PLoS Pathogens*, 6(6), e1000960.

Yen, H., Karino, M. y Tobe, T. (2016) 'Modulation of the Inflammasome Signaling Pathway by Enteropathogenic and Enterohemorrhagic *Escherichia coli*', *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 6, pp. 1–8.

Zhang, W.L., Bielaszewska, M., Liesegang, A., Tschape, H., Schmidt, H., Bitzan, M.,

Karch, H. (2000) 'Molecular characteristics and epidemiological significance of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26 strains', *J. Clin. Microbiol.* 38(6), pp. 2134-2140.

Zhang, L., Chaudhuri, R. R., Hobman, J. L., Patel, M. D., Antony, C., Sarti, D., Roe, A. J., Vlisidou, I., Shaw, R. K., Falciani, F., Stevens, M. P., Gally, L., Knutton, S., Frankel, G., Penn, C. W., Pallen, M. J., Constantinidou, C., Jones, A. C. y Gally, D. L. (2004) 'Regulators encoded in the *Escherichia coli* type III secretion system 2 gene cluster influence expression of genes withing the locus of enterocyte effacement in Enterohemorrhagic *E. coli* O157:H7', *Infection and Immunity*, 72(12), pp. 7282–7293.

Ziebell, K., Konczy, P., Yong, I., Frost, S., Mascarenhas, M., Kropinski, A. M., Whittam, T. S., Read, S. C. y Karmali, M. A. (2008) 'Applicability of phylogenetic methods for characterizing the public health significance of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* strains', *Applied and Environmental Microbiology*, 74(5), pp. 1671–1675.

4.2. PUBLICACIONES Y COMUNICACIONES

4.2.1. Publicaciones científicas en revistas

- 2013** Cadona JS, Bustamante AV, Parma AE, Lucchesi PM, Sanso AM. Distribution of additional virulence factors related to adhesion and toxicity in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from raw products in Argentina. *Letters in Applied Microbiology*. 56(6), 449-455. doi: 10.1111/lam.12067.
- 2015** Sanso AM, Bustamante AV, Franci T, González J, Cadona JS, Lucchesi P. Serotype distribution of plasmid-encoded virulence profiles, and identification of *espP* and *subAB* alleles in verotoxigenic *Escherichia coli*. *British Microbiology Research Journal*. 5(5), 396-404. doi: 10.9734/BMRJ/2015/13905.
- 2016** Cadona JS, Bustamante AV, González J, Sanso AM. Genetic relatedness and novel sequence types of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated in Argentina. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 6, 93. doi: 10.3389/fcimb.2016.00093.
- 2017** González J, Sanso AM, Cadona JS, Bustamante AV. Virulence traits and different *nle* profiles in cattle and human verotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 strains from Argentina. *Microbial Pathogenesis*. 102, 102-108. doi: 10.1016/j.micpath.2016.11.022.
- 2017** González J, Cadona JS, Sanz M, Bustamante AV, Sanso AM. Molecular characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from vegetables in Argentina. *International Journal of Food Microbiology*. 261, 57-61. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2017.09.021.
- 2018** Soledad-Cadona J, Bustamante AV, González J, Mariel-Sanso A. Pathogenicity islands distribution in non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC). *Genes*. 9(2), 81. doi: 10.3390/genes9020081. Erratum: Cadona JS, Bustamante AV, González J, Sanso AM. "Erratum: Jimena Soledad Cadona, *et al.*; Pathogenicity Islands Distribution in Non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STEC). *Genes* 2018, 9, 81". *Genes*. 9 (4), 222. doi: 10.3390/genes9040222.

