



Universidad Nacional de San Martín
Administración Nacional de Laboratorios e Institutos
de Salud “Dr. Carlos G. Malbrán”
Maestría en Microbiología Molecular: 7^{ma} Cohorte

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

“Subtipificación y comparación de cepas STEC O157 aisladas
de casos clínicos esporádicos y de ganado vacuno en
Argentina”

AUTORA: Med. Vet. Beatriz Alejandra D´Astek

DIRECTORA: Mg. Marta Rivas

Tesis realizada en el Servicio Fisiopatogenia
Departamento Bacteriología
Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas
ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”

Octubre de 2016

"Cuando se es muy joven y se sabe un poco, las montañas son montañas, el agua es agua y los árboles son árboles. Cuando se ha estudiado y se es leído, las montañas ya no son montañas, el agua ya no es agua y los árboles ya no son árboles. Cuando se es sabio, nuevamente las montañas son montañas, el agua es agua y los árboles son árboles."

Antiguo refrán del budismo Zen.

A mis padres, Beatriz y Alejandro, quienes me enseñaron lo importante en la vida, a mi tía Idelba por darme la posibilidad de apreciar las formas y los colores, y a Hugo, mi compañero, quien con su ejemplo me da la fuerza para continuar.

Agradecimientos

Quiero expresar mi profundo agradecimiento a la Dra. Marta Rivas, por brindarme generosamente sus conocimientos y guiarme en el desarrollo de esta Tesis.

A la Dra. Gabriela Giacoboni con quien di mis primeros pasos en la microbiología.

A mis compañeros de trabajo por su sostén y paciencia.

A mis amigos por enterder mis ausencias.

Y, aunque ya no esté presente entre nosotros, un especial agradecimiento al Dr. Marcelo Masana quien era Co Director de esta Tesis.

RESUMEN	4
INTRODUCCIÓN	6
<i>Factores de virulencia</i>	9
- <i>Citotoxinas</i>	10
- <i>Factores de adherencia intestinal</i>	12
- <i>Plásmido pO157</i>	13
- <i>Lipopolisacárido (LPS)</i>	14
- <i>Otros factores de virulencia</i>	14
<i>Patogénesis</i>	16
<i>Manifestaciones clínicas</i>	18
<i>Epidemiología</i>	20
<i>Reservorios</i>	23
JUSTIFICACIÓN	32
HIPOTESIS	33
OBJETIVO GENERAL	34
OBJETIVOS PARTICULARES	34
MATERIALES Y MÉTODOS	35
<i>Aislamientos bacterianos</i>	35
<i>Identificación bioquímica y serotipificación</i>	35
<i>Caracterización genotípica de los factores de virulencia por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)</i>	36
<i>Subtipificación de los aislamientos</i>	38
- <i>Genotipificación stx</i>	38
- <i>Fagotipificación</i>	39
- <i>PFGE</i>	39
<i>Análisis estadístico</i>	40
RESULTADOS	49
<i>Caracterización de los aislamientos</i>	49
<i>Subtipificación de los aislamientos</i>	50
DISCUSIÓN	62
CONCLUSIONES	77
ANEXO	80
REFERENCIAS	85

Índice de Tablas

Tabla 1. Clasificación de serotipos de STEC en seropatotipos	7
Tabla 2. Prevalencia de STEC O157 en ganado bovino en diferentes países.	26
Tabla 3. Secuencias de <i>primers</i> , condiciones de PCR y tamaño de fragmentos de amplificación (pb) usados en este estudio.	41
Tabla 4. Concentración y volumen de reactivos en la mezcla de reacción en las PCR múltiple, <i>eae</i> , <i>ehxA</i> y <i>fliC_{h7}</i> usados en este estudio.	43
Tabla 5. Tamaños de los fragmentos obtenidos por RFLP para la subunidad B.	45
Tabla 6. Patrones líticos producidos en la fagotipificación de cepas de <i>Escherichia coli</i> O157:H7.	46
Tabla 7. Genotipos <i>stx</i> encontrados en aislamientos de <i>Escherichia coli</i> O157:H7 de origen humano y bovino.	50
Tabla 8. Fagotipos detectados en aislamientos de <i>Escherichia coli</i> O157:H7 de origen humano y bovino.	51
Tabla 9. Relación encontrada entre genotipos <i>stx</i> y PTs predominantes en aislamientos de <i>Escherichia coli</i> O157:H7 de origen humano y bovino.	52
Tabla 10. Distribución de aislamientos de <i>Escherichia coli</i> O157:H7 de origen humano y bovino en clusters por <i>XbaI</i> -PFGE.	53
Tabla 11. Frecuencia de detección de los factores de virulencia putativos en aislamientos de <i>Escherichia coli</i> O157:H7 de origen humano y bovino.	56
Tabla 12. Relación entre genotipos <i>stx</i> y PT predominantes con diferentes entidades clínicas.	59

Índice de Figuras

Figura 1. Frecuencia de factores de virulencia putativos de <i>Escherichia coli</i> O157:H7 separados en categorías según su función.	9
Figura 2. Esquema de la interacción de STEC con la célula intestinal del hospedador.	13
Figura 3. Factores de virulencia de la cepa TW14359.	16
Figura 4. Etapas de la patogénesis de STEC en el hombre y la colonización del ganado bovino, excreción y vías de transmisión.	18
Figura 5. Árbol filogenético de clados en STEC O157.	23
Figura 6. Distribución geográfica de la producción ganadera en Argentina, 2007.	27
Figura 7. Patrones generados por los fragmentos obtenidos por PCR-RFLP.	45
Figura 8. Discriminación de aislamientos de <i>Escherichia coli</i> O157:H7 de origen humano y bovino con idéntico patrón de <i>Xba</i> I-PFGE, genotipo- <i>stx</i> y fagotipo, utilizando la enzima de restricción <i>Bln</i> I.	57
Figura 9. Patrones de <i>Xba</i> I-PFGE idénticos encontrados por fuera del período de estudio y los aislamientos de origen bovino.	58
Figura 10. Distribución geográfica de cepas STEC O157 aisladas de casos clínicos y de bovinos	60
Figura 11. Distribución estacional de los aislamientos STEC O157 obtenidos de casos clínicos y de bovinos	61

RESUMEN

Escherichia coli productor de toxina Shiga (STEC) es causa de diarrea sin sangre (D), diarrea sanguinolenta (DS), y síndrome urémico hemolítico (SUH), y el ganado ha sido descrito como su principal reservorio. STEC O157:H7 es el serotipo predominante en infecciones clínicas, sin embargo en Argentina poco se sabe acerca de los subtipos dominantes en seres humanos y animales, ni de su relación genética. El objetivo de este estudio fue comparar los subtipos de STEC O157 que se detectan en las infecciones humanas con aquellos que se encuentran en el reservorio bovino. Se realizó el análisis de las variantes de *stx* por polimorfismo de la longitud de fragmentos de restricción (*stx*-PCR-RFLP), la fagotipificación y la electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE), y los subtipos obtenidos se correlacionaron con la severidad de las manifestaciones clínicas. Se determinaron también nuevos factores de virulencia putativos, relacionados a cepas con alta virulencia (ECSP_3620, ECSP_0242, ECSP_2687, ECSP_1773, ECSP_3286 y ECSP_2870/2872). Se realizó un georeferenciamiento de los aislamientos y se analizó la estacionalidad de los eventos. Se incluyeron 280 cepas STEC O157:H7 aisladas de casos de SUH (n=122), DS (n=69), D (n=30), portadores asintomáticos (n=5), y de bovinos (n=54). El genotipo *stx*_{2a}/*stx*_{2c} fue predominante en cepas humanas (76,1%) y bovinas (55,5%), mientras que el segundo genotipo más frecuente en cepas humanas fue *stx*_{2a} (20,8%) y *stx*_{2c} (16,7%) en bovinas. En las cepas humanas, PT4 (37,6%), PT49 (24,3%) y PT2 (18,6%) fueron los PT más frecuentes, representando el 80,5% del total. En los aislamientos de la especie bovina, PT2 (26%), PT39 (16,7%), PT4 y PT49 (11,1% cada uno) fueron predominantes, correspondiendo al 64,9% del total. Por *Xba*I-PFGE, se obtuvieron 144 patrones de macrorestricción con un 75,3% de similitud, y 176 cepas fueron agrupadas

en 39 *clusters*. En cepas de ambos orígenes se detectaron combinaciones idénticas de PT-patrón de *Xba*I-PFGE-genotipo-*stx*: PT4-AREXH01.0011-*stx*_{2a}/*stx*_{2c} (12 cepas humanas y una bovina), PT4-AREXH01.0543-*stx*_{2a}/*stx*_{2c} (una cepa humana y cuatro bovinas), PT2-AREXH01.0076-*stx*_{2a}/*stx*_{2c} (una cepa humana y cuatro bovinas), PT49-AREXH01.0175-*stx*_{2a}/*stx*_{2c} (siete cepas humanas y una bovina) y PT49-AREXH01.0022-*stx*_{2a}/*stx*_{2c} (siete cepas humanas y una bovina). No se encontró correlación entre genotipo-*stx* y fagotipo con la severidad de los síntomas clínicos. ECSP_3620, ECSP_0242 y ECSP_2687 se presentaron con una muy alta frecuencia (>80%). ECSP_1773 fue el menos prevalente detectándose en un 34% en aislamientos humanos y 33,3% en bovinos. Se observó una diferencia muy significativa en las frecuencias para los loci ECSP_3286 (86,2% vs. 55,5%, $P < 0.0001$) y ECSP_2870/2872 (85,7% vs. 61,1%, $P < 0.0002$), entre aislamientos humanos y bovinos, respectivamente. La mayoría de las cepas humanas (47,9%) y más de la mitad de las bovinas (51%) se aislaron de la provincia de Buenos Aires y de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires (CABA). Se observó que los aislamientos humanos tuvieron una mayor frecuencia en los meses cálidos. Sin embargo, los aislamientos bovinos mostraron una distribución relativamente similar a través de los meses de estudio.

INTRODUCCIÓN

Escherichia coli es un microorganismo que forma parte de la flora anaerobia facultativa del tracto intestinal del hombre y de los animales. La mayoría de las cepas son comensales, pero algunas de ellas son patógenas para el ser humano. Se han descrito 8 categorías, también conocidas como patotipos o patovares, las cuales son clasificadas dentro de *E. coli* extraintestinal (ExPEC) y *E. coli* diarregénico (DEC). Dos patotipos corresponden a ExPEC, *E. coli* uropatógeno (UPEC) y *E. coli* productor de meningitis neonatal (NMEC), y seis patotipos a DEC: *E. coli* productor de toxina Shiga (STEC), *E. coli* enteropatógeno (EPEC), *E. coli* enterotoxigénico (ETEC), *E. coli* enteroinvasivo (EIEC), *E. coli* enteroagregativo (EAEC), y *E. coli* de adherencia difusa (DAEC) (Kaper *et al.*, 2004; Williams *et al.*, 2010). Actualmente se han descrito otros patotipos, como el *E. coli* enteroagregativo productor de toxina Shiga (EASTEC, también llamado EAEHEC), responsable del brote ocurrido en Alemania en 2011, y *E. coli* adherente invasivo (AIEC), el cual se cree que está asociado con la enfermedad de Crohn, aunque no causa infecciones diarregénicas (Clements *et al.*, 2012).

Escherichia coli productor de toxina Shiga (STEC) puede ser aislado de portadores asintomáticos, y también causar diarrea sin sangre (D), diarrea con sangre (DS) y síndrome urémico hemolítico (SUH) (Griffin & Tauxe, 1991). La primera descripción fue realizada por Knowalchuk *et al.* en 1977, quienes informaron que cepas de *E. coli* de los serogrupos O18, O26, O111, y O128, aisladas de niños con diarrea y de cerdos con edema de pulmón, producían una toxina a la que se denominó Verotoxina, debido al efecto citotóxico en cultivos de células Vero de riñón de mono Verde Africano. Pocos años después se aislaron cepas de *E. coli* que producían un efecto citotóxico en células HeLa, el cual podía ser neutralizado por el antisuero anti-toxina

Shiga de *Shigella dysenteriae* Tipo 1, por lo cual se las llamó “Shiga-like toxin” (O’Brien *et al.*, 1982).

Los aislamientos de *E. coli* se diferencian serológicamente por una combinación de tres estructuras inmunogénicas, el lipopolisacárido (LPS) (antígeno somático O), el antígeno capsular (K) y el antígeno flagelar (H). Dado que sólo unos pocos laboratorios realizan la tipificación del antígeno K, la detección de la combinación O:H que determina el serotipo, se ha convertido en el estándar de oro para la caracterización de cepas patógenas de *E. coli*. El esquema actual de serotipificación incluye un total de 188 antígenos O designados O1-O188, y 53 antígenos H designados como H1-H56 (Joensen *et al.*, 2015). Aproximadamente 400 serotipos O:H diferentes de *E. coli* pueden albergar genes *stx* (Guth *et al.*, 2010a). En 2003, Karmali *et al.*, propusieron clasificar los serotipos de STEC en cinco seropatotipos (A a E) con el fin de esclarecer las diferencias en la virulencia de las cepas. Esta clasificación se basa en la incidencia de los distintos serotipos en enfermedad humana, y la asociación con la ocurrencia de brotes y enfermedad severa en el hombre. A pesar de presentar ciertas limitaciones, esta clasificación permite observar la relación de los diferentes serotipos con perfiles genéticos característicos de factores de virulencia (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación de serotipos de STEC en seropatotipos

Seropatotipo	Incidencia relativa	Frecuencia en la ocurrencia de brotes	Asociación con enfermedades severas	Serotipos
A	Alta	Común	Si	O157:H7, O157:NM
B	Moderada	No común	Si	O26:H11, O103:H2 O111:NM, O121:H19, O145:NM
C	Baja	Rara	Si	O91:H21, O104:H21, O113:H21, otros
D	Baja	Rara	No	Variados
E	Nula	Nula	Nula	Variados

Escherichia coli O157:H7 es considerado el prototipo de un grupo cepas que comparten el mismo potencial patogénico, y es el serotipo aislado más frecuentemente de casos clínicos. Es responsable de casos esporádicos en diferentes partes del mundo (Rangel *et al.*, 2005; Pennington, 2010), y también de brotes emblemáticos con gran número de afectados, que promovieron el estudio en profundidad de este serotipo.

