



Maestría en Microbiología Molecular
7^{ma} cohorte 2010
UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTIN

Trabajo de Tesis realizado como requisito para optar al título de
MAGISTER EN MICROBIOLOGIA MOLECULAR

Caracterización de cepas *Escherichia coli* O145 productor de toxina Shiga aisladas en Argentina entre los años 1998 y 2012

Autora
Claudia Carolina Carbonari

Directora
Elizabeth Sandra Miliwebsky

Lugar de Trabajo:
Servicio Fisiopatogenia, Departamento Bacteriología, Instituto Nacional de Enfermedades
Infecciosas –ANLIS“Dr. Carlos G. Malbrán”
Buenos Aires, 2024

A don Sosa, con amor.

Agradecimientos

Quiero agradecer a todas las personas que de una forma u otra me ayudaron a concretar este trabajo:

A mis padres, Angélica y Luis por su apoyo incondicional para perseguir mis sueños y sobre todo por haberme ayudado a ser la persona que soy. A mi hermano Corán por su confianza y a mis abuelos y abuelas que siempre fueron seguidores de todos mis proyectos.

A Elizabeth Miliwebsky, quien aceptó acompañarme en este camino de aprendizaje, por su apoyo, sus enseñanzas y comentarios para la corrección y revisión de éste trabajo, y sobre todo por sus palabras de aliento en los momentos de flaqueza, su paciencia y dedicación. Es además quien hoy guía y estimula ese gran grupo de trabajo del que estoy muy agradecida de formar parte.

A Marta Rivas, porque fue quien me abrió las puertas del Servicio Fisiopatogenia, estuvo ahí para enseñarme en mis comienzos y ayudarme en mi desarrollo profesional y me dio la libertad que todo investigador persigue. A Isabel Chinen por acompañarme durante parte del camino, sus consejos y enseñanzas también me han servido de guía. A mis compañeros de trabajo, por su valiosa y desinteresada colaboración. El tiempo que compartimos juntos los convierte además en mi segunda familia, muchos ya no están pero han dejado su huella.

A mis amigos por su comprensión y apoyo incondicional.

Y a mis amores... a Bruno, por su paciencia, compañía y por incentivarme a seguir siempre adelante y a Tomi por compartir conmigo la curiosidad del saber.

Gracias, sin Uds. nada de esto hubiera sido posible.

Resumen

Caracterización de cepas *Escherichia coli* O145 productor de toxina Shiga aisladas en Argentina entre los años 1998 y 2012

Escherichia coli (EC) es parte de la microbiota intestinal del hombre y animales de sangre caliente. La mayoría de las cepas son comensales, pero otras pueden causar enfermedad. Los *Escherichia coli* diarreigénicos se han clasificado en seis categorías: productor de toxina Shiga (STEC), enteropatógeno, enterotoxigénico, enteroinvasivo, enteroagregativo, y de adherencia difusa. En particular STEC puede causar desde manifestaciones clínicas leves hasta enfermedades severas como diarrea sanguinolenta, colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico (SUH). Esto es debido a factores de virulencia tales como: la toxina Shiga que se clasifica en dos tipos (Stx1 y Stx2), la proteína intimina (*eae*), la enterohemolisina (*ehxA*), y otras adhesinas como las fimbrias Lpf. Durante la infección por STEC, estos patógenos alcanzan el intestino, se adhieren a los enterocitos y se produce la lesión de pegado y borrado de las microvellosidades. La toxina es liberada al lumen intestinal, produciendo daño celular y puede a través de la circulación sanguínea alcanzar otros órganos blanco. El SUH fue definido como una entidad clínica caracterizado por presentar anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia e insuficiencia renal, siendo los niños el grupo más vulnerable. El ganado bovino se considera el principal reservorio, también los alimentos contaminados son fuente de infección y el contacto persona a persona es una importante vía de transmisión. En Argentina el SUH es endémico con aproximadamente 400 casos al año. Durante los últimos años se estimó que los serotipos O157:H7 y O145:NM se asocian aproximadamente en un 69,3% y 23,3% respectivamente con casos de SUH. Tomando en cuenta estos datos es que surgió la necesidad de estudiar las características fenotípicas y perfiles de virulencia de las cepas de *E. coli* O145 aisladas de los casos clínicos y del reservorio animal durante el período comprendido entre los años 1998 y 2012. Se incluyeron 286 cepas aisladas de casos clínicos y del reservorio animal. Se realizaron estudios fenotípicos y genotípicos de los cuales la mayoría de las cepas resultaron ser O145:NM (96,8%; 277/286), siendo O145:NM[H28] en el 97,8% (271/277) de las cepas no móviles, y O145:HNT, O145:H28 y O145:H25 (9,5%, 0,9%, y 0,5%) entre las móviles. El 11,5% del total de las cepas presentaron resistencia a al menos alguno de los antimicrobianos ensayados, como tetraciclina. Por PCR se determinó que la mayoría de las cepas (90,2%) presentaron el perfil de virulencia con gran potencial patogénico *stx_{2a}/eae-γ/ehxA/lpfA1-5*. Por electroforesis de campos pulsado (PFGE) se pudo evidenciar la gran diversidad que presentan las cepas STEC O145 que circulan en el país ya que se identificaron 294 patrones *XbaI*-PFGE con un porcentaje de similitud del 58,7% entre ellas. Sin embargo, se pudieron establecer patrones similares asociados a brotes y un cluster entre cepas humanas y de reservorio. Si bien, la mayoría de los casos analizados se presentaron de forma esporádica se pudieron estudiar 10 brotes asociados a infección por STEC O145. Es fundamental fortalecer el sistema de vigilancia para prevenir casos humanos asociados a STEC O145 y otros STEC no-O157, así como también monitorear la circulación de este patógeno en reservorios y en posibles alimentos contaminados en nuestro país.

Palabras clave: STEC O145, perfil de virulencia, brotes, vigilancia.

Abstract

Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O145 strains isolated in Argentina between 1998 and 2012

Escherichia coli (EC) is part of the intestinal microbiota of man and warm-blooded animals. Most strains are commensal, but others can cause disease. Diarrheagenic EC are classified into six categories: Shiga toxin producing (STEC), enteropathogenic, enterotoxigenic, enteroinvasive, enteroaggregative, and diffuse adherence. STEC can cause mild clinical manifestations to severe diseases such as bloody diarrhea, hemorrhagic colitis, and hemolytic uremic syndrome (HUS). This is due to virulence factors such as: Shiga toxin, which is classified into two types (Stx1 and Stx2), the intimin protein (*eae*), enterohemolysin (*ehxA*), and other adhesins such as Lpf fimbriae. During STEC infection, these pathogens reach the intestine, adhere to enterocytes, and microvilli attachment and effacement lesions occur. The toxin is released into the intestinal lumen, causing cellular damage and can reach other target organs through blood circulation. HUS was defined as a clinical entity characterized by microangiopathic haemolytic anaemia, thrombocytopenia and renal failure, being the children the most vulnerable group. Cattle are considered the main reservoir; contaminated food is also a source of infection, and person-to-person contact is an important route of transmission. In Argentina HUS is endemic with approximately 400 cases per year. In recent years, it has been estimated that serotypes O157:H7 and O145:NM are associated with approximately 69.3% and 23.3%, respectively, with HUS cases. Taking these data into account, the need arose to study the phenotypic characteristics and virulence profiles of the *E. coli* O145 strains isolated from clinical cases and the animal reservoir during the period between 1998 and 2012. We include 286 strains isolated from clinical cases and from the animal reservoir. Phenotypic and genotypic studies were carried out, of which the majority of the strains turned out to be O145:NM (96.8%; 277/286), with O145:NM[H28] being in 97.8% (271/277) of non-motile strains, and O145:HNT, O145:H28 and O145:H25 (9.5%, 0.9%, and 0.5%) among the motile ones. 11.5% of the total strains showed resistance to at least one of the antimicrobials tested, such as tetracycline. By PCR, it was determined that most of the strains (90.2%) presented the virulence profile with great pathogenic potential *stx_{2a}/eae-γ/ehxA/lpfA1-5*. Pulsed field electrophoresis (PFGE) showed the great diversity of the STEC O145 strains circulating in the country since 294 *Xba*I-PFGE patterns were identified with a similarity percentage of 58.7% between them. However, similar patterns associated with outbreaks and a cluster between human and reservoir strains could be established. Although most of the cases analyzed occurred sporadically, 10 outbreaks associated with STEC O145 infection could be studied. It is essential to strengthen the surveillance system to prevent human cases associated with STEC O145 and other non-O157 STEC, as well as monitor in our country the circulation of this pathogen in reservoirs and in possible contaminated foods

Keywords: STEC O145, virulence profile, outbreaks, surveillance.

| INDICE | Página |
|--|---------------|
| I. INTRODUCCION | 1 |
| 1. <i>Escherichia coli</i> productor de toxina Shiga | 1 |
| 2. Factores de virulencia de STEC | 2 |
| 2.1. Toxina Shiga | 2 |
| 2.2. Isla de patogenicidad LEE: gen <i>eae</i> - Intimina y factores de adherencia intestinal | 4 |
| 2.3. Adhesinas - Lpf | 6 |
| 2.4. Enterohemolisina | 7 |
| 3. Patogénesis | 8 |
| 4. Historia natural de la enfermedad y manifestaciones clínicas | 9 |
| 5. Reservorio y vías de transmisión | 11 |
| 6. Vigilancia epidemiológica de las infecciones por STEC | 12 |
| 7. Epidemiología de las infecciones por STEC | 15 |
| 8. <i>Escherichia coli</i> productor de toxina Shiga O145 | 15 |
| | |
| II. OBJETIVOS | 17 |
| 1. Objetivos generales | 17 |
| 2. Objetivos específicos | 17 |
| | |
| III. MATERIALES Y METODOS | 18 |
| 1. Cepas bacterianas | 18 |
| 2. Caracterización fenotípica | 18 |
| 2.1. Serotipificación | 18 |
| 2.2. Confirmación de los resultados atípicos en las pruebas de fermentación del sorbitol, actividad β -D-glucuronidasa y de hemólisis por EHEC-Hly | 19 |
| 2.3. Susceptibilidad antimicrobiana | 19 |
| 3. Caracterización genotípica | 20 |
| 3.1. Extracción del ADN | 20 |

| | |
|--|----|
| 3.2. Detección de los genes O145wzx2 y O145wzy2 | 20 |
| 3.3. Detección del <i>fliCH8</i> y <i>fliCH28</i> | 21 |
| 3.4. Detección del gen <i>ehxA</i> | 21 |
| 3.5 Detección de los genes <i>lpfA₁₋₅</i> y <i>lpfO₁₁₃</i> | 21 |
| 4. Subtipificación | 22 |
| 4.1. Detección de las variantes genotípicas del gen <i>eae</i> | 22 |
| 4.2. Electroforesis en gel de campo pulsado | 22 |
| 5. Perfiles de virulencia | 24 |
| 6. Relación entre los perfiles de virulencia y las manifestaciones clínicas | 25 |
| 7. Análisis de los controles de excreción de STEC | 25 |
| IV. RESULTADOS | 26 |
| 1. Caracterización fenotípica | 26 |
| 1.1. Subtipificación de la toxina Shiga | 26 |
| 1.2. Confirmación de los resultados atípicos en las pruebas de fermentación del sorbitol, actividad β -D-glucuronidasa y de hemólisis por EHEC-Hly | 26 |
| 1.3. Susceptibilidad antimicrobiana | 27 |
| 2. Caracterización genotípica | 28 |
| 2.1. Detección de los genes O145wzx y O145wzy | 29 |
| 2.2. Detección del <i>fliCH28</i> y <i>fliCH8</i> | 29 |
| 2.3. Detección del gen <i>ehxA</i> | 30 |
| 2.4. Detección de los genes <i>lpfA₁₋₅</i> y <i>lpfO₁₁₃</i> | 30 |
| 3. Subtipificación | 31 |
| 3.1. Detección de las variantes genotípicas del gen <i>eae</i> | 31 |
| 3.2. Subtipificación molecular para el estudio de la relación clonal de las cepas STEC O145 | 32 |
| 4. Perfiles de virulencia | 34 |
| 5. Relación entre los perfiles de virulencia y las manifestaciones clínicas | 35 |

| | |
|--|----|
| 6. Epidemiología: Estudio de brotes por STEC O145 | 36 |
| 7. Control de excreción de STEC | 38 |
| V. DISCUSION | 40 |
| VI. CONCLUSIONES | 47 |
| VII. PROPUESTA DE TRABAJOS A FUTURO | 49 |
| VIII. REFERENCIAS | 50 |
| IX. APENDICE I | 67 |
| Componentes y condiciones de las PCRs | 67 |
| X. APENDICE II | 70 |
| Relación clonal de cepas STEC O145 por <i>Xba</i> I- PFGE según protocolo STEC O157 | 70 |
| XI. APENDICE III | 74 |
| Relación clonal de cepas STEC O145 por <i>Xba</i> I- PFGE según protocolo STEC no-O157 | 74 |
| XII. APENDICE IV | 79 |
| Estudio de brotes por STEC O145 | 79 |

I. INTRODUCCIÓN

1. *Escherichia coli* productor de toxina Shiga

Escherichia coli es parte de la flora habitual del tracto intestinal del hombre y de animales de sangre caliente, especialmente rumiantes. La mayoría de las cepas son comensales, pero algunas pueden causar enfermedad en humanos. Los *Escherichia coli* diarreigénicos se han clasificado en seis categorías en seis categorías: productor de toxina Shiga (STEC), enteropatógeno (EPEC), enterotoxigénico (ETEC), enteroinvasivo (EIEC), enteroagregativo (EAEC), y de adherencia difusa (DAEC) (Nataro y Kaper, 1998).

Escherichia coli productor de toxina Shiga comprende a un grupo de patógenos zoonóticos, que pueden transmitirse a través de los alimentos, cuya principal propiedad es la capacidad de producir una o más citotoxinas de la familia de las toxinas Shiga (Stx) (Melton-Celsa, 2014). Las manifestaciones clínicas relacionadas con infecciones causadas por STEC pueden variar desde una portación asintomática, diarrea leve a formas clínicas más graves como diarrea sanguinolenta (DS), colitis hemorrágica (CH) y síndrome urémico hemolítico (SUH) (Tarr *et al.* 2005). Las cepas STEC que además de la toxina Stx (*stx*) poseen otros factores de virulencia adicionales como la proteína intimina (*eae*) y la enterohemolisina (*ehxA*), y que son capaces de producir enfermedad severa en el hombre pertenecen al subgrupo conocido como *E. coli* enterohemorrágico (EHEC) (Nataro y Kaper, 1998). Si bien la incidencia de infecciones por EHEC varía en diferentes partes del mundo, los casos de DS y de SUH tienen un gran impacto en Salud Pública (Tarr *et al.* 2005; Rivas *et al.* 2006a).

En 1982, STEC fue descrito por primera vez como agente causal de enfermedades transmitidas por los alimentos. A partir de los brotes de CH ocurridos en Oregon y Michigan, en los Estados Unidos, se pudo establecer la asociación de los casos con el consumo de hamburguesas. En la descripción de los brotes, Riley *et al.* (1983) mencionaron el aislamiento, a partir de las heces de los individuos afectados, de un serotipo raro de *E. coli*. En la mitad de las muestras de materia fecal de los 47 casos de CH, y en una muestra de carne de un lote sospechoso en Michigan, se aisló por primera vez *E. coli* O157:H7. Al año siguiente en Canadá, Karmali *et al.* (1985), pudieron establecer la asociación entre casos de SUH y la infección por este mismo serotipo de STEC. *E. coli* O157:H7 es el prototipo de este grupo bacteriano y sigue siendo el serotipo responsable de la mayoría de los casos de enfermedad severa en humanos en diferentes regiones alrededor del mundo. Durante el período comprendido entre diciembre de 1992 y febrero del año 1993, ocurrió el gran brote de los multi estados que afectó a cuatro estados de la costa oeste

de los Estados Unidos. En Washington se reportaron 501 casos, que incluyeron 151 hospitalizaciones (31%), 45 casos de SUH (9%), y 3 fallecidos. Alrededor del 90% de los pacientes refirieron haber comido en locales de una cadena de comidas rápidas, pudiéndose establecer el vínculo epidemiológico con el consumo de hamburguesas (Bell *et al.* 1994). A partir de este brote, se implementó la notificación obligatoria de la infección por *E. coli* O157 en casos humanos y se estableció la reglamentación de USDA/FSIS para el estudio de STEC en carne picada. De esta manera, también se reforzó la vigilancia de STEC O157:H7 a nivel mundial.

Hasta el momento se conocen más de 400 serotipos de STEC. Diferentes estudios epidemiológicos han demostrado que solo una proporción de estos pueden causar enfermedad en humanos. Además del clásico O157, otros serogrupos como O26, O45, O103, O111, O121 y O145 también han sido reconocidos como responsables de casos severos de infección por STEC (Gould *et al.* 2013; Terajima *et al.* 2014).

2. Factores de virulencia de STEC

2.1. Toxina Shiga

La toxina Shiga (Stx) es el principal factor de virulencia de STEC. La familia Stx comprende varias toxinas, relacionadas con la Stx de *Shigella dysenteriae*, con quien se asemeja en estructura y actividad biológica. Las Stx se clasifican en dos tipos Stx1 y Stx2, las cuales presentan en sus secuencias nucleotídicas y de aminoácidos una homología general del 56% (Paton, y Paton, 1998). El operón del gen *stx* de ambos tipos de toxina se encuentra en el cromosoma bacteriano, inserto en la secuencia de un bacteriófago de tipo lambda (γ), (Melton-Celsa, 2014).

El gen *stx* no se encuentra en otras especies bacterianas, sin embargo, se han descrito cepas de *Citrobacter freundii*, *Enterobacter* spp y *Aeromonas hydrophila* que portan el gen *slt-II* (Shiga toxin like) que presenta una gran homología con el gen *stx2* que se encuentra en *E. coli* (Schmidt *et al.* 1993; Thomas *et al.* 2020).

En cuanto a su estructura, la toxina Shiga es una molécula formada por una subunidad A y cinco subunidades B. La subunidad A esta compuesta por dos péptidos A1 (28 kDa) y A2 (4 kDa) unidos por un puente disulfuro. El péptido A1 es responsable de la actividad biológica y A2 funciona como nexa a través de una unión no covalente entre el péptido A1 con las subunidades

B. Las cinco subunidades B (7,5 kDa) forman un pentámero, en forma de anillo responsable de la unión de la halotoxina con el receptor celular específico globotriaosil ceramida (Gb3). El mecanismo de citotoxicidad se inicia cuando Stx se une al receptor Gb3 presente en diferentes superficies celulares como la de los enterocitos, células endoteliales y renales. El pentámero se une al receptor Gb3 y el complejo halotoxina-receptor es endocitado por la célula. Luego la vesícula endocítica es llevada por medio del transporte reverso por el aparato de Golgi hacia el retículo endoplasmático. Allí la subunidad A1 es liberada al citoplasma, se une a los ribosomas y por su actividad glicohidrolasa separa la adenina específica del componente 28S de la subunidad 60S ribosomal, inhibiendo de esta manera la síntesis de proteínas. La interrupción de la síntesis de proteínas conduce a la muerte celular (Cherla *et al.* 2003).

Si bien ambos tipos de Stx son similares en cuanto a estructura y función, presentan una amplia diferencia en cuanto a la toxicidad en tejidos celulares y en modelos animales. Los ensayos de citotoxicidad descritos por primera vez por Konowalchuk *et al.* en el año 1977 determinaron que los cultivos filtrados de algunas cepas de *E. coli* producían un efecto citotóxico irreversible sobre células Vero (línea celular de riñón de mono verde africano). Años más tarde se estudió el efecto citotóxico en células endoteliales microvasculares renales humanas y, se comprobó que Stx2 presentaba una actividad citotóxica de cien a mil veces superior que Stx1 (Louise y Obrig, 1995). Además, la comparación de los efectos de las dos toxinas mostró diferencias en las respuestas pro-inflamatorias del huésped y en los tiempos en los que se producen las lesiones de los órganos. Stx1 indujo en babuinos una respuesta pro-inflamatoria más intensa y rápida mientras que la respuesta de Stx2 fue gradual y demoró varios días (Stearns-Kurosawa *et al.* 2010). En otro estudio, también utilizando un modelo de primate no humano, se observó que tanto Stx1 como Stx2 afectaba la función renal, y aunque Stx2 inflige un daño más severo en el riñón que Stx1, el daño causado por Stx1 fue significativo (Stearns-Kurosawa *et al.* 2013). En un estudio realizado por Bauwens *et al.* (2011) se describió la susceptibilidad diferencial de las células endoteliales para Stx1 y Stx2, pero estas diferencias no han podido ser completamente explicadas. Es probable que la afinidad por el receptor, la estabilidad del complejo holotoxina, y la actividad enzimática estén relacionadas con la toxicidad diferencial entre Stx1 y Stx2.

A lo largo de los años se han descrito diferentes subtipos de Stx (Marques *et al.* 1987; Ganon *et al.* 1990; Ito *et al.* 1990; Tyler *et al.* 1991; Melton-Celsa *et al.* 1996; Pierard *et al.* 1998; Zhang *et al.* 2002; Leung *et al.* 2003; Bürk *et al.* 2003). A partir del año 2012 se propuso una serie de modificaciones en la nomenclatura basado en las secuencias de las toxinas y se

desarrolló una metodología específica para la detección y subtipificación de los distintos genes de *stx*. De acuerdo a estas modificaciones se estableció la siguiente designación para los subtipos y genes de toxina de ambos tipos de Stx: Stx1a (*stx1a*), Stx1c (*stx1c*), Stx1d (*stx1d*), Stx2a (*stx2a*), Stx2b (*stx2b*), Stx2c (*stx2c*), Stx2d (*stx2d*), Stx2e (*stx2e*), Stx2f (*stx2f*), y Stx2g (*stx2g*) (Scheutz *et al.* 2012). Más recientemente, siguiendo con la misma taxonomía, se han identificado nuevos subtipos, Stx1e (Probert *et al.* 2014), Stx2h (Bai *et al.* 2018), Stx2i (Lacher *et al.* 2016), Stx2j (Gill *et al.* 2022), Stx2k (Meng *et al.* 2014), Stx2l (Yang *et al.* 2022), Stx2m (Bai *et al.* 2021) y Stx2o (Gill *et al.* 2022).

Algunos subtipos como Stx2a, Stx2c o Stx2d presentan un mayor grado de virulencia y se han asociado con casos clínicos severos, como DS y SUH. Mientras que otros, de menor virulencia como Stx1a, Stx1c, Stx2b y Stx2f se han asociado a casos menos severos de diarrea (Scheutz *et al.* 2014). Las variantes Stx1d, Stx2e, y Stx2g no están relacionadas con enfermedad humana, sin embargo, se han identificado en cepas aisladas del reservorio animal. Stx2e es la toxina asociada a la enfermedad del edema en porcinos, mientras que Stx2g se detectó en cepas aisladas de ganado bovino (Persad y LeJeune, 2014). Dos de los nuevos subtipos han sido identificados en muestras clínicas, lo que indica que podrían tener cierto potencial patogénico en humanos (Gill *et al.* 2022).

La acción de la toxina Shiga es fundamental para el desarrollo de la enfermedad, pero existen además una gran variedad de factores de virulencia adicionales, como distintas adhesinas, toxinas y proteasas, que contribuyen a la severidad de la infección por STEC.

2.2. Isla de patogenicidad LEE: gen *eae* - Intimina y factores de adherencia intestinal

Una característica fundamental de las cepas STEC es la capacidad para colonizar el epitelio intestinal del huésped. Un subgrupo de STEC posee la isla de patogenicidad “LEE” (del inglés *locus of enterocyte effacement*), que se encuentra inserta en el cromosoma de la bacteria. En esta región está presente el gen *eae* que codifica la proteína intimina. Este factor de virulencia interviene en la primera etapa de la patogénesis y es responsable de la lesión de adhesión y barrido de las microvellosidades intestinales del inglés “*attaching-and-effacing*” (A/E). La lesión comienza con la unión íntima de la bacteria al enterocito y continúa con la formación de estructuras de tipo pedestal con la acumulación de los filamentos de actina en la zona de unión íntima entre la bacteria y la célula huésped. La alteración histopatológica y la pérdida de la

capacidad absorptiva de las microvellosidades contribuyen a la sintomatología de la diarrea (Nataro y Kaper, 1998).

La región LEE codifica además reguladores transcripcionales, chaperonas, el sistema de secreción de tipo III (TTSS) que transporta las proteínas efectoras hacia la célula huésped, translocadores, y otras proteínas incluyendo al receptor translocado de la intimina denominado Tir (del inglés, “*translocated intimin receptor*”) (Garmendia *et al.* 2005).

La intimina es una proteína con una estructura dimérica ubicada en la membrana externa de las bacterias codificada por el gen *eae*. Cada uno de los monómeros está compuesto por una región periplásmica; una región de estructura ancha β cilíndrica anclada en la membrana externa de la bacteria (región N-terminal) y una última región que se proyecta fuera de la superficie bacteriana (C-terminal), la cual sería la responsable de la unión con el receptor. El análisis de la secuencia nucleotídica del gen de la intimina mostró un patrón general de secuencia, con una gran homología en los dos tercios del extremo 5' correspondientes a la región N-terminal y con un grado significativo de variabilidad en el último tercio del extremo 3' correspondiente a los últimos 280 aminoácidos de la región C-terminal de la proteína. Esta zona de marcada heterogeneidad representa la superficie expuesta donde ocurre la unión de la proteína intimina con su receptor Tir en la superficie del enterocito. De acuerdo a esto, es que los diferentes tipos de intimina presentan especificidad o la habilidad de colonizar distintas regiones del epitelio intestinal. Utilizando un modelo animal, Tzipori *et al.* (1995) observaron que, mientras la intimina α específica de las cepas EPEC causa la lesión en el intestino delgado, la intimina γ específica de algunos serotipos de EHEC como O157:H7 y O145:NM[H28], causa la lesión en el intestino grueso. Además del papel fundamental en la formación de la lesión A/E, la intimina puede desempeñar un papel en el tropismo tisular. Se sabe que las intiminas pueden unirse a integrinas β y quizás a algunos receptores del huésped, lo que podría generar diferentes patrones de colonización en distintas regiones específicas del epitelio intestinal. Hasta el momento se han descrito 17 variantes diferentes del gen *eae* $\alpha 1$, $\alpha 2$, β , γ , θ , ε , ζ , κ , η , ι , λ , μ (R), μ (B), ν (R), ν (B), ξ (R) y ξ (B). La secuencia de la proteína intimina es altamente conservada dentro de un mismo serotipo, pero no necesariamente dentro del mismo serogrupo o clase de patógeno. Por ejemplo, en diferentes cepas de *E. coli* O145:NM[H28] la secuencia del gen *eae* es idéntica (*eae*- γ), mientras que es distinta (*eae*- β) en cepas de *E. coli* O145:H25 (Zhang, Köhler *et al.* 2002; Ramachandran *et al.* 2003; Blanco *et al.* 2004). Se considera que ciertos serotipos de STEC-LEE positivos (O157:H7, O26:H11, O111:NM y O145:NM) son muy virulentos y están

asociados a brotes y casos esporádicos de enfermedad severa en humanos (Paton y Paton,1998; Heiman *et al.* 2015; Vishram *et al.* 2021).

2.3. Adhesinas - Lpf

Si bien se han propuesto varios factores de colonización, el rol que desempeña cada uno de estos no está completamente determinado. Sin embargo, respecto de aquellos que controlan la expresión de fimbrias, podemos decir que la fimbria Lpf (del inglés, “*long polar fimbriae*”), es considerada un factor de adherencia de las cepas EHEC O157:H7 y está relacionada con la colonización intestinal. Unos 14 loci genéticos distintos podrían codificar esta fimbria. En *E. coli* K-12 están descriptos diez loci y otros cuatro exclusivos en EHEC O157 (Farfan *et al.* 2011). Dos de estos loci Lpf que se encuentran en EHEC O157, resultan no ser idénticos y son homólogos a la fimbria Lpf de *Salmonella* entérica serovar Typhimurium (STP) que codifica para una estructura fimbrial regulada (Torres *et al.* 2002). Uno de los dos locus de aproximadamente 5,9 kb, se localiza en una isla de patogenicidad específica de O157 (O-isla 141 u OI141), insertada en la región intergénica yhjX-yhjW (en relación con el cromosoma *E. coli* K-12). Este operón denominado *lpf1* contiene 6 genes (*lpfABCC'DE*) similares a los genes presentes en *Salmonella* (*lpfABCDE*). En estudios realizados por Torres *et al.* (2002, 2004), se demostró que una mutación en el gen *lpfA1* que codifica para la subunidad principal fimbrial en cepas STEC O157:H7, provocaba un patrón difuso con reducción de la adherencia en células epiteliales intestinales. El segundo locus *lpf2*, es de aproximadamente 6,8 kb y está inserto en la región intergénica glmS-pstS en la isla O-I154 (Torres *et al.* 2004). A diferencia de *lpf1* (*lpfABCC'DE*), *lpf2* contiene 5 genes (*lpfABCDD'*), posee una sola copia del gen *lpfC*, carece del homólogo *lpfE* y en su lugar está presente el gen *lpfD*. Aún no está esclarecido por completo el fenotipo de adherencia in vitro conferido por este locus, sin embargo, se ha relacionado con la adherencia a las células epiteliales y se cree que su expresión en otras cepas patógenas de *E. coli* sería importante para el desarrollo de diarrea severa (Giron *et al.* 2001). Otros genes homólogos de *lpf* se han descripto y estudiado en relación a la adherencia de cepas STEC no-O157. El análisis por secuenciación demostró que la cepa STEC O113:H21 posee un operón *lpf* (también denominado *lpfO113*) que contiene 4 genes (genes *lpfABCD*) en la misma localización cromosómica que el locus *lpf2* en cepas STP/O157:H7 (O-I154) (Doughty *et al.* 2002).