- 2018** Sanso AM, Bustamante AV, Krüger A, Cadona JS, Alfaro R, Cáceres E, Fernández D, Lucchesi APM, Padola NL. Molecular epidemiology of Shiga toxin-producing O113:H21 isolates from cattle and meat. *Zoonoses and Public Health*. 65, 569-577. doi: 10.1111/zph.12467.
- 2018** Hernandez LB, Cadona JS, Christensen M, Fernández D, Padola NL, Bustamante AV, Sanso AM. Virulence genes and genetic diversity assessment of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O91 strains from cattle, beef and poultry products. *Microbial Pathogenesis*. 125, 463-467. doi: 10.1016/j.micpath.2018.10.009.

4.2.2. Comunicaciones a congresos y jornadas

- 2011** Cadona, Jimena S.; Sanso, A. Mariel; Bustamante, Ana V.; Lucchesi, Paula A.; Parma, Alberto E. Detección de genes de virulencia en cepas de *Escherichia coli* verotoxigénico aisladas de alimentos cárnicos. XVII Congreso Argentino de Toxicología. Tandil. 28 septiembre al 01 octubre. Acta Toxicología Argentina. 19: 58-59.
- 2012** Cadona JS, AV Bustamante, AE Parma, PMA Lucchesi, AM Sanso. Análisis de las islas genómicas OI-71 y OI-122 en cepas de *Escherichia coli* verotoxigénico aisladas en Argentina. Resumen. XI Congreso Latinoamericano de Microbiología e Higiene de los Alimentos. Ciudad Autónoma de Buenos Aires. 26-29 noviembre. MICROAL, Libro de Resúmenes págs. 112-113.
- 2012** Cagnoli CI, JS Cadona, AV Bustamante, AE Parma, PMA Lucchesi, AM Sanso. Distribución del gen de la toxina CDT-V en aislamientos de *Escherichia coli* verotoxigénico de Argentina. Resumen. XI Congreso Latinoamericano de Microbiología e Higiene de los Alimentos. Ciudad Autónoma de Buenos Aires. 26-29 noviembre. MICROAL, Libro de Resúmenes pág. 113.
- 2013** Cadona JS, AV Bustamante, AM Sanso. *Escherichia coli* verotoxigénico: distribución de genes efectores de la Isla Genómica (OI)-57 en cepas nativas. Resumen. XIII Congreso Argentino de Microbiología. Ciudad Autónoma de Buenos Aires. 23-26 septiembre. Revista Argentina de Microbiología, p187. 45(1): 78-79.

- 2013** Cadona, J.S., Bustamante A.V., Sanso A.M. *Escherichia coli* verotoxigénico: identificación de líneas clonales. Póster. Primer Congreso Internacional Científico y Tecnológico de la Provincia de Buenos Aires - CONCIC 2013. Ciudad de La Plata, Buenos Aires. 19-20 de septiembre. Póster publicado (<http://www.concic2013.com.ar/posters.html>).
- 2014** González Juliana, Cadona Jimena S., Sanso Mariel A, Bustamante Ana V. Verotoxigenic *Escherichia coli* O157:H7 from argentinean pampean region: pathogenicity islands and effectors genes. Resumen. X Congreso Argentino de Microbiología General – SAMIGE. Ciudad de Mar del Plata, Buenos Aires. 2-4 julio. Libro de resúmenes, MM-015.
- 2014** Lucchesi P.; Etcheverría A.; Sanso A.; Krüger A.; Bustamante A.; Colello R.; Cadona J.; González J.; Ruiz J.; Cáceres E.; Burgán J.; Sanz M.; Arroyo G.; Lenzi L.; Fernández D.; Padola N. *Escherichia coli* verotoxigénico: reservorios, variabilidad genética y virulencia. 16° Encuentro Nacional de Investigación Pediátrica. Ciudad de Tandil, Buenos Aires. 04-05 de julio. Libro de resúmenes, pág. 25.
- 2015** Colello R.; Krüger A.; Ruiz J.; Sanso A.; Bustamante A.; Sanz M.; Arroyo G.; Fernández D.; Cadona J.; González J.; Burgán J.; Cáceres E.; Lucchesi P.; Etcheverría A.; Padola N. Desde la granja a la mesa: situación de *Escherichia coli* verocitotoxigénica en Argentina. 9° Jornadas Internacionales de Veterinaria Práctica. Ciudad de Mar del Plata, Buenos Aires. 28-29 de agosto. <http://cvpba.org/wp-content/uploads/2015/09/5.microbiologia.pdf>
- 2015** Cadona J.S., González J., Bustamante A.V., Sanso A.M. VTEC in Argentina: First screening of the circulating clones using multilocus sequence typing (MLST). The 9th Triennial Internacional Symposium on Shiga Toxin Producing *Escherichia coli* Infections (VTEC 2015). Boston, Massachusetts, United States. September 13-16. Poster Abstracts group B - Diagnostics, Typing and Phylogenetics, pp 42-43.
- 2015** González J., Cadona J.S., Sanso A.M., Bustamante A.V. Genotypic characterization of verotoxigenic *Escherichia coli* O157:H7 from Argentina. The 9th Triennial Internacional Symposium on Shiga Toxin (Verocytotoxin) Producing *Escherichia coli* Infections (VTEC 2015). Boston, Massachusetts, United States. September 13-16. Poster Abstracts group B - Diagnostics, Typing and Phylogenetics, pp 40-41.