En 1982 ocurrieron dos brotes de enfermedad intestinal, caracterizados por dolor abdominal y diarrea acuosa al inicio, seguida por diarrea sanguinolenta, pero sin casos de SUH, que afectaron a alrededor de 47 personas en los Estados de Oregon y Michigan, EE.UU. Estos brotes fueron asociados al consumo de hamburguesas en restaurantes de comidas rápidas de una misma cadena. Del cultivo de 9 de 12 materias fecales recogidas dentro de los cuatro días del inicio de la enfermedad, y de una hamburguesa de carne vacuna, se aisló *E. coli* O157:H7, serotipo poco frecuente en enfermedad humana hasta ese momento. La cepa causal del brote fue denominada EDL933, siendo utilizada actualmente como referencia (Riley *et al.*, 1983).

Entre fines de 1992 y principios de 1993, en cuatro Estados de la Costa Oeste de EE.UU., más de 500 personas fueron afectadas por el consumo de hamburguesas en restaurantes de una casa de comidas rápidas. El 7% de los afectados desarrolló SUH (Barret *et al.*, 1994). En 1996 en Japón, la cepa Sakai causó el brote más grande conocido hasta la fecha, con más de 8000 afectados, mayormente niños, el cual fue vinculado al consumo de brotes de rábano, entre otros alimentos, en comedores escolares. El 1,2% del total de casos evolucionó a SUH (Watanabe *et al.*, 1996).

De gran importancia fue el brote ocurrido en julio de 2006 en EE.UU. relacionado al consumo de espinaca prelavada envasada, que afectó a 205 individuos, con 15% de casos de SUH, cifra que fue significativamente mayor a la incidencia anual promedio (4,1%), y con aproximadamente 8% de afección de adultos. (CDC, 2006). La

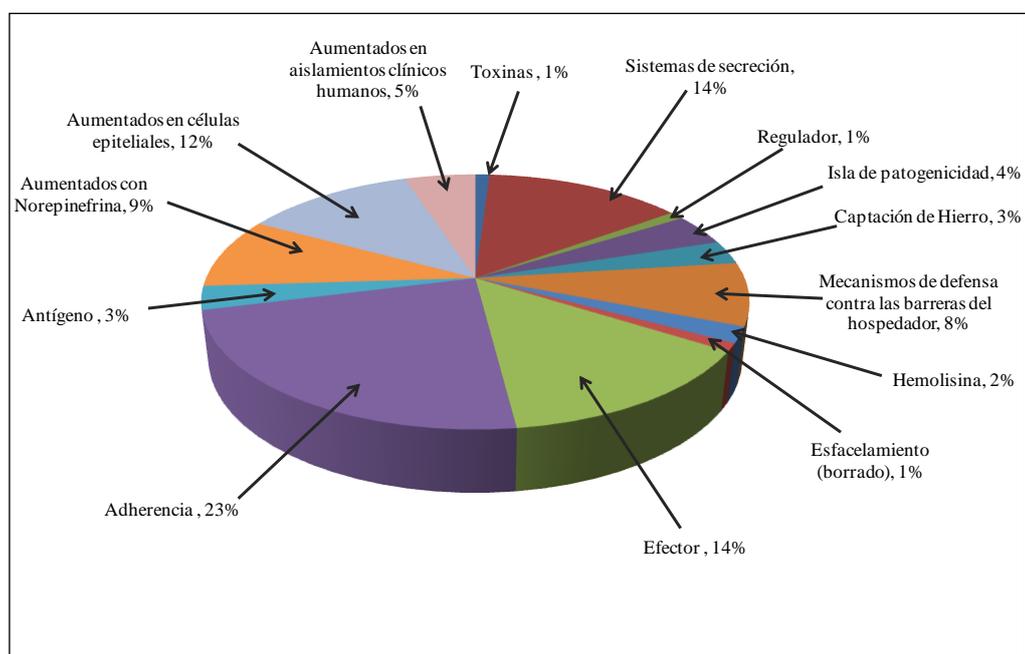
cepa TW14359 responsable de este brote, fue secuenciada y se identificaron nuevos determinantes de virulencia que podrían explicar la capacidad de esta cepa para causar un número elevado de hospitalizaciones y casos de SUH (Kulasekara *et al.*, 2009).

En Argentina, la mayoría de las infecciones por STEC son esporádicas y STEC O157 es el serogrupo más frecuentemente identificado en enfermedad humana (>70%) (Rivas *et al.*, 2006). Sin embargo, se han sido descrito brotes, sobre todo familiares, en jardines de infantes y centros de atención diurna (Miliwebsky *et al.*, 2007).

Factores de virulencia

Desde el primer brote vinculado a *E. coli* O157:H7 en 1982, mucho se ha avanzado en el conocimiento de los factores de virulencia que intervienen en la patogenia, identificándose más de 390 genes (Figura 1).

Figura 1. Frecuencia de factores de virulencia putativos de *Escherichia coli* O157:H7 separados en categorías según su función.



Tomado y adaptado de Reiland *et al.*, 2014

Los siguientes factores son los de mayor relevancia y los más estudiados:

-Citotoxinas

Las toxinas Shiga (Stx) son el principal factor de virulencia de STEC (Scheutz *et al.*, 2012). Poseen estructura de subunidades AB₅ y están codificadas por bacteriófagos lisogénicos insertados en el cromosoma bacteriano. La subunidad A (33 KDa) es la parte biológicamente activa y la B (7,5 KDa), presente en cinco copias, es la que se une al receptor celular específico globotriosilceramida (Gb3) de hospedador.

Existen dos tipos de Stx: Stx1 y Stx2, según la neutralización del efecto citotóxico en células Vero o HeLa con anticuerpos específicos, o por la detección de los genes *stx* mediante técnicas de biología molecular (Paton *et al.*, 1998a). El grupo de Stx1 es bastante homogéneo, siendo el gen *stx* casi idéntico al de *Shigella dysenteriae* Tipo 1. Actualmente, se incluyen 3 variantes para Stx1 (Stx1a, Stx1c y Stx1d). Por el contrario, el grupo de Stx2 es más heterogéneo y hasta el momento se han descrito 7 variantes (Stx2a, Stx2b, Stx2c, Stx2d, Stx2e, Stx2f y Stx2g) (Scheutz *et al.*, 2012).

Las cepas STEC de origen humano, animal o de alimentos pueden producir Stx1, Stx2 o sus variantes, solas o en combinación de dos o más toxinas. (Strockbine *et al.*, 1986; Friedrich *et al.*, 2002). Si bien los miembros de la familia de Stx muestran similitud en su estructura y función, cada uno de los subtipos presenta grandes diferencias en su toxicidad en tejidos celulares y en animales. Stx1a es aproximadamente 10 veces más citotóxica para las células Vero que Stx2a. Sin embargo, en ratones ocurre lo contrario donde Stx1a es 100 a 400 veces menos letal que Stx2a. Los datos epidemiológicos de enfermedad severa en humanos indican una asociación más fuerte con las cepas de STEC que producen Stx2a que Stx1a. Asimismo, se ha determinado que Stx1a y Stx2a son más citotóxicas que la variante Stx2c. Una posible explicación para la toxicidad diferencial es que, en contraste a los cultivos

celulares tales como las células Vero, las células endoteliales son más sensibles a Stx2a que a Stx1a. Las células endoteliales microvasculares renales obtenidas a partir de glomérulos humanos son aproximadamente 1000 veces más sensibles a Stx2a que a Stx1a. Por otro lado, el receptor Gb3 no está distribuido en forma homogénea dentro de la célula, por lo cual podría ocurrir que las toxinas no se unan a éste de forma equivalente en la célula blanco. También tiene importancia la existencia de diferencias en la secuencia nucleotídica de la subunidad B, responsable de la unión de la toxina al receptor Gb3 (Melton-Celsa 2014).

Varios factores influyen en la diversidad de síntomas causados por STEC en el hombre, siendo el tipo de toxina Shiga el más importante de éstos (Kawano *et al.*, 2011). Se ha demostrado que cepas STEC productoras de Stx2c son menos virulentas y causan diarrea sanguinolenta menos frecuentemente que cepas productoras de Stx2a sola o en la asociación Stx2a/Stx2c. El genotipo-*stx* influye en la probabilidad de evolución a SUH y se describió que el genotipo *stx*_{2a}/*stx*_{2c} se encuentra altamente asociado a enfermedad grave (Ostroff *et al.*, 1989; Nishikawa *et al.*, 2000). En Argentina, las cepas de STEC O157:H7 en su gran mayoría (>80%) se caracterizan como portadoras de este genotipo (Rivas *et al.*, 2006). La asociación Stx2a/Stx2c es considerada como una característica principal de clones de STEC O157 de alta virulencia descritos por Manning *et al.* (2008). Por lo tanto, la prevalencia de cepas STEC de determinados genotipos *stx*, junto a otros factores de riesgo de evolución a SUH, podrían explicar la alta incidencia de enfermedad humana y la severidad de los casos clínicos que se presentan en ciertas regiones.

Además de Stx, se han descrito otras toxinas y proteasas que podrían participar en la patogénesis de STEC. La subtilasina es una toxina con estructura AB₅, detectada en un numerosos serotipos de cepas STEC, principalmente O113:H21. Se ha demostrado

que puede ser letal e inducir daño renal en ratones (Paton *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2007). Bielaszewska *et al.* (2004) describieron otra toxina, la toxina citoletal distensiva (CDT-V: del inglés, *cytolethal distending toxin*) que daña directamente las células endoteliales produciendo su muerte, y por lo tanto puede contribuir en la patogénesis del SUH.

-Factores de adherencia intestinal

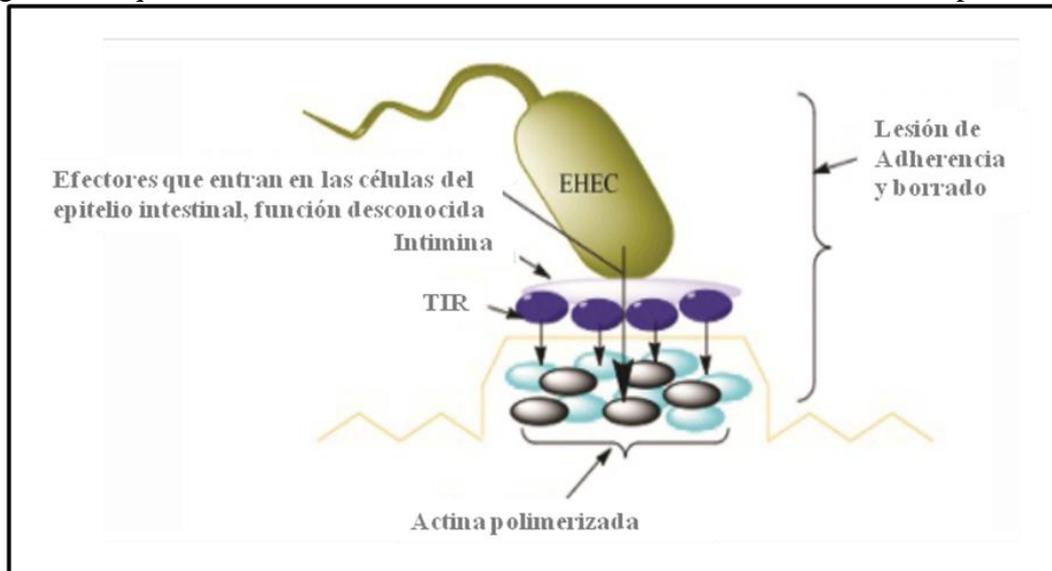
Para causar infección, las cepas STEC deben colonizar la mucosa intestinal y muchos trabajos se han enfocado en estudiar los genes involucrados en la adherencia bacteriana.

A) Codificados en la región LEE (del inglés, *locus of enterocyte effacement*) del cromosoma. En esta región se encuentra el gen *eae*, el cual codifica una proteína denominada intimina responsable de la unión estrecha de la bacteria al enterocito y de la desorganización de las microvellosidades con producción de una lesión de borrado y adherencia denominada A/E (del inglés, *attaching and effacing*). La formación de la lesión A/E está asociada con un drástico reordenamiento del citoesqueleto de la célula huésped, dando como resultado la producción de una estructura con forma de pedestal rica en actina polimerizada (Frankel *et al.*, 2001). El gen *eae* es considerado como un factor de riesgo de evolución a SUH, ya que bacterias aisladas en muchos de estos casos suelen transportar este gen (O157:H7, O26:H11, O111:NM, O121:H19 y O145:NM, entre otros) (Paton *et al.*, 1998b; Jenkis *et al.*, 2003; Ethelberg *et al.*, 2004).

La región LEE codifica además reguladores transcripcionales, chaperonas, el sistema de secreción de tipo III (TTSS – del inglés, *type three secretion system*) empleado en el transporte de las proteínas efectoras hacia la célula huésped, translocadores, y proteínas efectoras incluyendo al receptor translocado de la intimina denominado Tir (del inglés, *translocated intimin receptor*) (Garmendia *et al.*, 2005). El

dominio central extracelular de Tir actúa como receptor de la adhesina intimina de la bacteria (Frankel *et al.*, 2001). En la Figura 2 se presenta la interacción de STEC y la célula intestinal.

Figura 2. Esquema de la interacción de STEC con la célula intestinal del hospedador.



Tomado de Reiland *et al.*, 2014

B) Codificados fuera de la región LEE. Se ha descrito un grupo adhesinas relacionadas con la adherencia de las cepas STEC al enterocito, las adhesinas Iha (del inglés, *iron regulated gene A homologue adhesin*) (Tarr *et al.*, 2001), Efa1 (del inglés, *EHEC factor for adherence*) (Nicholls *et al.*, 2000), LPFO157/OI-141; LPFO157/OI-154 y LPFO113/OI-154 (del inglés, *long polar fimbria*) (Doughty *et al.*, 2002; Torres *et al.*, 2002). Estas adhesinas están codificadas en islas genómicas únicas de *E. coli* EDL933.