Los genes *lpfA1* y *lpfA2* son muy frecuentes entre las cepas STEC LEE-positivas asociadas con enfermedad severa. El gen *lpfA1* se puede agrupar en cinco subtipos (*lpfA1-1*, *lpfA1-2*, *lpfA1-3*, *lpfA1-4* y *lpfA1-5*), y *lpfA2* en tres subtipos (*lpfA2-1*, *lpfA2-2* y *lpfA2-3*). Los diferentes subtipos de *lpfA1* y *lpfA2* están relacionados con variantes específicas de intimina. El subtipo *lpfA1-1* está relacionado con $\alpha 1$, δ/κ , $\eta 1$, $\eta 2$, λ , μ y π ; *lpfA1-2* está asociado con $\beta 1$, $\gamma 2/\Theta$, $\epsilon 1$, y $\epsilon 2$; *lpfA1-3* y *lpfA1-4* sólo se encontraron en cepas de los serotipos O157:H7 y O55:H7 con intimina $\gamma 1$ (Farfan *et al.* 2011). Además, en estudios previos Torres *et al.* (2009) confirmaron la presencia del gen *lpfA1-5* en cepas STEC O145:NM y EPEC O145:H28 con intimina $\gamma 1$ y relacionaron a *lpfA2-1* con las variantes de intimina $\beta 1$, $\theta 1$, ϵ , σ y $\gamma 1$.

2.4. Enterohemolisina

La patogénesis de STEC también está relacionada con la capacidad de producir enterohemolisina de EHEC (EHEC-Hly), codificada en el gen *exhA* en el megaplásmido de 90-kb (Schmidt *et al.* 1995). En el año 1989 este nuevo tipo de hemolisina fue descrito en cepas STEC de distintos serotipos incluyendo el O157:H7 (Beutin *et al.* 1989). Se determinó que existía una estrecha relación entre la producción de Stx y EHEC-Hly, ya que el 89% de las cepas Stx positivas expresaban EHEC-Hly. Schmidt *et al.* (1995) demostraron que el megaplásmido pO157 es el responsable de portar la información genética del fenotipo enterohemolítico. El análisis de la secuencia nucleotídica del plásmido recombinante pE40 que portaba un fragmento de 12 Kb del pO157, reveló la presencia de dos marcos de lectura (ORFs) responsables del fenotipo enterohemolítico y una gran homología con la secuencia de α -hemolisina de *E. coli* y con otras proteínas de la familia de las citolisinas formadoras de poros RTX (del inglés, repeats in toxin). Estas hemolisinas (citolisinas RTX) tienen actividad específica sobre diferentes células como linfocitos, granulocitos, eritrocitos y células de los túbulos renales y son consideradas importantes factores de virulencia de bacterias que causan enfermedades extraintestinales. Se demostró que al igual que las proteínas RTX, la EHEC-Hly tenía una alta capacidad de formación de poros de 2,6 nm en membranas artificiales y en eritrocitos. La primera evidencia de que EHEC-Hly estaba asociada a la virulencia de STEC fue a partir de un estudio de la respuesta inmune en pacientes con SUH. La detección de anticuerpos de tipo IgG anti-EHEC-Hly, demostró que la proteína se expresaba durante el curso de la infección (Schmidt, 1995). Las proteínas RTX pueden afectar el normal funcionamiento de las células y estimular la producción de interleuquina 1 β . En las infecciones por STEC se observó que la liberación de interleuquina 1 β podría aumentar la capacidad citotóxica de Stx

sobre las células endoteliales. En el caso que la infección sea por el serotipo O157:H7, probablemente la interleuquina 1 β aumente por la presencia del LPSO157 y por la acción estimulante que tiene la EHEC-Hly. Por lo tanto, la toxina Shiga junto con la enterohemolisina actuaría de manera sinérgica en la patogenicidad asociada a la infección por STEC.

3. Patogénesis

Durante la infección por STEC, estos patógenos alcanzan el intestino y se adhieren a los enterocitos sin invadirlos. La adherencia bacteriana está mediada por fimbrias y causa el alargamiento de las microvellosidades. Luego, se produce la translocación del receptor Tir, que se integra a la membrana plasmática del enterocito adoptando forma de pelo enrollado (Hartland *et al.* 1999). El dominio central extracelular de Tir actúa como receptor de la proteína intimina que producen las cepas LEE-positivas (Frankel *et al.* 2001). Simultáneamente, el receptor Tir interactúa a través de sus dominios intracelulares N- y C-terminal, con diversas proteínas del citoesqueleto para la formación del pedestal (Goosney *et al.* 2001). Además, se produce la desorganización de las microvellosidades con producción de la lesión A/E y acumulación de filamentos de actina formando un pedestal por debajo de la unión de la bacteria con la célula epitelial. Esto reduce notablemente la superficie absorptiva, desencadenando diarrea sin sangre. La toxina Shiga liberada en el lumen intestinal, se une mediante el pentámero de la subunidad B, a la célula epitelial del intestino por interacción con el receptor Gb3 que se encuentra en la membrana apical. La toxina es luego internalizada en una vesícula endocítica, y transportada al aparato de Golgi, donde se libera el fragmento A1, el cual actúa sobre la subunidad ribosomal 60S, inhibiendo la síntesis proteica y provocando la muerte celular. La toxina puede también ser translocada desde la membrana apical a la superficie baso lateral, con inducción de interleuquina-8 (IL-8), lo cual contribuiría a la acumulación de leucocitos en la pared intestinal. Además, se produce daño en las células endoteliales de los vasos sanguíneos por el mismo mecanismo de unión de la toxina a su receptor, endocitosis y acción sobre ribosomas, provocando muerte celular y por consiguiente diarrea sanguinolenta. La toxina Stx que entra a la circulación sanguínea, podría ser transportada a distintos órganos blanco cuyas células endoteliales poseen el receptor Gb3. El LPS bacteriano y las citoquinas del huésped aumentan la sensibilidad a la Stx incrementando la disponibilidad de dichos receptores. En el riñón se encuentran altos niveles de Gb3, particularmente en la región cortical, donde se observan las principales lesiones en los pacientes con SUH. Las lesiones histopatológicas a nivel del glomérulo ocurren por el hinchazón y desprendimiento de las células endoteliales de los vasos

sanguíneos (Jandhyala *et al.* 2012). Simultáneamente, se produce depósito de fibrina y de plaquetas en la microvasculatura renal, que eclosionan los capilares y se reduce el flujo sanguíneo, provocando la ruptura de los glóbulos rojos y la consecuente insuficiencia renal. También se observan lesiones trombóticas, particularmente en la microvasculatura del intestino, cerebro y páncreas.

4. Historia natural de la enfermedad y manifestaciones clínicas

El período de incubación promedio de la infección por STEC es de 3 días y puede oscilar entre 2 y 5 días. Al inicio, el cuadro clínico puede manifestarse con vómitos, fiebre baja o ausente, dolores abdominales severos, diarrea sin sangre y evidencia de edema en la mucosa colónica. Seguidamente puede desarrollarse diarrea sanguinolenta o colitis hemorrágica durante 4 a 6 días. Si bien la mayoría de los casos de diarrea por STEC se auto limitan, alrededor del 5 al 10 % de los niños infectados evolucionan a SUH.

Originalmente, el SUH fue definido como una entidad clínica de comienzo agudo con anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia e insuficiencia renal (Gianantonio *et al.* 1973; Goldstein *et al.* 1979). Esta enfermedad sindrómica puede presentar dos formas, una típica de etiología infecciosa, precedida generalmente por un período prodrómico con diarrea de características endemo-epidémicas (llamada D+), y otra forma atípica (D-) desencadenada por varios factores, como los medicamentos, los trasplantes de órganos, el post parto, etc. El SUH de etiología infecciosa puede ser la continuación o no de un episodio de diarrea con o sin sangre, en pacientes previamente sanos. A partir de estudios poblacionales realizados por Siegler (1994), se vio que aproximadamente el 90% de los casos de SUH están precedidos por diarrea. Los niños constituyen el grupo más vulnerable, con mayor incidencia de infecciones sintomáticas por STEC y alto riesgo de evolución a SUH (Mead *et al.* 1998). Las manifestaciones clínicas que más comúnmente se observan son: palidez, petequias, hematomas, oliguria, edema, hipertensión arterial, y cambios neurológicos como letargia o convulsiones (Comité de Nefrología, 1995). Se han propuesto un cambio en la definición de SUH, incluyendo hemólisis en lugar de anemia, consumo de plaquetas en lugar de trombocitopenia y signos de daño renal en lugar de la insuficiencia renal (Ardissino *et al.* 2014).

Las formas más graves de SUH se caracterizan por tener un período prodrómico más corto con diarrea severa y pueden presentarse con un elevado recuento de leucocitos, anuria, y convulsiones. No existe un tratamiento específico para esta enfermedad sindrómica y los

pacientes reciben atención para controlar el desequilibrio del agua, la anemia, la hipertensión y la insuficiencia renal. Aproximadamente, la mitad de los pacientes con SUH requiere diálisis peritoneal y el 75% requiere transfusión sanguínea. Alrededor del 1 al 2% de los pacientes fallece durante la fase aguda de la enfermedad (Mele *et al.* 2014) y casi el 30% desarrollan a largo plazo daño renal, requiriendo en algunos casos el trasplante del órgano (Spinale *et al.* 2013).

Como ya se ha mencionado, hasta el momento no existe una terapia específica para el tratamiento de las infecciones por STEC. Si bien el uso de antibióticos no está indicado, muchos pacientes reciben tratamiento antimicrobiano con anterioridad al diagnóstico definitivo. En general *E. coli* O157 es susceptible a los agentes antimicrobianos comúnmente usados. Sin embargo, hay algunos estudios clínicos que relacionan el uso de antibióticos con una mayor duración de la diarrea, mayor riesgo de evolución a SUH e incluso con una alta mortalidad (Panos *et al.* 2006; Paton y Paton, 1998). Además del uso de antibióticos, los agentes que reducen la motilidad intestinal, narcóticos y antiinflamatorios no esteroideos, están contraindicados en pacientes con infección aguda. Sólo se recomienda en pacientes críticos con SUH, el restablecimiento del equilibrio interno con la administración de líquidos intravenosos, además del control de los órganos posiblemente afectados. La lesión vascular que conduce a SUH es probable que tenga un mejor pronóstico en tanto los pacientes infectados busquen lo más tempranamente posible, la atención primaria para la diarrea (Tarr *et al.* 2005).

Entre los factores de riesgo de evolución a SUH se incluyen: edades extremas de la vida, pertenecer al sexo femenino (Rowe, 1991), presentar leucocitosis, fiebre, período prodrómico corto (Buteau *et al.* 2000), y en algunos casos diarrea sanguinolenta. El genotipo y subtipo de la toxina Shiga también es un factor importante en la evolución a SUH (Ostroff *et al.* 1989).

En los últimos años, el diagnóstico precoz de la enfermedad y el mejor manejo de la insuficiencia renal aguda y de la anemia disminuyó la letalidad durante el período agudo, siendo en la actualidad del 3 al 5%. Sin embargo, la complejidad del tratamiento y el posterior seguimiento de los pacientes con esta patología conlleva a grandes costos para el sistema de salud, por lo que todavía representa un fuerte impacto económico en los países en desarrollo.

5. Reservorio y vías de transmisión

Los mamíferos de sangre caliente, entre ellos los rumiantes, fueron descritos como el reservorio de STEC. El ganado bovino es el principal reservorio y distintos estudios de portación y prevalencia de STEC lo han confirmado a lo largo del tiempo (Meichtri *et al.* 2004; Masana *et al.* 2010; Cap *et al.* 2019). Tanto el ganado de carne como el ganado lechero son portadores de STEC, inclusive cepas O157:H7. La bacteria no es patógena para el ganado, la colonización es de menos de 2 meses de duración y la portación fecal es más frecuente en el ganado joven (2 a 24 meses) que en el ganado adulto (Parma *et al.* 2000).

La principal vía de transmisión de STEC son los alimentos contaminados, en general se trata de productos cárnicos crudos o insuficientemente cocidos, como ser carne picada, hamburguesas, embutidos fermentados, morcilla, leche no pasteurizada, yogur, quesos, mayonesa, papas, lechuga, brotes de soja y alfalfa, jugos de manzana no pasteurizados, y agua, entre otros (Caprioli *et al.* 2005; Oteiza *et al.* 2006; Rivas *et al.* 2014).

La contaminación de los alimentos se debe principalmente al contacto directo o indirecto con heces de animales. Durante la faena y debido a prácticas inadecuadas puede ocurrir la contaminación de la superficie de la res por heces o por el contenido intestinal del animal. En el procesamiento de la carne se puede transferir la contaminación bacteriana al interior de la masa cárnica, donde los microorganismos podrían resistir una cocción insuficiente y mantenerse de esta manera viable. En la Argentina, se detectó un 8,4% de STEC no-O157 en hamburguesas congeladas (Gómez *et al.* 2002) y un 3,9% de STEC O157 en productos cárnicos a nivel de boca de expendio (Chinen *et al.* 2001). Más recientemente en un relevamiento que se llevó a cabo en supermercados, el 22% de las muestras resultaron positivas, siendo un 11% O157:H7/NM y el resto no-O157 (Llorente *et al.* 2014). En un estudio retrospectivo se encontró STEC O157:H7 y O157 no toxigénico en diferentes matrices alimentarias (Jure *et al.* 2015). Las cepas STEC son resistentes a los ácidos y pueden sobrevivir en alimentos fermentados y vegetales frescos.

En cuanto al agua, la contaminación de esta puede ser por la descarga de materia fecal, tanto en aguas de recreación que se encuentran inadecuadamente cloradas, como así también en el agua destinada al consumo sin el tratamiento adecuado correspondiente (Meyer *et al.* 2005). Además, se ha descrito que el agua de riego de suelos productores de alimentos constituye un riesgo potencial de transmisión (Tanaro *et al.* 2010 y 2012). La contaminación de los cultivos puede deberse al uso de materia fecal de ganado como fertilizante o al uso de aguas cloacales, durante

la cosecha o procesamiento de los mismos. Durante el año 2006, se notificaron casos clínicos por infección de STEC O157:H7 en 21 Estados de EE. UU., los cuales estuvieron asociados al consumo de espinaca fresca (CDC, 2006). En ese mismo año, en un estudio piloto realizado en nuestro país se detectó en ensaladas listas para el consumo *E. coli* del mismo serotipo. (Leotta *et al.* 2006).

La transmisión persona a persona por la vía fecal-oral, el contacto directo con animales y la contaminación cruzada durante la preparación de los alimentos son importantes y muy bien documentadas vías de transmisión (Rivas *et al.* 2006b).

Se sabe que la dosis infectiva es muy baja, lo que implica un alto riesgo de infección en centros de cuidado diario como jardines maternos y de infantes, asilos de ancianos y cárceles donde los hábitos de higiene pueden verse fácilmente deteriorados. Además, se debe enfatizar que aquellos individuos que están recuperándose de un episodio diarreico, también pueden contribuir al riesgo de transmisión, pues pueden seguir eliminando gérmenes. El personal y los niños con diarrea, que asisten a esas Instituciones no deben reincorporarse a esos centros hasta la resolución de los síntomas, tengan o no identificado el patógeno. Además, dado que la excreción de STEC puede ser intermitente y prolongada (Swerdlow *et al.* 1997), no debe permitirse el ingreso a la Institución a todo niño o adulto con infección por STEC, sintomático o asintomático, hasta determinar la finalización de la excreción mediante la obtención de dos coprocultivos negativos sucesivos con intervalos de 48 horas entre ellos (Miliwebsky *et al.* 2007).

6. Vigilancia epidemiológica de las infecciones por STEC

Teniendo en cuenta el número y severidad de los casos de SUH que se producen anualmente en la Argentina, el Ministerio de Salud estableció en abril del 2000 (Resolución N.º 346/00) la notificación obligatoria al Sistema Nacional de Vigilancia de la Salud (SNVS) con modalidad inmediata e individualizada.

Además, con el fin de fortalecer el Sistema de Vigilancia se implementó la estrategia de vigilancia basada en Unidades Centinela (UC). La vigilancia epidemiológica a través de UC permite determinar tendencias, focalizar actividades de vigilancia y definir intervenciones preventivas. Si bien no tiene representatividad poblacional, es una estrategia que alerta de forma especial sobre situaciones de riesgo, y cumple una función clave en la toma de decisiones. Las

UC en lugar de seleccionar un área geográfica con una población definida, seleccionan una unidad de atención de salud sin población definida, de ahí la limitante que se presenta cuando se desea comparar la magnitud de un problema estudiado con otras sub-poblaciones o áreas donde la información se recolecta a través de diferentes estrategias. Este sistema de vigilancia está integrado por tres componentes: epidemiológico, clínico y laboratorio. Todas las partes cumplen funciones específicas con relación a la recolección, el análisis y a la difusión de la información. Las Unidades Centinela conformaron un Subsistema del SNVS.

Como todo subsistema, debió responder a las prioridades identificadas como problemas relevantes y debió cumplir con los atributos generales del sistema de vigilancia. Hasta el año 2018 se habían conformado 25 UC para el estudio de los casos de SUH en 16 jurisdicciones del país.

Hacia fines del año 2018 se comenzó a trabajar con el Sistema Integrado de Información Sanitaria Argentina del SNVS 2.0. A través de este sistema cada institución hospitalaria que notifica sus resultados al SISA constituye una Unidad Centinela en si misma al ser integrado en esta plataforma toda la información referente al caso originada de las áreas clínica, laboratorio y de epidemiología.

Así mismo, la enfermedad diarreica aguda es de notificación obligatoria. La notificación clínica y los principales patógenos bacterianos que se identifican son informados por los laboratorios también a la plataforma SISA – del SNVS 2.0.

La vigilancia epidemiológica de patógenos bacterianos de transmisión alimentaria es realizada principalmente por los laboratorios que integran la Red Nacional de Diarreas que notifican los resultados al SISA. El objetivo principal de esta Red es promover la organización y la integración de los laboratorios del área humana y de alimentos, para generar un sistema de trabajo multidisciplinario, bajo normas de gestión de calidad que garanticen un diagnóstico microbiológico confiable, oportuno y reproducible, para mejorar la atención del paciente, avanzar en la disminución de casos y la prevención de brotes. La Red está integrada por 4 Laboratorios de Referencia Nacional que funcionan en el Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas -ANLIS- “Dr. Carlos G. Malbran” y más de 500 laboratorios de distintos niveles de complejidad localizados en las diferentes regiones de Argentina (Manual de Procedimientos, 2019).

Otra estrategia es la vinculada a la vigilancia molecular realizada por los laboratorios que componen la Red PulseNet de América Latina y El Caribe. Esta Red realiza la caracterización molecular de bacterias asociadas a enfermedades de transmisión alimentaria (ETA) por electroforesis de campo pulsado (PFGE, del inglés “*pulsed-field gel electrophoresis*”) utilizando el protocolo propuesto por el Centro de Enfermedades Infecciosas (CDC) de Atlanta, EE.UU. (CDC, 2010). Esta metodología permite observar el polimorfismo genético existente en una población bacteriana, a través de diferencias obtenidas en los patrones de restricción del ADN genómico utilizando enzimas de corte poco frecuente. Para la subtipificación de STEC O157 y no-O157, se requiere el uso de enzimas de restricción como *XbaI* y *BlnI* (*AvrII*) que permiten la obtención de fragmentos de gran tamaño que pueden ser separados por PFGE (Ribot *et al.* 2006; CDC, 2010). La Red PulseNet tiene como objetivo comparar los patrones de PFGE obtenidos de aislamientos humanos, del reservorio animal, ambiental y de los alimentos, con los existentes en las Bases de Datos Nacionales (BDN) de los laboratorios que componen dicha Red. El análisis de los patrones en tiempo real permite monitorear los clones circulantes de STEC, detectar microorganismos emergentes, identificar la cepa asociada a un brote, así como también, detectar el vehículo de transmisión, para poder implementar medidas rápidas de intervención y de esta manera lograr limitar la ocurrencia de nuevos casos. Por otro lado, el aislamiento del agente etiológico con igual patrón de PFGE, en aquellos casos de ETA que ocurren simultáneamente en diferentes áreas geográficas, permite diferenciar casos de un brote difuso de casos esporádicos. Por lo tanto, la vigilancia molecular constituye una herramienta útil para identificar aquellos brotes que no pueden ser detectados por vínculos epidemiológicos (CDC, 1993 y 2006). Un ejemplo de ello fue lo ocurrido en el año 2011 con el brote asociado a EAEC-STE C del serotipo O104:H4, que afectó a varios países europeos, principalmente Alemania y también a Canadá y a EE. UU. La aparición de un nuevo patotipo desencadenó, a través de la vigilancia molecular, los mecanismos de alarma que rápidamente pudieron identificar el patógeno emergente causal del evento (Wadl *et al.* 2011).

En el marco de esta Red, el Servicio Fisiopatogenia como Laboratorio Nacional de Referencia (LNR) ha formado dos BDN con patrones *XbaI* PFGE de cepas STEC O157 y no-O157 aisladas de diferentes regiones de Argentina desde el año 1988 hasta la actualidad. Esto ha permitido realizar estudios de diversidad genética y relación clonal. En general las cepas estudiadas presentan una gran diversidad genética. Sin embargo, al comparar patrones prevalentes de cepas aisladas en la actualidad con aquellos preexistentes en la BDN, se observa que muchos de ellos fueron detectados con anterioridad asociados a enfermedad humana, alimentos y medio

ambiente. Estos estudios son relevantes dado que son capaces de identificar cepas, algunas con características especiales como los clones hipervirulentos (Pianciola *et al.* 2014), capaces de sobrevivir, persistir a través del tiempo en diferentes nichos y diseminarse en diferentes reservorios aumentando la probabilidad de transmisión en la población humana.

7. Epidemiología de las infecciones por STEC en Argentina

En Argentina, donde el SUH es endémico, se reportan aproximadamente 400 casos al año. En el período comprendido entre los años 2010-2015 la media de la tasa anual estimada resultó ser de 8,4 casos por cada 100,000 niños menores de cinco años de edad, con un porcentaje de letalidad que osciló entre 2 y 5%. Durante el año 2015 se notificaron 337 casos de SUH de los cuales 190/257 (73,9%) fueron confirmados y asociados a la infección por STEC por el LNR. (BIV.2016: n296-se05-11022016). Durante el 2021, la tasa anual estimada de SUH reportada por el sistema de salud pública durante parte de la pandemia de SARS-covid-19 fue de 6 casos por cada 100000 niños menores a 5 años. (BIV .2022: n-630-se-48-2022). Durante los últimos años se estimó que aproximadamente O157:H7 y O145:NM se asociaron en un 69,3% y 23,3% respectivamente, con casos de SUH (Carbonari *et al.* 2022).

8. *Escherichia coli* productor de toxina Shiga O145

Uno de los primeros serogrupos no-O157 que Karmali *et al.* (1985) aislaron de pacientes con SUH fue el O145:NM. Años después se propuso la clasificación de los serotipos en cinco seropatotipos con el fin de agrupar a las cepas STEC según su potencial patogénico de acuerdo con: la incidencia de los distintos serotipos en enfermedad humana, la asociación con la ocurrencia de brotes y enfermedad severa en el hombre (Karmali *et al.* 2003). Dentro de esta clasificación, STEC O145 fue considerado parte del seropatotipo B, por tener una moderada incidencia mundial, porque es un agente causal poco común en brotes y por estar asociado a casos de enfermedad severa en humanos.

Así mismo, a nivel mundial las cepas STEC O145, incluyendo los serotipos O145:NM, O145:HNT, O145:H8, O145:H16, O145:H25, O145:H28 y O145:H34, están asociados a diarrea y a casos severos como diarrea sanguinolenta, colitis hemorrágica y SUH (Sonntag *et al.* 2004; Blanco *et al.* 2004; Wadl *et al.* 2011).

En un estudio caso-control realizado en Argentina, en el cual se incluyeron niños con SUH, diarrea sanguinolenta y no sanguinolenta, se pudo establecer la siguiente frecuencia de detección de serotipos: O157:H7 (59,2%), O145:NM (12,6%), O26:H11 (5,8%), O113:H21 (3,9%), O174:H21 (2,9%) y otros (15,6%) (Rivas et al. 2006b).

En la actualidad en Argentina, O145:NM continúa siendo el serotipo que se detecta más frecuentemente luego de STEC O157:H7, tanto en casos esporádicos de enfermedad severa como asociado a brotes familiares e institucionales. (BIV .2022: n-630-se-48-2022; Carbonari et al. 2022).

Las cepas de *E. coli* O145 no presentan características bioquímicas distintivas de otras cepas de *E. coli* por lo que su identificación resulta muy laboriosa. Pueden fermentar el sorbitol y presentan actividad β -glucuronidasa. Por esta razón es necesario el uso de técnicas de biología molecular para su identificación, tanto para detectar la toxina Stx o genes asociados al lipopolisacárido O145, como por ejemplo los descriptos por Fratamico et al. (2009). Si bien la mayoría de las cepas son no móviles, algunas pueden expresar el antígeno flagelar. Además de la capacidad de producir Stx1 o Stx2, presentan el gen *eae* y *ehxA* (Sonntag et al. 2004), lo que explica su potencial patogénico.

En general las cepas STEC O145 son susceptibles a la mayoría de los antibióticos, pero se han detectado casos de cepas multirresistentes. Si bien el tratamiento antimicrobiano para las infecciones por STEC no está recomendado, la identificación de la resistencia antimicrobiana puede aportar información importante en los estudios epidemiológicos (Folster et al. 2011).

El desarrollo y la presentación de este trabajo de Tesis se fundamenta en la necesidad de estudiar las características fenotípicas y perfiles de virulencia de las cepas de *E. coli* O145 aisladas de los casos clínicos y del reservorio animal durante el período comprendido entre los años 1998 y 2012. El conocimiento de la epidemiología de este patógeno de gran virulencia, frecuentemente detectado en casos severos en Argentina permitirá tomar acciones para prevenir y/o controlar tanto los casos severos esporádicos, como brotes familiares e institucionales.

II. OBJETIVOS

1. Objetivos generales

Caracterizar feno-genotípicamente cepas de *Escherichia coli* O145 productor de toxina Shiga de origen clínico y del reservorio animal, y estudiar su asociación con la severidad de las manifestaciones clínicas de casos ocurridos durante el período comprendido entre los años 1998 y 2012.

2. Objetivos específicos

- a. Confirmar las características fenotípicas de las cepas de *E. coli* O145 en aquellas que presentan o no atipias.
- b. Determinar los perfiles de resistencia a los antimicrobianos.
- c. Confirmar las características genotípicas de las cepas de *E. coli* O145 en aquellas que presentan o no atipias tales como la movilidad o inmovilidad (expresión del gen *fliC*) y en cepas no enterohemolíticas (gen *ehxA*).
- d. Subtipificar las cepas O145 determinando factores de adherencia putativos adicionales como *lpfA1-5* y *lpfO113* y las variantes del gen *eae*.
- e. Estudiar las cepas STEC O145 mediante macrorestricción y análisis de los patrones obtenidos por electroforesis en gel de campo pulsado (*pulsed-field gel electrophoresis* PFGE) para establecer la relación clonal entre ellos.
- f. Establecer la asociación entre los perfiles de virulencia con las manifestaciones clínicas.
- g. Analizar los casos que presentan periodos prolongados de excreción del patógeno.