- 2016** Sanso AM, JS Cadona, J González, AV Bustamante. Clones circulantes de *Escherichia coli* verotoxigénico no-O157 aislados en Argentina. XXIII Congreso Latinoamericano de Microbiología y XIV Congreso Argentino de Microbiología. Rosario, Santa Fe, Argentina. 26-30 de septiembre de 2016. Libro de resúmenes, MA-0228.
- 2016** Bustamante AV, J González, JS Cadona, M Sanz, AM Sanso. Aislamiento y caracterización de *Escherichia coli* diarreogénico a partir de vegetales para el consumo humano de la región pampeana. XXIII Congreso Latinoamericano de Microbiología y XIV Congreso Argentino de Microbiología. Rosario, Santa Fe, Argentina. 26-30 de septiembre. Libro de resúmenes, MA-0267.
- 2016** Bustamante AV A Krüger, JS Cadona, R Alfaro, E Cáceres, D Fernández, AI Etcheverría, NL Padola, AM Sanso. *Escherichia coli* productor de toxinas shiga O113:H21 aislado de tambos y alimentos. XXIII Congreso Latinoamericano y XIV Congreso Argentino de Microbiología. Rosario, Santa Fe, Argentina. 26-30 septiembre. Libro de resúmenes, MA-0231.
- 2017** Lucchesi P, A. Etcheverría, A. Krüger, M. Sanso, A. Bustamante, D. Fernández, M. Sanz, R. Colello, E. Cáceres, J. Ruiz, J. Burgán, J. Cadona, J. González, L. Hernández, M. García, V. Vélez, G. Arroyo, N. L. Padola. Síndrome Urémico Hemolítico: eco-epidemiología del enemigo que afecta la seguridad alimentaria. IV Congreso Internacional Científico y Tecnológico de la Provincia de Buenos Aires (CONCYT 2017). Universidad Nacional de Quilmes, Buenos Aires. 1º de septiembre. Herramientas para el Desarrollo - Ponencias y Resúmenes, p. 109. ISBN: 978-987-98816-1-3.
- 2018** Cadona J., González J., Bustamante A., Sanso M. *Escherichia coli* verotoxigénico: detección de la Isla de Patogenicidad (OI)-122 y su asociación con serotipos en cepas no-O157 aisladas en Argentina. I Jornada de Microbiología General (I MICROGEN). Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina. 13 de abril. Libro de Resúmenes (MG1), pág. 392.
- 2018** González J., Cadona J., Sanso M., Bustamante A. Diversidad genética de aislamientos de *Escherichia coli* verotoxigénico O157:H7 circulantes en Argentina. I Jornada de

Microbiología General (I MICROGEN). Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina. 13 de abril. Libro de Resúmenes (MG3), pág. 394.