-Plásmido pO157

Este plásmido de 90 Kb, se encuentra en la mayoría las cepas de STEC O157:H7 y en algunas cepas STEC no-O157, y contiene diversos genes que codifican para distintos factores de virulencia, entre ellos la enterohemolisina (*ehxA*), citolisina formadora de poros que contribuye al desarrollo de la enfermedad a través de la lisis de eritrocitos, liberando en consecuencia hemoglobina como fuente de hierro para la

bacteria. Este daño a la membrana celular podría darse también sobre una amplia variedad de células e inducir a su vez, la producción de citoquinas pro-inflamatorias.

Otros factores de virulencia son la enzima serina proteasa extracelular (*espP*), la catalasa-peroxidasa (*katP*) y el sistema de secreción tipo II (*etp*) (Schmidt *et al.*, 1995).

-Lipopolisacárido (LPS)

Es uno de los principales factores producidos por bacterias gram negativas. Induce shock séptico y necrosis de la corteza renal. Algunos trabajos sugieren un sinergismo entre el LPS y Stx. Muchas sustancias, incluyendo prostaglandinas, citoquinas y factores vasoactivos y procoagulantes son estimulados por LPS. La injuria endotelial primaria, inducida por Stx, es agravada por los mediadores de la inflamación y el LPS (Palermo *et al.*, 2009).

-Otros factores de virulencia

Las dos primeras cepas cuyos genomas fueron secuenciados (EDL933 y Sakai), fueron aisladas de brotes con baja frecuencia de enfermedad severa y hospitalización. La comparación de estos genomas con el de la cepa TW14359, responsable del brote por consumo de espinaca en 2006, permitió identificar nuevos factores de virulencia putativos que aumentarían la virulencia bacteriana provocando un elevado número casos graves con hospitalización y SUH. El criterio de selección para estos factores de virulencia incluyó homología con genes conocidos implicados en la resistencia contra los mecanismos de defensa del huésped o la presencia de dominios comunes en las proteínas eucariotas, pero no en las proteínas procariotas (Kulasekara *et al.*, 2009). Se describieron los siguientes factores:

ECSP_3620 es el de mayor relevancia, codifica para la enzima anaeróbica reductasa del óxido nítrico (*NorV*). Se observó que las copias de *norV* en las cepas EDL933 y Sakai tienen una delección de 204 pb que conserva el marco de la secuencia de

codificación pero resulta en una pérdida de 68 aminoácidos que abarcan todo el dominio flavodoxina, presumiblemente destruyendo la función de NorV. Esto sugiere que el gen *norV* es funcional en las cepas hipervirulentas, pero no en las cepas O157:H7 menos virulentas. El efecto de esta delección originaría una reducción en la colonización o la persistencia dentro del medio anaerobio del intestino grueso, en el cual se produce óxido nítrico. El óxido nítrico también inhibe la expresión de Stx2, por lo que es probable que las cepas portadoras de la delección produzcan niveles más bajos de Stx2 en el intestino, y por lo tanto, tengan atenuada su virulencia.

ECSP_0242 codifica para un dominio que contiene cinco ankyrinas repetidas, común en las membranas de células eucariotas que facilita en gran medida la interacción entre proteínas. Ha sido encontrado en otras categorías de *E. coli*, incluyendo EIEC y EPEC.

ECSP_3286 codifica para una proteína que posee un dominio de la familia citocromo b5 asociado con proteínas eucariotas con propiedades de unirse al grupo hemo y con alta homología con la proteína ChuA de *Shigella flexneri*, que une y facilita el transporte del grupo hemo extracelular.

ECSP_2870 codifica para una proteína con similitud a proteínas eucariotas que participan en el mantenimiento estructural del cromosoma.

ECSP_2872 codifica para una proteína que contiene un dominio putativo de serina esterasa que es común en proteínas eucariotas. La presencia de dominios que se encuentran comúnmente en eucariotas, sugiere que estos genes posiblemente codifican para factores de virulencia. Es posible que los genes ECSP_2870/2872 sean utilizados de alguna manera para promover la adaptación de *E. coli* O157 al huésped vegetal.

Otros factores descritos incluyen dos genes, que codifican proteínas similares a aquellas que inhiben el sistema inmune del huésped: **ECSP_2687** que por alteración de

la cromatina produce una reducción en la expresión de citoquinas; y **ECSP_1773** que interfiere con la vía de la inmunidad innata previniendo la activación de NF- κ B (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas). En la Figura 3 se presentan los factores de virulencia descritos por Kulasekara *et al.* (2009).

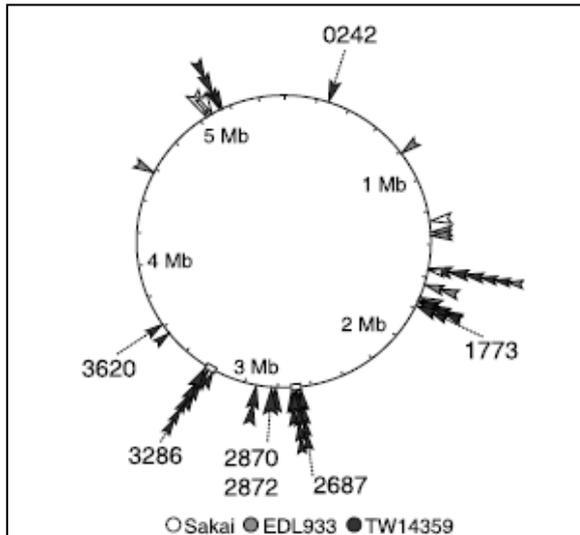


Figura 3. Factores de virulencia de la cepa TW14359.

Las regiones específicas de las cepas TW14359, EDL933, y Sakai están indicadas por puntas de flecha, cuyos tamaños son proporcionales a los tamaños de las regiones específicas de las cepas. Los determinantes de virulencia de la cepa TW14359 están indicados con los números de los locus ECSP. La codificación de fagos Stx2 y Stx2c de TW14359 se indican mediante rectángulos abiertos. Tomado de Kulasekara *et al.* (2009).

Patogénesis

Una vez que las cepas de STEC alcanzan el intestino, se adhieren a los enterocitos sin invadirlos. Por medio del TTSS, el receptor Tir es inyectado dentro de la célula huésped, luego de lo cual es translocado hacia el exterior de la membrana celular. El mismo se integra a la membrana plasmática adoptando una forma de pelo enrollado (Hartland *et al.*, 1999). Sucede luego la unión de la intimina al receptor Tir, la lesión A/E y la acumulación de filamentos de actina en el citoplasma con la consecuente reducción de la superficie absorptiva y la producción de diarrea sin sangre.

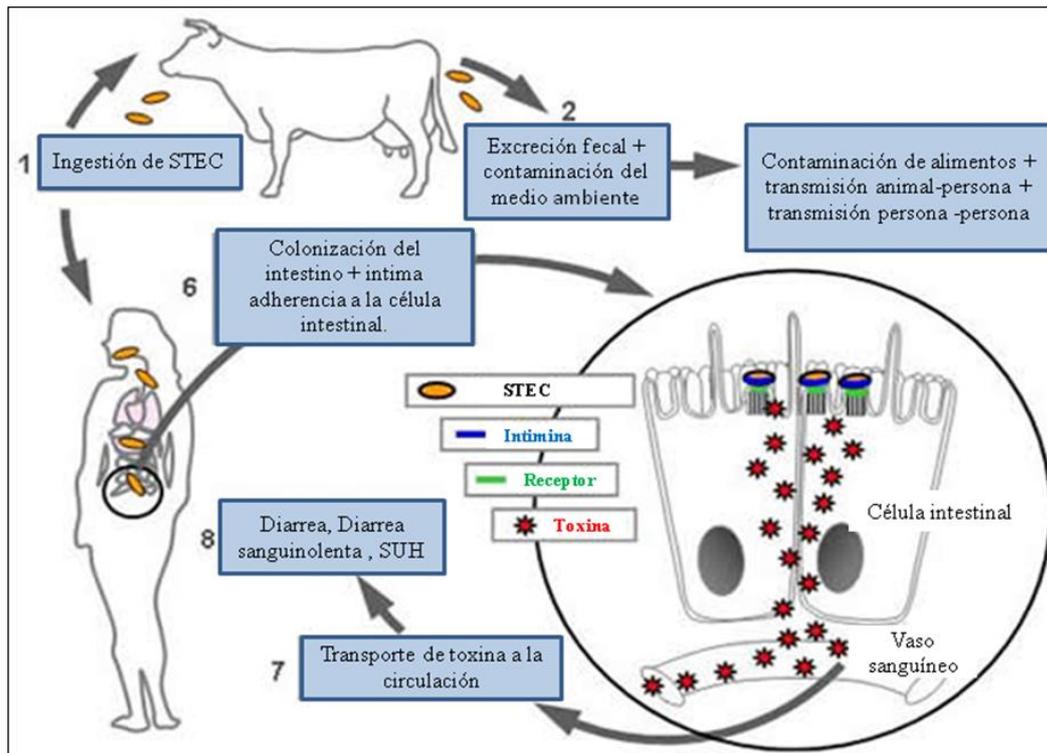
Stx es liberada y se une, mediante la subunidad B del pentámero B₅, a la célula epitelial del intestino por interacción con el receptor Gb3 que se encuentra en la membrana apical. Stx induce diferentes efectos biológicos mediados por el receptor en

función del tipo de célula, y esto está relacionado con el destino de la toxina dentro de la célula. En las células donde Stx es citotóxica, la toxina se internaliza en una vesícula endocítica, y es transportada al aparato de Golgi, donde la subunidad A es clivada proteolíticamente liberando el fragmento A1, el cual actúa sobre la subunidad ribosomal 28S, inhibiendo la síntesis proteica y provocando la muerte celular (Paton *et al.*, 2006). Además de su efecto inhibitor de la síntesis de proteínas, Stx puede estimular las células, incluyendo células endoteliales, para producir citocinas y quimiocinas (Palermo *et al.*, 2009)

La toxina puede también ser translocada desde la membrana apical a la superficie basolateral, con inducción de interleuquina-8 (IL-8), que contribuye a la acumulación de leucocitos en la pared intestinal.

Se produce también daño en las células endoteliales de los vasos sanguíneos provocando diarrea sanguinolenta. La Stx entra a la circulación sanguínea y es transportada a distintos órganos blanco cuyas células endoteliales poseen el receptor Gb3. El LPS bacteriano y las citoquinas del huésped aumentan la sensibilidad a las Stxs 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. Simultáneamente se produce un depósito de fibrina y de plaquetas en la microvasculatura renal, se ocluyen los capilares y se reduce el flujo sanguíneo, provocando insuficiencia renal aguda. También se pueden observar lesiones trombóticas, particularmente en la microvasculatura del intestino, cerebro y páncreas. La ruptura de los glóbulos rojos provocada por el daño a nivel capilar es también característica. En la Figura 4 se presentan los pasos involucrados en la patogénesis y mecanismos de transmisión de STEC.

Figura 4. Etapas de la patogénesis de STEC en el hombre, la colonización del ganado bovino, excreción y vías de transmisión.



Tomado de Reference Laboratory for *Escherichia coli* (EeL)

Manifestaciones clínicas

La incidencia y la severidad de las infecciones no pueden atribuirse únicamente a los factores de virulencia de STEC, sino que son el resultado de la interacción del patógeno con factores del huésped y el ambiente. El inóculo inicial bacteriano, la cantidad y el tipo de Stx producida por la bacteria, factores de virulencia adicionales, el grado de activación de la respuesta inflamatoria y de la coagulación, son algunos de los factores que pueden determinar la severidad de una infección por STEC (Palermo *et al.*, 2009). La infección puede dar lugar también a portación asintomática, diarrea acuosa o diarrea con sangre. (Tarr, 1995; Miliwebsky *et al.*, 2007).

El período de incubación promedio de la infección es de 3 días (con un rango de 1-8 días) y el cuadro clínico incluye un período de 1 a 2 días de vómitos, fiebre baja o ausente, dolores abdominales severos, diarrea sin sangre y evidencia de edema de la mucosa colónica como síntomas iniciales, seguidos por diarrea sanguinolenta durante 4

a 6 días. Aunque en la mayoría de los casos la diarrea por STEC es autolimitada, aproximadamente del 5 al 10 % de los niños infectados evolucionan a SUH, para el cual no existe un tratamiento específico, sino de sostén. El SUH, descrito por primera vez en 1955 por Gasser *et al.*, es una enfermedad de comienzo agudo con anemia hemolítica microangiopática, plaquetopenia y daño renal, que habitualmente puede seguir o no a un episodio de diarrea con o sin sangre. Más tarde, en 1983, Karmali *et al.*, describieron la asociación entre *E. coli*, Stx y SUH.

Las formas más severas incluyen un elevado recuento de leucocitos, período prodrómico con diarrea severa, anuria, convulsiones, con afección principal en niños menores de 2 años (Rowe *et al.*, 1991; Siegler *et al.*, 1994;) y de sexo femenino (Rowe *et al.*, 1991).

El SUH es la causa principal de insuficiencia renal aguda en los niños y la segunda causa de insuficiencia renal crónica (Exeni *et al.*, 2001). En nuestro país, el grupo del Dr. Gianantonio en el año 1968 describió 76 casos de SUH, y propusieron la diálisis peritoneal como tratamiento en el período agudo, lo que produjo una disminución de la mortalidad del 50% en los primeros años al 1-5% en la actualidad.

En el período agudo, aproximadamente la mitad de los pacientes con SUH requiere diálisis y el 75% transfusión sanguínea. Superado este período alrededor del 90% de los pacientes se recupera pero un 5% de niños con SUH desarrolla insuficiencia renal crónica, requiriendo en pocos años diálisis o trasplante renal (Spizzirri *et al.*, 1997). Durante el período 2011-2014, se realizaron 37 trasplantes renales en pacientes con diagnóstico de SUH, lo que representa el 9% del total de trasplantes renales realizados en el mismo período (Boletín Integrado de Vigilancia N° 328–SE 38-2016).