III. MATERIALES Y METODOS

1. *Cepas bacterianas*

Todas las cepas de STEC O145 estudiadas en este trabajo pertenecen a la Colección de Cultivos Bacterianos del Servicio Fisiopatogenia. Se incluyeron 286 cepas aisladas, entre los años 1998 y 2012. Del total de cepas, 282 fueron aisladas de muestras clínicas correspondientes a 272 casos, de algunos pacientes se obtuvo más de un aislamiento debido a la excreción prolongada del microorganismo. Los especímenes clínicos (materia fecal y/o aislamiento) fueron tomados de casos de SUH y de diarreas identificados a través del Sistema Nacional de Vigilancia y remitidos al LNR para su estudio, identificación, aislamiento, y caracterización de cepas STEC. Se incluyeron, además, 4 cepas aisladas de muestras de materia fecal y carcasa de ganado bovino sano, obtenidas durante la faena, en el marco de diferentes programas de investigación llevados a cabo en el mismo período. Las 282 cepas O145 de origen humano fueron aisladas de 272 casos clínicos, que fueron diagnosticados de la siguiente forma: SUH (n=154), DS (n=47), D (n=45), contactos asintomáticos de casos de SUH (n=16) y pacientes sin diagnóstico clínico conocido (n=10). Todas las cepas incluidas en este estudio ya estaban caracterizadas en cuanto a sus propiedades fenotípicas tales como la fermentación del sorbitol y la actividad de β -glucuronidasa y en cuanto a sus propiedades genotípicas tales como la detección de los genes de *eae* y *ehxA* y la subtipificación de las Stx. Los ensayos de esta investigación se realizaron a partir del cultivo bacteriano puro obtenido de la conservación de las cepas en ultra freezer a -80°C. Para ello, una alícuota de la conservación se sembró en forma directa en placa de agar MacConkey con sorbitol (SMAC, BD-Difco™, Le Pont de Claix, Francia) y se incubó a 37°C durante 19-20 h.

2. *Caracterización fenotípica*

2.1. Serotipificación

Todas las cepas se ensayaron con el antisuero anti-antígeno somático “O” del lipopolisacárido O145 (anti-O145) producido por el Instituto Nacional de Producción de Biológicos del ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán", siguiendo la técnica de aglutinación en lámina. Para completar la serotipificación, se realizó la detección del antígeno flagelar “H” de las cepas móviles con los antisueros anti-H del kit Denka Seiken (H25, H28, H34 y H40), siguiendo la técnica de aglutinación en tubo (Ørskov y Ørskov, 1984). Este ensayo requirió previamente la

estimulación de la expresión flagelar mediante la realización de sucesivos pasajes en el medio de Craigie (Craigie, 1931).

2.2. Confirmación de los resultados atípicos en las pruebas de fermentación del sorbitol, actividad β -D-glucuronidasa y de hemólisis por EHEC-Hly

Se realizó la confirmación de características atípicas (no fermentación del sorbitol, ausencia de actividad de β -D-glucuronidasa y de hemólisis por EHEC-Hly) en aquellas cepas que en ensayos previos ya se habían identificado. Se confirmó la ausencia de: a) fermentación del sorbitol en tubo utilizando la prueba de caldo Rojo Fenol (BBL™ Phenol Red Broth Base, Le Pont de Claix, Francia) con el agregado de D-sorbitol (1%) en 3 de 286 cepas; b) actividad β -D-glucuronidasa mediante el uso de discos Coli-Brit. (Laboratorios Britania, Buenos Aires, Argentina) embebidos en p-nitrofenil-glucuronido en 41 de 286 cepas; y c) la hemólisis por EHEC-Hly utilizando placas de agar sangre desfibrinada de oveja lavada (placa de prueba) y no lavada (placa control) (Beutin et al. 1989) en 7 de 286 cepas. Los cultivos en agar Trypticase de Soja (BD-Difco™, Le Pont de Claix, Francia) se sembraron simultáneamente en placas de prueba y de control. Luego de 3 h de incubación a 37°C, se realizó una primera lectura para descartar hemólisis debida a otra hemolisina y una segunda lectura a las 18 h de incubación para detectar la ausencia de actividad hemolítica debida a EHEC-Hly. Los aislamientos se consideran no productores de EHEC-Hly al no detectarse una fina hemólisis alrededor de la estría de siembra tanto en placas de prueba, como de control. Las cepas de *E. coli* E32511 (STEC O157:H7) y *E. coli* E2348/69 (EPEC O127:H6) fueron utilizadas como controles positivo y negativo del ensayo, respectivamente.

2.3. Susceptibilidad antimicrobiana

Todas las cepas fueron primeramente estudiadas utilizando la técnica de difusión con discos, siguiendo los métodos estandarizados propuestos y puntos de corte definidos por las normas CLSI (CLSI, 2008-2015). Se realizaron ensayos de susceptibilidad a amikacina, ampicilina, ciprofloxacina, cloranfenicol, gentamicina, ácido nalidíxico, norfloxacina, estreptomina, tetraciclina y trimetoprima-sulfametoxazol (BD BBL™, Ireland, USA - Oxoid™, Hampshire, England). A partir de estos resultados se estudiaron los perfiles de resistencia y se seleccionaron las cepas que presentaron resistencia a ampicilina, en las que se probó la presencia de actividad

de β -lactamasas y la actividad de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) utilizando el método de difusión de doble disco. Para ello se realizaron suspensiones en solución fisiológica de las cepas estudias y se llevaron a una turbidez de 0,5 en la escala de McFarland. Luego se procedió a hisopar con cada una de las suspensiones las superficies de placas de Müller-Hinton agar (BD-DifcoTM, Le Pont de Claix, Francia) y sobre ellas se colocaron los mono discos de antibióticos. Posterior a la incubación a 37°C durante 19-20 h, se procedió a la lectura de los halos de resistencia.

3. Caracterización genotípica

3.1. Extracción del ADN

Se prepararon extractos de ADN de cada una de las cepas para ser utilizados en todos los ensayos de PCR. Se tomó una colonia de la placa de cultivo y se resuspendió en 100 μ l de buffer Tris-EDTA (TE) 1X con 1% de Titrón X-100. La suspensión se calentó en bloque térmico a 100°C durante 10 minutos y luego se centrifugó a 10.000 rpm por 5 minutos.

3.2. Detección de los genes O145wzx2 y O145wzy2

La confirmación genotípica del antígeno somático O145 se realizó mediante la PCR descrita por Fratamico et al. (2009), utilizando los oligonucleótidos específicos que amplifican los fragmentos *wzx2* (antígeno-O de la flipasa) de 555 pb, y *wzy2* (antígeno-O de la polimerasa) de 310 pb. Los componentes de la mezcla de reacción, las cepas utilizadas como controles positivos y negativos, los ciclos de amplificación y las condiciones de la electroforesis para la detección del producto de amplificación se detallan en el Apéndice I. La PCR se realizó en un termociclador My Cycler (Bio-Rad, Laboratories, Hercules, CA, USA). Los productos de amplificación se diluyeron en buffer de siembra (6X) compuesto por Xilene cyanol (0,25% y glicerol en agua (30%) y se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 2% en buffer Tris Acético EDTA (TAE) 1X, durante 40 min a 80 vol. La visualización de los fragmentos de ADN en geles de agarosa se realizó de dos maneras distintas. Una utilizando una concentración de 0,5 μ l/ml de bromuro de etidio (BrEt) en la solución de agarosa y la otra realizando la siembra de los productos de amplificación en el gel de agarosa con el buffer de siembra con colorante GelRed en una concentración de 12,3X (EurBiophys J., 2014) en una proporción de 10 μ l de

amplicón y 10µl de la mezcla del buffer. La adquisición de la imagen se realizó con cámara digital fotográfica (Olympus Corporation, Japan) y la fotografía quedó registrada en la computadora utilizando el programa informático Doc-IT2000 (Bio-Rad).

3.3. Detección del *fliCH8* y *fliCH28*

Para la determinación del antígeno flagelar se utilizaron dos pares de oligonucleótidos específicos que amplifican fragmentos de 110 pb de los genes *fliCH8* y *fliCH28*, diseñados por Bugarel et al. (2010) y adaptados en este trabajo a dos PCRs de punto final. Los componentes de la mezcla de reacción, las cepas utilizadas como controles positivos y negativos, los ciclos de amplificación y las condiciones de la electroforesis para la detección del producto de amplificación de ambas PCRs se indican en el Apéndice I. El termociclador utilizado y como se realizó la adquisición de la imagen se detalla en el punto 3.2.

3.4. Detección del gen *ehxA*

Se ensayaron los extractos de ADN de aquellas cepas que previamente a este trabajo fueron caracterizadas como *ehxA* negativas (7/286). Se realizó la PCR descrita por Schmidt et al. (1995) utilizando los oligonucleótidos específicos que amplifican un fragmento de 1551 pb de la región del extremo 5' del gen *ehxA*. Además, para confirmar los resultados obtenidos, se realizó una PCR adicional descrita por Wang et al. (2002), que amplifica un fragmento de 534 pb. Los componentes de la mezcla de reacción, las cepas utilizadas como controles positivos y negativos, los ciclos de amplificación y condiciones de la electroforesis para la detección del producto de amplificación de la PCR se indican en el Apéndice I. El termociclador utilizado y como se realizó la adquisición de la imagen se detalla en el punto 3.2.

3.5. Detección de los genes *lpfA1-5* y *lpfO113*

Se realizaron dos PCRs utilizando los oligonucleótidos específicos que amplifican los siguientes fragmentos: I) *lpfA1-5* de 250pb (Torres et al. 2009) relacionado con la intimina y que se encuentra en la mayoría de las cepas O145; II) *lpfO113* de 573 pb (Doughty et al. 2002) que por tratarse de un gen homólogo al *lpf2* se propone como un factor accesorio de adherencia en

cepas STEC no-O157. Los componentes de la mezcla de reacción, las cepas utilizadas como controles positivos y negativos, los ciclos de amplificación y las condiciones de la electroforesis para la detección del producto de amplificación de ambas PCRs se indican en el Apéndice I. El termociclador utilizado y como se realizó la adquisición de la imagen se detalla en el punto 3.2.

4. Subtipificación

4.1. Detección de las variantes genotípicas del gen *eae*

La caracterización de las variantes genotípicas de la proteína intimina. $\alpha 1$, $\alpha 2$, β , γ , θ , ε , ζ , κ , η , ι , λ , μ , ν y ξ se realizó mediante el análisis de polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) según lo descrito por Ramachandran et al. (2003), luego de la restricción con las enzimas *RsaI*, y *AluI* del producto de amplificación obtenido por PCR utilizando los oligonucleótidos específicos que amplifican un fragmento de 840-880 pb de la región del gen *eae* correspondiente al extremo 3' de la secuencia de intimina. Los componentes de la mezcla de reacción, las cepas utilizadas como controles positivos y negativos, los ciclos de amplificación y las condiciones de la electroforesis para la detección del producto de amplificación se indican en el Apéndice I. El termociclador utilizado y como se realizó la adquisición de la imagen se detalla en el punto 3.2.

Para el RFLP se realizó la restricción de dos alícuotas de 10 μ l del producto de amplificación de 840-880 pb con 10 U de *RsaI* y de *AluI* (Promega, Corp.) respectivamente, durante 2 h a 37°C, en un volumen final de 20 μ l de mezcla de reacción por alícuota. Los fragmentos de restricción se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 2% en buffer TAE 1X utilizando GelRed como colorante del ADN. Según el análisis del RFLP se determinaron las variantes genotípicas de intimina.

4.2. Electroforesis en gel de campo pulsado

Con el fin de establecer la relación clonal de las cepas, el genoma de cada una de ellas fue extraído y sometido a una macrorestricción con enzimas de corte poco frecuente. Los fragmentos así obtenidos se separaron en gel por electroforesis de campo pulsado (PFGE) utilizando los protocolos de 24 h de la red PulseNet, estandarizados por el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) de Estados Unidos para cepas O157 (Ribot et al. 2007)

y no-O157 (CDC, 2010). En este estudio, antes que el CDC estandarizara para la red PulseNet un protocolo específico para subtipificar cepas STEC no-O157, un total de 172 aislamientos fueron procesados en una primera instancia con el protocolo de PFGE estipulado para STEC O157. El resto fue procesado con el nuevo protocolo. Para que todos los patrones de fragmentos de restricción obtenidos por ambos protocolos fueran comparables para establecer la relación clonal, se seleccionaron cepas representantes de aquellas que tenían patrones únicos con el protocolo para O157 y se repitieron con el nuevo protocolo. De esta forma se pudieron analizar los diferentes patrones de todas las cepas con un mismo protocolo.

Una colonia de cada cepa se sembró en forma directa y confluyente en placas de Agar Trypticase Soja (BD-Difco™, Le Pont de Claix, Francia). Se incubaron las placas a 37°C por 14-18 h y luego se realizó una suspensión bacteriana en Buffer de Suspensión Celular (BSC). Se ajustó la concentración de las suspensiones celulares entre 0.40 - 0.45 utilizando un medidor de turbidez Microscan® Turbidity Meter (Dade Behring Inc. West Sacramento, USA). A 200 µl de cada una de las suspensiones celulares se adicionaron 10 µl de Proteinasa K (20 mg/ml; Promega, Madison, WI, USA) y 200 µl de agarosa SeaKem Gold 1%. Cada una de estas mezclas se transfirió a un molde para la formación de los bloques o “*plugs*” y se dejaron solidificar a temperatura ambiente por 10-15 min. Como control se utilizó una Salmonella Branderup H9812, que se preparó de la misma forma.

En una segunda etapa se realizó la lisis celular: Se colocaron los “*plugs*” en tubos con 5 ml de buffer de lisis celular (Tris 50 mM: EDTA 50 mM, pH 8.0 + Sarcosyl 1%) y se incubaron en un baño termostático a 54°C durante 2 h con agitación (150-175 rpm). Posteriormente se realizaron dos lavados con 15 ml de agua estéril calidad molecular y 4 lavados sucesivos con buffer TE 1X (Tris 10 mM: EDTA 1 mM, pH 8.0), con los líquidos pre-calentados a 54-55°C y con agitación en el baño termostático durante 15 min.

Luego de los lavados se continuó con la digestión enzimática utilizando *Xba*I (Promega, Madison, WI, USA y Fermentas, EU) como primera y *Bln*I (Amersham Biosciences, UK Limited) como segunda enzima según correspondiera. Una porción de 2,0-2,5 mm de espesor del “*plug*” se transfirió a un tubo de microcentrífuga conteniendo la enzima (30U/muestra) en buffer 1X. Se incubaron los tubos en baño termostático a 37°C durante 2h.

Por último, se procedió al armado del gel utilizando agarosa SeaKem Gold (SKG) al 1% en TBE 0,5X. Se acomodaron en los hoyos del gel todas las porciones de los diferentes “*plugs*” conteniendo el ADN fragmentado. Una vez solidificado el gel se realizó la electroforesis en un

equipo CHEF DR III (BioRAD Laboratories, Inc., USA) utilizando buffer Tris-Borato EDTA (TBE) 0,5X. Para la electroforesis se siguieron las condiciones que se describen en la Tabla 1.

Tabla 1. Condiciones en el CHEF DR III para realizar la electroforesis.

| Variables del protocolo de electroforesis | O157 | no-O157 |
|--|-------------|----------------|
| Tiempo de pulso inicial | 2,2 seg | 6,8 seg |
| Tiempo de pulso final | 54,2 seg | 35,4 seg |
| Voltaje | 6 V | 6 V |
| Ángulo | 120° | 120° |
| Tiempo de corrida | 18-19 h | 18 - 19 h |

Una vez finalizada la corrida electroforética, se tiñó el gel con una solución de GelRed 1X, durante 20 min en agitación (50 rpm). Luego se realizó un lavado en agua destilada durante 5 min con leve agitación.

Las imágenes de los geles de PFGE se obtuvieron con Doc-It 2000 (Bio-Rad). El análisis de las imágenes en formato TIFF se realizó con el programa BioNumerics versión 5.1 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium) usando un coeficiente de Dice y UPGMA para generar dendrogramas con un 1,5% de valor de tolerancia.

La interpretación del análisis de los patrones obtenidos por PFGE se realizó buscando “clusters” o grupos formados por aislamientos con patrones indistinguibles. Se puede aceptar variabilidad de al menos dos o tres bandas, si se trata de un evento que transcurre durante algún tiempo o si la propagación de persona a persona es una característica prominente. Además, si la información epidemiológica lo avala, los aislamientos con patrones de PFGE diferentes pueden incluirse en un mismo evento o brote (Barrett et al. 2006).

5. Perfiles de virulencia

Se determinaron los diferentes perfiles de virulencia que surgieron del estudio de las cepas O145, teniendo en cuenta la caracterización previa de las mismas y los resultados que surgieron de este estudio. Para ello se utilizaron los genes de las variantes de toxina *stx*, variantes de *eae*, *ehxA*, *lpfA1-5* y *lpfO113*.

6. Relación entre los perfiles de virulencia y las manifestaciones clínicas

Teniendo en cuenta los diferentes perfiles de virulencia se estableció la relación de los mismos con el número de casos y la severidad de las manifestaciones clínicas.

7. Análisis de los controles de excreción de STEC

En este trabajo se presenta el estudio y el análisis del control de excreción de 7 casos en los cuales se había detectado STEC O145. De cada uno de estos casos se realizó la toma de muestras con intervalos de 48 h entre cada una ellas. Para dar por finalizada la excreción se realizó un seguimiento hasta obtener 2 muestras con resultados negativos consecutivos. De los análisis realizados se consideró al período de excreción al tiempo transcurrido entre la primera y la última muestra positiva.

IV. RESULTADOS

1. Caracterización fenotípica

1.1. Serotipificación

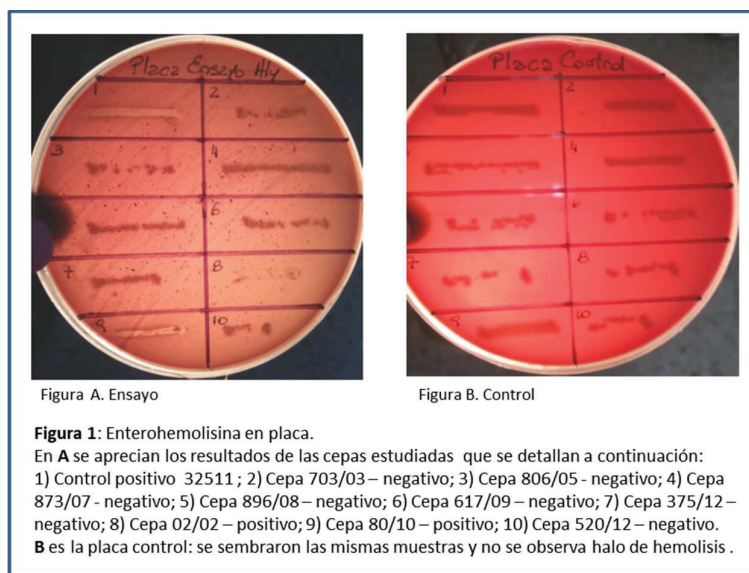
El seroagrupamiento de todas las cepas (n=286) resultó ser O145 positivo. El 96,8% de las cepas (277/286) no presentaron movilidad, por lo que fueron caracterizadas como O145:NM. Entre las cepas móviles se identificaron los serotipos O145:H25 (3/286; 1%) y O145:H no tipificable (HNT) (6/286; 2%).

1.2. Confirmación de los resultados atípicos en las pruebas de fermentación del sorbitol, actividad β -D-glucuronidasa y de hemólisis por EHEC-Hly

Siendo que la mayoría de las cepas incluidas en este estudio tenían la capacidad de fermentar el sorbitol, se confirmó que solo el 1% (3/286) no la presentaban.

En cuanto a la actividad de la enzima β -glucuronidasa, la mayoría de las cepas presentaban actividad enzimática y se confirmaron los resultados negativos en el 14,4% (41/286) de las cepas.

Además, se confirmó que el 2,5% (7/286) de las cepas, no presentaba actividad enterohemolítica. En la figura 1 se pueden observar las placas de prueba y de control del ensayo de enterohemolisina de las siete cepas EHEC-Hly negativas en comparación con dos cepas EHEC-Hly positivas. Todas son O145:NM[H28], sólo una de las cepas β -glucuronidasa negativa, resultó ser EHEC-Hly negativa.



1.3. Susceptibilidad antimicrobiana

Del total de las cepas, 33/286 (11,5%) presentaron resistencia a al menos alguno de los antimicrobianos ensayados. Las resistencias a tetraciclina (n=25), ampicilina (n=16), estreptomycin (n=12) y a trimetoprima-sulfametoxazol (n=12) fueron las que se identificaron con mayor frecuencia (Tabla 2), mientras que no se detectaron para gentamicina y norfloxacin. Se identificaron 12 perfiles distintos de resistencia antimicrobiana. Se observaron dos perfiles con un total de 12 cepas (36,4%) que presentaron resistencia a un solo antibiótico, el resto de los perfiles con 21 cepas (63,6%) fueron a dos (n=8; 24%), tres (n=10; 30%) y cuatro antimicrobianos (n=3; 9%). Los perfiles y porcentajes de resistencia detectados están detallados en la Tabla 3.

Tabla 2. Frecuencia de detección de resistencias a los antimicrobianos ensayados.

| Antibióticos | n° total de cepas (n=33; %) |
|---------------------------------|--|
| Tetraciclina | 25; 8,75 |
| Ampicilina | 16; 5,8 |
| Trimetoprima- sulfametoxazol | 12; 4,4,3 |
| Estreptomycin | 12; 4,3 |
| Acido nalidixico | 2; 0,7 |
| Cloranfenicol | 1; 0,4 |
| Gentamicina | 0; 0 |
| Norfloxacin | 0; 0 |

Todas las cepas resistentes a ampicilina fueron estudiadas para la producción de β -lactamasa y la actividad BLEE usando amoxicilina, ácido clavulánico, ceftazidima, cefotaxima, cefoxitina y cefalotina tal como se describe en materiales y métodos. Todas presentaron actividad enzimática de β - lactamasas, sin embargo, no se puede inferir que haya mecanismos de resistencia ya que no se evaluó la susceptibilidad antimicrobiana a cefalosporinas de tercera generación.

Tabla 3. Perfiles de resistencia detectados

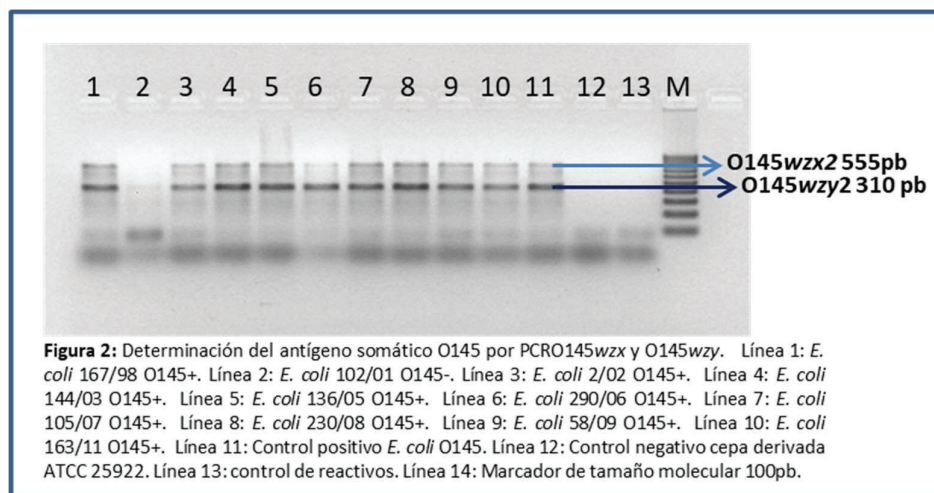
| Nº de perfil | Nº total de cepas por perfil (n=33; %) | Perfil de Resistencia* |
|--------------|--|------------------------|
| 1 | 2; 6,06 | A / ES / T / TMS |
| 2 | 1; 3,03 | C / ES / T / TMS |
| 3 | 4; 12,12 | A / T / TMS |
| 4 | 2; 6,06 | A / ES / TMS |
| 5 | 2; 6,06 | A / ES / T |
| 6 | 2; 6,06 | A / N / T |
| 7 | 3; 9,09 | ES / T |
| 8 | 2; 6,06 | A / ES |
| 9 | 2; 6,06 | T / TMS |
| 10 | 1; 3,03 | A / TMS |
| 11 | 9; 27,27 | T |
| 12 | 3; 9,09 | A |

* ampicilina (A), cloranfenicol (C), gentamicina (G), ácido nalidixico (AN), norfloxacin (N), estreptomicina (ES), tetraciclina (T), y trimetoprima-sulfametoxazol (TMS).

2. Caracterización genotípica

2.1. Detección de los genes O145wzx y O145wzy

En las 286 cepas estudiadas se confirmó genotípicamente por la PCR múltiple **O145wzx2** y **O145wzy2** el antígeno somático O145. En la figura 2 se muestra a manera de ejemplo como se visualizan los resultados obtenidos luego de realizar la electroforesis para detectar los productos de amplificación obtenidos con la PCR.

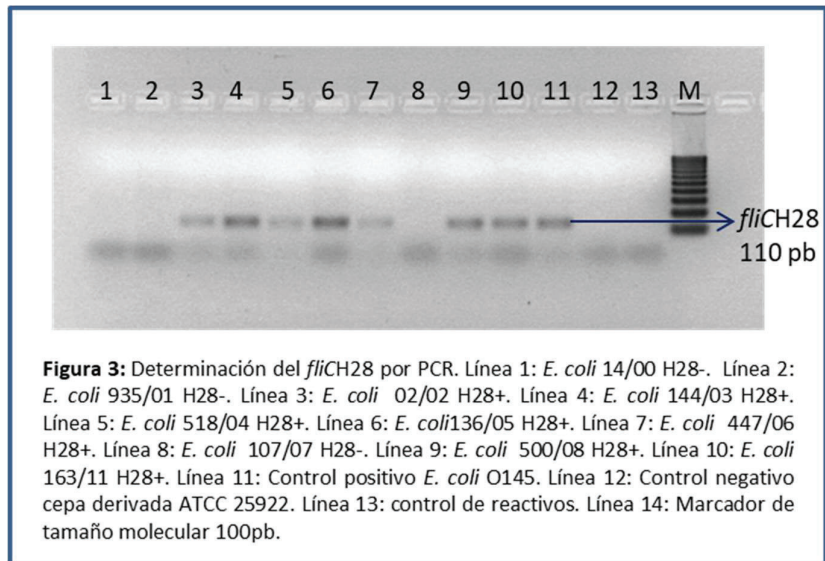


2.2. Detección del *fliCH28* y *fliCH8*

Todas las cepas no móviles, excepto 6, resultaron positivas para el gen del antígeno flagelar *fliCH28*, por lo cual el 97,8% (271/277) se pudo caracterizar como O145:NM[H28]. Con respecto a las cepas móviles O145:HNT (n=6), solo una se pudo determinar como positiva para el *fliCH28* confirmándose como STEC O145:H28. Las 6 cepas O145:NM (n=6) y O145:HNT (n=5) negativas para *fliCH28* también resultaron ser negativas para el gen *fliCH8*. Estos resultados junto con los obtenidos por serología se observan en la tabla 4. Además, en la figura 3 se muestra a manera de ejemplo como se visualizan los resultados obtenidos luego de realizar la electroforesis para detectar los productos de amplificación obtenidos con la PCR para el gen *fliCH28*.