- 2018** Hernández L., Christensen M., Cadona J., Fernández D., Padola N.L., Bustamante A., Sanso M. Genetic diversity assessment of VTEC O91 in Argentina. 10th Internacional Symposium on Shiga Toxin (Verocytotoxin) Producing *Escherichia coli* Infections (VTEC 2018). Florence, Italy. May 6-9. Program and abstract book, page 159.

4.3. ANEXO I. Tabla S1.

Tabla S1. Aislamientos VTEC no-O157 estudiados y su caracterización correspondiente a los genes ubicados en las PAI estudiadas.

					OI-36				OI-57			OI-71						OI-122									
SEROTIPO	AI SLAM.	Nro. aislam.	ORIGEN ^a	<i>eae</i>	<i>nle B2</i>	<i>nle C</i>	<i>nle H1-1</i>	<i>nle D</i>	<i>nleG 2-3</i>	<i>nleG 5-2</i>	<i>nleG 6-2</i>	<i>nle A</i>	<i>nle F</i>	<i>nle G</i>	<i>nleG 2-1</i>	<i>nle G9</i>	<i>nleH 1-2</i>	<i>nle B</i>	<i>nle E</i>	<i>ent/espl2</i>	Z4321 (<i>pagC</i>)	Z4326 (<i>sen</i>)	Z4332 (<i>efa1</i>)	Z4333 (<i>efa2</i>)	OI 122 ^b	SPT (según serotipo)	
02:H5	AM 166-1	1	Bovino M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	INC	ND	
02:NM	HT 6-15	2	Hamburguesa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	INC	ND	
05:NM	T 246-5	3	Ternero	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	CO	C	
05:NM	T 68-1	4	Ternero	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	CO	C	
05:NM	T 249-5	5	Ternero	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	CO	C	
05:NM	T 250-5	6	Ternero	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	CO	C	
08:H16	CM 15-2	7	Carne picada	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	INC	E	
08:H16	CM 15-1	8	Carne picada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	INC	E	
08:H16	FO 164	9	Bovino F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	INC	E	
08:H19	03M	10	Carne picada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	AUS	E	
08:H19	07M	11	Carne picada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	AUS	E	
08:H19	30M	12	Carne picada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	AUS	E	
08:H19	33M	13	Carne picada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	AUS	E	
08:H19	44M	14	Carne picada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	AUS	E	
08:H19	47M	15	Carne picada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	AUS	E	
08:H19	48M	16	Carne picada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	AUS	E	
08:H19	51M	17	Carne picada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	AUS	E	
08:H19	CM 2-4	18	Carne picada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	AUS	E	
015:H21	FB 11	19	Bovino F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	INC	ND	
020:H7	AM 216-1	20	Bovino M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	AUS	ND	
020:H7	AM 209-1	21	Bovino M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	AUS	ND	

O20:H19	HT 6-2	22	Hamburguesa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	INC	C
O20:H19	T 22-1	23	Ternero	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	AUS	C
O20:H19	HT 1-6	24	Hamburguesa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	AUS	C
O20:H19	AM 114-1	25	Bovino M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	AUS	C
O20:H19	AP 28-1	26	Bovino P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	AUS	C
O20:H19	FO 112	27	Bovino F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	AUS	C
O20:H19	T 22-2	28	Ternero	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	AUS	C
O20:HNT	T 250-4	29	Ternero	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	CO	ND
O22:H8	M36	30	Carne picada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	INC	C
O22:H8	HW 1-3	31	Hamburguesa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	INC	C
O22:H8	HW 1-15	32	Hamburguesa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	INC	C
O25:H19	FB 68	33	Bovino F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	AUS	ND
O26:H11	224.2.2	34	Humano CH	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	INC	B
O26:H11	323.5.1	35	Humano SUH	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	INC	B
O26:H11	T 246-6	36	Ternero	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	INC	B
O26:H11	T 130-1	37	Ternero	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	INC	B
O26:H11	T 129-1	38	Ternero	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	INC	B
O26:H11	T 125-1	39	Ternero	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	INC	B
O26:H11	T 59-2	40	Ternero	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	INC	B
O26:H11	T 8-1	41	Ternero	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	INC	B
O38:H39	T 246-1	42	Ternero	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	INC	ND
O39:H49	AM 169-3	43	Bovino M	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	INC	E
O39:H49	AM 165-1	44	Bovino M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	INC	E
O39:H49	AM 162-1	45	Bovino M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	INC	E
O79:H19	16M	46	Carne picada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	AUS	ND
O79:H19	27M	47	Carne picada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	AUS	ND
O79:H19	AM 168-3	48	Bovino M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	AUS	ND