Epidemiología

La incidencia de las infecciones difiere sustancialmente en distintas partes del mundo. Los sistemas de vigilancia varían considerablemente de un país a otro, y por lo tanto se requiere precaución cuando se comparan las tasas de incidencia de STEC entre los distintos países. En Estados Unidos, las infecciones por *E. coli* O157:H7 son de notificación obligatoria desde 1995, y la notificación por STEC no-O157 desde el año 2000. En el año 2011, la tasa de infecciones por STEC O157 fue de 0,97 cada 100.000 personas siendo la tasa de SUH del 6,3% y la tasa de mortalidad del 0,43%. (CDC 2012). En Canadá la incidencia fue de 2,3 cada 100.000 personas en 2008 (Government of Canada, 2011 Short Report). En la Comunidad Europea se reportó una incidencia promedio de 0,96 cada 100.000 personas para 2010. El informe anual da una síntesis sobre la incidencia de todas las infecciones por STEC en Austria, Bélgica, Finlandia, e Italia, de 1 caso cada 100.000 o menos; y para Alemania, Reino Unido, los Países Bajos, Dinamarca, Suecia e Irlanda, de 1,2; 1,8; 2,9; 3,2; 3,6; y 4,4 casos por cada 100.000 personas, respectivamente (European Centre for Disease Prevention and Control. 2013. Annual Epidemiological Report 2012). En Australia, para un período de 11 años (2000-2010), la tasa anual global fue de 0,4 casos cada 100.000 personas, y la tasa anual de la notificación para SUH fue de 0,07 casos cada 100.000 personas, mientras que para Nueva Zelanda se reportó una tasa de infección por STEC de 3,3 casos 100.000 por año (Vally *et al.*, 2012). En América Latina, las infecciones por STEC son endémicas siendo responsable de 2% del total de casos de diarrea aguda, y en algunos estudios corresponden al 20-30% de diarrea con sangre (Guth *et al.*, 2010a). Existen importantes diferencias en la incidencia de STEC infecciones y SUH en América del Sur. Una red regional con fines de vigilancia sigue siendo inexistente, y los datos son restringidos a sólo unos pocos países y la notificación sólo es obligatoria en Argentina, Bolivia, Chile y Paraguay. En Brasil, las infecciones por STEC constituyen

un problema importante para la salud pública, al menos en algunas regiones, pero en general, la incidencia es relativamente baja (Guth *et al.*, 2010b). En Chile, se estableció un Sistema Nacional de Vigilancia en 1999. En Uruguay, sólo se registran unos pocos casos de SUH cada año (Varela *et al.*, 2010). En Paraguay, la notificación de SUH es obligatoria desde 2005, y la incidencia anual estimada es de 0,6 casos por 100.000 niños menores de 5 años (Guth *et al.*, 2010a). En Argentina, donde el SUH es endémico, se producen entre 300 y 500 casos nuevos por año, con una tasa de incidencia anual promedio de 1 caso cada 100.000 habitantes. La incidencia es alrededor de 10 casos por cada 100.000 niños menores de 5 años de edad (Antman *et al.*, 2014).

Se han planteado distintas hipótesis para tratar de explicar las diferencias en la patogenicidad de las cepas de *E. coli* O157. La plasticidad del genoma, el potencial de virulencia y la gran diversidad genética podrían condicionar los determinantes de patogenicidad que explicarían las diferencias en la severidad de las enfermedades asociadas. Besser *et al.* (2007) describieron una gran diversidad genotípica de cepas de *E. coli* O157 de diferentes orígenes, humano, animal y ambiental, observándose la mayor diversidad en el reservorio bovino. Mellor *et al.* (2013) postularon evidencias de la existencia de linajes filogenéticos característicos en áreas geográficas definidas, que sugieren una evolución divergente de las poblaciones de *E. coli* O157. También se detectaron cepas de *E. coli* O157 con diferente potencial de virulencia en algunos grupos filogenéticos y la existencia de cepas de mayor virulencia en diferentes nichos y áreas geográficas, lo cual explicaría la alta prevalencia de enfermedad humana severa en determinados países (Manning *et al.*, 2008; Etoh *et al.*, 2014)

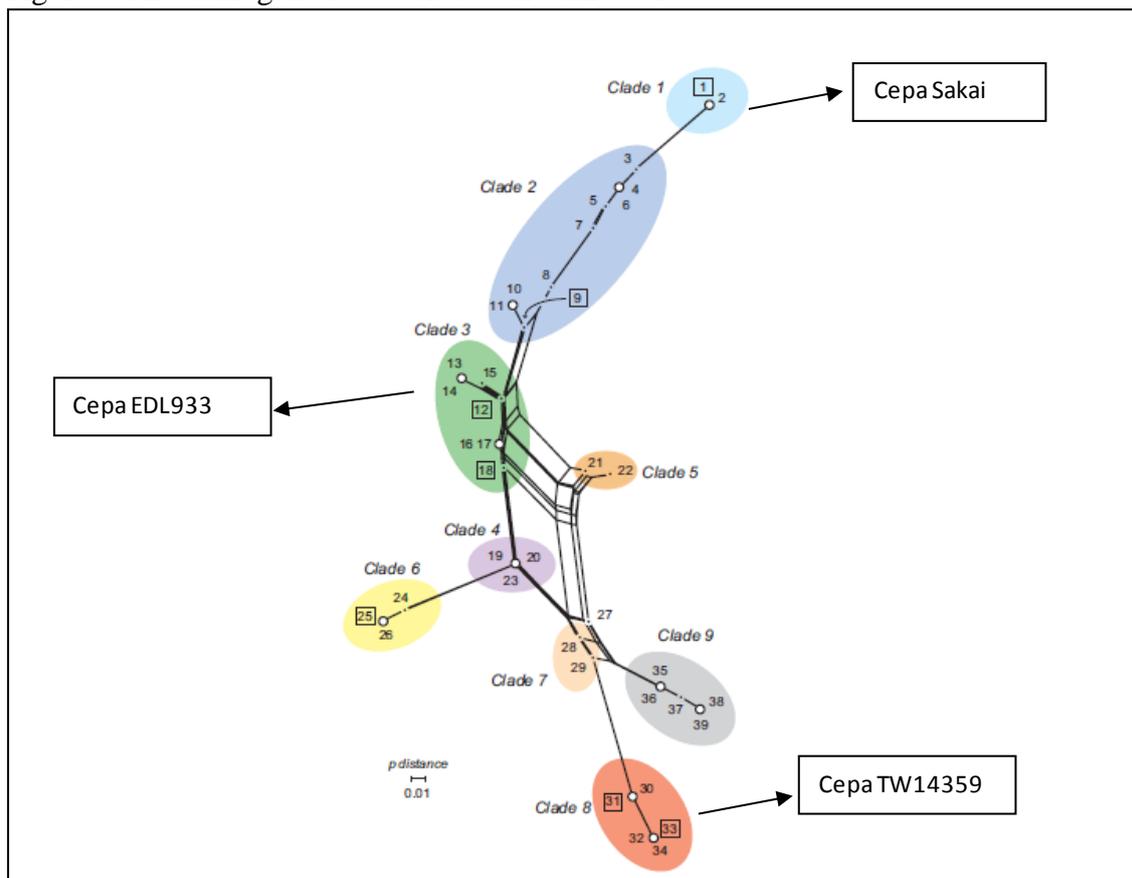
Estas hipótesis han motivado a distintos grupos de investigación a trabajar en estudios poblacionales de *E. coli* O157, de manera de caracterizar a estas cepas de

acuerdo a su origen (humano, animal y medio ambiente) y su asociación con la severidad y frecuencia de los cuadros clínicos.

La circulación casi excluyente de cepas de *E. coli* O157 hipervirulentas en determinadas regiones permiten empezar a entender las causas de la alta incidencia de SUH en las mismas (Boqvist *et al.*, 2009; Aspan *et al.*, 2010; Thomas *et al.*, 2012; , Pianciola *et al.*, 2014)

Manning *et al.* (2008), desarrollaron una PCR en tiempo real para detectar mutaciones, como polimorfismos de nucleótido único. Analizaron más de 500 cepas STEC O157 de origen clínico e identificaron 39 genotipos SNP que se separaron en nueve clados. Los autores observaron diferencias entre los clados y la frecuencia y distribución de los genes *stx* y el tipo manifestación clínica. Los pacientes con SUH tuvieron significativamente más probabilidades de infectarse con cepas del clado 8, las cuales han aumentado en frecuencia en los últimos 5 años. Observaron además, que la mayoría de estas cepas carecían de *stx*₁ y portaban *stx*_{2a}, confirmando que la mayoría eran *stx*_{2a}/*stx*_{2c}. La secuenciación del genoma completo de la cepa TW14359 perteneciente al clado 8, responsable del brote vinculado al consumo de espinacas en 2006, puso de manifiesto diferencias genómicas sustanciales. Estos hallazgos sugieren que una subpoblación emergente del clado 8 ha adquirido factores críticos que contribuyen a una enfermedad más severa. En la Figura 5 se muestra el árbol filogenético de clados en cepas STEC O157.

Figura 5. Árbol filogenético de clados en STEC O157.



Tomado de Manning *et al.*, 2008

Reservorios

Más de 400 serotipos diferentes de STEC se han aislado del hombre, y la mayor parte de éstos fueron identificados en el ganado bovino y en la carne vacuna, y más de 100 estuvieron asociados con enfermedad humana (Brooks *et al.*, 2005; Gyles, 2007; Moxley & Acuff, 2014).

Si bien los rumiantes fueron descritos como los principales reservorios de STEC, el ganado vacuno en particular, se reconoce como su reservorio principal. Tanto el ganado de carne como el ganado lechero es portador de *E. coli* O157:H7 (Beutin *et al.*, 1993; Chapman *et al.*, 1993; Cobbold *et al.*, 2007). Las ovejas y las cabras también son reservorios de STEC, aunque los serotipos aislados con mayor frecuencia son O5:H-, O91:H-, O128:H2, O77:H4 y OX3:H8 (Ramachandran *et al.*, 2001; Caprioli *et al.*, 2005). Los cerdos, aves, perros y gatos han sido descritos también como reservorios de

STEC, aunque no de gran importancia (Beutin *et al.*, 1993). También se demostró que la interacción entre mascotas y niños es un factor de riesgo para el contagio (Bentancor *et al.*, 2012).

A partir del primer brote asociado a STEC ocurrido en 1982 vinculado al consumo de hamburguesas de carne vacuna (Riley *et al.*, 1983), el bovino fue considerado como potencial reservorio de este patógeno, motivando su investigación mundialmente. STEC es generalmente un miembro de la microflora transitoria intestinal y sólo rara vez causa enfermedad en terneros jóvenes debilitados. Aunque el ganado puede albergar este patógeno en el rumen, STEC se encuentra más frecuentemente en la porción distal del tracto gastrointestinal bovino, siendo la unión ano-rectal el sitio de la colonización predominante (Arthur *et al.*, 2010). Se ha informado que <300 células son suficientes para la colonización de ganado (Besser *et al.*, 2001), y sólo 10 a 100 células de *E. coli* O157:H7 son suficientes para inducir la enfermedad humana (Tuttle *et al.*, 1999). La excreción de STEC por el ganado es generalmente intermitente, siendo la colonización en el intestino de menos de 2 meses de duración con miembros del rodeo negativos durante meses. Aunque se han detectado durante todo el año, las tasas de portación están sujetas a los efectos estacionales, con tasas más altas reportadas en primavera y verano. Otros factores que se cree pueden influir en la portación de STEC son las edades de los animales y las prácticas agrícolas y ganaderas (Naylor *et al.*, 2005). La portación fecal es más frecuente en el ganado joven (2 a 24 meses) que en el ganado adulto (Monaghan *et al.*, 2011). Los animales engordados en sistemas de cría intensiva tienen una prevalencia de STEC tres veces superior a la observada en animales alimentados por meses con granos, probablemente debido a alteraciones de la flora normal, el pH y la concentración de ácidos grasos (Gannon *et al.*, 2002). A partir de las

heces de bovinos sanos se han aislado diferentes serotipos de STEC, e inclusive se demostró que un animal puede portar más de un serotipo (Masana *et al.*, 2011).

El número de STEC (UFC/g) eliminado en las heces de los animales individuales se considera importante en el contexto de la contaminación del cuero, del medio ambiente, y de la posterior contaminación de la canal durante la faena. Se cree que el fenómeno de los animales "super-eliminadores" (aquellos que eliminan $> 10^4$ UFC/g de heces) es un factor importante en la transmisión de STEC O157 dentro y entre rebaños, y en los frigoríficos (Duffy *et al.*, 2006; Matthews *et al.*, 2006). Un estudio en un frigorífico de Reino Unido encontró que el 70% de los animales positivos para *E. coli* O157 eliminaban < 100 UFC g^{-1} de las heces, pero en algunos individuos las concentraciones podrían ser de hasta 10^6 UFC g^{-1} de las heces (Omisakin *et al.*, 2003). La transmisión horizontal entre animales puede ser facilitada por el agua contaminada y los alimentos (Carroll *et al.*, 2005).

Numerosos trabajos han tenido como objetivo estudiar la presencia de STEC O157:H7 en el ganado vacuno. En 1987, Ørskov *et al.*, publicaron un trabajo donde se describe el aislamiento de STEC O157 en terneros con colibacilosis estudiados en Argentina en 1977, representando el primer hallazgo de este serotipo en el ganado bovino. Desde entonces el ganado vacuno ha sido reconocido como el principal reservorio de *E. coli* O157 en todo el mundo (Gyles, 2007).