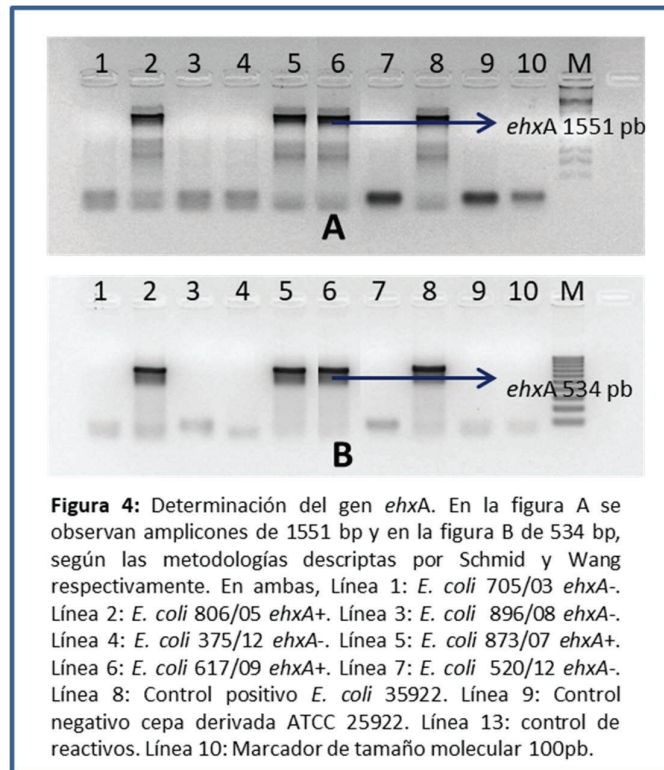
Tabla 4. Serotipos obtenidos por serología y PCR del total de 286 cepas.

| N | Serología | | PCR | |
|-----|-----------|----|-----------------|----------------|
| | O | H | <i>fliC</i> H28 | <i>fliC</i> H8 |
| 271 | 145 | NM | + | - |
| 6 | 145 | NM | - | - |
| 3 | 145 | 25 | - | - |
| 5 | 145 | NT | - | - |
| 1 | 145 | NT | + | - |



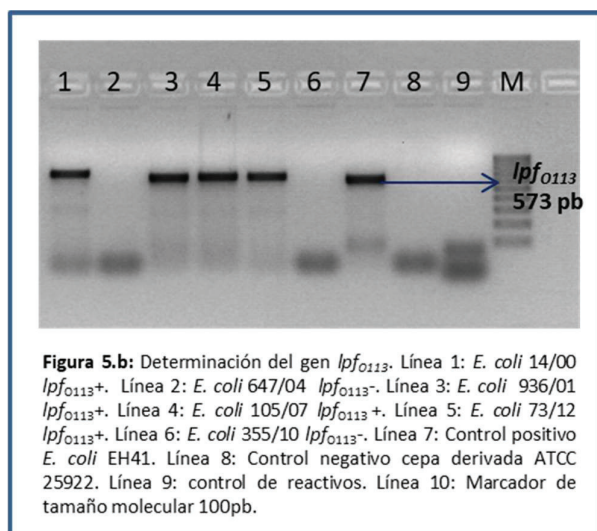
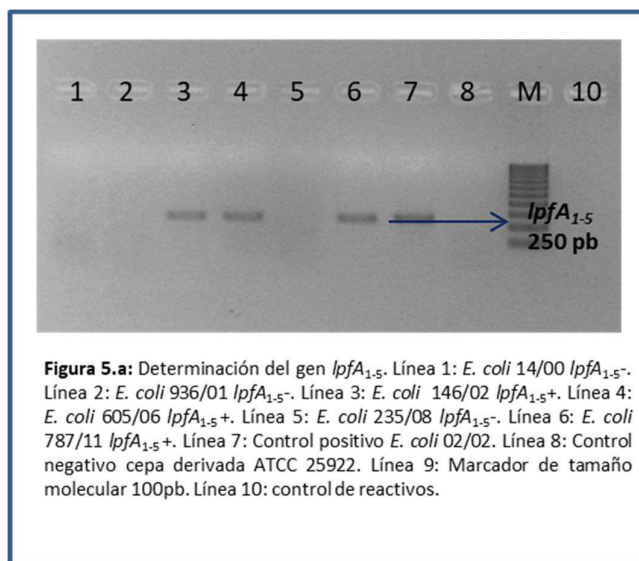
2.3. Detección del gen *ehxA*

Aquellas cepas que previamente fueron caracterizadas como *ehxA*-negativas (4/286; 1,4%), fueron ensayadas según Schmidt *et al.* y Wang *et al.* (1995 y 2002). Estas 4 cepas O145:NM resultaron negativas para el gen *ehxA*, por ambas PCRs. Cabe destacar que estas cepas resultaron negativas tanto por PCR como por el estudio fenotípico; mientras que otras 3 cepas que resultaron portadoras del gen, no expresaron actividad enterohemolítica. En la figura 4 se muestran los resultados por ambas PCRs para las siete cepas no hemolíticas, 4 *ehxA* (-) y 3 *ehxA* (+).



2.4. Detección de los genes *lpfA*₁₋₅ y *lpfO*₁₁₃

El gen *lpfA*₁₋₅ fue detectado en 275 de las 286 cepas (96,15%) y mientras que en un porcentaje menor resultaron portadoras del gen que codifica para la adhesina *lpfA*_{O113} (15/286; 5,2%). En las figuras 5.a y 5.b se muestran a manera de ejemplo como se visualizan los resultados obtenidos luego de realizar la electroforesis para detectar los productos de amplificación obtenidos con ambas PCRs.

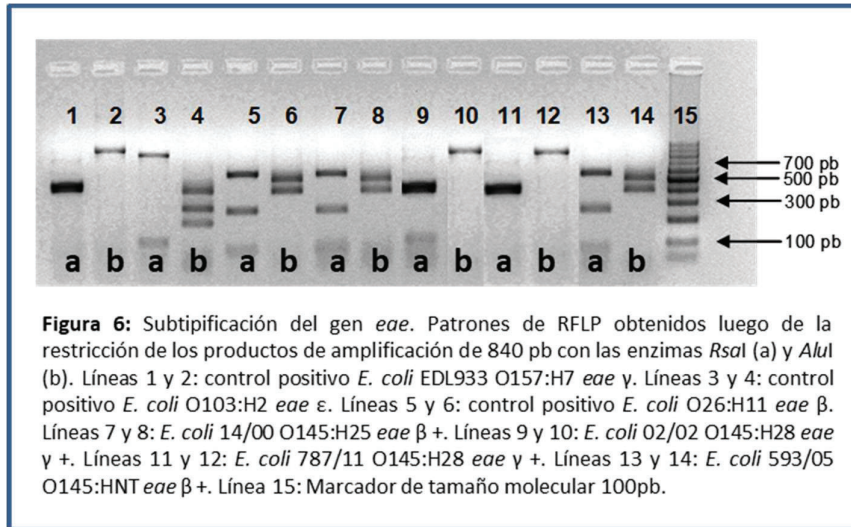


3. Subtipificación

3.1. Detección de las variantes genotípicas del gen *eae*

El gen *eae* fue caracterizado principalmente como subtipo *eae*- γ , siendo el 97,6% de las cepas portadoras de dicho gen (279/286) de las cuales 96,8% coincidió con el serotipo O145:NM[H28] (270/279) y las 9 cepas restantes pertenecieron a los serotipos O145:NM (n=6) y O145:NT (n=3) a las cuales no se les pudo determinar el antígeno flagelar. Por otro lado sólo 7 cepas (2,4%) correspondieron al subtipo *eae*- β , identificando los serotipos O145:H25 (n=3), O145:NM[H28] (n=2) y O145:NT (n=2). En la figura 6 se muestra a manera de ejemplo como se visualizan los perfiles obtenidos luego de realizar la amplificación, el corte con las enzimas

de restricción y la electroforesis para detectar las variantes de intimina. Se incluyeron cepas no-O145 para poder mostrar las diferencias entre los patrones posibles para distintas variantes de *eae*.



3.2. Subtipificación molecular para el estudio de la relación clonal de las cepas STEC O145

Utilizando la metodología de electroforesis de campo pulsado se procesaron en una primera instancia 172 cepas utilizando el protocolo del CDC para STEC O157. Se pudieron establecer 126 patrones únicos *XbaI*-PFGE, con un porcentaje de similitud del 60,15% entre ellos (Apéndice II).

A partir del año 2009 se implementó el nuevo protocolo de electroforesis para a STEC no-O157, por lo que se realizó nuevamente la macrorestricción y electroforesis de una cepa representativa de cada uno de los 126 patrones identificados previamente con el protocolo para STEC O157, de modo tal que pudieran ser incorporados y comparados con los patrones de la nueva base de datos construida con el protocolo para no-O157. Entonces en una segunda instancia se procesaron un total de 245 cepas (126 aislamientos representantes de los patrones obtenidos anteriormente más 119 nuevos aislamientos) con el segundo protocolo. Se pudieron establecer 204 patrones *XbaI*-PFGE con un porcentaje de similitud del 58,7% entre ellos (Apéndice III).

Del análisis general de los patrones de restricción por *XbaI*-PFGE no-O157, 123 cepas se agruparon en 36 *clusters*, mientras que los 168 restantes presentaron patrones únicos. La composición total de los *clusters* se describe en la tabla 5.

Tabla 5. Distribución de las cepas STEC O145 de origen humano y bovino en *clusters*, según *Xba*I-PFGE por ambos protocolos.

| Cluster | Patrones de <i>Xba</i> I-PFGE | Origen (n) | | | | | | n total | Serotipo | Genotipo |
|---------|-------------------------------|------------|----|----|----------|----------|--------|---------|--------------|---|
| | | SUH | DS | D | Contacto | Sin dato | Bovino | | | |
| I | ARENMX01.0061 | 5 | | | 1 | | | 6 | O145:NM[28] | <i>stx</i> _{2a} / <i>eae</i> - ν / <i>ehx</i> A// <i>lpf</i> A ₁₋₅ |
| II | ARENMX01.0006 | 7* | 2 | 2 | 3 | | | 14 | O145:NM[28] | <i>stx</i> _{2a} / <i>eae</i> - ν / <i>ehx</i> A*/ <i>lpf</i> A ₁₋₅ |
| III | ARENMX01.0032 | 1 | | 1' | | | | 2 | O145:NM[28]' | <i>stx</i> _{2a} / <i>eae</i> - ν / <i>ehx</i> A// <i>lpf</i> A ₁₋₅ |
| IV | ARENMX01.0125 | 1 | | 1 | 1* | | | 3 | O145:NM[28] | <i>stx</i> _{2a} / <i>eae</i> - ν / <i>ehx</i> A// <i>lpf</i> A ₁₋₅ /* <i>lpf</i> O ₁₁₃ |
| V | ARENMX01.0018 | 1* | | 1 | | | | 2 | O145:NM[28] | <i>stx</i> _{2a} / <i>eae</i> - ν / <i>ehx</i> A/* <i>lpf</i> A ₁₋₅ |
| VI | ARENMX01.0004 | 6 | 3 | 2 | | 1 | | 12 | O145:NM[28] | <i>stx</i> _{2a} / <i>eae</i> - ν / <i>ehx</i> A// <i>lpf</i> A ₁₋₅ |
| VII | ARENMX01.0008 | 7 | | | 2 | | | 9 | O145:NM[28] | <i>stx</i> _{2a} / <i>eae</i> - ν / <i>ehx</i> A// <i>lpf</i> A ₁₋₅ |
| VIII | ARENMX01.0084 | 1 | 2 | 2 | | | 2 | 7 | O145:NM[28] | <i>stx</i> _{2a} / <i>eae</i> - ν / <i>ehx</i> A// <i>lpf</i> A ₁₋₅ |
| IX | ARENMX01.0078 | 2 | | | | | | 2 | O145:NM[28] | <i>stx</i> _{2a} / <i>eae</i> - ν / <i>ehx</i> A// <i>lpf</i> A ₁₋₅ |
| X | ARENMX01.0099 | 1 | 1 | | | | | 2 | O145:NM[28] | <i>stx</i> _{2a} / <i>eae</i> - ν / <i>ehx</i> A// <i>lpf</i> A ₁₋₅ |
| XI | ARENMX01.0002 | 2 | | | | | | 2 | O145:NM[28] | <i>stx</i> _{2a} / <i>eae</i> - ν / <i>ehx</i> A// <i>lpf</i> A ₁₋₅ |
| XII | ARENMX01.0076 | 5 | 1 | | | | | 6 | O145:NM[28] | <i>stx</i> _{2a} / <i>eae</i> - ν / <i>ehx</i> A// <i>lpf</i> A ₁₋₅ |
| XIII | ARENMX01.0030 | 1 | 1 | | | | | 2 | O145:NM[28] | <i>stx</i> _{2a} / <i>eae</i> - ν / <i>ehx</i> A// <i>lpf</i> A ₁₋₅ |
| XIV | ARENMX01.0036 | 1 | 2 | | | | | 3 | O145:NM[28] | <i>stx</i> _{2a} / <i>eae</i> - ν / <i>ehx</i> A// <i>lpf</i> A ₁₋₅ |
| XV | ARENMX01.0016 | | 1 | 1 | | | | 2 | O145:NM[28] | <i>stx</i> _{2a} / <i>eae</i> - ν / <i>ehx</i> A// <i>lpf</i> A ₁₋₅ |
| XVI | ARENMX01.0063 | 3 | | | | | | 3 | O145:HNT | <i>stx</i> _{2a} / <i>eae</i> - ν /* <i>eae</i> - β / <i>ehx</i> A// <i>lpf</i> O ₁₁₃ |
| XVII | ARENMX01.0042 | | | 2 | | | | 2 | O145:NM[28] | <i>stx</i> _{2a} / <i>eae</i> - ν / <i>ehx</i> A// <i>lpf</i> A ₁₋₅ |
| XVIII | ARENMX01.0017 | | | 2* | | | | 2 | O145:H25 | <i>stx</i> _{2a} / <i>eae</i> - β / <i>ehx</i> A/* <i>lpf</i> A ₁₋₅ /* <i>lpf</i> O ₁₁₃ |
| XIX | ARENMX01.0172 | | 1 | 1 | | | | 2 | O145:NM | <i>stx</i> 2a/ <i>eae</i> / <i>ehx</i> A |
| XX | ARENMX01.0034 | | 1 | 1 | | | | 2 | O145:NM[28] | <i>stx</i> _{2a} / <i>eae</i> - ν / <i>ehx</i> A// <i>lpf</i> A ₁₋₅ |
| XXI | ARENMX01.0163 | | 1 | 1 | | | | 2 | O145:NM[28] | <i>stx</i> _{2a} / <i>eae</i> - ν / <i>ehx</i> A// <i>lpf</i> A ₁₋₅ |
| XXII | ARENMX01.0194 | 1 | | | 1 | | | 2 | O145:NM[28] | <i>stx</i> _{2a} / <i>eae</i> - ν / <i>ehx</i> A// <i>lpf</i> A ₁₋₅ |
| XXIII | ARENMX01.0173 | 1 | | | 1 | | | 2 | O145:NM[28] | <i>stx</i> _{2a} / <i>eae</i> - ν / <i>ehx</i> A// <i>lpf</i> A ₁₋₅ |
| XXIV | ARENMX01.0152 | 1 | | | 1 | | | 2 | O145:NM[28] | <i>stx</i> _{2a} / <i>eae</i> - ν / <i>ehx</i> A// <i>lpf</i> A ₁₋₅ |
| XXV | ARENMX01.0049 | 2 | | | 1* | | | 3 | O145:NM[28] | <i>stx</i> _{2a} / <i>eae</i> - ν / <i>ehx</i> A// <i>lpf</i> A ₁₋₅ /* <i>lpf</i> O ₁₁₃ |
| XXVI | ARENMX01.0203 | 1 | 1 | | | | | 2 | O145:NM[28] | <i>stx</i> _{2a} / <i>eae</i> - ν / <i>ehx</i> A// <i>lpf</i> A ₁₋₅ |
| XXVII | ARENMX01.0100 | 2 | | | | | | 2 | O145:NM[28] | <i>stx</i> _{2a} / <i>eae</i> - ν / <i>ehx</i> A// <i>lpf</i> A ₁₋₅ |
| XXVIII | ARENMX01.0178 | | 2 | 3 | | | | 5 | O145:NM[28] | <i>stx</i> _{2a} / <i>eae</i> - ν / <i>ehx</i> A// <i>lpf</i> A ₁₋₅ |
| XXIX | ARENMX01.0037 | 1 | 1 | | | | | 2 | O145:NM[28] | <i>stx</i> _{2a} / <i>eae</i> - ν / <i>ehx</i> A// <i>lpf</i> A ₁₋₅ |
| XXX | ARENMX01.0041 | 1' | | | | 1* | | 2 | O145:NM[28]' | <i>stx</i> _{2a} / <i>eae</i> - ν / <i>ehx</i> A// <i>lpf</i> A ₁₋₅ /* <i>lpf</i> O ₁₁₃ |
| XXXI | ARENMX01.0188 | | 2 | | | | | 2 | O145:NM[28] | <i>stx</i> _{2a} / <i>eae</i> - ν / <i>ehx</i> A// <i>lpf</i> A ₁₋₅ |
| XXXII | ARENMX01.0177 | | 1' | | 1 | | | 2 | O145:NM[28]' | <i>stx</i> _{2a} / <i>eae</i> - ν / <i>ehx</i> A// <i>lpf</i> A ₁₋₅ |
| XXXIII | ARENMX01.0035 | | | 1 | | 1 | | 2 | O145:NM[28] | <i>stx</i> _{2a} / <i>eae</i> - ν / <i>ehx</i> A// <i>lpf</i> A ₁₋₅ |
| XXXIV | ARENMX01.0129 | 2 | | | | | | 2 | O145:NM[28] | <i>stx</i> _{2a} / <i>eae</i> - ν / <i>ehx</i> A// <i>lpf</i> A ₁₋₅ |
| XXXV | ARENMX01.0080 | 2 | | | | | | 2 | O145:NM[28] | <i>stx</i> _{2a} / <i>eae</i> - ν / <i>ehx</i> A// <i>lpf</i> A ₁₋₅ |
| XXXVI | ARENMX01.0064 | 4 | | | | | | 4 | O145:NM[28] | <i>stx</i> _{2a} / <i>eae</i> - ν / <i>ehx</i> A// <i>lpf</i> A ₁₋₅ |

Referencias: Los patrones marcados con color verde corresponden a aquellos en los que se pudo establecer una relación en ambas bases de datos, es decir son *clusters* identificados con el protocolo de STEC O157 y el actualizado para STEC no-O157.

*ehxA**: sólo una de las 7 cepas señaladas con * es negativa para el gen *ehxA*.

[28]': la cepa señalada con ' es negativa para el gen *fliCH28*.

**eae*- β : sólo una de las cepas es positiva para el gen *eae*- β .

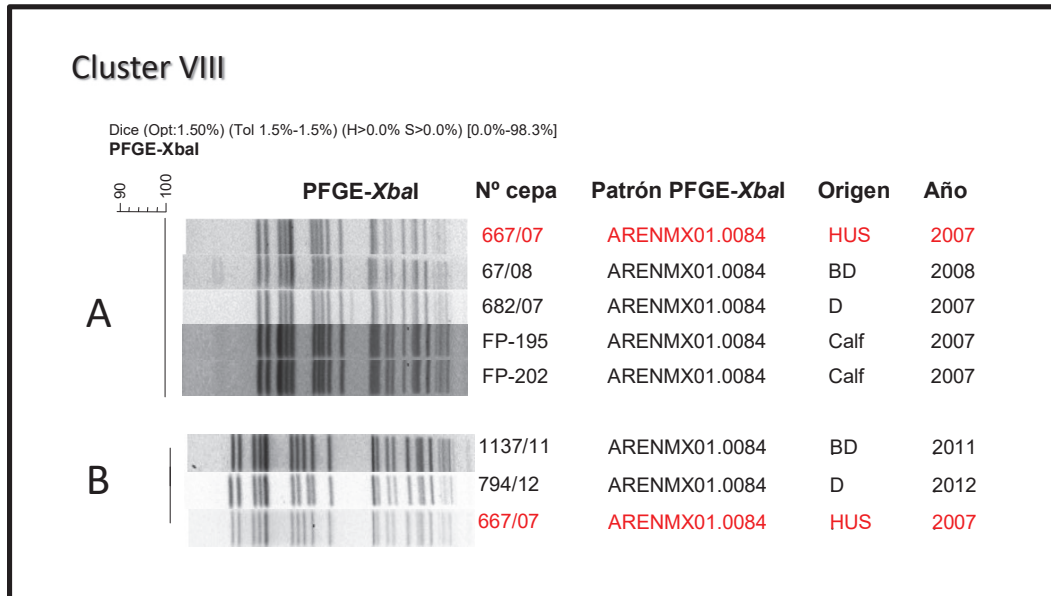
**lpf*_{O113}: sólo una de las cepas es positiva para el gen *lpf*_{O113}

**lpf*_{A1-5}: sólo una de las cepas es positiva para el gen *lpf*_{A1-5}.

En cuanto a las 4 cepas aisladas de bovinos se estableció que dos tenían perfiles idénticos (*cluster* VIII), con 100% de similitud, obteniéndose en total 3 patrones *Xba*I-PFGE con 87,5%

de similitud entre todas. En la figura 7 se observa que dentro del *cluster* VIII se pudo establecer la relación clonal entre 5 cepas de origen humano y 2 aisladas de bovinos, a las que se les asignó el patrón ARENMX01.0084.

Figura 7. Relación clonal por *Xba*I-PFGE entre cepas de origen humano y bovino.



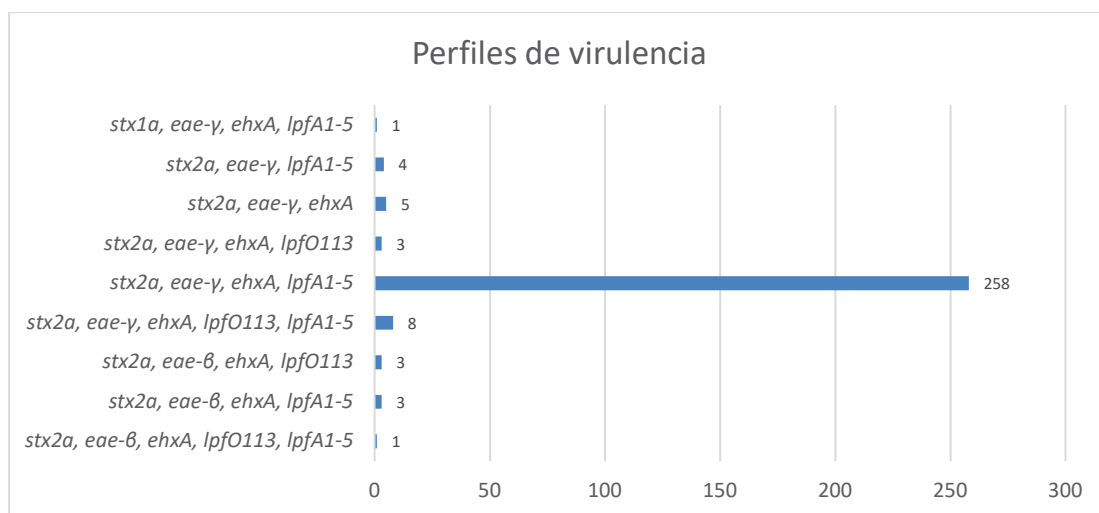
Los patrones marcados con color rojo corresponden a aquellos designados como patrón único, representante en cada base de datos. **A** corresponde a las cepas corridas con el protocolo de STEC O157 y **B** con la actualización para STEC no-O157.

Además se establecieron diferencias según el serotipo, es decir las 271 cepas STEC O145:NM[28] y O145:NM (n=6) arrojaron 199 patrones y entre las cepas móviles correspondientes a O145:H25 (n=3) y O145:HNT (n=6), se diferenciaron 5 patrones *Xba*I-PFGE, con 92,7% de similitud entre sí. En total todas las cepas presentaron 67.01% de similitud.

4. *Perfiles de virulencia*

Teniendo en cuenta todos los genes de virulencia estudiados, se identificaron 9 perfiles genéticos de virulencia diferentes, que se muestran en la figura 8, siendo el más frecuente: *stx2a/eae-γ/ehxA/lpfA1-5* en un 90,2% (258/286).

Figura 8: Distintos perfiles de virulencia detectados entre las cepas estudiadas.



5. *Relación entre los perfiles de virulencia y las manifestaciones clínicas*

Teniendo en cuenta todos los perfiles de virulencia y serotipos que se identificaron, se estudió si existía relación entre ellos con la severidad de las manifestaciones o el diagnóstico de enfermedad de cada caso del cual se aislaron las cepas. Eso puede observarse en la tabla 6.

Tabla 6. Relación de los perfiles de virulencia de las cepas y diagnóstico de los casos.

| n° cepas | Perfil de virulencia | Antígeno flagelar | Movilidad | Diagnóstico |
|----------|---|-------------------|-----------|---|
| 1 | <i>stx2a, eae-β, ehxA, lpfO113, lpfA1-5</i> | H28 | NM | DS |
| 1 | <i>stx2a, eae-β, ehxA, lpfA1-5</i> | H28 | | SUH |
| 7 | <i>stx2a, eae-γ, ehxA, lpfO113, lpfA1-5</i> | H28 | | 2 contactos, 2 SUH, 3 D |
| 1 | <i>stx2a, eae-γ, ehxA, lpfO113, lpfA1-5</i> | noH28 | | sin dato |
| 253 | <i>stx2a, eae-γ, ehxA, lpfA1-5</i> | H28 | | 140 SUH (2 fallecidos), 47 DS, 40 D, 13 contacto, 4 reservorio, 9 S/D |
| 4 | <i>stx2a, eae-γ, ehxA, lpfA1-5</i> | noH28 | | SUH, DS, 2 D |
| 4 | <i>stx2a, eae-γ, ehxA</i> | H28 | | 2 SUH, DS, D |
| 1 | <i>stx2a, eae-γ, ehxA</i> | noH28 | | D |
| 4 | <i>stx2a, eae-γ, lpfA1-5</i> | H28 | | 3 SUH, D |
| 1 | <i>stx1a, eae-γ, ehxA, lpfA1-5</i> | H28 | | Contacto |
| 2 | <i>stx2a, eae-β, ehxA, lpfO113</i> | H25 | Móviles | SUH, D |
| 1 | <i>stx2a, eae-β, ehxA, lpfO113</i> | HNT | | SUH |
| 1 | <i>stx2a, eae-β, ehxA, lpfA1-5</i> | H25 | | D |
| 1 | <i>stx2a, eae-β, ehxA, lpfA1-5</i> | HNT | | SUH |
| 3 | <i>stx2a, eae-γ, ehxA, lpfO113</i> | HNT | | SUH |
| 1 | <i>stx2a, eae-γ, ehxA, lpfA1-5</i> | H28 | | SUH |

6. Epidemiología: Estudio de brotes por STEC O145

El primer aislamiento de STEC O145 registrado por el LNR fue en 1998 de un caso de SUH, detectado en la provincia de Mendoza. Por otro lado, en 1999 se registró el primer aislamiento de reservorio a partir de la materia fecal de un bovino (datos no publicados).

Durante el periodo de estudio de este trabajo se identificaron 9 brotes de STEC O145 con el perfil genotípico O145:NM[28], *stx2a, eae-γ, ehxA, lpfA1-5* en distintas partes del país. Todos fueron detectados a través de la vigilancia epidemiológica y estudiados por epidemiología molecular (PFGE). Cinco de estos brotes fueron familiares y el resto ocurrió en instituciones de cuidado diario. Los eventos se detallan a continuación:

1. El primero se produjo en 2005, en una guardería en Rosario, provincia de Santa Fe. Cincuenta y tres personas fueron muestreadas y se sospechó que el caso índice era un niño de un año de edad. Este brote incluyó dos casos de SUH y un caso de portación

asintomática. Uno de los casos de SUH presentó excreción prolongada del microorganismo (18 días).

2. El segundo brote ocurrió dentro de una familia en Mar del Plata, Buenos Aires a principios de 2006; donde tres contactos del hogar presentaron SUH y un contacto familiar que resultó ser un portador asintomático.
3. El tercero, ocurrió a finales de 2006 en la ciudad de Neuquén y el caso índice resultó ser una niña de 20 meses de edad con SUH, y tres contactos asintomáticos del hogar.
4. A principios de 2011, se detectó un brote familiar en Córdoba. Las cepas fueron recuperadas del caso índice-SUH y de su hermana.
5. El quinto brote ocurrió durante abril de 2011 en una guardería de la ciudad de Buenos Aires, involucró a un caso de SUH (fallecido), un caso que presentó diarrea sanguinolenta y dos casos de diarrea no complicada. Además en este mismo brote un contacto asintomático resultó portador de una cepa STEC O111:NM *stx*_{1a}/*eae/ehxA*. En el caso de diarrea sanguinolenta y uno de los casos de diarrea se observó que la excreción del microorganismo fue prolongada.
6. En mayo de 2011 se produjo otro brote en un jardín de infantes que pertenece a un hospital público de la ciudad de Buenos Aires. En este evento el organismo aislado con mayor frecuencia fue STEC O157:H7 (SUH, DS, 3 diarreas y un contacto asintomático). Se detectó además como coinfección, STEC O145:NM[28], *stx*_{2a}, *eae-γ*, *ehxA*, *lpfA*₁₋₅ en el caso de SUH y en uno de los casos de diarrea.
7. A finales de 2011 el séptimo brote ocurrió dentro de una familia en la ciudad de Buenos Aires, donde se detectaron positivos para el microorganismo, tanto el caso de SUH como dos contactos del hogar (hermana y padre).
8. Al mismo tiempo se produjo otro brote en una familia en los alrededores de Buenos Aires. Esta vez el caso índice presentó diarrea sanguinolenta al igual que su hermana. Ambos casos resultaron positivos.
9. El último y noveno registro de brotes durante este período de estudio, ocurrió en San Carlos de Bariloche, Río Negro en una guardería a mediados del año 2012. El caso índice SUH y dos contactos asintomáticos fueron positivos para STEC O145:NM.