088:H21	HW 1-7	49	Hambur- guesa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	INC	ND
091:H21	HAB 14	50	Hambur- guesa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	INC	C
091:H21	AP 16-1	51	Bovino P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	INC	C
091:H21	FO 135	52	Bovino F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	INC	C
091:H21	FO 130	53	Bovino F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	INC	C
0103:NМ	AM 202-2	54	Bovino M	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	INC	B
0103:NМ	T 46-6	55	Ternero	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	CO	B
0103:H2	FB 94	56	Bovino F	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	CO	B
0111:H2	73.2.2	57	Humano D	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	CO	ND
0111:NМ	T 9-1	58	Ternero	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	CO	B
0112:H2	02M	59	Carne picada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	AUS	C
0113:NМ	15M	60	Carne picada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	INC	E
0113:NМ	17M	61	Carne picada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	INC	E
0113:NМ	18M	62	Carne picada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	INC	E
0113:NМ	19M	63	Carne picada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	INC	E
0113:NМ	20M	64	Carne picada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	INC	E
0113:NМ	22M	65	Carne picada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	INC	E
0113:NМ	23M	66	Carne picada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	INC	E
0113:NМ	24M	67	Carne picada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	INC	E
0113:NМ	25M	68	Carne picada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	INC	E
0113:NМ	28M	69	Carne picada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	INC	E
0113:H21	HT 7-14	70	Hambur- guesa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	INC	C
0113:H21	FO 165	71	Bovino F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	INC	C
0113:H21	FC 103	72	Bovino F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	INC	C
0113:H21	05M	73	Carne picada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	INC	C

0113:H21	BE 2-3	74	Bandeja Eviscerado	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	AUS	C
0113:H21	AP 97-3	75	Bovino P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	INC	C
0116:H21	CM 3-18	76	Carne picada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	INC	D
0117:H7	08M	77	Carne picada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	AUS	D
0117:H7	01M	78	Carne picada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	INC	D
0117:H7	HT 2-2	79	Hamburguesa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	INC	D
0117:H7	AP 32-1	80	Bovino P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	INC	D
0117:H7	FC 146	81	Bovino F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	INC	D
0117:H7	AM 214-1	82	Bovino M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	AUS	D
0117:H7	FT 156	83	Bovino F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	INC	D
0117:H7	FC 149	84	Bovino F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	INC	D
0118:H2	306.10.3	85	Humano D	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	CO	ND
0118:H16	T 250-2	86	Ternero	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	CO	C
0120:H19	FS 151	87	Bovino F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	AUS	ND
0121:H19	299	88	Humano CH	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	CO	B
0128:NM	430.3.3	89	Humano portador	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	AUS	ND
0141:H7	AM 167-1	90	Bovino M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	AUS	ND
0141:H8	AP 31-1	91	Bovino P	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	INC	ND
0141:H8	AP 21-1	92	Bovino P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	AUS	ND
0145:NM	3.1.2	93	Humano CH	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	INC	B
0145:NM	74.2	94	Humano SUH	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	INC	B
0145:NM	181.2.4	95	Humano CH	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	AUS	B
0145:NM	355	96	Humano D	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	INC	B
0145:NM	506.1.5.2	97	Humano CH	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	INC	B
0145:NM	512.4.5.1	98	Humano CH	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	AUS	B
0145:NM	FB 97	99	Bovino F	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	INC	B