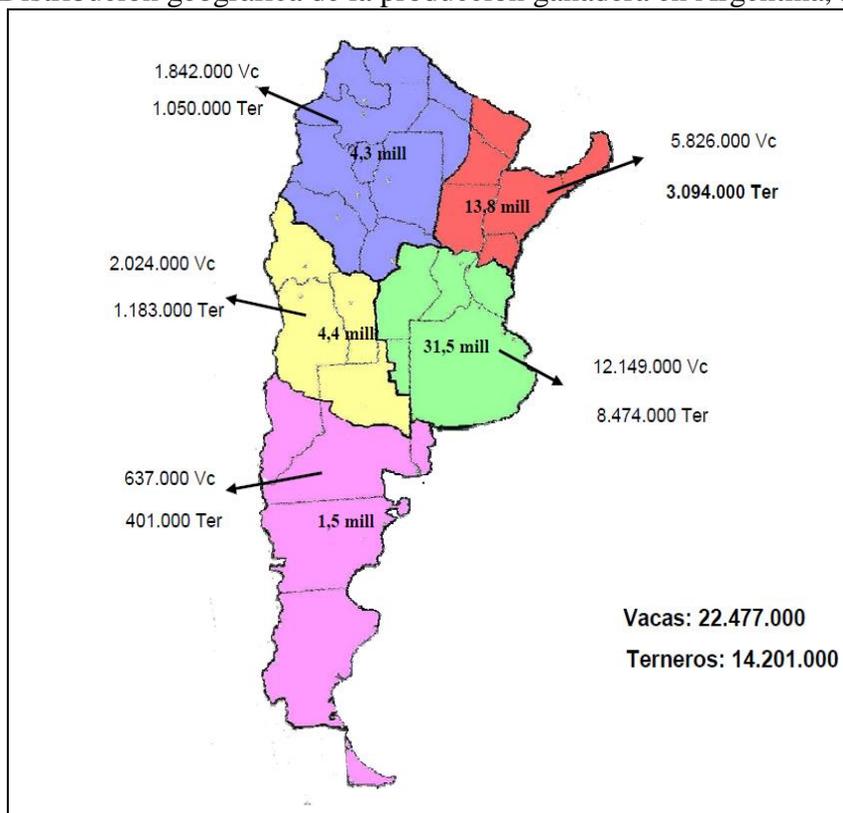
En la Tabla 2 se presentan algunos de los trabajos realizados para la detección de *E. coli* O157 en el ganado de distintos países.

Tabla 2. Prevalencia de STEC O157 en ganado bovino en diferentes países.

Tipo de muestra (N°)	País	Prevalencia (%)	Referencia
Carcasa (811)	Argentina	2,6%	Masana <i>et al.</i> , 2010
Materia fecal (811)	Argentina	4,1%	Masana <i>et al.</i> , 2010
Materia fecal (310)	Australia	13%	Fegan <i>et al.</i> , 2004
Materia fecal (310)	Australia	1,7%	Barlow <i>et al.</i> , 2010
Materia fecal (197)	Brasil	1,5%	Cerqueira <i>et al.</i> , 1999
Materia fecal (565)	Canadá	14,2%	Vidovic <i>et al.</i> , 2009
Materia fecal (136)	Chile	2,7%	Borie <i>et al.</i> , 1997
Carcasa (474)	Dinamarca	3,4%	Breum <i>et al.</i> , 2010
Materia fecal (2419)	Dinamarca	3,6%	Nielsen <i>et al.</i> , 2002 (a)
Materia fecal (589)	Escocia	7,5%	Omisakin <i>et al.</i> , 2003
Materia fecal (206)	España	6,7%	Oporto <i>et al.</i> , 2008
Carcasa (300)	España	14,7%	Ramoneda <i>et al.</i> , 2013
Materia fecal (327)	Estados Unidos	28%	Elder <i>et al.</i> , 2000
Materia fecal (1145)	Estados Unidos	19,7%	Dargatz <i>et al.</i> , 2013
Materia fecal (4663)	Inglaterra	4,2%	Paiba <i>et al.</i> , 2003
Materia fecal	Irán	0,51%	Sami <i>et al.</i> , 2007
Materia fecal (301)	Irlanda	2,7%	Thomas <i>et al.</i> , 2012
Cuero (301)	Irlanda	18,9%	Thomas <i>et al.</i> , 2012
Carcasa (301)	Irlanda	0,7%	Thomas <i>et al.</i> , 2012
Materia fecal (250)	Japón	6,4 %	Sasaki <i>et al.</i> , 2013
Materia fecal (250)	México	5,2%	Narvaez-Bravo <i>et al.</i> , 2013
Cuero (250)	México	11,7%	Narvaez-Bravo <i>et al.</i> , 2013
Carcasa (250)	México	0,8 %	Narvaez-Bravo <i>et al.</i> , 2013
Materia fecal (750)	Noruega	0,6%	LeJeune <i>et al.</i> , 2006
Materia fecal (1758)	Suecia	3,4%	Boqvist <i>et al.</i> , 2009
Materia fecal (1481)	Suecia	5,1%	Ekicson <i>et al.</i> , 2005

En Argentina la producción de carne bovina es una actividad importante para la economía, representando el 35%-40% del Producto Bruto Agropecuario Nacional. Aunque el ganado vacuno se encuentra distribuido en todo el país, existen zonas agroecológicas claramente diferenciadas que permiten dividir al país en 5 grandes regiones ganaderas: Región Pampeana, Región del Noreste (NEA), Región del Noroeste (NOA), Región Semiárida y Región Patagónica. La Región Pampeana es el área ganadera por excelencia conteniendo el 57% de la población vacuna nacional y donde se produce el 80% de la carne del país. En la Figura 6 se representan la distribución de ganado bovino en el territorio Argentino.

Figura 6. Distribución geográfica de la producción ganadera en Argentina, 2007.



Tomado de Rearte D. 2007

En nuestro país, los primeros reportes del aislamiento de STEC del ganado vacuno son del año 1998, donde Sanz *et al.*, detectaron cepas portadoras de los genes *stx*₁, *stx*₂ y *eae*, mediante hisopado rectal de terneros y vacas,. Dos años más tarde, Parma *et al.* (2000) compararon los perfiles de virulencia y serotipos de aislamientos obtenidos de terneros y bovinos adultos con los obtenidos de hamburguesas y carne picada, identificando cepas de los serotipos O20:H19, O91:H21, O113:H21, O116:H21, O117:H7, O171:H2, OX3:H21 en muestras de ambos orígenes. En el mismo año, Notario *et al.*, aislaron cepas del serogrupo O157 a partir de hisopados rectales de bovinos y cerdos.

Durante un muestreo realizado entre julio de 1998 y diciembre de 1999 en tambos de Santa Fe, Chinen *et al.* (2003) aislaron y caracterizaron STEC O157 de terneros, obteniéndose una prevalencia de 0,5% (2/422) con genotipos *stx*_{2c}/*eae*/*ehxA*, y *stx*_{2a}/*stx*_{2c}/*eae*/*ehxA*. Meichtri *et al.* (2004), reportaron también una prevalencia del 0,5%

en 200 novillitos de Buenos Aires, Córdoba, Santa Fe y San Luis, entre julio de 1999 y diciembre de 2000. El genotipo hallado fue *stx*_{1a}/*stx*_{2c}/*eae/ehxA*. En otro estudio realizado en un feed-lot para engorde en 2007, López *et al.* (2009), informaron que 49 de 256 (19%) animales muestreados fueron portadores de *E. coli* O157, dato superior al encontrado en trabajos anteriores realizados en nuestro país. Entre septiembre 2005 y noviembre 2006, Tanaro *et al.* (2010) detectaron *E. coli* O157:H7 en 11/288 (3,8%) muestras de hisopados rectales bovinos y en 1/79 (1,3%) muestras de aguas abiertas superficiales donde abrevaba el ganado, en un establecimiento productor de ganado de carne criado en forma extensiva. Los genotipos hallados fueron *stx*_{1a}/*stx*_{2c}/*eae/ehxA* (63,6%) y *stx*_{2c}/*eae/ehxA* (36,4%). El aislamiento obtenido de agua presentó el perfil genotípico *stx*_{2a}/*stx*_{2c}/*eae/ehxA*.

Siendo hasta el momento, escasos los datos sobre la prevalencia y características de las cepas de *E. coli* O157 circulantes en el ganado bovino argentino, Masana *et al.* (2010) publicaron el primer estudio de prevalencia de STEC O157 en materia fecal y carcasas de ganado vacuno de carne, a nivel de planta de faena, en nueve frigoríficos de exportación. Este estudio fue conducido entre noviembre de 2006 y abril de 2008 y presentó datos obtenidos del muestreo de 811 animales. Se aislaron 54 cepas STEC O157, obteniéndose una frecuencia de detección del 4,1% en materia fecal y 2,6% en carcasas. Los terneros (10,5%) y novillos (8,5%) presentaron mayores porcentajes de prevalencia en heces. El genotipo prevalente fue *stx*_{2a}/*stx*_{2c}/*eae/ehxA*.

Si bien la prevalencia de *E. coli* O157 en heces de ganado bovino es similar en algunos países, se observan diferencias en la incidencia de la infección humana la cual podría explicarse por la conjunción de numerosos factores, como los diferentes sistemas de vigilancia, la susceptibilidad del huésped, los hábitos culturales y alimentarios, las

cadena de provisión alimentaria, y la distinta patogenicidad de las cepas prevalentes, entre otros (Bono *et al.*, 2007; Shringi *et al.*, 2012).

Basado en esas diferencias se han realizado numerosos trabajos con el objetivo de comparar fenotípica y genotípicamente aislamientos de STEC O157:H7 provenientes de enfermedad humana con aquellos detectados en ganado vacuno.

Hay fuertes evidencias que ciertos grupos genéticos de STEC O157:H7 están sobrerrepresentados en aislamientos vinculados a enfermedad humana comparado a su prevalencia en el ganado (Manning *et al.*, 2008; Eriksson *et al.*, 2011). Estudios realizados en distintos países demostraron el predominio de linajes específicos en aislamientos de origen humano y bovino, lo cual estaría relacionado con la incidencia de enfermedad humana y su severidad. Esto ha llevado al desarrollo de metodologías de subtipificación molecular para caracterizar las poblaciones circulantes.

Mecanismo de transmisión

La principal vía de transmisión de STEC O157 y no-O157 son los alimentos contaminados, como por ejemplo, carne molida, productos cárnicos crudos o insuficientemente cocidos, 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 (WHO, 1997; Caprioli *et al.*, 2005; Oteiza *et al.*, 2006). Otras formas de transmisión incluyen el contacto directo del hombre con los animales, la contaminación cruzada durante la preparación de los alimentos, la transmisión persona a persona por la ruta fecal-oral, bañarse en aguas recreacionales contaminadas, y la concurrencia a granjas y a zoológicos (Rivas *et al.*, 2014).

En nuestro país, STEC O157 fue aislado de diferentes alimentos, especialmente carne molida cruda, y hamburguesas cocidas (Chinen *et al.*, 2001; Chinen *et al.*, 2009; Bentancor *et al.*, 2012).

La contaminación de los alimentos se debe principalmente al contacto de éstos con las heces del ganado bovino. Durante la faena, se contamina la superficie de la res, y en el procesamiento se transfiere la contaminación bacteriana al interior de la carne, donde los microorganismos pueden resistir una cocción insuficiente.

STEC es resistente a los ácidos y puede sobrevivir en alimentos fermentados. En vegetales frescos la contaminación se debe a la fertilización de los cultivos con materia fecal animal utilizada como abono, o posiblemente también la contaminación se produzca durante la cosecha o procesamiento de los mismos, ya que se observó la presencia del microorganismo en ensaladas listas para el consumo.

La contaminación fecal del agua puede deberse a la descarga de materia fecal en aguas de recreación o en aguas de pozo que son consumidas sin tratamiento previo de purificación. A pesar que *E. coli* O157:H7 es susceptible al agua clorada, cuando el mantenimiento desinfectante de las piscinas es inadecuado, pueden llegar a ocurrir brotes debido a un ineficiente sistema de control de las mismas.

En Argentina se aisló *E. coli* O157:H7 en el Río de La Plata, en áreas cercanas a las tomas de agua de los centros de purificación para el consumo humano (López *et al.*, 1998), como así también en aguas recreacionales como piletas o piletines comunitarios. (Ilardo *et al.*, 2004). Se debe remarcar que también presentan riesgo de transmisión aquellos individuos que están recuperándose de un episodio diarreico, pues pueden seguir eliminando gérmenes a través de sus heces. Diversos trabajos han descrito que la excreción de STEC O157 en humanos puede ser prolongada e intermitente (Miliwebsky *et al.*, 2007).

El tratamiento térmico es el método recomendado para asegurar la eliminación de STEC de los alimentos. La temperatura de pasteurización de la leche (72°C, durante 16,2 seg) es un método efectivo para eliminar 10^4 células de *E. coli* O157:H7 por mililitro. En los alimentos cárnicos se estableció una temperatura interna de 68,3°C, para asegurar la inactivación de *E. coli* O157:H7 (Griffin *et al.*, 1994).

Por lo tanto, hay que tener en cuenta que los animales, principalmente el ganado bovino, son el reservorio natural de STEC. Los animales excretan las bacterias en sus heces, es por ello que la contaminación fecal del agua y la diseminación de las bacterias contaminantes durante la faena y el consumo de carne insuficientemente cocida se han señalado como fuentes importantes de infección.

JUSTIFICACIÓN

- La incidencia de SUH en nuestro país está entre las más altas del mundo.
- A través de la vigilancia epidemiológica, se ha establecido que aproximadamente el 90% de los casos de SUH están precedidos por diarrea.
- Datos de la vigilancia basada en laboratorio, establecen que la mayoría de los casos están asociados a la infección por *E. coli* O157 (>70%).
- La exposición frecuente a productos cárnicos y el contacto con animales de granja han sido relacionados con un mayor riesgo de infección por STEC (Rivas *et al.*, 2014).
- Estudios de prevalencia de STEC O157 en el ganado vacuno en la Argentina han establecido una frecuencia de 2,6% y 4,1% en carcasa y materia fecal, respectivamente.
- A pesar que STEC O157:H7 es el serotipo prevalente en casos clínicos, el conocimiento de los subtipos dominantes en seres humanos y animales en Argentina y su relación genética resulta escaso.
- Es necesario profundizar los estudios genéticos de las cepas de *E. coli* O157 aisladas del reservorio bovino y ambiental, de distintas regiones del país a efectos de establecer si existe divergencia geográfica en las poblaciones circulantes, y compararlas con las cepas humanas aisladas en el mismo período.
- Los conocimientos alcanzados serán de gran interés epidemiológico para tratar de explicar la alta incidencia de enfermedad severa en el país, permitiendo establecer la relación de los subtipos génicos más frecuentes en humanos y bovinos. Esto ayudará a entender su diseminación en cada nicho biológico y a determinar las posibles rutas de transmisión.

- Toda esta información se vislumbra como muy valiosa para delinear estrategias de control y prevención de las enfermedades asociadas a STEC, de impacto en Salud Pública.