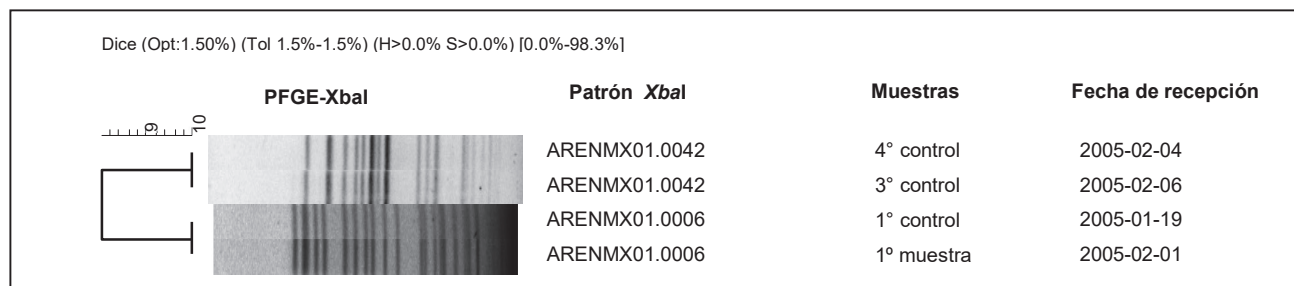
Todos estos eventos se describen asociados con los datos de PFGE en el apéndice IV.

7. Control de excreción de STEC

En este estudio se incluyeron 7 casos en los que se llevó a cabo el control de excreción de cepas STEC O145. A continuación, se describen a cada uno de ellos:

1. Niña con SUH de la ciudad de Neuquén, de la que sólo se obtuvieron dos muestras positivas tomadas con 48 h de diferencia entre ellas. Las cepas aisladas presentaron el mismo patrón de *Xba*I-PFGE: ARENMX01.0006. Sin embargo, se pudo observar, que si bien ambas cepas eran positivas para el gen *ehxA*, en la primera no se expresaba fenotípicamente.
2. Durante un brote que se produjo en la ciudad de Rosario en el año 2005, se estudió a un niño positivo para STEC O145:NM y se pudo demostrar la excreción de la bacteria durante 18 días. Las cepas aisladas de la primera y segunda muestra (1° control) mostraron un patrón de *Xba*I-PFGE indistinguible. La colonia *stx*-positiva de la tercera muestra de materia fecal estudiada (2° control), no pudo ser recuperada. Sin embargo, se aislaron cepas con el mismo patrón de *Xba*I-PFGE de la cuarta y quinta muestra (3° y 4° control), las cuales presentaron un 85% de similitud respecto de la cepa original aislada en la primera muestra. (Figura 9).

Figura 9: Relación clonal de cepas O145:NM según *Xba*I-PFGE



A partir del año 2011 se estudiaron varios casos con control de excreción, algunos de los cuales formaron parte de los diversos brotes detectados durante ese año:

3. Caso de diarrea sanguinolenta de una nena de un año asociada a un brote en un jardín de infantes, en la Ciudad de Buenos Aires durante el mes de abril. Se estudiaron 3 muestras de la misma paciente, de las cuales el aislamiento de la primera muestra (ARENMX01.0136) presentó diferencias significativas (83,73% de similitud) en el patrón de *Xba*I-PFGE respecto del segundo y tercer aislamiento (ARENMX01.0178)

que fueron idénticos entre sí. Este último patrón también fue identificado en cepas aisladas de otros pacientes en el marco del estudio de un brote (ver punto 4). El tiempo de excreción para esta paciente fue de 15 días con una evolución favorable.

4. Dentro del mismo brote que se mencionó en el punto 3, se estudió un caso de diarrea de una niña de 4 años, con tres muestras positivas. Las cepas aisladas presentaron 100% de similitud entre ellas y con los últimos dos aislamientos del caso anterior (ARENMX01.0178). Se confirmó la excreción del microorganismo por 13 días.
5. Durante el mismo año en un jardín de infantes también en la Ciudad de Buenos Aires, se estudió un caso de SUH, correspondiente a una bebé de 10 meses. Se identificaron 2 muestras positivas de STEC O145 con un margen de 5 días entre ambas muestras. Además de la primera toma se pudo aislar una cepa STEC O157:H7 y se pudo establecer una coinfección. Las cepas de O145 presentaron dos patrones de *Xba*I-PFGE (ARENMX01.0173 y ARENMX01.0139) con 93,3% de similitud.
6. En el año 2012, en la ciudad de San Carlos de Bariloche, provincia de Rio Negro, se estudió un caso de DS en un niño de 8 años. En dos muestras tomadas con 48 hs de diferencia entre ambas, se identificaron 2 cepas con patrones de PFGE (ARENMX01.0187 y ARENMX01.0188) que presentaban un 97,62% de similitud.
7. Por último, se estudió un caso de SUH correspondiente a una niña de 22 meses, de la provincia de Buenos Aires. Se identificaron cepas con idéntico patrón de PFGE (ARENMX1.0064) en dos muestras sucesivas de materia fecal tomadas con un margen de 72 hs entre ellas.

V. DISCUSION

Actualmente, en diferentes países los avances tecnológicos en metodologías de detección han hecho posible la vigilancia y notificación, principalmente para STEC no-O157. La frecuencia de asociación con enfermedad humana según los diferentes serogrupos varía a nivel mundial.

Según el LRN, entre 1998 y 2012, la proporción de casos asociados a los serogrupos prevalentes fue: STEC O157, 76,6% (n = 1636/2135); STEC O145, 12,7% (n = 272/2135), STEC O26, 2 % (n = 43/2135); STEC O121, 1,3 % (n = 28/2135), y STEC O103, 0,7 % (n = 16/2135). En comparación, en Estados Unidos se describió que STEC O26 (22%) es el segundo serogrupo asociado a enfermedad humana después de STEC O157:H7, mientras que STEC O145:NM representa un pequeño porcentaje (5%) y ocupa el sexto lugar entre los serogrupos detectados (Brooks et al. 2005; Mathusa et al. 2010). En Europa, EHEC O26:H11/H- representó el 5-7 % de todos los aislamientos de origen humanos de EHEC (Bielaszewska et al. 2013). Además, en Alemania, O26:H11/H- (13 %) fue el serotipo STEC no-O157 aislado con mayor frecuencia, seguido de los serogrupos O103 (5 %) y O145 (4 %). Estos resultados concuerdan con los datos de prevalencia informados en otros países de Europa continental, incluidos Austria, Bélgica, República Checa, Finlandia, Francia, Italia, Serbia, Suiza y los Países Bajos, en pacientes con enfermedad grave como SUH y también diarrea no complicada (Bielaszewska y Karch (2000). Cabe destacar que, en Argentina, las cepas STEC O145 son de suma importancia, porque se trata del segundo serogrupo más frecuentemente detectado relacionado con enfermedad severa, después del STEC O157, es por eso la necesidad de su estudio en mayor profundidad.

En este estudio se analizaron 286 cepas aisladas entre los años 1998 y 2012, de las cuales 282 se aislaron de 272 casos clínicos. La diferencia observada entre el número de cepas aisladas (n=282) y la cantidad de casos clínicos (n=272) surge de que en algunos casos de SUH se pudo recuperar más aislamientos al realizar el control de excreción del patógeno. Además, se incluyeron 4 cepas del reservorio animal.

En cuanto a la caracterización de estas cepas, podemos decir que la mayoría resultaron ser O145:NM (96,8%; 277/286). Incluso, como fue posible determinar el *fliCH28* por PCR, se llegó a completar la serotipificación molecular como O145:NM[H28] en el 97,8% (271/277) de las cepas no móviles. Por otra parte, las cepas móviles se identificaron como O145:HNT, O145:H28 y O145:H25 (9,5%, 0,9%, y 0,5%), respectivamente. Estos serotipos son los más comúnmente descriptos para STEC O145 (Sonntag et al. 2004; Lorenz et al. 2017). Como en su mayoría las cepas que circulan son no móviles, la detección del gen *fliC* es esencial para una completa caracterización. Otros autores han descripto, variantes de los genes del antígeno

flagelar de O145, y si bien en este trabajo no se ha abordado un estudio genómico de dichos genes, es decir no se han secuenciado, es fundamental para el contexto epidemiológico realizar al menos la caracterización (feno-genotípica) porque está en relación con la actualización de los datos epidemiológicos en cada lugar (Beutin *et al.* 2015). La mayoría de las cepas fueron capaces de fermentar el sorbitol, y de presentar la actividad de β -glucuronidasa como es de esperarse en cepas STEC no-O157 (Paton y Paton, 1998). Sin embargo, el 1% y el 14% se confirmaron como negativas, respectivamente. En cuanto a la actividad enterohemolítica, 7/286 (2,5%) cepas no expresaron hemolisis. Sin embargo, 4 de estos aislamientos fueron confirmados como no enterohemolíticos cuando resultaron ser por PCR negativos para el gen *ehxA*. Por tratarse de algo excepcional fue necesario el uso de dos PCRs, la que se usa habitualmente en el LNR para la caracterización de las cepas STEC y otra alternativa que amplifica una región diferente del gen (Wang *et al.* 2002).

Mediante pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos, encontramos que la mayoría de las cepas fueron susceptibles a los antimicrobianos seleccionados, tal como se describe en la bibliografía para STEC O157:H7 (Gentle *et al.* 2020). Sin embargo, el 11,5% del total de las cepas (33/286) fueron resistentes a al menos uno de los antimicrobianos ensayados, sin detectarse ESBL. De los 12 perfiles únicos de resistencia a los antimicrobianos, dos exhibieron multi resistencia a cuatro antimicrobianos. Informes recientes indican que están siendo detectadas cepas STEC O145 resistentes a los antimicrobianos, asociadas tanto a casos esporádicos como a brotes. Se describieron cepas resistentes a múltiples fármacos (cloranfenicol, ácido nalidíxico, estreptomina, sulfametoxazol y tetraciclina), aisladas de un brote asociado al consumo de lechuga (Taylor *et al.* 2010). Además, durante una investigación en los EE. UU. se observó una alta prevalencia de resistencia (n=5; 80%), siendo a la azitromicina la más común, con un 20 % de multi resistencia (Beier *et al.* 2016). En nuestro estudio, todas las cepas STEC O145 de origen bovino fueron susceptibles, en oposición a los resultados descritos durante una investigación realizada en ganado vacuno escocés que mostró perfiles de resistencia a ampicilina, tetraciclina, estreptomina y trimetoprima-sulfametoxazol (Vali *et al.* 2007). Estos resultados fueron similares a los detectados en las cepas humanas de Argentina. Beier *et al.* (2016) también describió un 63% de cepas bovinas resistentes (n=11) con diferentes perfiles de resistencia y un 9% de multi resistencias, siendo también la azitromicina la más común. Es importante dar seguimiento al monitoreo del perfil de resistencia en la vigilancia de las cepas de STEC, debido a que el determinante resistente puede adquirirse por transmisión plasmídica entre diferentes bacterias entéricas. También se considera que algunos tipos de plásmidos tienen una amplia gama de huéspedes y se han encontrado en

miembros de enterobacterias de origen clínico, alimentario y animal. Además, los estudios de monitoreo molecular y filogenético permitirían una mejor comprensión de las fuentes de infección (WHO, 2021) y el papel de los reservorios animales o de los alimentos derivados de animales, en el origen de las infecciones humanas por STEC no-O157 (Bai et al. 2016).

Al ser todas las cepas *eae* positivas podemos confirmar que son potencialmente virulentas debido a la asociación con la adherencia íntima de la bacteria a las células del huésped provocando la primera lesión de pegado y borrado de las microvellosidades intestinales. En cuanto a la subtipificación del gen *eae* se pudo determinar la asociación entre la variante de *eae* y el *fliC* detectado. Las cepas STEC O145:NM[H28]/H28 fueron todas *eae*- γ , mientras que las cepas O145:H25 fueron *eae*- β , tal como fue descrito por Sonntag et al. (2004). Esto indicaría que se trata de diferentes linajes dentro del mismo serogrupo. Sin embargo y debido al bajo número de cepas no se pudo establecer una relación con una mayor o menor severidad de los mismos. En otro estudio llevado a cabo en Brasil también se observó la relación entre los subtipos *eae* con los diferentes *fliC*. En este trabajo se identificó una cepa como O145:H34 *stx2f* con la variante *eae*- ι , asociada con un caso de diarrea aguda (Cavalcanti et al. 2020).

Así mismo, la mayoría de las cepas resultaron ser portadores del gen *lpfA*₁₋₅ (96,2 %) y un número más acotado presentó el gen de la adhesina *lpfO*₁₁₃ (5,2 %). Esta asociación entre el gen *lpfA*₁₋₅ y STEC O145 se describió previamente por Torres et al. (2009). Los genes que codifican estructuras fimbriales suelen estar presentes en cepas patógenas de *E. coli* y, en especial, los genes *lpfA*₁ y *lpfA*₂ se encuentran con frecuencia entre las cepas LEE positivas asociadas con enfermedades graves (Farfan y Torres, 2012).

A partir de los resultados obtenidos en este estudio, se determinó que en la mayoría de las cepas estudiadas (90,2%) el perfil prevalente de virulencia fue *stx2a/eae*- γ /*ehxA*/*lpfA*₁₋₅, representando a la mayoría de las cepas de origen humano (254/282) y también a todas las cepas de origen bovino (n=4). Este perfil, aislado con mayor frecuencia durante el período de estudio podríamos considerarlo, como el de mayor virulencia. Se sabe que la capacidad citotóxica de Stx2 es mucho mayor que Stx1 (Louise y Obrig, 1995) y diferentes estudios epidemiológicos sugieren que Stx2 se asocia más frecuentemente con enfermedades graves y desarrollo de SUH que Stx1. También a nivel de los subtipos se han estudiado las potencias citotóxicas relativas de cinco de los subtipos purificados de Stx2, Stx2a, Stx2b, Stx2c, Stx2d, y se pudo establecer in vitro tanto en células Vero como en células epiteliales primarias del túbulo renal proximal humano que, Stx2a y Stx2d fueron al menos 25 veces más potentes que Stx2b y Stx2c. Los mismos resultados se observaron en un modelo ratón (Fuller et al. 2011). Por otro lado, al igual que en el serotipo O157:H7 asociado a enfermedad severa, el gen *eae* y en particular la variante

eae-γ, les confiere a las cepas de O145 la capacidad de adherirse y dañar al enterocito (Nataro y Kaper, 1998). Se conoce que la presencia del gen *ehxA* está relacionado con una actividad sinérgica sobre el accionar de la Stx y además la enterohemolisina per se, produce daño a eritrocitos y células de los túbulos renales (Schmidt, 1995). Por último, las fimbrias están asociadas con la adherencia y colonización intestinal. En particular la fimbria *lpfA1-5* se ha descrito en cepas STEC O145 asociada a determinadas variantes de intimina como *eae-γ* (Torres et al. 2009). A diferencia de otros trabajos donde se observan perfiles de virulencia para STEC O145 tanto con la presencia de *stx1* como *stx2* (Sonntag et al. 2004; Wahl et al. 2011; Cernichiaro et al. 2013 y Carter et al. 2015) en este estudio sólo se detectó una sola cepa con el perfil O145:NM[H28]/*stx1a/eae-γ/ehxA/lpfA1-5*, mostrando una gran diseminación, tendencia y estabilidad de cepas de gran virulencia portadoras de Stx2 y no Stx1.

En este estudio, además, se demostró la alta diversidad de las cepas STEC O145 que circulan en el país. Entre 286 cepas, se identificaron 204 patrones *XbaI*-PFGE con un porcentaje de similitud del 58,7%. El patrón ARENMX01.0006 fue el más frecuentemente detectado en Argentina a lo largo del tiempo (14/204; 6,7%). Los patrones asociados a los brotes fueron variables y el patrón ARENMX01.0006 se ha identificado en sólo dos de los brotes estudiados en 2005 y 2006 (Apéndice IV). En uno de los *clusters* analizados (*cluster* VIII) se pudo establecer la relación clonal entre cepas humanas y bovinas, con un 100% de similitud. Este patrón *XbaI*-PFGE (ARENMX01.0084) se reconoció por primera vez en 2007 en bovinos y humanos pudiéndose establecer la circulación de un mismo clon tanto en reservorio como en humanos sin vínculo epidemiológico. Esto hace sospechar su circulación de forma intermitente ya que se detectó años siguientes en casos clínicos. En otro estudio realizado en Argentina, se estableció una asociación similar entre cepas STEC O157:H7 humanas y bovinas aisladas durante el mismo período. En ese trabajo se detectaron cinco grupos o *clusters* de cepas humanas y bovinas con un 100% de similitud entre ellas (D'Astek et al. 2012).

Del total de casos asociados a STEC O145 durante este período, el 56,6 % correspondió a casos de SUH y cinco de ellos fallecieron (1,8 %). Es de destacar que la mayoría de los casos que ocurren en Argentina se corresponden con enfermedad grave y esto podría estar directamente relacionado con el perfil de gran potencial de virulencia, que además se detecta con mayor frecuencia. La descripción de dicho perfil sería evidencia importante como para poder asociar a este patógeno con el gran número de casos de enfermedad severa en el país por STEC O145. Por otro lado, si nos referimos solo a los casos totales de SUH en dicho período, el SUH-STE C O145 (n = 154) representa el 16,2% de todos los casos de SUH estudiados en el mismo período (n = 953), lo que confirma que es el segundo serogrupo asociado a enfermedad grave en nuestro

país, después del SUH-STE_C O157:H7 (73,8 %). En tercer lugar, podemos mencionar SUH-STE_C O121 que se encontró en un 2,1 % de los casos, mostrando una gran diferencia en cuanto a la frecuencia de los principales serogrupos. Esto está disponible en los informes nacionales (BIV .2022: n-630-se-48-2022) donde se presentan STE_C O157:H7 y O145:NM/H28 a lo largo de los años. Además de la asociación con enfermedad grave, debemos considerar que STE_C O145 se encuentra asociado con otras manifestaciones clínicas, tales como diarrea sanguinolenta (17,3 %), diarrea (16,5%), contactos asintomáticos (5,9 %) y diagnóstico clínico desconocido (4 %). Se estima que este patógeno circula en nuestro país desde hace varios años, teniendo en cuenta que el primer aislamiento se detectó a partir de un caso de SUH notificado en 1998, momento en el que el NRL comenzaba a implementar PCR específicas para *stx* descriptas previamente por Paton y Paton (1998).

A pesar de que la mayoría de los casos se reportaron como eventos esporádicos, también se detectaron brotes asociados a STE_C O145. La estrategia del sistema de vigilancia implementada en el país permite la posibilidad de detectar brotes de tipo comunitario cerrados. En general, los eventos ocurren en ambientes familiares o institucionales acotados. El número de personas involucradas en cada brote detectado por el procedimiento de seguimiento epidemiológico mostró que la transmisión persona a persona fue la vía de diseminación más probable. Independientemente del esfuerzo en la investigación, no se pudo identificar la asociación con la fuente de infección en ninguno de los brotes descriptos. Sin embargo, uno de los brotes de jardín de infantes estuvo asociado con el agua recreativa, aunque no se recuperó ninguna cepa de STE_C para confirmar esta hipótesis. Otros países también han informado brotes asociados con O145. En Alemania, un brote ocurrido en 1999 ha sido descrito con dos casos positivos para STE_C O145:H28, sin asociación con una fuente de contagio (Mathusa et al. 2010). En Bélgica se notificó un brote de STE_C O145 y se pudo establecer la relación de los casos con el consumo de helado como vehículo de infección. Este evento ocurrió en dos fiestas de cumpleaños sucesivas celebradas en una finca con cinco casos de SUH; cuatro de ellos fueron confirmados como positivos para STE_C O145 y uno incluía una coinfección con STE_C O26 (De Schrijver et al. 2008). En 2009, en Noruega se notificó un brote en una guardería con 16 casos de diarrea, particularmente asociados a STE_C O145:H28/*stx*₁/*eae* (Wahl et al. 2011). En el año 2010 en los Estados Unidos se notificó un brote denominado de multi Estado pudiéndose establecer el vínculo en 5 estados diferentes. La causa del brote estuvo asociada al consumo de lechuga romana rayada lista para el consumo. Se confirmaron 26 casos por infección con STE_C O145, de los cuales 14 tuvieron que ser hospitalizados y 3 de ellos evolucionaron a SUH (Taylor et al. 2013). Durante 2012 se notificó otro brote con 18 casos de infección por STE_C O145 en

nueve estados diferentes (cuatro pacientes debieron ser hospitalizados y uno de ellos falleció), sin confirmación de fuente (CDC, 2012).

Además del estudio de brotes, la estrategia del sistema de vigilancia también ha permitido el estudio y seguimiento prolongado de algunos casos y contactos, especialmente cuando se trata en un contexto de brote. En total, se identificaron 7 casos con más de una muestra positiva para STEC O145, aislada durante el periodo de eliminación fecal. Esto da cuenta de la duración en el tiempo que puede tener la portación y el potencial de diseminación de este patógeno, como en el caso del brote ocurrido en 2005 en Rosario, donde el caso índice presentó excreción intermitente y persistente en el tiempo por alrededor de 20 días (Miliwebsky *et al.* 2007). La portación y excreción de STEC por tiempo prolongado se ha descrito previamente en Alemania (Karch *et al.* 1995). La baja dosis infectiva de STEC es un factor determinante que facilita la transmisión del patógeno, principalmente de persona a persona y a través del consumo de alimentos contaminados (Paton y Paton, 1998). Además, hay varios factores del huésped que influyen en el riesgo de adquirir una infección por STEC, como la edad, la inmunidad, el estado de salud, el uso de antibióticos y agentes anti-motilidad intestinal, el estrés y los factores genéticos (Rivas *et al.* 2014). Por lo tanto, siempre es importante realizar un seguimiento de los pacientes y evaluar las infecciones por STEC también entre los convivientes, para interrumpir el ciclo de transmisión.

Si bien en Argentina STEC O145:NM no es un serotipo frecuentemente aislado de reservorio, en este estudio describimos cuatro cepas STEC O145:NM de origen bovino. Tres de dichas cepas fueron aisladas en el marco de una investigación realizada en mataderos y frigoríficos, representando solo el 1% de las cepas aisladas de heces bovinas (Masana *et al.* 2011). La cuarta cepa estudiada, fue parte de un estudio en colaboración con el INTA durante 1999 y es por tanto hasta el momento considerada el primer registro de origen bovino de STEC O145 (Meichtri *et al.* 2004). Por otro lado, otros autores que han trabajado en estudios de portación en Argentina describieron unos 31 serogrupos diferentes aislados de carcasas, cortes y recortes de carne vacuna en un matadero de exportación del país, sin embargo, no han identificado O145 durante ese muestreo (Brusa *et al.* 2017). En otro estudio llevado a cabo en animales de compañía se aisló STEC O145 de un gato doméstico, que convivía con un niño que padecía SUH. Si bien del caso se pudo detectar otro serogrupo diferente de STEC, esto indicaría el potencial de contagio y lo importante que podrían ser las medidas de higiene para controlar la transmisión del patógeno (Rumi *et al.* 2012). En nuestro país, hasta el momento no se ha descrito ningún hallazgo de STEC O145 en alimentos. Sin embargo, es importante reforzar la vigilancia en alimentos, considerando que en diferentes países este patógeno se ha asociado con infecciones

en humanos luego del consumo de diferentes tipos de alimentos, como helado artesanal, lechuga lista para el consumo (CDC, 2010; De Schrijver et al. 2008 y Wahl et al. 2011), y carne de venado poco cocida (Rounds et al. 2012).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo permitieron conocer con más detalle las características de las cepas STEC O145 que circulan en Argentina. Si nos referimos a la detección de STEC no-O157, podemos decir que es un desafío para el diagnóstico de infecciones humanas. Resulta muy dificultoso en el cultivo bacteriano diferenciar estos patógenos del resto de las cepas de *E. coli* comensales dado que presentan las mismas características morfológicas. Por tanto, es muy importante conocer los perfiles genéticos de virulencia del patógeno para poder detectarlo mediante las técnicas adecuadas de biología molecular.

VI. CONCLUSIONES

- En este estudio se completó la caracterización de las cepas STEC O145 aisladas en Argentina en el período 1998-2012 y se analizó el perfil de virulencia de estas. El conocimiento del potencial virulento de estas cepas es fundamental para una mejor comprensión del impacto que generan en Salud Pública.

- Se identificaron 9 perfiles de virulencia diferentes y podemos decir que los factores de virulencia para este serogrupo están muy conservados, siendo O145:NM[H28], *stx2a*, *eae-γ*, *ehxA*, *lpfA1-5* el perfil prototipo mayoritario de las cepas circulantes en Argentina. Sin embargo, a partir del estudio de subtipificación por *XbaI*-PFGE podemos inferir que las cepas presentan una gran diversidad genética debido a la gran cantidad de patrones únicos que se obtuvieron respecto de la cantidad de cepas estudiadas y que muchos de ellos se mantuvieron viables en el tiempo.

- Se observó un mismo patrón de PFGE en cepas de reservorio bovino y de aislamientos clínicos, esto pone de manifiesto la circulación de un clon potencialmente exitoso que pasa del reservorio al humano y / o viceversa.

- Los resultados obtenidos demuestran que las cepas STEC O145 que circulan en Argentina, no solo presentan un perfil genético con gran potencial virulento, sino que como son detectadas con alta frecuencia, constituyen un factor de riesgo importante. Son causales de enfermedad en humanos, desde una diarrea sin complicación, hasta casos severos como diarrea sanguinolenta y SUH. También se encuentran asociadas a brotes y pueden ser excretadas por períodos largos e intermitentes como así también infectar a individuos de manera asintomática.

- De acuerdo entonces a la virulencia demostrada en este trabajo que poseen las cepas de STEC O145:H28, se puede inferir que la severidad de los casos en Argentina no solo está vinculada a la infección por STEC O157:H7 que es el prototipo más importante a nivel mundial, sino que también está relacionada con este serotipo que es el segundo detectado en frecuencia en nuestro país.

- A partir de este estudio, debemos destacar la importancia y la necesidad de mejorar los algoritmos de diagnóstico orientados a identificar este tipo de patógenos. Esto permite monitorear la circulación, prevalencia y la detección de brotes asociados a STEC O145 y otros serogrupos significativos, y por lo tanto facilita a los agentes responsables de las distintas áreas (clínica, alimentos y reservorio animal) la toma de decisiones para la implementación de medidas adecuadas de control y prevención.

-El monitoreo de las cepas circulantes de STEC O145 que se aíslan de casos clínicos, del reservorio animal y del ambiente es de suma importancia para conocer la epidemiología de este patógeno, para prevenir y/o controlar oportunamente la ocurrencia de casos esporádicos, como brotes familiares e institucionales.

-Para ellos es necesario contar con un sistema de vigilancia fortalecido que permita establecer las estrategias de prevención y control de las enfermedades asociadas a la infección por STEC, que las mismas sean dinámicas y se adapten a los cambios que estos patógenos pueden manifestar eventualmente, a fin de disminuir la incidencia de SUH en nuestro país de forma eficaz.

-Por lo tanto es fundamental fortalecer el sistema de vigilancia para prevenir casos humanos asociados a STEC O145 y otros STEC no-O157, así como también monitorear la circulación de este patógeno en los posibles reservorios y en alimentos en nuestro país.

VII. PROPUESTA DE TRABAJOS A FUTURO

A partir de este estudio quedaron planteadas las siguientes líneas temáticas para su investigación:

- Caracterización de las cepas no móviles incorporando como parte de la rutina de diagnóstico las PCRs para determinar el gen *fliC*.
- Incorporación de la secuenciación de genoma completo (SGC) como una herramienta importante para facilitar el diagnóstico de rutina en los laboratorios. En este contexto, debido a la gran cantidad de información que aporta, la implementación de SGC será un gran avance que contribuirá a la mejora de la caracterización de las cepas y estudio de genes de virulencia accesorios.
- Fortalecimiento de la vigilancia epidemiológica a través de diferentes estudios locales que permitan establecer además de las características de virulencia de las cepas, su nicho ecológico y factores de riesgo de las infecciones por STEC O145.
- Estudios de los mecanismos de supervivencia y de evolución de la población STEC O145 en el país.
- Adecuación de la estrategia de vigilancia a las nuevas metodologías de secuenciación masiva.