0145:NM	FB 73	100	Bovino F	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	INC	B
0145:NM	FB 5	101	Bovino F	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	INC	B
0145:NM	FB 13	102	Bovino F	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	INC	B
0145:NM	FB 79	103	Bovino F	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	INC	B
0145:NM	FB 67e	104	Bovino F	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	INC	B
0145:NM	FB 87	105	Bovino F	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	INC	B
0145:NM	FB 92	106	Bovino F	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	INC	B
0145:NM	FB 78	107	Bovino F	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	INC	B
0145:NM	FB 91	108	Bovino F	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	INC	B
0145:NM	FB 81e	109	Bovino F	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	INC	B
0145:NM	AMB 166	110	Bovino M	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	INC	B
0146:NM	FB 32	111	Bovino F	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	INC	D
0146:H21	FB 12	112	Bovino F	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	CO	D
0162:H7	EN 1-4	113	Hamburguesa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	INC	ND
0165:NM	T 83-1	114	Ternero	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	INC	ND
0171:HNT	10M	115	Carne picada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	INC	ND	
0171:H2	CM 20-7	116	Carne picada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	INC	D
0171:H2	FO 140	117	Bovino F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	INC	D	
0171:H2	FB 38	118	Bovino F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	INC	D	
0171:H2	FB 27	119	Bovino F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	INC	D	
0171:H2	AM 203-3	120	Bovino M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	INC	D	
0171:H2	AM 217-1	121	Bovino M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	INC	D	
0171:H2	FB 58	122	Bovino F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	INC	D	
0171:H2	AM 200-2	123	Bovino M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	INC	D	
0171:H2	FB 8	124	Bovino F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	AUS	D	
0171:H2	FB 49	125	Bovino F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	INC	D	
0171:H2	AM 174-1	126	Bovino M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	INC	D	
0171:NM	FB 1	127	Bovino F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	INC	ND	
0171:NM	FB 21	128	Bovino F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	AUS	ND	

0171:NM	45M	129	Carne picada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	INC	ND
0171:NM	49M	130	Carne picada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	INC	ND
0174:H21	53M	131	Carne picada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	INC	C
0174:H21	54M	132	Carne picada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	INC	C
0174:H21	55M	133	Carne picada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	INC	C
0174:H21	56M	134	Carne picada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	INC	C
0174:H21	57M	135	Carne picada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	INC	C
0174:H21	CM 25-12	136	Carne picada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	INC	C
0174:H21	FB 10	137	Bovino F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	INC	C
0174:H21	FC 101	138	Bovino F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	INC	C
0174:H21	FO 122	139	Bovino F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	INC	C
0174:H21	FB 31	140	Bovino F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	AUS	C
0174:H21	FB 33	141	Bovino F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	INC	C
0174:H21	AM 178-2	142	Bovino M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	INC	C
0174:H21	AM 174-2	143	Bovino M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	INC	C
0174:H21	AM 170-3	144	Bovino M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	INC	C
0174:H21	T 186-3	145	Ternero	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	INC	C
0175:H8	FB 40	146	Bovino F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	AUS	ND
0175:H8	FB 46	147	Bovino F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	AUS	ND
0177:NM	T 186-6	148	Ternero	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	INC	ND
0177:NM	FB 15	149	Bovino F	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	INC	ND
0177:NM	FO 127-3	150	Bovino F	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	INC	ND
0178:H19	RE1-5	151	Remolacha	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	AUS	ND
0178:H19	11M	152	Carne picada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	INC	ND
0178:H19	13M	153	Carne picada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	AUS	ND
0178:H19	14M	154	Carne picada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	INC	ND