HIPOTESIS

Existe una alta correlación de subtipos entre las cepas STEC O157 aisladas de casos clínicos y del reservorio bovino.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar y comparar los subtipos de STEC O157 prevalentes en enfermedad humana y en el reservorio bovino, y correlacionar los subtipos con la gravedad de las manifestaciones clínicas.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Caracterizar feno-genotípicamente los aislamientos de STEC O157 detectados en enfermedad humana y ganado vacuno.
- Establecer la frecuencia de los factores de virulencia putativos descritos por Kulasekara *et al.* (2009).
- Subtipificar las cepas STEC O157 aisladas de infecciones humanas y del reservorio bovino, utilizando electroforesis de campo pulsado, fagotipificación y genotipificación de *stx* por PCR-RFLP.
- Establecer la relación clonal entre los aislamientos de STEC O157 de origen humano y animal por PFGE.
- Correlacionar los subtipos hallados con la gravedad de las manifestaciones clínicas.
- Establecer la estacionalidad y distribución geográfica de los eventos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamientos bacterianos

Se estudiaron 280 cepas STEC O157 aisladas entre noviembre de 2006 y abril de 2008. Un total de 226 cepas fueron aisladas de casos de infección humana, de las cuales 122 cepas correspondieron a pacientes con SUH, 69 con DS, 30 con D y 5 de portadores asintomáticos, pertenecientes a la colección del Laboratorio Nacional de Referencia (Servicio Fisiopatogenia, INEI-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán"), como parte de la Vigilancia del SUH e infecciones asociadas a STEC.

Con fines comparativos se analizaron 54 cepas STEC O157 aisladas de ganado bovino sano, correspondientes al mismo período de estudio. Estas cepas fueron aisladas en el marco de un Proyecto de prevalencia de STEC en ganado bovino, el muestreo fue realizado en 9 frigoríficos argentinos de exportación realizado en forma conjunta con el INTA-Castelar y el IPCVA (Instituto de Promoción de la Carne Vacuna Argentina) (Masana *et al.*, 2010).

Identificación bioquímica y serotipificación

A los aislamientos confirmados como *E. coli* mediante pruebas bioquímicas de acuerdo a Ewing (1986) se les realizó la determinación de biotipo (Krishnan *et al.*, 1987). La serotipificación se realizó según la metodología propuesta por Ørskov y Ørskov (1984) utilizando antisueros somáticos (O) y flagelares (H) provistos por el Instituto Nacional de Producción de Biológicos - ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán".

La sensibilidad a los antimicrobianos se evaluó mediante la prueba de difusión en agar con discos para: amikacina, ampicilina, ciprofloxacina, cloramfenicol, colistin, gentamicina, ácido nalidíxico, nitrofurantoína, estreptomina, tetraciclina, y trimetoprima-sulfametoxazol, según el método y los patrones del National Committee

for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2011).

Se realizó el ensayo de citotoxicidad en células Vero para confirmar la capacidad de producción de Stx (Karmali *et al.*, 1985).

La producción de EHEC-Hly se determinó mediante hemólisis en placa de agar sangre desfibrinada de oveja al 5% suplementado con CaCl₂ (10 mM), según la metodología descrita por Beutin *et al.* (1989).

Caracterización genotípica de los factores de virulencia por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las cepas identificadas bioquímicamente y serológicamente como *E. coli* O157:H7 fueron caracterizadas por PCR para diferentes factores de virulencia.

Para la obtención del ADN templado se partió de cultivo puro incubado a 37°C por 18 h en agar MacConkey sorbitol (SMAC). Se tomó una ansada de la zona de crecimiento confluyente y se resuspendió en 150 µl de buffer Tritón X-100 al 1% en TE 1X en tubos tipo Eppendorf de 1,5 ml. Se hirvió en baño termostático a 100°C durante 15 min. Posteriormente se centrifugaron a 10.000 rpm por 5 min. y se reservó el sobrenadante como ADN templado.

La detección de los genes *stx*₁, *stx*₂, *rfb*_{O157} se realizó por una PCR múltiple según Leotta *et al.* (2005). Los cebadores o *primers* utilizados amplifican un fragmento de la región del gen correspondiente a la subunidad B para Stx1, un fragmento de la región del gen correspondiente a la subunidad A para Stx2 y un fragmento del gen correspondiente al LPS O157.

La caracterización de los marcadores de virulencia accesorios *eae*, *ehxA* y *fliC*_{H7} se efectuó por PCR simples. Los *primers* SK1/SK2 amplifican un fragmento de la región conservada del gen *eae* para EPEC y EHEC (Karch *et al.*, 1993). Para el gen *ehxA* se utilizaron los *primers* hlyA1/hlyA4 que amplifican un fragmento de la región 5' de gen (Schmidt *et al.*, 1995), y los *primers* FLICH7-F/FLICH7-R amplifican un

fragmento de la región 5' de gen *fliC_{H7}* (Gannon *et al.*, 1997). Como control positivo se utilizaron las cepas de referencia EDL933 (*stx₁*, *stx₂*, *rfb_{O157}* y *fliC_{H7}*), 2348/69 (*eae*), E32511 (*ehxA*).

Se realizó complementariamente la detección de factores de virulencia putativos en los aislamientos mediante PCR de punto final individuales para los loci correspondientes a los siguientes factores: ECSP_3620, ECSP_0242, ECSP_3286, ECSP_2870/2872, ECSP_2687, y ECSP_1773 (Kulasekara *et al.*, 2009). Como control positivo se utilizó la cepa FP 467/03 (*stx₁*, *stx₂*, *eae*, *ehxA*, *rfb_{O157}* y *fliC_{H7}*).

Para todas las PCR se utilizó como control negativo la cepa ATCC 25922 sin factores de virulencia y un control de mezcla de reacción sin ADN. Las secuencias de los *primers*, y condiciones de ciclado de las PCR se muestra en la Tabla 3.

El volumen final de la mezcla de reacción fue de 50 µl, conteniendo las siguientes concentraciones de trabajo de los reactivos: Buffer PCR 10X, mezcla de dNTPs 2,5 mM, MgCl₂ 50 mM, *primers* específicos 0,1 nmol/µl, *Taq* polimerasa: 5U/µl y 2 µl de ADN templado, se completó el volumen final con agua tridestilada estéril. Para todas las PCR se utilizaron reactivos comerciales (Invitrogen Life Technologies, Brasil). Las concentraciones de los reactivos en la mezcla de reacción para cada PCR se describen en la Tabla 4.

Para la detección de los productos de amplificación se realizó la siembra en geles de agarosa al 1 ó 2%, según tamaño del fragmento, en TAE 1X conteniendo 0,5 µg de Bromuro de Etidio/ml. Como buffer de siembra se utilizó xilene cyanol (0,25%) y glicerol en agua (30%) en proporción 1:5 (una parte de buffer y 5 de amplificado). Se utilizó un marcador de peso molecular estándar de 100 bp (Biodynamics S.R.L., Buenos Aires, Argentina). La corrida electroforética se realizó a 80 Volts por 30-40 min y el revelado del gel se realizó en un transiluminador UV 2000 (BioRad Laboratories,

Hercules, CA, USA) y el sistema Kodak Digital Science DC 120 (Eastman Kodak Company, Rochester, NY, USA).

Subtipificación de los aislamientos

Para la subtipificación de los aislamientos se utilizaron 3 metodologías: 1) análisis de las variantes de los genes *stx*₁ y *stx*₂, 2) fagotipificación, y 3) comparación de patrones de macrorestricción generados por electroforesis de campo pulsado (PFGE). Las tres metodologías fueron combinadas para obtener así un perfil más completo de los aislamientos y poder realizar una comparación de los mismos.

-*Genotipificación stx* El análisis de las variantes *stx*₁ y *stx*₂ se realizó mediante el análisis del polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) a partir del producto de amplificación obtenido por PCR del ADN que codifica la subunidad B según lo descrito por Zhang *et al.* (2002) y Tyler *et al.* (1991), respectivamente.

El análisis de las variantes del gen *stx*₁ permite diferenciar las variantes Stx1a y Stx1c. Los genes que codifican para la subunidad B de la toxina fueron amplificados por los primers KS7/KS8, posteriormente 12 µl del producto de amplificación fue digerido con la enzima de restricción *Hha*I. Los aislamientos que poseen la variante *stx*_{1a} producen 3 fragmentos de 135, 92, 55 pb característicos de esta variante, mientras que los aislamientos *stx*_{1c} producen fragmentos de 218 y 64 pb.

Para la determinación de las variantes de *stx*₂ se utilizaron dos pares de *primers*. VT2-c y VT2-d que amplifican un fragmento común de los genes de la subunidad B de Stx2 y sus variantes, y los *primers* VT2v-1 y VT2v-2 amplifican los genes de la subunidad B de la variante. Los productos de amplificación fueron digeridos con tres enzimas de restricción (*Hae*III, *Rsa*I, y *Nci*I). Esta técnica permite diferenciar las variantes Stx2a, anteriormente denominada Stx2, y Stx2c, anteriormente denominada Stx2c(vh-a) y Stx2c(vh-b). La enzima *Hae*III no produce digestión del amplicón de 285

pb para *stx*_{2a}, y genera dos fragmentos de 161 y 124 pb para *stx*_{2c}. *RsaI* produce dos fragmentos de 216 y 69 pb para *stx*_{2a} y tres fragmentos de 136, 80 y 69 pb para *stx*_{2c}. *NciI* no produce digestión del amplicón de 285 pb en ambas variantes *stx*_{2a}, y *stx*_{2c}. En la Tabla 5 se muestran los fragmentos obtenidos por RFLP y en Figura 7 los patrones que forman estos fragmentos luego de la electroforesis.

Los productos de PCR fueron visualizados en un gel de agarosa al 2,5% teñido con bromuro de etidio. La corrida electroforética y captura de imagen se realizó de igual forma que en el ítem anterior.

-Fagotipificación. La técnica se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Ahmed *et al.* (1987), y ampliado por Khakhria *et al.* (1990), empleando un conjunto de 16 fagos provistos por el National Microbiology Laboratory, Canadian Centre for Human and Animal Health. Winnipeg, Manitoba, Canadá, que permite la diferenciación de 87 fagotipos (PT) según el patrón de lisis. Los aislamientos fueron incubados en TSA a 37°C por 18 h. Se seleccionaron tres colonias lisas y se inocularon en 5 ml de caldo nutritivo (Difco, Le Pont de Claix, Francia) y se incubaron con agitación a 37°C por 2-3 h. Un ml del caldo enriquecido se sembró en placas de agar nutritivo (Difco) para obtener una pátina sobre éstas. Una vez absorbido el inóculo, los fagos fueron inoculados en gotas de 20 µl, separadas unas de otras, y cuando las gotas dejaron de ser visibles se incubaron a 37°C por 18 h. Posteriormente, se determinó el patrón de lisis según Tabla 6.

-PFGE. La separación de los fragmentos obtenidos por macrorrestricción y el análisis de los patrones se realizó siguiendo el protocolo estandarizado de PFGE de 24 h de PulseNet para *E. coli* O157:H7, con modificaciones menores (Ribot *et al.*, 2006). La restricción enzimática del ADN inmovilizado en tacos de agarosa, se realizó con 25 U de *XbaI* (Promega Corporation, Madison, WI. USA) a 37°C durante 18 h. *BlnI*

(Promega Corporation) fue utilizada como segunda enzima según lo requerido, con 30 U a 37°C durante 18 h. La cepa *Salmonella Braenderup* H1298 (provista por el CDC, EE.UU.) fue utilizada como patrón de referencia para el análisis. La electroforesis se realizó en un gel de agarosa al 1% (Seakem Gold Agarose, Lonza, Rockland, ME, USA) con el buffer Tris borato EDTA 0,5X. Para la corrida electroforética se utilizó el equipo CHEF DR-III system (BioRad) con las siguientes condiciones: tiempo inicial del pulso, 2,2 seg; tiempo final del pulso, 54,2 seg; duración total de la corrida, 18 h a 200 V y 14°C. La adquisición de la imagen se realizó mediante un transiluminador UV 2000 (BioRad) y el sistema Kodak Digital Science DC 120 (Eastman Kodak Company). El análisis de los patrones electroforéticos se efectuó mediante el programa BioNumerics Software Package Ver. 4.0 (Applied Maths, Belgium), utilizando el coeficiente de Dice y UPGMA para generar los dendrogramas con un 1,5% de tolerancia. Los clusters fueron confirmados visualmente.

Análisis estadístico

El análisis estadístico de la frecuencia de genotipos *stx* y fagotipos entre las cepas STEC O157 humanas y bovinas se realizó por la prueba exacta de Fisher, utilizando INSTAT versión 3.05 (GraphPad Software, San Diego, CA. USA). Un valor de $P < 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo.

Tabla 3. Secuencias de *primers*, condiciones de PCR y tamaño de fragmentos de amplificación (pb) usados en este estudio.