VIII. REFERENCIAS

1. Ardissino, G., Possenti, I., Tel, F., Testa, S., & Paglialonga, F. (2014). Time to change the definition of hemolytic uremic syndrome. *European journal of internal medicine*, 25(2), e29. <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2013.12.002>
2. Bai, X., Fu, S., Zhang, J., Fan, R., Xu, Y., Sun, H., He, X., Xu, J., & Xiong, Y. (2018). Identification and pathogenomic analysis of an *Escherichia coli* strain producing a novel Shiga toxin 2 subtype. *Scientific reports*, 8(1), 6756. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25233-x>
3. Bai, X., Hu, B., Xu, Y., Sun, H., Zhao, A., Ba, P., Fu, S., Fan, R., Jin, Y., Wang, H., Guo, Q., Xu, X., Lu, S., & Xiong, Y. (2016). Molecular and Phylogenetic Characterization of Non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Strains in China. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 6, 143. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00143>
4. Bai, X., Scheutz, F., Dahlgren, H. M., Hedenström, I., & Jernberg, C. (2021). Characterization of Clinical *Escherichia coli* Strains Producing a Novel Shiga Toxin 2 Subtype in Sweden and Denmark. *Microorganisms*, 9(11), 2374. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9112374>
5. Bauwens, A., Bielaszewska, M., Kemper, B., Langehanenberg, P., von Bally, G., Reichelt, R., Mulac, D., Humpf, H. U., Friedrich, A. W., Kim, K. S., Karch, H., & Müthing, J. (2011). Differential cytotoxic actions of Shiga toxin 1 and Shiga toxin 2 on microvascular and macrovascular endothelial cells. *Thrombosis and haemostasis*, 105(3), 515–528. <https://doi.org/10.1160/TH10-02-0140>
6. Banco de Recursos de Comunicación del Ministerio de Salud de la Nación|Boletín integrado de vigilancia -BIV.2016: <https://bancos.salud.gob.ar/recurso/boletin-integrado-de-vigilancia-n296-se05-11022016>
7. Banco de Recursos de Comunicación del Ministerio de Salud de la Nación|Boletín integrado de vigilancia -BIV.2022: <https://bancos.salud.gob.ar/recurso/boletin-epidemiologico-nacional-n-630-se-48-2022>
8. Barrett, T. J., Gerner-Smidt, P., & Swaminathan, B. (2006). Interpretation of pulsed-field gel electrophoresis patterns in foodborne disease investigations and surveillance. *Foodborne pathogens and disease*, 3(1), 20–31. <https://doi.org/10.1089/fpd.2006.3.20>

9. Beier, R. C., Franz, E., Bono, J. L., Mandrell, R. E., Fratamico, P. M., Callaway, T. R., Andrews, K., Poole, T. L., Crippen, T. L., Sheffield, C. L., Anderson, R. C., & Nisbet, D. J. (2016). Disinfectant and Antimicrobial Susceptibility Profiles of the Big Six Non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Strains from Food Animals and Humans. *Journal of food protection*, 79(8), 1355–1370. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-15-600>
10. Bell, B. P., Goldoft, M., Griffin, P. M., Davis, M. A., Gordon, D. C., Tarr, P. I., Bartleson, C. A., Lewis, J. H., Barrett, T. J., & Wells, J. G. (1994). A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7-associated bloody diarrhea and hemolytic uremic syndrome from hamburgers. The Washington experience. *JAMA*, 272(17), 1349–1353.
11. Beutin, L., Delannoy, S., & Fach, P. (2015). Sequence Variations in the Flagellar Antigen Genes *fliCH25* and *fliCH28* of *Escherichia coli* and Their Use in Identification and Characterization of Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) O145:H25 and O145:H28. *PloS one*, 10(5), e0126749. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126749>
12. Beutin, L., Montenegro, M. A., Orskov, I., Orskov, F., Prada, J., Zimmermann, S., & Stephan, R. (1989). Close association of verotoxin (Shiga-like toxin) production with enterohemolysin production in strains of *Escherichia coli*. *Journal of clinical microbiology*, 27(11), 2559–2564. <https://doi.org/10.1128/jcm.27.11.2559-2564.1989>
13. Bielaszewska, M., Karch, H. (2000). Non-O157:H7 Shiga toxin (verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* strains: epidemiological significance and microbiological diagnosis. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 16, 711–718. <https://doi.org/10.1023/A:1008972605514>
14. Bielaszewska, M., Mellmann, A., Bletz, S., Zhang, W., Köck, R., Kossow, A., Prager, R., Fruth, A., Orth-Höller, D., Marejková, M., Morabito, S., Caprioli, A., Piérard, D., Smith, G., Jenkins, C., Curová, K., & Karch, H. (2013). Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26:H11/H-: a new virulent clone emerges in Europe. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 56(10), 1373–1381. <https://doi.org/10.1093/cid/cit055>
15. Blanco, J. E., Blanco, M., Alonso, M. P., Mora, A., Dahbi, G., Coira, M. A., & Blanco, J. (2004). Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from human patients: prevalence in Lugo, Spain,

- from 1992 through 1999. *Journal of clinical microbiology*, 42(1), 311–319. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.1.311-319.2004>
16. Brooks, J. T., Sowers, E. G., Wells, J. G., Greene, K. D., Griffin, P. M., Hoekstra, R. M., & Strockbine, N. A. (2005). Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in the United States, 1983-2002. *The Journal of infectious diseases*, 192(8), 1422–1429. <https://doi.org/10.1086/466536>
 17. Brusa, V., Restovich, V., Galli, L., Teitelbaum, D., Signorini, M., Brasesco, H., Londero, A., García, D., Padola, N. L., Superno, V., Sanz, M., Petrolì, S., Costa, M., Bruzzone, M., Sucari, A., Ferreghini, M., Linares, L., Suberbie, G., Rodríguez, R., & Leotta, G. A. (2017). Isolation and characterization of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from beef carcasses, cuts and trimmings of abattoirs in Argentina. *PloS one*, 12(8), e0183248. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183248>
 18. Bugarel, M., Beutin, L., Martin, A., Gill, A., & Fach, P. (2010). 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), 318–329. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.07.010>
 19. Bürk, C., Dietrich, R., Açar, G., Moravek, M., Bülte, M., & Märtlbauer, E. (2003). Identification and characterization of a new variant of Shiga toxin 1 in *Escherichia coli* ONT:H19 of bovine origin. *Journal of clinical microbiology*, 41(5), 2106–2112. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.5.2106-2112.2003>
 20. Buteau, C., Proulx, F., Chaibou, M., Raymond, D., Clermont, M. J., Mariscalco, M. M., Lebel, M. H., & Seidman, E. (2000). Leukocytosis in children with *Escherichia coli* O157:H7 enteritis developing the hemolytic-uremic syndrome. *The Pediatric infectious disease journal*, 19(7), 642–647. <https://doi.org/10.1097/00006454-200007000-00012>
 21. Caprioli, A., Morabito, S., Brugère, H., & Oswald, E. (2005). Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. *Veterinary research*, 36(3), 289–311. <https://doi.org/10.1051/vetres:2005002>
 22. Carter, M. Q., Quinones, B., He, X., Zhong, W., Louie, J. W., Lee, B. G., Yambao, J. C., Mandrell, R. E., & Cooley, M. B. (2015). An Environmental Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O145 Clonal Population Exhibits High-Level Phenotypic

Variation That Includes Virulence Traits. *Applied and environmental microbiology*, 82(4), 1090–1101. <https://doi.org/10.1128/AEM.03172-15>

23. Cavalcanti, A. M. F., Hernandes, R. T., Takagi, E. H., Guth, B. E. C., Ori, É. L., Pinheiro, S. R. S., Andrade, T. S., Oliveira, S. L., Cergole-Novella, M. C., Francisco, G. R., & Santos, L. F. D. (2020). Virulence Profiling and Molecular Typing of Shiga Toxin-Producing *E. coli* (STEC) from Human Sources in Brazil. *Microorganisms*, 8(2), 171. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8020171>
24. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (1993). Update: multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections from hamburgers--western United States, 1992-1993. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*, 42(14), 258–263.
25. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2006). Ongoing multistate outbreak of *Escherichia coli* serotype O157:H7 infections associated with consumption of fresh spinach--United States, September 2006. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*, 55(38), 1045–1046.
26. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2010). One-Day (24–48 h) Standardized Laboratory Protocol for Molecular Subtyping of *Escherichia coli* non-O157:H7 by Pulsed Field Gel Electrophoresis; Centers for Disease Control and Prevention: Atlanta, GA, USA, 2010.
27. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2012). Multistate Outbreak of Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* O145 Infections (Final Update)|Multistate Outbreak of Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* O145 Infections|*E. coli*|CDC. Available online: <https://www.cdc.gov/ecoli/2012/o145-06-12/index.html>
28. Cernicchiaro, N., Cull, C. A., Paddock, Z. D., Shi, X., Bai, J., Nagaraja, T. G., & Renter, D. G. (2013). Prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and associated virulence genes in feces of commercial feedlot cattle. *Foodborne pathogens and disease*, 10(10), 835–841. <https://doi.org/10.1089/fpd.2013.1526>
29. Cherla, R. P., Lee, S. Y., & Tesh, V. L. (2003). Shiga toxins and apoptosis. *FEMS microbiology letters*, 228(2), 159–166. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00761-4](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00761-4)
30. Chinen, I., Tanaro, J. D., Miliwebsky, E., Lound, L. H., Chillemi, G., Ledri, S., Baschkier, A., Scarpin, M., Manfredi, E., & Rivas, M. (2001). Isolation and characterization of *Escherichia coli* O157:H7 from retail meats in Argentina. *Journal of food protection*, 64(9), 1346–1351. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-64.9.1346>

31. CLSI: Clinical And Laboratory Standards Institute. Available online: https://webstore.ansi.org/sdo/clsi?gclid=CjwKCAjwhuCKBhADEiwA1HegOSWEmXu_Wr6gory5DOflzQ8G3rvIQrycbFPF1pMQOWO7zwxCswFT7hoC5XkQAvD_BwE
32. Craigie, J., 1931. Studies on the serological reactions of flagella of *B. typhosus*. *J. Immun.*, 21: 417
33. Comité de Nefrología (1995) Incidencia del Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) en la República Argentina. *Arch. Arg. de Pediatría* 93: 407-411.
34. D'Astek, B. A., del Castillo, L. L., Miliwebsky, E., Carbonari, C., Palladino, P. M., Deza, N., Chinen, I., Manfredi, E., Leotta, G. A., Masana, M. O., & Rivas, M. (2012). Subtyping of *Escherichia coli* O157:H7 strains isolated from human infections and healthy cattle in Argentina. *Foodborne pathogens and disease*, 9(5), 457–464. <https://doi.org/10.1089/fpd.2011.1062>
35. De Schrijver, K., Buvens, G., Possé, B., Van den Branden, D., Oosterlynck, O., De Zutter, L., Eilers, K., Piérard, D., Dierick, K., Van Damme-Lombaerts, R., Lauwers, C., & Jacobs, R. (2008). Outbreak of verocytotoxin-producing *E. coli* O145 and O26 infections associated with the consumption of ice cream produced at a farm, Belgium, 2007. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*, 13(7), 8041. <https://doi.org/10.2807/ese.13.07.08041-en>
36. Doughty, S., Sloan, J., Bennett-Wood, V., Robertson, M., Robins-Browne, R. M., & 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), 6761–6769. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.12.6761-6769.2002>
37. *EurBiophys J* (2014), doi: 10.1007/s00249-014-0995-4GelRed
38. Farfan, M. J., Cantero, L., Vidal, R., Botkin, D. J., & Torres, A. G. (2011). Long polar fimbriae of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 bind to extracellular matrix proteins. *Infection and immunity*, 79(9), 3744–3750. <https://doi.org/10.1128/IAI.05317-11>
39. Farfan, M. J., & Torres, A. G. (2012). Molecular mechanisms that mediate colonization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains. *Infection and immunity*, 80(3), 903–913. <https://doi.org/10.1128/IAI.05907-11>

40. Folster, J. P., Pecic, G., Taylor, E., & Whichard, J. (2011). Characterization of Isolates from an outbreak of multidrug-resistant, Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O145 in the United States. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 55(12), 5955–5956. <https://doi.org/10.1128/AAC.05545-11>
41. Frankel, G., Phillips, A. D., Trabulsi, L. R., Knutton, S., Dougan, G., & Matthews, S. (2001). Intimin and the host cell--is it bound to end in Tir(s)?: *Trends in microbiology*, 9(5), 214–218. [https://doi.org/10.1016/s0966-842x\(01\)02016-9](https://doi.org/10.1016/s0966-842x(01)02016-9)
42. Fratamico, P. M., DebRoy, C., Miyamoto, T., & Liu, Y. (2009). PCR detection of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O145 in food by targeting genes in the E. coli O145 O-antigen gene cluster and the shiga toxin 1 and shiga toxin 2 genes. *Foodborne pathogens and disease*, 6(5), 605–611. <https://doi.org/10.1089/fpd.2008.0254>
43. Fuller, C. A., Pellino, C. A., Flagler, M. J., Strasser, J. E., & Weiss, A. A. (2011). Shiga toxin subtypes display dramatic differences in potency. *Infection and immunity*, 79(3), 1329–1337. <https://doi.org/10.1128/IAI.01182-10>
44. Gannon, V. P., Teerling, C., Masri, S. A., & Gyles, C. L. (1990). Molecular cloning and nucleotide sequence of another variant of the *Escherichia coli* Shiga-like toxin II family. *Journal of general microbiology*, 136(6), 1125–1135. <https://doi.org/10.1099/00221287-136-6-1125>
45. Garmendia, J., Frankel, G., & Crepin, V. F. (2005). Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections: translocation, translocation, translocation. *Infection and immunity*, 73(5), 2573–2585. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.5.2573-2585.2005>
46. Gentle, A., Day, M. R., Hopkins, K. L., Godbole, G., & Jenkins, C. (2020). Antimicrobial resistance in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* other than serotype O157:H7 in England, 2014-2016. *Journal of medical microbiology*, 69(3), 379–386. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.001146>
47. Gianantonio, C. A., Vitacco, M., Mendilaharsu, F., Gallo, G. E., & Sojo, E. T. (1973). The hemolytic-uremic syndrome. *Nephron*, 11(2), 174–192. <https://doi.org/10.1159/000180229>
48. Gill, A., Dussault, F., McMahon, T., Petronella, N., Wang, X., Cebelinski, E., Scheutz, F., Weedmark, K., Blais, B., & Carrillo, C. (2022). Characterization of Atypical Shiga Toxin Gene Sequences and Description of Stx2j, a New Subtype. *Journal of clinical microbiology*, 60(3), e0222921. <https://doi.org/10.1128/jcm.02229-21>

49. Girón, J. A., Torres, A. G., Freer, E., & Kaper, J. B. (2002). The flagella of enteropathogenic *Escherichia coli* mediate adherence to epithelial cells. *Molecular microbiology*, *44*(2), 361–379. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02899.x>
50. Goldstein, M. H., Churg, J., Strauss, L., & Gribetz, D. (1979). Hemolytic-uremic syndrome. *Nephron*, *23*(6), 263–272. <https://doi.org/10.1159/000181648>
51. Gómez, D., Miliwebsky, E., Fernández Pascua, C., Baschkier, A., Manfredi, E., Zotta, M., Nario, F., Piquín, A., Sanz, M., Etcheverría, A., Padola, N., Parma, A., & Rivas, M. (2002). Aislamiento y caracterización de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga en hamburguesas supercongeladas y quesos de pasta blanda [Isolation and characterization of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* from frozen hamburgers and soft cheeses]. *Revista Argentina de microbiología*, *34*(2), 66–71.
52. Goosney, D. L., DeVinney, R., & Finlay, B. B. (2001). Recruitment of cytoskeletal and signaling proteins to enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* pedestals. *Infection and immunity*, *69*(5), 3315–3322. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.5.3315-3322.2001>
53. 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., Griffin, P. M., & Emerging Infections Program Foodnet Working Group (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), 453–460. <https://doi.org/10.1089/fpd.2012.1401>
54. Hartland, E. L., Batchelor, M., Delahay, R. M., Hale, C., Matthews, S., Dougan, G., Knutton, S., Connerton, I., & Frankel, G. (1999). Binding of intimin from enteropathogenic *Escherichia coli* to Tir and to host cells. *Molecular microbiology*, *32*(1), 151–158. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01338.x>
55. Heiman, K. E., Mody, R. K., Johnson, S. D., Griffin, P. M., & Gould, L. H. (2015). *Escherichia coli* O157 Outbreaks in the United States, 2003-2012. *Emerging infectious diseases*, *21*(8), 1293–1301. <https://doi.org/10.3201/eid2108.141364>
56. Ito, H., Terai, A., Kurazono, H., Takeda, Y., & Nishibuchi, M. (1990). Cloning and nucleotide sequencing of Vero toxin 2 variant genes from *Escherichia coli* O91:H21 isolated from a patient with the hemolytic uremic syndrome. *Microbial pathogenesis*, *8*(1), 47–60. [https://doi.org/10.1016/0882-4010\(90\)90007-d](https://doi.org/10.1016/0882-4010(90)90007-d)

57. Jandhyala, D. M., Thorpe, C. M., & Magun, B. (2012). Ricin and Shiga toxins: effects on host cell signal transduction. *Current topics in microbiology and immunology*, 357, 41–65. https://doi.org/10.1007/82_2011_181
58. Jure, M. A., Condorí, M. S., Pérez Terrazzino, G., Catalán, M. G., López Campo, A., Zolezzi, G., Chinen, I., Rivas, M., & Castillo, M. (2015). Aislamiento y caracterización de *Escherichia coli* O157 en productos cárnicos bovinos y medias reses en la provincia de Tucumán [Isolation and characterization of *Escherichia coli* O157 in bovine meat products and cattle in the province of Tucuman]. *Revista Argentina de microbiología*, 47(2), 125–131. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2015.03.006>
59. Karch, H., Rüssmann, H., Schmidt, H., Schwarzkopf, A., & Heesemann, J. (1995). Long-term shedding and clonal turnover of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 in diarrheal diseases. *Journal of clinical microbiology*, 33(6), 1602–1605. <https://doi.org/10.1128/jcm.33.6.1602-1605.1995>
60. Karmali, M. A., Steele, B. T., Petric, M., & Lim, C. (1983). Sporadic cases of haemolytic-uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. *Lancet (London, England)*, 1(8325), 619–620. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(83\)91795-6](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(83)91795-6)
61. Karmali, M. A., Petric, M., Lim, C., Fleming, P. C., Arbus, G. S., & Lior, H. (1985). The association between idiopathic hemolytic uremic syndrome and infection by verotoxin-producing *Escherichia coli*. *The Journal of infectious diseases*, 151(5), 775–782. <https://doi.org/10.1093/infdis/151.5.775>
62. Karmali, M. A., Mascarenhas, M., Shen, S., Ziebell, K., Johnson, S., Reid-Smith, R., Isaac-Renton, J., Clark, C., Rahn, K., & 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), 4930–4940. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.11.4930-4940.2003>
63. Konowalchuk, J., Speirs, J. I., & Stavric, S. (1977). Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infection and immunity*, 18(3), 775–779. <https://doi.org/10.1128/iai.18.3.775-779.1977>
64. Lacher, D. W., Gangiredla, J., Patel, I., Elkins, C. A., & Feng, P. C. (2016). Use of the *Escherichia coli* Identification Microarray for Characterizing the Health Risks of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolated from Foods. *Journal of food protection*, 79(10), 1656–1662. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-16-176>

65. Leotta, G. A., Deza, N., Origlia, J., Toma, C., Chinen, I., Miliwebsky, E., Iyoda, S., Sosa-Estani, S., & Rivas, M. (2006). Detection and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in captive non-domestic mammals. *Veterinary microbiology*, *118*(1-2), 151–157. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.07.006>
66. Leung, P. H., Peiris, J. S., Ng, W. W., Robins-Browne, R. M., Bettelheim, K. A., & Yam, W. C. (2003). A newly discovered verotoxin variant, VT2g, produced by bovine verocytotoxigenic *Escherichia coli*. *Applied and environmental microbiology*, *69*(12), 7549–7553. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.12.7549-7553.2003>
67. Llorente, P., Barnech, L., Irino, K., Rumi, M. V., & Bentancor, A. (2014). Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from ground beef collected in different socioeconomic strata markets in Buenos Aires, Argentina. *BioMed research international*, *2014*, 795104. <https://doi.org/10.1155/2014/795104>
68. Lorenz, S. C., Gonzalez-Escalona, N., Kotewicz, M. L., Fischer, M., & Kase, J. A. (2017). Genome sequencing and comparative genomics of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O145:H25 and O145:H28 reveal distinct evolutionary paths and marked variations in traits associated with virulence & colonization. *BMC microbiology*, *17*(1), 183. <https://doi.org/10.1186/s12866-017-1094-3>
69. Louise, C. B., & Obrig, T. G. (1995). Specific interaction of *Escherichia coli* O157:H7-derived Shiga-like toxin II with human renal endothelial cells. *The Journal of infectious diseases*, *172*(5), 1397–1401. <https://doi.org/10.1093/infdis/172.5.1397>
70. Manual de Procedimientos (2019). “*Escherichia coli* productor de toxina Shiga en el marco de la detección de *E. coli* diarregénico”. Buenos Aires: INEI-ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”
71. Marques LRM, Peiris JSM, Cryz SJ, O’Brien (1987). *Escherichia coli* strains isolated from pigs with edema disease produce a variant of Shiga-like toxin II. *FEMS Lett* *44*:33-8
72. Masana, M. O., D’Astek, B. A., Palladino, P. M., Galli, L., Del Castillo, L. L., Carbonari, C., Leotta, G. A., Vilacoba, E., Irino, K., & Rivas, M. (2011). Genotypic characterization of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef abattoirs of Argentina. *Journal of food protection*, *74*(12), 2008–2017. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-11-189>

73. Masana, M. O., Leotta, G. A., Del Castillo, L. L., D'Astek, B. A., Palladino, P. M., Galli, L., Vilacoba, E., Carbonari, C., Rodríguez, H. R., & Rivas, M. (2010). Prevalence, characterization, and genotypic analysis of *Escherichia coli* O157:H7/NM from selected beef exporting abattoirs of Argentina. *Journal of food protection*, 73(4), 649–656. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-73.4.649>
74. Mathusa, E. C., Chen, Y., Enache, E., & Hontz, L. (2010). Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in foods. *Journal of food protection*, 73(9), 1721–1736. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-73.9.1721>
75. Mead, P. S., & Griffin, P. M. (1998). *Escherichia coli* O157:H7. *Lancet (London, England)*, 352(9135), 1207–1212. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(98\)01267-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(98)01267-7)
76. Meichtri, L., Miliwebsky, E., Gioffré, A., Chinen, I., Baschkier, A., Chillemi, G., Guth, B. E., Masana, M. O., Cataldi, A., Rodríguez, H. R., & Rivas, M. (2004). Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in healthy young beef steers from Argentina: prevalence and virulence properties. *International journal of food microbiology*, 96(2), 189–198. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.018>
77. Mele, C., Remuzzi, G., & Noris, M. (2014). Hemolytic uremic syndrome. *Seminars in immunopathology*, 36(4), 399–420. <https://doi.org/10.1007/s00281-014-0416-x>
78. Melton-Celsa, A. R., Darnell, S. C., & O'Brien, A. D. (1996). Activation of Shiga-like toxins by mouse and human intestinal mucus correlates with virulence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O91:H21 isolates in orally infected, streptomycin-treated mice. *Infection and immunity*, 64(5), 1569–1576. <https://doi.org/10.1128/iai.64.5.1569-1576.1996>
79. Melton-Celsa A. R. (2014). Shiga Toxin (Stx) Classification, Structure, and Function. *Microbiology spectrum*, 2(4), 10.1128/microbiolspec.EHEC-0024-2013. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.EHEC-0024-2013>
80. Meng, Q., Bai, X., Zhao, A., Lan, R., Du, H., Wang, T., Shi, C., Yuan, X., Bai, X., Ji, S., Jin, D., Yu, B., Wang, Y., Sun, H., Liu, K., Xu, J., & Xiong, Y. (2014). Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from healthy pigs in China. *BMC microbiology*, 14, 5. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-14-5>
81. Meyer, K. J., Appletoft, C. M., Schwemm, A. K., Uzoigwe, J. C., & Brown, E. J. (2005). Determining the source of fecal contamination in recreational waters. *Journal of environmental health*, 68(1), 25–30.
82. Miliwebsky, E., Deza, N., Chinen, I., Martinez Espinosa, E., Gomez, D., Pedroni, E., Caprile, L., Bashckier, A., Manfredi, E., Leotta, G., & Rivas, M. (2007). Prolonged

- fecal shedding of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* among children attending day-care centers in Argentina. *Revista Argentina de microbiologia*, 39(2), 90–92.
83. Nataro, J. P., & Kaper, J. B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical microbiology reviews*, 11(1), 142–201. <https://doi.org/10.1128/CMR.11.1.142>
 84. Orskov, F., & Orskov, I. (1992). *Escherichia coli* serotyping and disease in man and animals. *Canadian journal of microbiology*, 38(7), 699–704.
 85. Ostroff, S. M., Tarr, P. I., Neill, M. A., Lewis, J. H., Hargrett-Bean, N., & Kobayashi, J. M. (1989). Toxin genotypes and plasmid profiles as determinants of systemic sequelae in *Escherichia coli* O157:H7 infections. *The Journal of infectious diseases*, 160(6), 994–998. <https://doi.org/10.1093/infdis/160.6.994>
 86. Oteiza, J. M., Chinen, I., Miliwebsky, E., & Rivas, M. (2006). Isolation and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from precooked sausages (morcillas). *Food microbiology*, 23(3), 283–288. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2005.04.003>
 87. Panos, G. Z., Betsi, G. I., & Falagas, M. E. (2006). Systematic review: are antibiotics detrimental or beneficial for the treatment of patients with *Escherichia coli* O157:H7 infection?. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 24(5), 731–742. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2006.03036.x>
 88. Parma, A. E., Sanz, M. E., Blanco, J. E., Blanco, J., Viñas, M. R., Blanco, M., Padola, N. L., & Etcheverría, 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), 757–762. <https://doi.org/10.1023/a:1026746016896>
 89. Paton, J. C., & Paton, A. W. (1998). Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clinical microbiology reviews*, 11(3), 450–479. <https://doi.org/10.1128/CMR.11.3.450>
 90. Persad, A. K., & LeJeune, J. T. (2014). Animal Reservoirs of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. *Microbiology spectrum*, 2(4). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.EHEC-0027-2014>
 91. Pianciola, L., Chinen, I., Mazzeo, M., Miliwebsky, E., González, G., Müller, C., Carbonari, C., Navello, M., Zitta, E., & Rivas, M. (2014). Genotypic characterization of *Escherichia coli* O157:H7 strains that cause diarrhea and hemolytic uremic

- syndrome in Neuquén, Argentina. *International journal of medical microbiology : IJMM*, 304(3-4), 499–504. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2014.02.011>
92. Piérard, D., Muyltermans, G., Moriau, L., Stevens, D., & Lauwers, S. (1998). Identification of new verocytotoxin type 2 variant B-subunit genes in human and animal *Escherichia coli* isolates. *Journal of clinical microbiology*, 36(11), 3317–3322. <https://doi.org/10.1128/JCM.36.11.3317-3322.1998>
 93. Probert, W. S., McQuaid, C., & Schrader, K. (2014). Isolation and identification of an *Enterobacter cloacae* strain producing a novel subtype of Shiga toxin type 1. *Journal of clinical microbiology*, 52(7), 2346–2351. <https://doi.org/10.1128/JCM.00338-14>
 94. Ramachandran, V., Brett, K., Hornitzky, M. A., Dowton, M., Bettelheim, K. A., Walker, M. J., & Djordjevic, S. P. (2003). Distribution of intimin subtypes among *Escherichia coli* isolates from ruminant and human sources. *Journal of clinical microbiology*, 41(11), 5022–5032. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.11.5022-5032.2003>
 95. Ribot, E. M., Fair, M. A., Gautom, R., Cameron, D. N., Hunter, S. B., Swaminathan, B., & Barrett, T. J. (2006). Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. *Foodborne pathogens and disease*, 3(1), 59–67. <https://doi.org/10.1089/fpd.2006.3.59>
 96. Riley, L. W., Remis, R. S., Helgerson, S. D., McGee, H. B., Wells, J. G., Davis, B. R., Hebert, R. J., Olcott, E. S., Johnson, L. M., Hargrett, N. T., Blake, P. A., & Cohen, M. L. (1983). Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *The New England journal of medicine*, 308(12), 681–685. <https://doi.org/10.1056/NEJM198303243081203>
 97. Rivas, M., Miliwebsky, E., Chinen, I., Deza, N., & Leotta, G. A. (2006a). Epidemiología del síndrome urémico hemolítico en Argentina. Diagnóstico del agente etiológico, reservorios y vías de transmisión [The epidemiology of hemolytic uremic syndrome in Argentina. Diagnosis of the etiologic agent, reservoirs and routes of transmission]. *Medicina*, 66 Suppl 3, 27–32.
 98. Rivas, M., Miliwebsky, E., Chinen, I., Roldán, C. D., Balbi, L., García, B., Fiorilli, G., Sosa-Estani, S., Kincaid, J., Rangel, J., Griffin, P. M., & Case-Control Study Group (2006b). Characterization and epidemiologic subtyping of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from hemolytic uremic syndrome and diarrhea cases