0178:H19	FC 104	155	Bovino F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	INC	ND
0178:H19	FO 143	156	Bovino F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	INC	ND
0178:H19	41M	157	Carne picada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	AUS	ND
0178:H19	42M	158	Carne picada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	AUS	ND
0185:H7	CM 22-1	159	Carne picada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	INC	ND
ONT:H7	38M	160	Carne picada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	INC	ND
ONT:H7	39M	161	Carne picada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	INC	ND
ONT:H7	52M	162	Carne picada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	INC	ND
ONT:H7	58M	163	Hamburguesa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	INC	ND
ONT:H7	43M	164	Carne picada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	INC	ND
ONT:H8	AM 159-1	165	Bovino M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	INC	ND
ONT:H8	HW 1-2	166	Hamburguesa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	INC	ND
ONT:H19	29M	167	Carne picada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	AUS	ND
ONT:H19	64M	168	Carne picada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	AUS	ND
ONT:H19	40M	169	Carne picada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	AUS	ND
ONT:H21	09M	170	Carne picada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	INC	ND
ONT:H21	65M	171	Carne picada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	AUS	ND
ONT:H21	CM 6-3F	172	Carne picada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	INC	ND
ONT:H21	AM 219-1	173	Bovino M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	INC	ND
ONT:H21	AM 173-1	174	Bovino M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	INC	ND
ONT:H21	AM 212-1	175	Bovino M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	INC	ND
ONT:H21	FO 120	176	Bovino F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	INC	ND
ONT:H21	FB 7	177	Bovino F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	INC	ND
ONT:H21	FB 16	178	Bovino F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	INC	ND
ONT:H21	FB 64	179	Bovino F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	INC	ND

ONT:H21	T 85-1	180	Ternero	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	INC	ND
ONT:H21	T 84-3	181	Ternero	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	INC	ND
ONT:H21	V 1-1	182	Bandeja Eviscerado	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	INC	ND
ONT:H21	FO 111	183	Bovino F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	INC	ND
ONT:HNT	06M	184	Carne picada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	INC	ND
ONT:HNT	46M	185	Carne picada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	AUS	ND
ONT:HNT	59M	186	Hamburguesa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	AUS	ND
ONT:HNT	HAB 5	187	Hamburguesa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	AUS	ND
ONT:NM	AM 210-1	188	Bovino M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	INC	ND
ONT:NM	AM 204-1	189	Bovino M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	INC	ND
ONT:NM	AM 207-2	190	Bovino M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	INC	ND
ONT:NM	AM 197-1	191	Bovino M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	INC	ND
ONT:NM	AM 198-1	192	Bovino M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	INC	ND
ONT:NM	AM 215-1	193	Bovino M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	INC	ND
ONT:NM	FB 50	194	Bovino F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	INC	ND
ONT:NM	FB 86	195	Bovino F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	INC	ND
ONT:NM	FB 56	196	Bovino F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	INC	ND
ONT:NM	FB 17	197	Bovino F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	INC	ND
ONT:NM	FB 70	198	Bovino F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	INC	ND
ONT:NM	FB 6	199	Bovino F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	INC	ND
ONT:NM	FB 82	200	Bovino F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	INC	ND
ONT:NM	FB 65	201	Bovino F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	INC	ND
ONT:NM	FB 45	202	Bovino F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	INC	ND
ONT:NM	FT 155	203	Bovino F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	INC	ND
ONT:NM	RE 1-3	204	Remolacha	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	AUS	ND

^a Bovino M, bovino adulto de matadero; Bovino P, bovino adulto en pastoreo; Bovino F, bovino de *feedlot*; Humano: CH, diarrea con sangre; D, diarrea; SUH, síndrome urémico hemolítico.

^b CO, completa; INC, incompleta; AUS, ausente..