<i>Primer</i>	Secuencia del <i>primer</i> 5'-3'	Target	Condiciones de PCR ^a			Longitud del producto de PCR (pb)	Referencia
			Desnaturalización	<i>Annealing</i>	Extensión		
stx1a	GAAGAGTCCGTGGGATTACG	<i>stx</i> ₁				130	
stx1b	AGCGATGCAGCTATTAATAA						
stx2a	TTAACCACACCCACCGGGCAGT	<i>stx</i> ₂	94°C, 30"	58°C, 30"	72°C, 30"	346	Leotta <i>et al.</i> , 2005
stx2b	GCTCTGGATGCATCTCTGGT						
O157F	CGGACATCCATGTGATATGG	<i>rfb</i> O157				259	
O157R	TTGCCTATGTACAGCTAATCC						
SK1	CCCGAATTCGGCACAAGCATAAAGC	<i>eae</i>	94°C, 30"	54°C, 1'	72°C, 2'	864	Karch <i>et al.</i> , 1993
SK2	CCGGATCCGTCTCGCCAGTATTCG						
hlyA1	GGTGCAGCAGAAAAAGTTGTAG	<i>ehxA</i>	94°C, 30"	58°C, 90"	72°C, 90"	1551	Schmidt <i>et al.</i> , 1995
hlyA4	TCTCGCCTGATAGTGTGGTA						
FLICH7-F	GCGCTGTCGAGTTCTATCGAGC	<i>fliC</i> _{H7}	94°C, 15"	60°C, 15"	72°C, 75"	625	Gannon <i>et al.</i> , 1997
FLICH7-R	CAACGGTGACTTTATCGCCATTCC						
ECSP_0242F	CCGATTTATGGAGGAAGCCAATG	ECSP_0242	94°C, 30 s	59°C 30"	72°C, 2'	600	
ECSP_0242R	GCATTACACCCAGGCTTATTCAG						
ECSP_1773F	TCTTTAAATTTTCATAACAAGGGCA	ECSP_1773	94°C, 30 s	55°C 30"	72°C, 2'	591	
ECSP_1773R	TGTACGCATCTGTAATCGTCG						
ECSP_2687F	AAGAACCCTACTACCTATTAGCGCC	ECSP_2687	94°C, 30 s	59°C 30"	72°C, 2'	876	
ECSP_2687R	GGGTTGAGTTCTACCCAAAGTG						
ECSP_2870F	TAGTTTGATTCTTGTGGCGTTCG	ECSP_2870	94°C, 30 s	58°C 30"	72°C, 2'	1968	Kulasekara <i>et al.</i> , 2009
ECSP_2870R	TAAACCTAAAGGCAAACCGTCCTC						
ECSP_2872F	GAGCATGGTTGAATGGATAAGCC	ECSP_2872	94°C, 30 s	60°C 30"	72°C, 2'	1224	
ECSP_2872R	CTTCATGATTACCTCGCCGT						
ECSP_3286F	AACCGATAAGAAACAGTATCCAG	ECSP_3286	94°C, 30 s	57°C 30"	72°C, 75"	507	
ECSP_3286R	TGCATGGTGTAACCTGCGGC						
ECSP_3620F	CGTGACTGGGAAGTACGAGATT	ECSP_3620	94°C, 30 s	60°C 30"	72°C, 90"	1335	
ECSP_3620R	GAAGTTATCCGGGACTTCACTC						

Tabla 3. Secuencias de *primers*, condiciones de PCR y tamaño de fragmentos de amplificación (pb) usados en este estudio (*continuación*).

<i>Primer</i>	Secuencia del <i>primer</i> 5'-3'	Target	Condiciones de PCR ^a			Longitud del producto de PCR (pb)	Referencia
			Desnaturalización	<i>Annealing</i>	Extensión		
KS7	CCCGGATCCATGAAAAAACATTATTAATAGC	<i>stxB</i> _{1f} / <i>stxB</i> _{1c}	94°C, 30"	52°C, 60"	72°C, 40"	282	Zhang <i>et al.</i> , 2002
KS8	CCC GAA TTC AGC TAT TCT GAG TCA ACG						
VT2-c	AAG AAG ATG TTT ATG GCG GT	<i>slt</i> -II	94°C, 2"	55°C, 2"	72°C, 1'	285	Tyler <i>et al.</i> , 1991
VT2-d	CAC GAA TCA GGT TAT GCC TC						
VT2v-1	CAT TCA CAG TAA AAG TGG CC	<i>vth</i> _{2ha} / <i>vth</i> _{2hb}				385	
VT2v-2	GGG TGC CTC CCG GTG AGT TC						

^aTodas las PCR incluyeron 30 ciclos con una desnaturalización inicial de 94°C, 5' y seguidos por un paso de extensión final de 72°C por 2 min.

Tabla 4. Concentración y volumen de reactivos en la mezcla de reacción en las PCR múltiple, *eae*, *ehxA* y *fliC_{H7}* usados en este estudio.

PCR	Múltiple			Intimina	Enterohemolisina	H7
	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>rfbO157</i>	<i>eae</i>	<i>ehxA</i>	<i>fliC_{H7}</i>
Reactivos						
Buffer		1X* (5 µl)**		1X (5 µl)	1X (5 µl)	1X (5 µl)
Mezcla de dNTP		0,1 mM (2 µl)		0,1 mM (2 µl)	0,1 mM (2 µl)	0,1 mM (2 µl)
Cl ₂ Mg		1,5 mM (1,5 µl)		1,5 mM (1,5 µl)	1,5 mM (1,5 µl)	1,5 mM (1,5 µl)
Primers F	2 pmol/µl (1 µl)	0,4 pmol/µl (0,2 µl)	0,6 pmol/µl (0,3 µl)	0,4 pmol/µl (0,2 µl)	0,4 pmol/µl (0,2 µl)	0,4 pmol/µl (0,2 µl)
Primers R	2 pmol/µl (1 µl)	0,4 pmol/µl (0,2 µl)	0,6 pmol/µl (0,3 µl)	0,4 pmol/µl (0,2 µl)	0,4 pmol/µl (0,2 µl)	0,4 pmol/µl (0,2 µl)
agua tridestilada estéril		36,3 µl		38,9 µl	38,9 µl	38,9 µl
ADN templado		2 µl		2 µl	2 µl	2 µl
<i>Taq</i> polimerasa		0,02 U/µl (0,2 µl)		0,02 U/µl (0,2 µl)	0,02 U/µl (0,2 µl)	0,02 U/µl (0,2 µl)
Volumen final		50 µl		50 µl	50 µl	50 µl

* Concentración del reactivo en la mezcla de reacción

** Volumen del reactivo en la mezcla para una determinación (µl)

Tabla 4. Concentración y volumen de reactivos en la mezcla de reacción en las diferentes PCR usados en este estudio (*continuación*).

PCR	ECSP_1773 ECSP_2872	ECSP_2870	ECSP_0242 ECSP_2687	ECSP_3620	ECSP_3286	variantes <i>stx</i> ₁	variantes <i>stx</i> ₂
Reactivos							
Buffer	1X* (5µl) **	1X (5µl)	1X (5µl)				
Mezcla de dNTP	0,1 mM (2µl)	0,1 mM (3µl)	0,1 mM (2µl)	0,1 mM (2µl)	0,1 mM (3µl)	0,1 mM (2µl)	0,1 mM (2µl)
Cl ₂ Mg	1,5 mM (1,5µl)	1,5 mM (1,5µl)	1,5 mM (1µl)	1,5 mM (1,5µl)	1,5 mM (1,5µl)	1,5 mM (1,5µl)	1,5 mM (1,5µl)
Primers F	0,5 pmol/µl (0,25 µl)	0,4 pmol/µl (0,2 µl)	0,4 pmol/µl (0,2 µl)	0,4 pmol/µl (0,2 µl)	0,4 pmol/µl (0,2 µl)	0,6 pmol/µl (0,2 µl)	0,8 pmol/µl (0,2 µl)
Primers R	0,5 pmol/µl (0,25 µl)	0,4 pmol/µl (0,2 µl)	0,4 pmol/µl (0,2 µl)	0,4 pmol/µl (0,2 µl)	0,4 pmol/µl (0,2 µl)	0,6 pmol/µl (0,2 µl)	0,8 pmol/µl (0,2 µl)
agua tridestilada estéril	38,7 µl	34,8 µl	39,4µl	38,9 µl	37,9 µl	38,9 µl	38,9 µl
AND templado	2 µl	5 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
<i>Taq</i> polimerasa	0,02 U/µl (0,3 µl)	0,02U/µl (0,3 µl)	0,02 U/µl (0,2 µl)	0,02 U/µl (0,2 µl)	0,02 U/µl (0,2 µl)	0,02 U/µl (0,2 µl)	0,02 U/µl (0,2 µl)
Volumen final	50µl	50µl	50µl	50µl	50µl	50µl	50µl

* Concentración del reactivo en la mezcla de reacción

** Volumen del reactivo en la mezcla para una determinación (µl)

Tabla 5. Tamaños de los fragmentos obtenidos por RFLP para la subunidad B

Enzima de restricción	Stx2a	Stx2c	
		Stx2v-a	Stx2v-b
<i>HaeIII</i>	285	161, 124	161, 124
<i>RsaI</i>	216, 69	136, 80, 69	216, 69
<i>NciI</i>	285	285	159, 126

Figura 7. Patrones generados por los fragmentos obtenidos por PCR-RFLP.

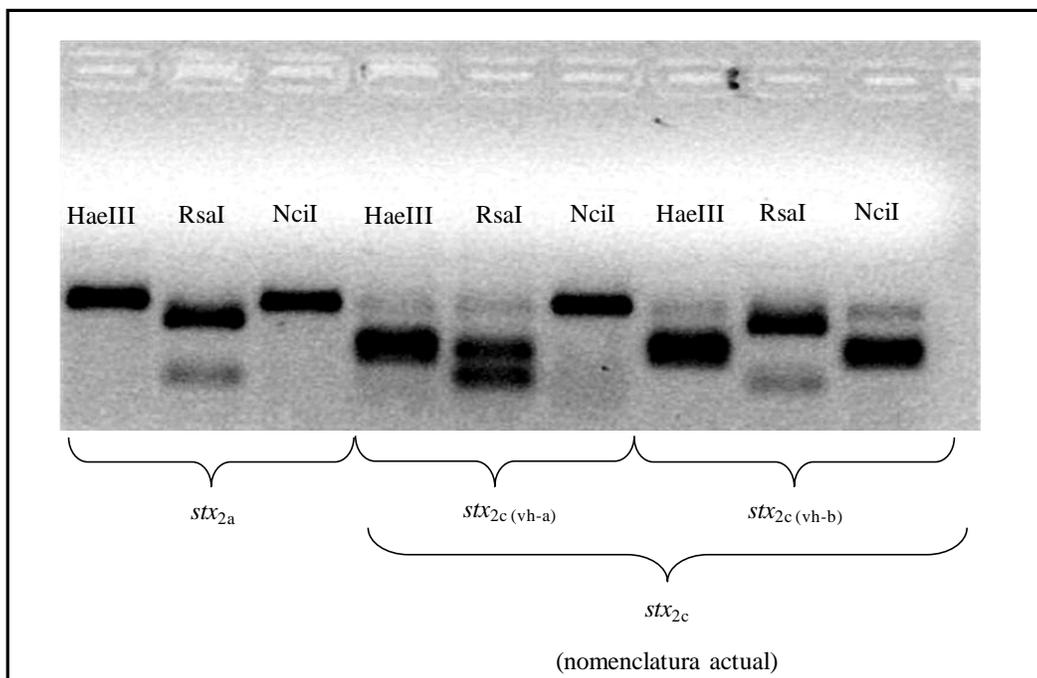


Tabla 6. Patrones líticos producidos en la fagotipificación de cepas de *Escherichia coli* O157:H7.

Fagotipo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1	<CL	CL	SCL	<SCL	SCL	-	<SCL	CL	-	-	CL	CL	-	<SCL	CL	SCL
2	CL	CL	<CL	-/<SCL	-	<SCL	<SCL	CL	OL	-	CL	CL	CL	-	CL	SCL
3	+++	-	SCL	-	-	-	<SCL	-°	OL	OL	SCL	CL	-	-	SCL	SCL
4	CL	CL	SCL	<<SCL	<<SCL	-	<SCL	CL	OL	OL	CL	CL	-	<SCL	CL	<CL
5	-	-	SCL	SCL	-	SCL	SCL	-	OL	OL	<<OL	<OL	CL	-	-	-
6	-	-	SCL	SCL	-	+++	SCL	-	-	-	SCL	-	SCL	-	-	-
7	-	-	SCL	SCL	SCL	-	-	-	-	-	SCL	-	-	SCL	-	-
8	CL	CL	<CL	<<SCL	SCL	SCL	SCL	CL	-	-	CL	CL	CL	<SCL	CL	<SCL
9	SCL	SCL	SCL	CL	SCL	+++	SCL	SCL	-	-	SCL	CL	-	-	-	CL
10	SCL	SCL	-	SCL	SCL	-	-	SCL	<<OL	<OL	+++	CL	-	CL	CL	CL
11	SCL	SCL	SCL	SCL	SCL	-	-	SCL	<<OL	-	SCL	SCL	-	SCL	SCL	SCL
12	SCL	SCL	SCL	CL	CL	-	SCL	SCL	-	-	+++	SCL	SCL	-	SCL	SCL
13	-	-	SCL	SCL	-	+++	+++	-°	<<OL	<<OL	<<OL	-	SCL	-	-	-
14	CL	CL	SCL	<<SCL	<SCL	<SCL	<<SCL	CL	OL	OL	CL	CL	CL	<<SCL	CL	<CL
15	SCL	+++	SCL	SCL	-	+++	SCL	SCL	-	-	SCL	SCL	SCL	-	SCL	SCL
16	-	+++	SCL	+++	-	+++	<SCL	-	<OL	<OL	-	+++	SCL	-	-	-
17	-	+++	+++	+++	-	-/+++	SCL	-	<OL	-	SCL	-	+++	-	-	-
18	-	-	+++	+++	-	-/++	+++	-	-	-	<<OL	-/++	<CL	-	-	-
19	-	+++	-	-	-	-	+++	-	-	-	<OL	+++	-	-	-	+++
20	-	-	+++	-/+++	-	++	-	-	-	-	-	-	<SCL	-	-	-
21	-	-	<<SCL	-	-	-	+++	-°	<OL	<OL	P-	-	-	-	-	-
22	-	-	-	-	-	-	-	+++	<OL	<OL	-	SCL	-	-	-	-
23	<CL	CL	SCL	-	-	-	SCL	CL	-	-	CL	<CL	-	-	CL	SCL
24	CL	CL	SCL	-	-	-	+++	CL	OL	-	CL	CL	-/++	-	CL	<<SCL
25	-	-	SCL	+++	-	<SCL	<SCL	-°	-	-	<<OL	<<OL	CL	-	-	-
26	<CL	SCL	+++	+++	+++	-	+++	CL	<OL	<OL	CL	CL	-	-	CL	SCL
27	+++	-/<<OL	SCL	-/+++	-	<<SCL	<<SCL	-/CL	+++	+++	CL	CL	CL	-	SCL	+++
28	-°	-	SCL	-°	-	-	<<SCL	-	<OL	<OL	-/<<OL°	-/<<OL°	-	-	-	-
29	<<OL°	-	+++	-	-	-	+++	+++	-	-	-	+++	-	-	+++	+++

Tabla 6. Patrones líticos producidos en la fagotipificación de cepas de *Escherichia coli* O157:H7 (continuación).