- in Argentina. *Foodborne pathogens and disease*, 3(1), 88–96.
<https://doi.org/10.1089/fpd.2006.3.88>
99. Rivas, M., Chinen, I., Miliwebsky, E., & Masana, M. (2014). Risk Factors for Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*-Associated Human Diseases. *Microbiology spectrum*, 2(5), 10.1128/microbiolspec.EHEC-0002-2013.
<https://doi.org/10.1128/microbiolspec.EHEC-0002-2013>
 100. Rounds, J. M., Rigdon, C. E., Muhl, L. J., Forstner, M., Danzeisen, G. T., Koziol, B. S., Taylor, C., Shaw, B. T., Short, G. L., & Smith, K. E. (2012). Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* associated with venison. *Emerging infectious diseases*, 18(2), 279–282. <https://doi.org/10.3201/eid1802.110855>
 101. Rumi, M. V., Irino, K., Deza, N., Huguet, M. J., & Bentancor, A. B. (2012). First isolation in Argentina of a highly virulent Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O145:NM from a domestic cat. *Journal of infection in developing countries*, 6(4), 358–363. <https://doi.org/10.3855/jidc.2225>
 102. Scheutz, F., Teel, L. D., Beutin, L., Piérard, D., Buvens, G., Karch, H., Mellmann, A., Caprioli, A., Tozzoli, R., Morabito, S., Strockbine, N. A., Melton-Celsa, A. R., Sanchez, M., Persson, S., & O'Brien, A. D. (2012). Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing Stx nomenclature. *Journal of clinical microbiology*, 50(9), 2951–2963. <https://doi.org/10.1128/JCM.00860-12>
 103. Scheutz F. (2014). Taxonomy Meets Public Health: The Case of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. *Microbiology spectrum*, 2(3), 10.1128/microbiolspec.EHEC-0019-2013.
<https://doi.org/10.1128/microbiolspec.EHEC-0019-2013>
 104. Schmidt, H., Montag, M., Bockemühl, J., Heesemann, J., & Karch, H. (1993). Shiga-like toxin II-related cytotoxins in *Citrobacter freundii* strains from humans and beef samples. *Infection and immunity*, 61(2), 534–543. <https://doi.org/10.1128/iai.61.2.534-543.1993>
 105. Schmidt, H., Beutin, L., & Karch, H. (1995). Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933. *Infection and immunity*, 63(3), 1055–1061. <https://doi.org/10.1128/iai.63.3.1055-1061.1995>
 106. Siegler, R., & Oakes, R. (2005). Hemolytic uremic syndrome; pathogenesis, treatment, and outcome. *Current opinion in pediatrics*, 17(2), 200–204. <https://doi.org/10.1097/01.mop.0000152997.66070.e9>

107. Sonntag, A. K., Prager, R., Bielaszewska, M., Zhang, W., Fruth, A., Tschäpe, H., & Karch, H. (2004). Phenotypic and genotypic analyses of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O145 strains from patients in Germany. *Journal of clinical microbiology*, 42(3), 954–962. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.3.954-962.2004>
108. Spinale, J. M., Ruebner, R. L., Copelovitch, L., & Kaplan, B. S. (2013). Long-term outcomes of Shiga toxin hemolytic uremic syndrome. *Pediatric nephrology (Berlin, Germany)*, 28(11), 2097–2105. <https://doi.org/10.1007/s00467-012-2383-6>
109. Stearns-Kurosawa, D. J., Collins, V., Freeman, S., Tesh, V. L., & Kurosawa, S. (2010). Distinct physiologic and inflammatory responses elicited in baboons after challenge with Shiga toxin type 1 or 2 from enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infection and immunity*, 78(6), 2497–2504. <https://doi.org/10.1128/IAI.01435-09>
110. Stearns-Kurosawa, D. J., Oh, S. Y., Cherla, R. P., Lee, M. S., Tesh, V. L., Papin, J., Henderson, J., & Kurosawa, S. (2013). Distinct renal pathology and a chemotactic phenotype after enterohemorrhagic *Escherichia coli* Shiga toxins in non-human primate models of hemolytic uremic syndrome. *The American journal of pathology*, 182(4), 1227–1238. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.12.026>
111. Swerdlow, D. L., & Griffin, P. M. (1997). Duration of faecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 among children in day-care centres. *Lancet (London, England)*, 349(9054), 745–746. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)60196-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)60196-1)
112. Tanaro, J. D., Leotta, G. A., Lound, L. H., Galli, L., Piaggio, M. C., Carbonari, C. C., Araujo, S., & Rivas, M. (2010). *Escherichia coli* O157 in bovine feces and surface water streams in a beef cattle farm of Argentina. *Foodborne pathogens and disease*, 7(4), 475–477. <https://doi.org/10.1089/fpd.2009.0431>
113. Tanaro, J. D., Galli, L., Lound, L. H., Leotta, G. A., Piaggio, M. C., Carbonari, C. C., Irino, K., & Rivas, M. (2012). Non-O157:H7 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in bovine rectums and surface water streams on a beef cattle farm in Argentina. *Foodborne pathogens and disease*, 9(10), 878–884. <https://doi.org/10.1089/fpd.2012.1182>
114. Tarr PI, Gordon CA, Chandler WL (2005). Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome. *Lancet*, 365:1073-1086.
115. Terajima, J., Iyoda, S., Ohnishi, M., & Watanabe, H. (2014). Shiga Toxin (Verotoxin)-Producing *Escherichia coli* in Japan. *Microbiology spectrum*, 2(5), 10.1128/microbiolspec.EHEC-0011-2013. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.EHEC-0011-2013>

116. Taylor, E. V., Nguyen, T. A., Machesky, K. D., Koch, E., Sotir, M. J., Bohm, S. R., Folster, J. P., Bokanyi, R., Kupper, A., Bidol, S. A., Emanuel, A., Arends, K. D., Johnson, S. A., Dunn, J., Stroika, S., Patel, M. K., & Williams, I. (2013). Multistate outbreak of *Escherichia coli* O145 infections associated with romaine lettuce consumption, 2010. *Journal of food protection*, 76(6), 939–944. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-12-503>
117. Thomas, S. G., Glover, M. A., Parthasarathy, A., Wong, N. H., Shipman, P. A., & Hudson, A. O. (2020). Expression of a Shiga-Like Toxin during Plastic Colonization by Two Multidrug-Resistant Bacteria, *Aeromonas hydrophila* RIT668 and *Citrobacter freundii* RIT669, Isolated from Endangered Turtles (*Clemmys guttata*). *Microorganisms*, 8(8), 1172. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8081172>
118. Taylor, E. V., Nguyen, T. A., Machesky, K. D., Koch, E., Sotir, M. J., Bohm, S. R., Folster, J. P., Bokanyi, R., Kupper, A., Bidol, S. A., Emanuel, A., Arends, K. D., Johnson, S. A., Dunn, J., Stroika, S., Patel, M. K., & Williams, I. (2013). Multistate outbreak of *Escherichia coli* O145 infections associated with romaine lettuce consumption, 2010. *Journal of food protection*, 76(6), 939–944. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-12-503>
119. Torres, A. G., Giron, J. A., Perna, N. T., Burland, V., Blattner, F. R., Avelino-Flores, F., & Kaper, J. B. (2002). Identification and characterization of lpfABCC'DE, a fimbrial operon of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infection and immunity*, 70(10), 5416–5427. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.10.5416-5427.2002>
120. Torres, A. G., Kanack, K. J., Tutt, C. B., Popov, V., & Kaper, J. B. (2004). Characterization of the second long polar (LP) fimbriae of *Escherichia coli* O157:H7 and distribution of LP fimbriae in other pathogenic *E. coli* strains. *FEMS microbiology letters*, 238(2), 333–344. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.07.053>
121. Torres, A. G., Blanco, M., Valenzuela, P., Slater, T. M., Patel, S. D., Dahbi, G., López, C., Barriga, X. F., Blanco, J. E., Gomes, T. A., Vidal, R., & Blanco, J. (2009). Genes related to long polar fimbriae of pathogenic *Escherichia coli* strains as reliable markers to identify virulent isolates. *Journal of clinical microbiology*, 47(8), 2442–2451. <https://doi.org/10.1128/JCM.00566-09>
122. Tyler, S. D., Johnson, W. M., Lior, H., Wang, G., & Rozee, K. R. (1991). Identification of verotoxin type 2 variant B subunit genes in *Escherichia coli* by the polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. *Journal of*

- clinical microbiology*, 29(7), 1339–1343. <https://doi.org/10.1128/jcm.29.7.1339-1343.1991>
123. Tzipori, S., Gunzer, F., Donnenberg, M. S., de Montigny, L., Kaper, J. B., & Donohue-Rolfe, A. (1995). The role of the *eaeA* gene in diarrhea and neurological complications in a gnotobiotic piglet model of enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection. *Infection and immunity*, 63(9), 3621–3627. <https://doi.org/10.1128/iai.63.9.3621-3627.1995>
124. Vali, L., Hamouda, A., Hoyle, D. V., Pearce, M. C., Whitaker, L. H., Jenkins, C., Knight, H. I., Smith, A. W., & Amyes, S. G. (2007). Antibiotic resistance and molecular epidemiology of *Escherichia coli* O26, O103 and O145 shed by two cohorts of Scottish beef cattle. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 59(3), 403–410. <https://doi.org/10.1093/jac/dkl491>
125. Vishram, B., Jenkins, C., Greig, D. R., Godbole, G., Carroll, K., Balasegaram, S., & Byrne, L. (2021). The emerging importance of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* other than serogroup O157 in England. *Journal of medical microbiology*, 70(7), 001375. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.001375>
126. Wadl, M., Rieck, T., Nachtnebel, M., Greutelaers, B., an der Heiden, M., Altmann, D., Hellenbrand, W., Faber, M., Frank, C., Schweickert, B., Krause, G., Benzler, J., Eckmanns, T., & HUS surveillance and laboratory team (2011). Enhanced surveillance during a large outbreak of bloody diarrhoea and haemolytic uraemic syndrome caused by Shiga toxin/verotoxin-producing *Escherichia coli* in Germany, May to June 2011. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*, 16(24), 19893. <https://doi.org/10.2807/ese.16.24.19893-en>
127. Wahl, E., Vold, L., Lindstedt, B. A., Bruheim, T., & Afset, J. E. (2011). Investigation of an *Escherichia coli* O145 outbreak in a child day-care centre--extensive sampling and characterization of *eae*- and *stx1*-positive *E. coli* yields epidemiological and socioeconomic insight. *BMC infectious diseases*, 11, 238. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-11-238>
128. Wang, G., Clark, C. G., & Rodgers, F. G. (2002). Detection in *Escherichia coli* of the genes encoding the major virulence factors, the genes defining the O157:H7 serotype, and components of the type 2 Shiga toxin family by multiplex PCR. *Journal of clinical microbiology*, 40(10), 3613–3619. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.10.3613-3619.2002>

129. WHO Integrated Global Surveillance on ESBL-Producing *E. coli* Using a “One Health” Approach (2021). Available online: <https://www.who.int/publications-detail-redirect/who-integrated-global-surveillance-on-esbl-producing-e.-coli-using-a-one-health-appr>.
130. Yang, X., Liu, Q., Sun, H., Xiong, Y., Matussek, A., & Bai, X. (2022). Genomic Characterization of *Escherichia coli* O8 Strains Producing Shiga Toxin 21 Subtype. *Microorganisms*, *10*(6), 1245. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10061245>
131. Zhang, W. L., Köhler, B., Oswald, E., Beutin, L., Karch, H., Morabito, S., Caprioli, A., Suerbaum, S., & Schmidt, H. (2002). Genetic diversity of intimin genes of attaching and effacing *Escherichia coli* strains. *Journal of clinical microbiology*, *40*(12), 4486–4492. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.12.4486-4492.2002>

Componentes y condiciones de las PCRs

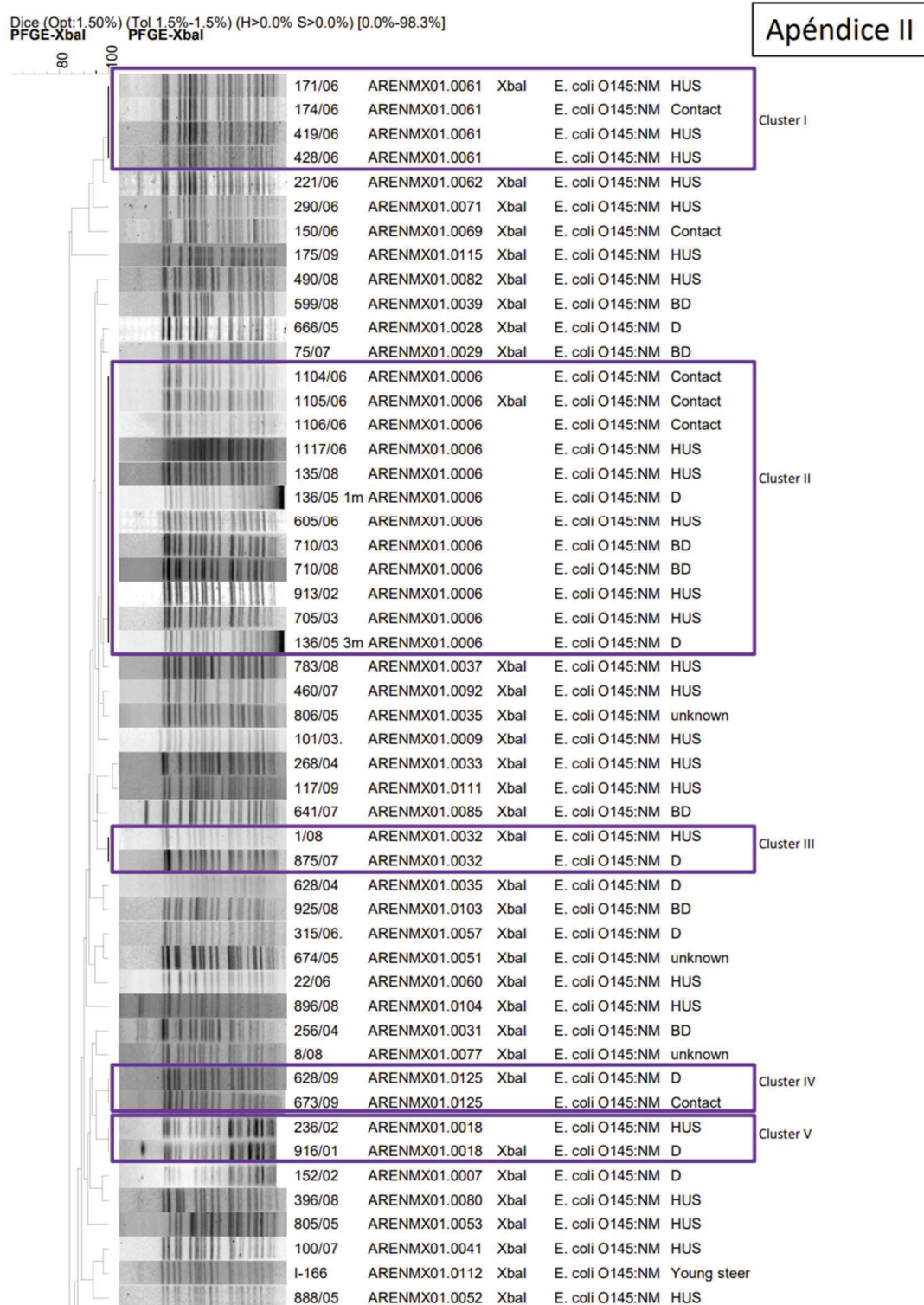
| PCR | O145 | fliCH8 | fliCH28 |
|---|---|--|--|
| Autor (año) | Fratamico (2009) | Bugarel (2010) | Bugarel (2010) |
| Tamaño del fragmento | wzx2 555 pb / wzy2 370 pb | 110 pb | 110 pb |
| Nombre y secuencia de los primers 5'-3' | O145wzx2 F: TTTGGTTGGTGGTACTGTGTCGG O145wzx2 R: TGTAACGATCTTCTCTCATCGCGT O145wzy2 F: ATATTGGGCTGCCACTGATGGGAT O145wzy2 R: TATGGCGTACAATGCACCGCAAAC | fliCH8 F: AAAGGCTCCATTGAATACAAGG fliCH8 R: TTGACCATCAATATTTGCGGTC | fliCH28 F: AAAACAATGCTGGGACTGTC fliCH28 R: TTGTAATTACCGTAGATACGGC |
| Cepas de referencias | | | |
| Control positivo 1 | <i>E. coli</i> FP-02/02 O145:NM | <i>E. coli</i> FP-625/08 O22:H8 | <i>E. coli</i> FP-02/02 O145:NM (H28) |
| Control positivo 2 | - | - | - |
| Control positivo 3 | - | - | - |
| Control Negativo | <i>E. coli</i> ATCC 25922 | <i>E. coli</i> ATCC 25922 | <i>E. coli</i> ATCC 25922 |
| Concentración de reactivos en la mezcla /50µl | | | |
| Tris-ClH 10 mM (pH. 8,3) | 1X | 1X | 1X |
| Cl ₂ Mg | 3 mM | 1,5 mM | 1,5 mM |
| dNTPs | 0,18 mM | 0,15 mM | 0,15 mM |
| Primers | 0,4 pmol/µl | 0,6 pmol/µl | 0,6 pmol/µl |
| Taq polimerasa | 0,04 U/µl | 0,02 U/µl | 0,02 U/µl |
| Templado | 2 / 50 µl | 2 / 50 µl | 2 / 50 µl |
| Condiciones de Amplificación | | | |
| Desnaturalización inicial | 94°C por 5 minutos | 94°C por 5 minutos | 94°C por 5 minutos |
| Nº de ciclos (condiciones de amplificación) | 30 (94°C, 30 seg.; 58°C, 90 seg.; 72°C, 90 seg.) | 30 (94°C, 30 seg.; 58°C, 90 seg.; 72°C, 90 seg.) | 30 (94°C, 30 seg.; 58°C, 90 seg.; 72°C, 90 seg.) |
| Extensión final | 72 °C por 2 min. | 72 °C por 2 min. | 72 °C por 2 min. |
| Electroforesis | | | |
| Concentración gel agarosa | 2% | 2% | 2% |
| Colorante del ADN | BrEtidio 0,5 µl/ml / GelRed 12,3X | GelRed 12,3X | GelRed 12,3X |
| Buffer de corrida | Tris Acético EDTA (TAE 1X) | Tris Acético EDTA (TAE 1X) | Tris Acético EDTA (TAE 1X) |
| Buffer de siembra | Xilene Cianol | Xilene Cianol | Xilene Cianol |
| Tiempo de corrida | 40 minutos | 40 minutos | 40 minutos |
| Voltaje | 80 V | 80 V | 80 V |

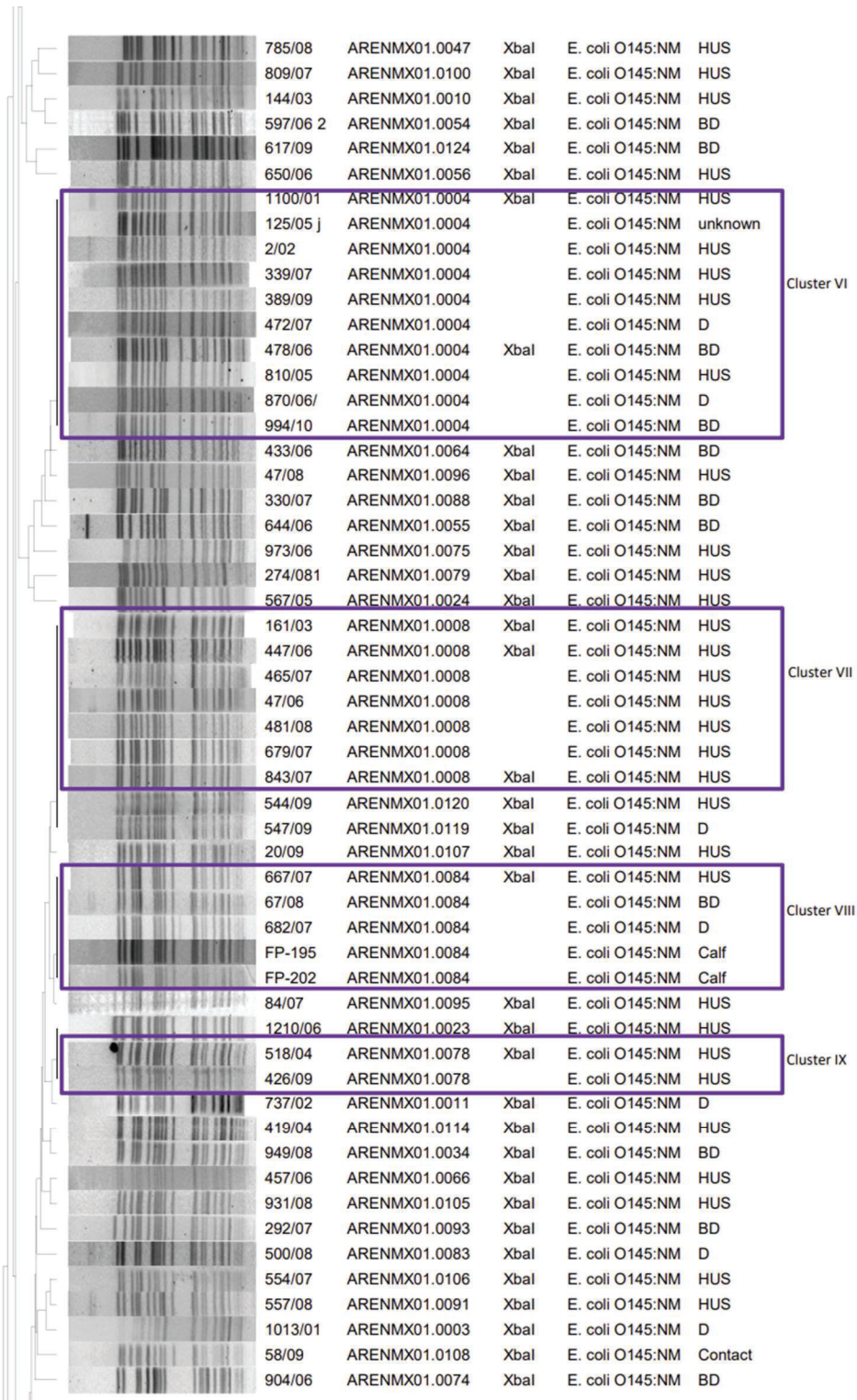
| Componentes y condiciones de las PCRs | | | |
|---|--|---|--|
| PCR | ehxA | ehxA | Intiminas |
| Autor (año) | Schmidt (1995) | Wang (2002) | $\alpha 1, \alpha 2, \beta, \gamma, \theta, \epsilon, \zeta, \kappa, \eta, \iota, \lambda, \mu, \nu, \xi$ Ramachandran (2003) |
| Tamaño del fragmento | 1551 pb | 534 pb | 840-880 pb |
| Nombre y secuencia de los primers 5'-3' | HlyA1: GGTCAGCAGAAAAGTTGTAG HlyA4: TCTCGCCTGATAGTGTGGTA | HlyAF: GCATCATCAAGCGTACGTTCC HlyAR: AATGAGCCAAGCTGGTTAAGCT | EaeVF: AGYATTACTGAGATTAAG EaeVR: AAATTAATTACACARAY EaeZetaVR: AGTTTATTTTACGCAAGT EaeIotaVR: TTAATTTATTTTATGCAAAC |
| Cepas de referencias | | | |
| Control positivo 1 | <i>E. coli</i> E32511 O157:NM (ehxA) | <i>E. coli</i> E32511 O157:NM (ehxA) | <i>E. coli</i> EDL933 O157:H7 (Int- γ) |
| Control positivo 2 | - | - | <i>E. coli</i> FP-635/07 O26:H11 (Int- β) |
| Control positivo 3 | - | - | - |
| Control Negativo | <i>E. coli</i> ATCC.25922 | <i>E. coli</i> ATCC.25922 | <i>E. coli</i> ATCC.25922 |
| Concentración de los reactivos en la mezcla/50 μl | | | |
| Tris-CIH 10 mM (pH. 8,3) | 1X | 1X | 1X |
| Cl ₂ Mg | 1,5 mM | 1,5 mM | 2 mM |
| dNTPs | 0,1 mM | 0,1 mM | 0,2 mM |
| Primers | 0,1 pmol/ μ l | 0,4 pmol/ μ l | 2 pmol/ μ l |
| Taq polimerasa | 0,02 U/ μ l | 0,02 U/ μ l | 0,04 U/ μ l |
| Templado | 2 / 50 μ l | 2 / 50 μ l | 2 / 50 μ l |
| Condiciones de Amplificación | | | |
| Desnaturalización inicial | 94°C por 5 minutos | 94°C por 5 minutos | - |
| Nº de ciclos (condiciones de amplificación) | 30 (94°C, 30 seg.; 58°C, 90 seg.; 72°C, 90 seg.) | 30 (94°C, 30 seg.; 58°C, 90 seg.; 72°C, 90 seg.) | 34 (94°C, 1 min.; 42°C, 1 min.; 72°C, 1 min.) |
| Extensión final | 72 °C por 2 min. | 72 °C por 2 min. | - |
| Electroforesis | | | |
| Concentración gel agarosa | 0,8% | 0,8% | 3% |
| Colorante del ADN | GelRed 12,3X | GelRed 12,3X | BrEtidlo 0,5 μ l/ml |
| Buffer de corrida | Tris Acético EDTA (TAE 1X) | Tris Acético EDTA (TAE 1X) | Tris Acético EDTA (TAE 1X) |
| Buffer de siembra | Xilene Cianol | Xilene Cianol | Xilene Cianol |
| Tiempo de corrida | 40 minutos | 40 minutos | 40 minutos |
| Voltaje | 80 V | 80 V | 80 V |

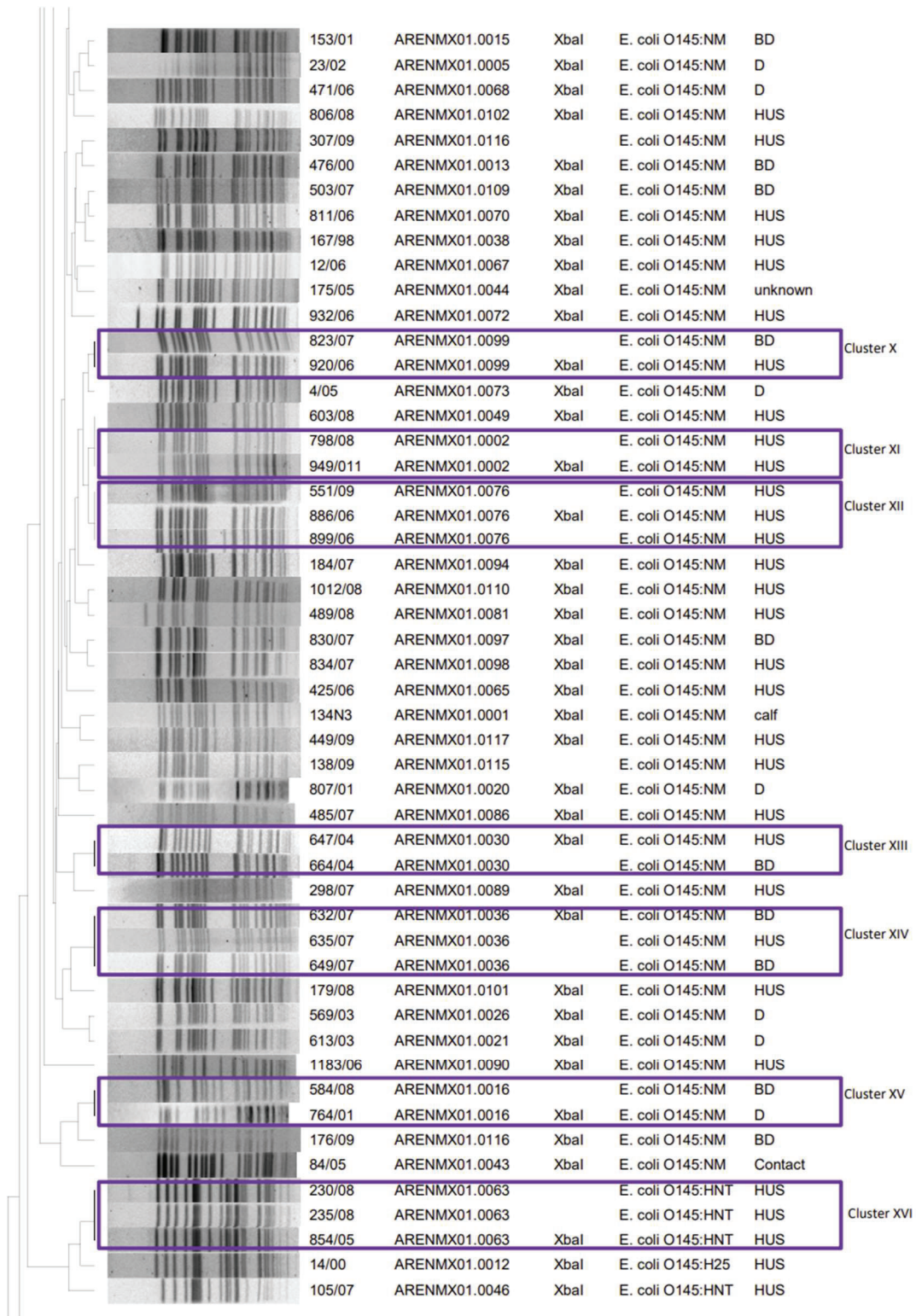
| PCR | <i>lpfA1-5</i> | <i>lpfO113</i> |
|--|---|--|
| Autor (año) | Torres (2009) | Doughty (2002) |
| Tamaño del fragmento | 250 pb | 573 pb |
| Nombre y secuencia de los primers 5'-3' | lpfA1-C: GGTTGGTGACAAATCCCCG lpfA1-CR1: GAGAACCGTCTGGCCTGTTT | lpfAF: ATGAAGCGTAATATTATAG lpfAR: TTATTTCTTATATTC GAC |
| Cepas de referencias | | |
| Control positivo 1 | <i>E. coli</i> FP-02/02 O145:NM (<i>lpfA1-5</i>) | <i>E. coli</i> EH41 O113:H21 (<i>lpfO113</i>) |
| Control positivo 2 | - | - |
| Control positivo 3 | - | - |
| Control Negativo | <i>E. coli</i> ATCC 25922 | <i>E. coli</i> ATCC 25922 |
| Concentración de los reactivos en la mezcla/50 µl | | |
| Tris-ClH 10 mM (pH. 8,3) | 1X | 1X |
| Cl ₂ Mg | 1,5 mM | 1,5 mM |
| dNTPs | 0,1 mM | 0,1 mM |
| Primers | 0,1 pmol/µl | 0,4 pmol/µl |
| Taq polimerasa | 0,02 U/µl | 0,02 U/µl |
| Templado | 1 / 25 µl | 2 / 50 µl |
| Condiciones de Amplificación | | |
| Desnaturalización inicial | 94°C por 5 minutos | 94°C por 2 minutos |
| Nº de ciclos (condiciones de amplificación) | 30 (94°C, 30 seg.; 60°C, 30 seg.; 72°C, 30 seg.) | 30 (94°C, 60 seg.; 52°C, 50 seg.; 72°C, 60 seg.) |
| Extensión final | 72 °C por 10 min. | 72 °C por 1 min. |
| Electroforesis | | |
| Concentración gel agarosa | 2% | 2% |
| Colorante del ADN | GelRed 12,3X | GelRed 12,3X |
| Buffer de corrida | Tris Acético EDTA (TAE 1X) | Tris Acético EDTA (TAE 1X) |
| Buffer de siembra | Xilene Cianol | Xilene Cianol |
| Tiempo de corrida | 40 minutos | 40 minutos |
| Voltaje | 80 V | 80 V |

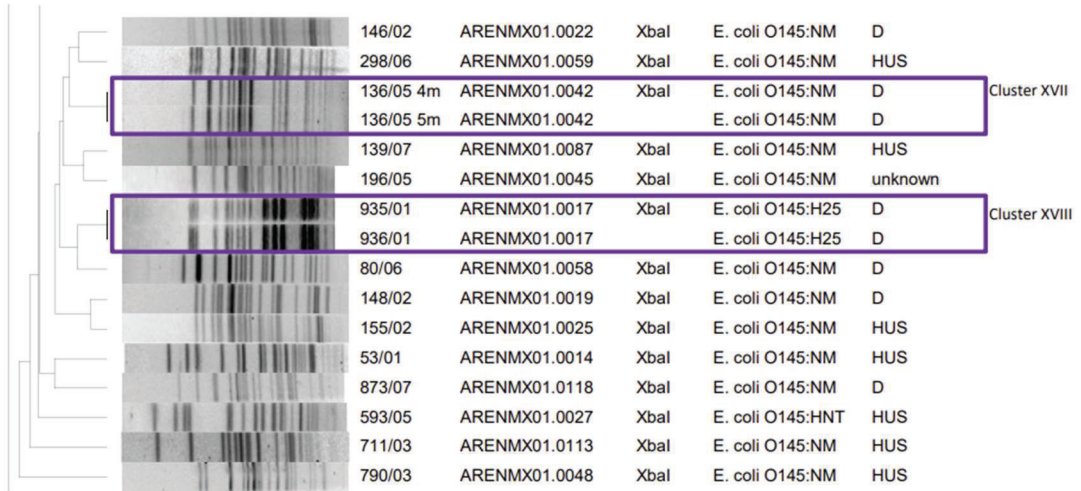
APÉNDICE II

Relación clonal de cepas STEC O145 por *Xba*I- PFGE según protocolo STEC O157



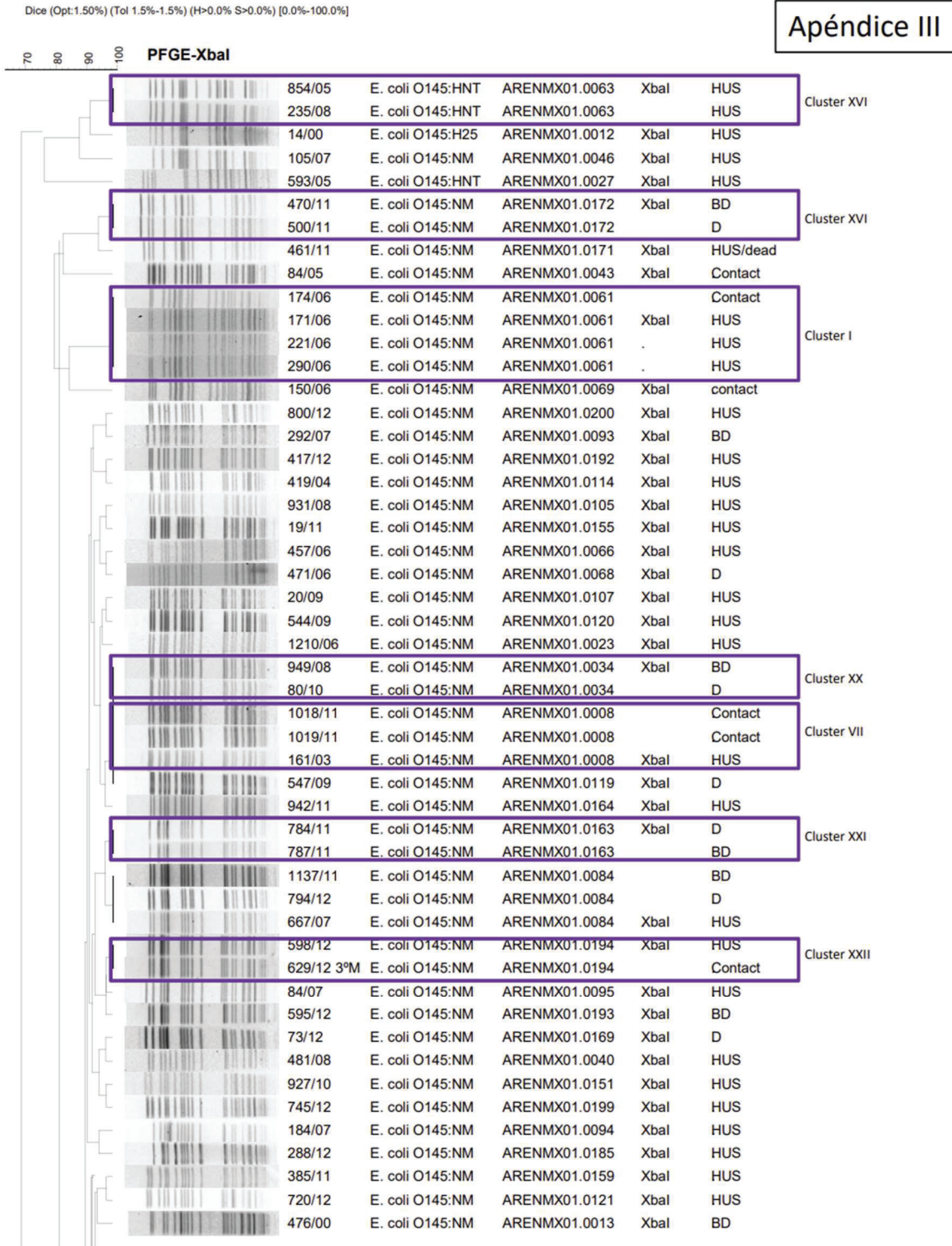


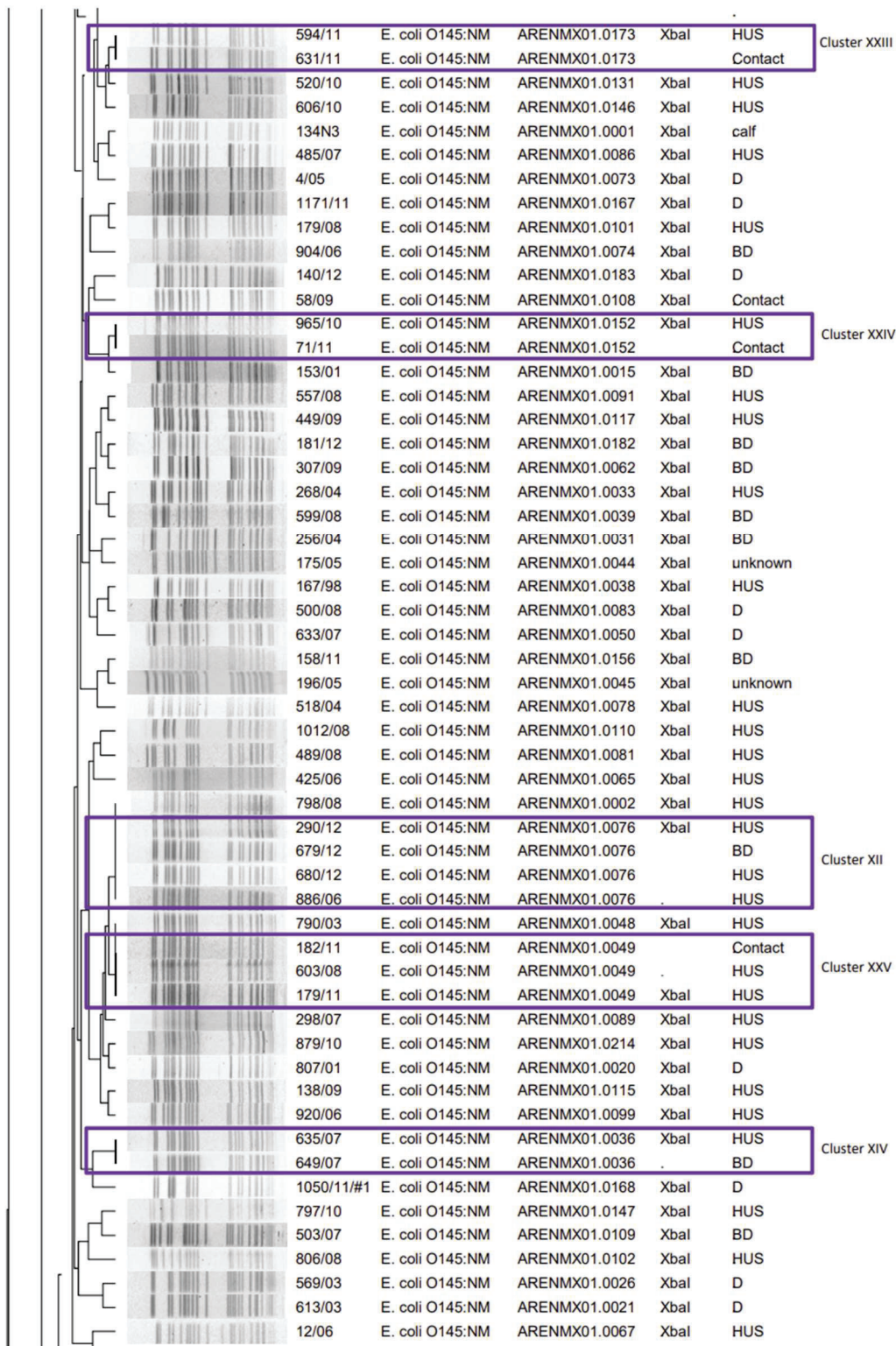


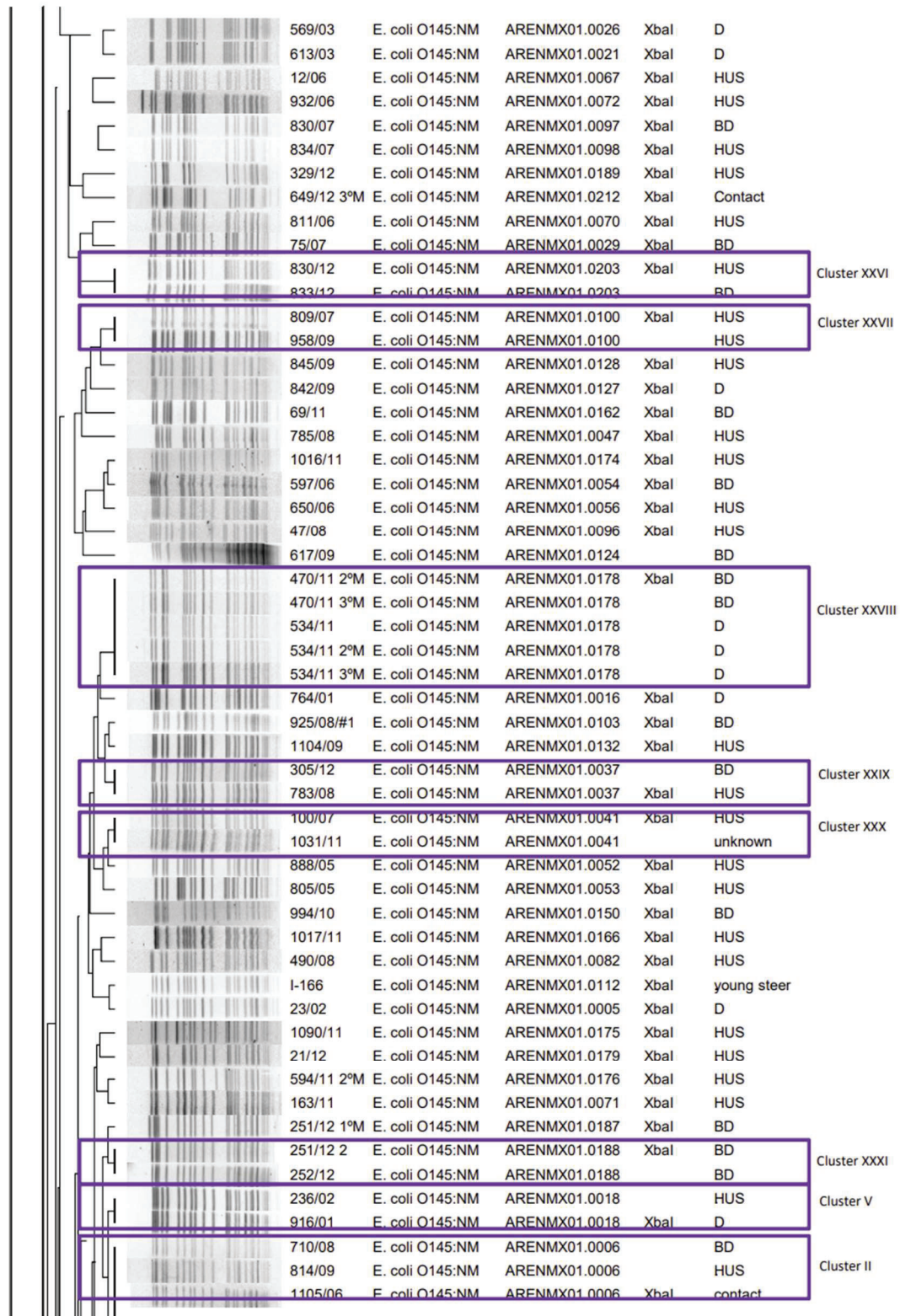


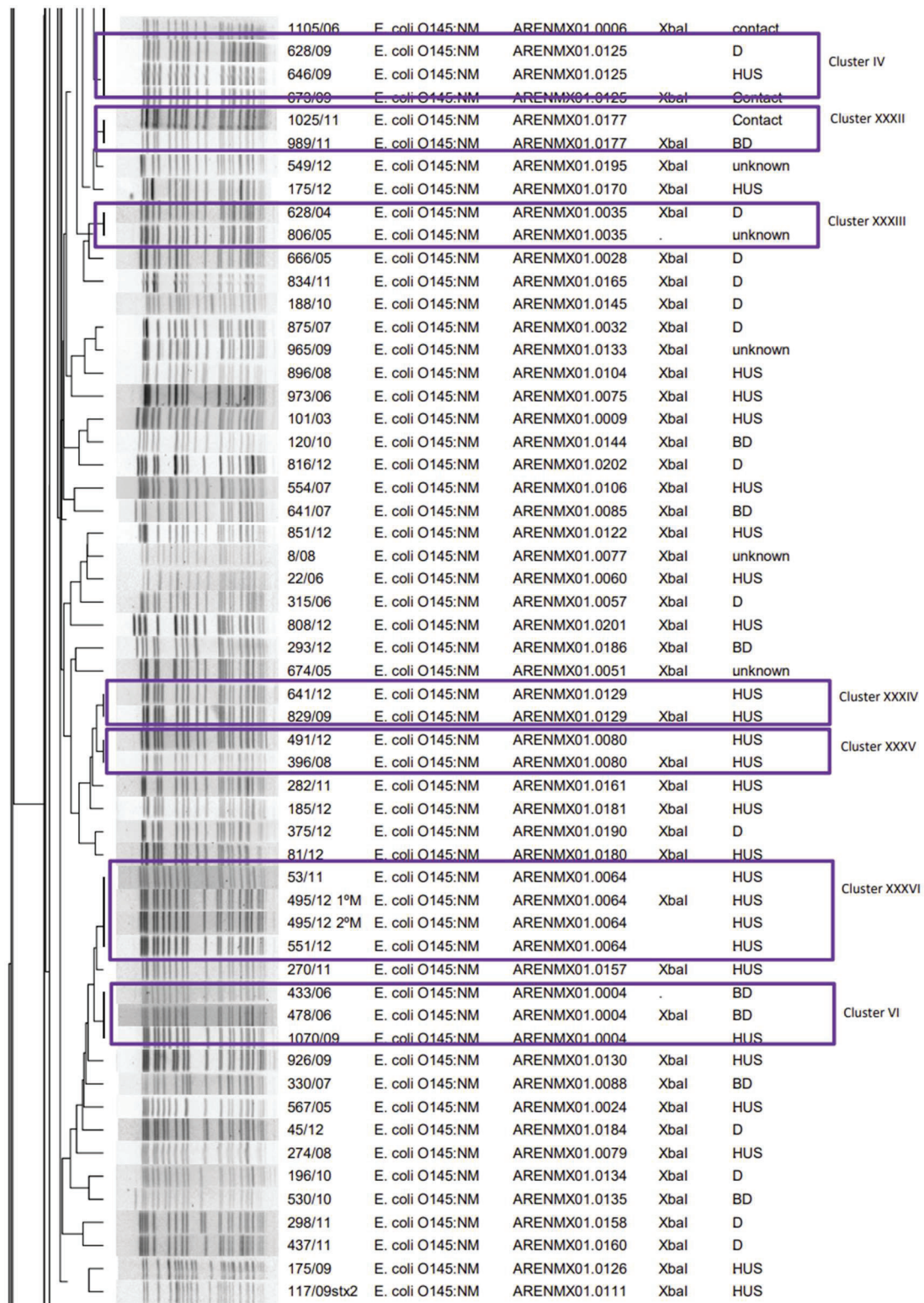
APÉNDICE III

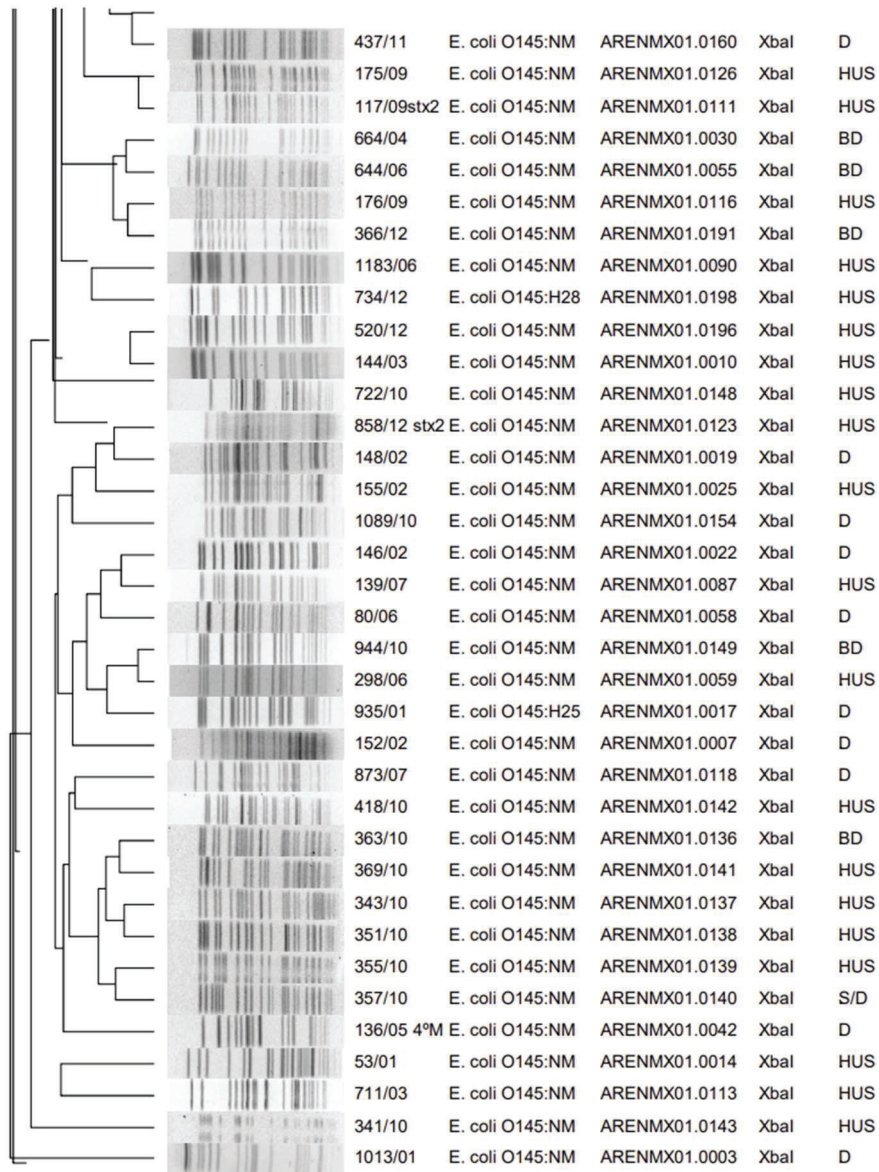
Relación clonal de cepas STEC O145 por *Xba*I- PFGE según protocolo STEC no-O157











APÉNDICE IV

Estudio de brotes por STEC O145

| N° de evento | Tipo de evento | Caso índice | N° total de casos de STEC y contactos detectados | Ciudad, Provincia / Mes, Año | Patrones de PFGE de cepas STEC O145 asociadas al brote |
|--------------|--|--|--|--|--|
| 1 | Institucional, brote en jardín maternal | Caso de SUH, niño de un año. Excreción prolongada (18 días y co-infección con STEC) | 1 caso de SUH con excreción prolongada. (Cuatro cepas STEC O145:NM[H28], <i>stx_{2b}</i> , <i>eae-y</i> , <i>ehxA</i> , <i>lpfA₁₋₅</i> y una STEC ONT:HNT) 1 caso de SUH y 1 asintomático (O145:NM <i>stx_{2a}</i> , <i>eae-y</i> , <i>ehxA</i> , <i>lpfA₁₋₅</i>) | Rosario, Santa Fe Enero, 2005 | ARENMX01.0006 (2 casos de SUH, uno presentó 2 cepas) y ARENMX01.0043 (asintomático) con 88,9% similitud. ARENMX01.0042 (2 cepas del control de excreción) con 74% similitud. |
| 2 | Brote familiar | Indeterminado | 3 casos de SUH 1 contacto asintomático (O145:NM[H28], <i>stx_{2b}</i> , <i>eae-y</i> , <i>ehxA</i> , <i>lpfA₁₋₅</i>) | Mar del Plata, Buenos Aires Enero y Febrero, 2006 | ARENMX01.0061 - 100% similitud |
| 3 | Brote familiar | Caso de SUH, de 20 meses | 1 caso de SUH (STEC negativo) y 3 contactos asintomáticos de convivientes (2 hermanas y el padre) (O145:NM[H28], <i>stx_{2b}</i> , <i>eae-y</i> , <i>ehxA</i> , <i>lpfA₁₋₅</i>) | Neuquén, Neuquén Noviembre, 2006 | ARENMX01.0006 - 100% similitud |
| 4 | Brote familiar | Caso de SUH | 1 caso de SUH y 1 contacto asintomático (hermana) (O145:NM[H28], <i>stx_{2b}</i> , <i>eae-y</i> , <i>ehxA</i> , <i>lpfA₁₋₅</i>) | Córdoba, Córdoba Enero, 2011 | ARENMX01.0049 - 100% similitud |
| 5 | Institucional, brote en jardín de infantes | Caso de SUH, niño de 5 años (†) | 1 caso de SUH (†), 1 caso de DS (3 muestras positivas) y 2 D no complicadas (1 D con 3 muestras positivas) (O145:NM[H28], <i>stx_{2b}</i> , <i>eae-y</i> , <i>ehxA</i> , <i>lpfA₁₋₅</i>) 1 contacto (O111:NM, <i>stx_{3a}</i> / <i>eae/ehxA</i>) | Ciudad de Buenos Aires Abril, 2011 | ARENMX01.0135 (SUH) ARENMX01.0136 (DS 1°M y D - 100% similitud) ARENMX01.0178 (D 1°, 2° y 3°M; DS 2° y 3°M - 100% similitud) 84,6% similitud entre todas las cepas |
| 6 | Institucional, brote en jardín de infantes | Caso de SUH, niña de 10 meses de edad. Co-infección con STEC O157 | 1 caso de SUH (2 muestras positivas) y 1 caso de D (O145:NM[28], <i>stx_{2b}</i> , <i>eae-y</i> , <i>ehxA</i> , <i>lpfA₁₋₅</i> -O157:H7, <i>stx_{2a}</i> / <i>stx_{2c}</i> / <i>eae/ehxA</i>) 1 caso de DS (O157:H7, <i>stx_{2a}</i> / <i>stx_{2c}</i> : <i>eae/ehxA</i>) 1 contacto (O26:H11, <i>stx_{3a}</i> / <i>eae/ehxA</i> - O157:H7, <i>stx_{2a}</i> / <i>stx_{2c}</i> / <i>eae/ehxA</i>) | Ciudad de Buenos Aires Mayo, 2011 | ARENMX01.0173 (SUH 1° y D - 100% similitud) ARENMX01.0139 93,3% similitud entre todas las cepas |
| 7 | Brote familiar | Caso de SUH, niña de 23 meses de edad | 1 caso de SUH y 2 contactos (padre y hermana) (O145:NM[H28], <i>stx_{2b}</i> , <i>eae-y</i> , <i>ehxA</i> , <i>lpfA₁₋₅</i>) | Ciudad de Buenos Aires Diciembre, 2011 | ARENMX01.0119 - 100% similitud |
| 8 | Brote familiar | Caso de DS, niño de 1 año | 1 caso de DS y 1 contacto (hermana) (O145:NM[28], <i>stx_{2b}</i> , <i>eae-y</i> , <i>ehxA</i> , <i>lpfA₁₋₅</i>) | Tandil, Buenos Aires Diciembre, 2011 | ARENMX01.0177 - 100% similitud |
| 9 | Institucional, brote en jardín maternal | Caso de SUH, niña de 2 años | 1 caso de SUH y 2 contactos asintomáticos (O145:NM[28], <i>stx_{2b}</i> , <i>eae-y</i> , <i>ehxA</i> , <i>lpfA₁₋₅</i>) | San Carlos de Bariloche, Río Negro Octubre, 2012 | ARENMX01.0194 (SUH y contacto - 100% similitud) ARENMX01.0212 (contacto - 90,5% similitud) |