Fagotipo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
30	-/++	<OL	+++	+++	+++	-	+++	-°	-	-	<<OL	<<OL	+	-	-/++	<OL
31	-	-	<SCL	-	-	<SCL	<SCL	-	-	-	P-	-	CL	-	-	-
32	-	-	<SCL	-	-	SCL	SCL	-°	OL	OL	P-	-	CL	-	-	-
33	-	-	<<SCL	-	-	-	<<SCL	-	-	-	P-	-	-	-	-	-
34	SCL	CL	+++	-	-	+++	+++	CL	++/<OL	+++/<OL	CL	CL	<CL	-	CL	CL
35	CL	-°	<SCL	SCL	+++	-	+++	CL	-	-	CL	CL	-	-	<CL	-/+s
36	<CL	-	<SCL	<<SCL	+++	-/+s	+++	CL	<OL	<OL	CL	CL	-	-/+s	CL	-/+s
37	CL	<<OL	SCL	+++	-/+	-	+++	CL	-	-	CL	CL	-	-	CL	<<OL
38	-	-	-/+s	-	-	-	-/+u	-	OL	OL	-	-	-	-	-/+s	-
39	<<OL	-	+++	-/+s	-/+s	+++	+++	<OL	<OL	<OL	<<OL	<<OL	CL	-	<<OL	-
40	<OL	-	+++	-	-	-	+++	CL	OL	OL	CL	CL	-	-	SCL	-°
41	<CL	CL	<<SCL	<<SCL	+++	-	-	CL	OL	OL	CL	CL	-	+++	CL	<CL
42	<SCL	<<OL	<<SCL	-	-	-	+++	CL	<OL	<OL	SCL	SCL	-	-	<<SCL	-/++
43	<<OL	-	SCL	-	-	<<SCL	+++	<<OL	-	-	<<OL	<<OL	CL	-	<<OL	-
44	-°	<<OL	<<SCL	+++	+++	-	+++	P-/ts	-	-	P-	-	-	-	P-	<SCL
45	<CL	<OL	+++	-	-/+	-	+++	CL	+++/OL	+++/OL	CL	CL	-	-/+	SCL	+++
46	-	-	<SCL	-	-	-	-	-	<OL	<OL	-	-	-	-	-	-
47	<CL	-	SCL	+++	+++	-	+++	CL	OL	OL	CL	CL	-	+++	CL	-
48	<CL	CL	SCL	<<SCL	<<SCL	+++	-	CL	OL	OL	CL	CL	SCL	SCL	CL	SCL
49	<CL	-	SCL	<<SCL	<<SCL	<SCL	<CL	CL	OL	OL	CL	CL	CL	CL	CL	-
50	-/SCL	-	SCL	-	-	<<SCL	+++	CL	OL	-	CL	CL	CL	-	<OL	-
51	-	-	+++	-	-	+++	<<SCL	-	<OL	-	+	-	+++	-	-	-
52	SCL	-	+++	+	-	-	<<SCL	SCL	-	-	<CL	<<OL	-	++	<<SCL	-
53	<<OL	-	<<SCL	+++	+++	+++	<<SCL	<<OL	+++	<<OL	<<OL	<<OL	<<SCL	-	+++	+++
54	<CL	CL	+++	-	-	+++	++	<CL	-	-	<CL	SCL	<<SCL	-	<<SCL	<SCL
55	<CL	CL	<<SCL	<<SCL	+++	-	-	CL	-	-	CL	CL	SCL	SCL	CL	SCL
56	<CL	CL	+++	<<SCL	+++	-	-	CL	-	-	CL	CL	-	+++	CL	SCL
57	<<OL	<<OL	<<SCL	+++	+++	-	+++	<<OL	<OL	OL	-	-	-	-	+	SCL
58	-	<<OL	<<SCL	+	+	-	+++	+	-	-	-	-	-	-	-	SCL

Tabla 6. Patrones líticos producidos en la fagotipificación de cepas de *Escherichia coli* O157:H7 (continuación).

Fagotipo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
59	-	+	<<SCL	+++	+++	+++	<<SCL	+	+++	<<OL	P-	P-	SCL	+++	-	<<SCL
60	-	+	+++	+++	+++	-	+++	-	-	-	P-	-	-	-	-	<SCL
61	SCL	<<OL	<<SCL	+++	+++	+++	-	CL	-	-	CL	CL	SCL	+++	SCL	+++
62	<CL	-	<<SCL	+++	++	-	<<SCL	-	+++	<OL	P-	-	-	+++	<CL	-
63	CL	SCL	-	-	-	-	SCL	CL	-	-	CL	CL	-	-	CL	SCL
64	-	-	<<SCL	+++	+++	-	+++	-	-	-	-	-	-	+++	-	<<SCL
65	-	-	+++	<<SCL	+++	+++	<<SCL	-	<OL	<OL	P-	-	+++	-	-	+++
66	-	-	<<SCL	-	-	+++	SCL	<<SCL	<OL	<OL	P-	-	+++	-	-	-
67	CL	CL	<<SCL	-	-	-	-	CL	-	-	CL	CL	-	-	CL	<<SCL
68	CL	-	SCL	-/ <<SCL	-	<<SCL	<<SCL	CL	OL	OL	CL	CL	<<SCL	-	<CL	-
69	+++	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	+++
70	CL	<<SCL	-	-	-	-	<<SCL	CL	<<SCL	<OL	CL	CL	-	-	CL	+++
71	CL	-	+++	-	-	+++	<<SCL	CL	-	-	CL	CL	+++	-	<CL	+++
72	-	-	+++	-	-	+++	-	-	<OL	<OL	-	-	++	-	-	-
73	<CL	-	+++	<CL	+++	++	+++	CL	-	-	CL	<CL	++	++	<SCL	-
74	CL	<<SCL	-	-	-	-	-/+u	CL	+/<OL	++/OL	CL	<CL	-	-	SCL	SCL
75	<SCL	-	+++	<OL	+++	+++	-	CL	-	-	CL	SCL	+++	<<SCL	+++	-
76	<<SCL	-	<<SCL	+++	-	<<SCL	SCL	<<SCL	<OL	OL	<<SCL	<<SCL	+++	-	-	-
77	CL	+++	-	-	-	-	-	CL	OL	-	CL	CL	-	-	<CL	++
78	<<SCL	-	<<SCL	-	-	-	<<SCL	<<SCL	<OL	OL	<<SCL	<<SCL	-	-	-	-
79	<<SCL	-	-	-	-	-	<<SCL	<<SCL	<OL	OL	<<SCL	<<SCL	-	-	<<SCL	-
80	<<SCL	-	-	-	-	-	<<SCL	<<SCL	<OL	-	<<SCL	<<SCL	-	-	-	-
81	-/SCL	-	-	-	-	-	-	<<SCL	<OL	<<SCL	<<SCL	<<SCL	-	-	<<SCL	-/+
82	-	-	<<SCL	-	-	+++	<<SCL	CL	-	-	<CL	<<SCL	+++	-	-	-
83	<CL	+++	CL	<<SCL	++	-	<<SCL	CL	<OL	OL	CL	<CL	-	++	<CL	<<SCL
NT*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

* No tipificable. CL, lisis confluyente. OL, lisis opaca. SCL, lisis semi confluyente. +++, 71-100 placas de lisis. ++, 21-70 placas. +, 5-20 placas. - no reacción. °, reacción inhibitoria con micro placas. P, menos de 5 placas. +/-, un posible rango de reacciones entre - y ++.

RESULTADOS

Caracterización de los aislamientos

Las 280 cepas STEC O157:H7 estudiadas no fermentaron el sorbitol, y la actividad de la enzima β -D-glucuronidasa fue negativa. Entre las cepas de ambos orígenes, el biotipo C (ramnosa+/dulcitol+) fue predominante (93,6%), mientras que 14 (5%) cepas (12 humanas y dos bovinas) pertenecieron al biotipo B (ramnosa- / dulcitol+), y cuatro (1,4%) humanas pertenecieron al biotipo D (ramnosa+/dulcitol-). Ninguna cepa correspondió al biotipo A.

Entre las 226 cepas humanas, 219 (96,9%) fueron sensibles a todos los antibióticos ensayados, dos cepas fueron resistentes a tetraciclina, una a ampicilina, una a ampicilina y trimetoprima sulfametoxazol, una a ampicilina y gentamicina, y dos a ampicilina, estreptomycin y tetraciclina. Entre las 54 cepas de la especie bovina, 48 (89%) fueron sensibles, dos cepas fueron resistentes al ácido nalidíxico, una a ampicilina, otra a estreptomycin, y dos a ácido nalidíxico y trimetoprima sulfametoxazol.

En todos los aislamientos se demostró la producción de Stx en los ensayos de citotoxicidad específica en células Vero.

De las 280 cepas, 14 (5%) portaron el gen *stx*₁ siempre en combinación con *stx*₂. El gen *stx*₂ se presentó en la totalidad de las cepas estudiadas. Todas las cepas humanas y bovinas portaron los genes *eae*, *ehxA*, *rfb*_{O157} y *fliC*_{h7}. El 95% de las cepas que portaban el gen *ehxA* expresaron el fenotipo enterohemolítico, sin embargo esta actividad no se detectó en 14 (25,9%) cepas de origen bovino.

Subtipificación de los aislamientos

El total de los aislamientos productores de Stx1 portaron la variante *stx*_{1a}. El gen *stx*₁ siempre se presentó en combinación con genes *stx*₂, y fue detectado con mayor frecuencia en cepas animales (16,6%) que en cepas humanas (2,2%). El análisis de las variantes del gen *stx*₂, reveló que el genotipo *stx*_{2a}/*stx*_{2c} fue el más detectado (72,1%) en cepas de ambos orígenes, con una mayor frecuencia en aislamientos humanos (76,1%) que en bovinos (55,5%) ($P < 0,05$). La variante *stx*_{2a} sola se detectó también en cepas humanas (20,8%) y bovinas (9,2%). En las cepas humanas, la variante *stx*_{2c} se detectó en una muy baja frecuencia (0,9%), mientras que en las cepas de la especie bovina fue el segundo genotipo encontrado (16,7%) ($P < 0,0001$). Los genotipos *stx*_{1a}/*stx*_{2a}, *stx*_{1a}/*stx*_{2c} y *stx*_{2no tipificable} solo se detectaron en cepas de origen animal. Los resultados de la genotipificación de *stx* se presentan en la Tabla 7.

Tabla 7. Genotipos *stx* encontrados en aislamientos de *Escherichia coli* O157:H7 de origen humano y bovino.

genotipo <i>stx</i>	Nº de aislamientos (%)		
	Total (n=280)	Humano (n=226)	Bovino (n=54)
<i>stx</i> _{2a} / <i>stx</i> _{2c}	202 (72,1)	172 (76,1)	30 (55,5)^a
<i>stx</i> _{2a}	52 (18,6)	47 (20,8)	5 (9,2)
<i>stx</i> _{2c}	11 (3,9)	2 (0,9)	9 (16,7)^a
<i>stx</i> _{1a} / <i>stx</i> _{2a} / <i>stx</i> _{2c}	9 (3,2)	5 (2,2)	4 (7,4)
<i>stx</i> _{1a} / <i>stx</i> _{2a}	4 (1,4)	0	4 (7,4)^a
<i>stx</i> _{1a} / <i>stx</i> _{2c}	1 (0,4)	0	1 (1,8)
<i>stx</i> _{2NT} ^b	1 (0,4)	0	1 (1,8)

^aFrecuencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$).

^bNo tipificable.

Por fagotipificación, se determinaron un total de 20 fagotipos (PT) entre las 280 cepas. De las 226 cepas humanas, 214 (94,7%) se clasificaron en 15 PTs diferentes y 12 (5,3%) cepas no mostraron un patrón de lisis incluido en el esquema de tipificación, por

lo que fueron clasificadas como RDNC (del inglés, *react but do not confirm*). PT4 (37,6%), PT49 (24,3%) y PT2 (18,6%) fueron los más frecuentes, constituyendo un 80,5% de los PTs encontrados. Los aislamientos bovinos fueron agrupados en 12 PTs y dos (3,7%) fueron RDNC. PT2 (26%), PT39 (16,7%), PT4 y PT49 (11,1% cada uno) fueron predominantes, lo que representa el 64,9% del total. PT4 estuvo fuertemente asociado a cepas humanas y PT39 a cepas bovinas ($P < 0,0001$). PT14, PT24, PT36, PT37, PT40, PT47, PT50 y PT54 sólo se detectaron en cepas humanas, mientras que PT21, PT31, PT33, PT43 y PT51 sólo se encontraron en cepas bovinas (Tabla 8).

Tabla 8. Fagotipos detectados en aislamientos de *Escherichia coli* O157:H7 de origen humano y bovino.

Fagotipos	Nº de aislamientos (%)		
	Total (n=280)	Humano (n=226)	Bovino (n=54)
PT2	56 (20)	42 (18,6)	14 (26)
PT4	91 (32,5)	85 (37,6)	6 (11,1)^a
PT8	5 (1,8)	3 (1,3)	2 (3,7)
PT10	2 (0,7)	1 (0,4)	1 (1,85)
PT14	8 (2,9)	8 (3,5)	0
PT21	4 (1,4)	0	4 (7,4)
PT24	1 (0,4)	1 (0,4)	0
PT26	5 (1,8)	2 (0,9)	3 (5,55)
PT31	1 (0,4)	0	1 (1,85)
PT33	3 (1,1)	0	3 (5,55)
PT36	1 (0,4)	1 (0,4)	0
PT37	1 (0,4)	1 (0,4)	0
PT39	10 (3,6)	1 (0,4)	9 (16,7)^a
PT40	1 (0,4)	1 (0,4)	0
PT43	2 (0,7)	0	2 (3,7)
PT47	2 (0,7)	2 (0,9)	0
PT49	61 (21,8)	55 (24,3)	6 (11,1)^a
PT50	1 (0,4)	1 (0,4)	0
PT51	1 (0,4)	0	1 (1,85)
PT54	10 (3,6)	10 (4,4)	0
RDNC	14 (5)	12 (5,3)	2 (3,7)

^aFrecuencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$).

La relación entre genotipo-*stx* y fagotipo, en cepas de ambos orígenes, reveló que en las cepas aisladas de casos humanos, el genotipo *stx*_{2a}/*stx*_{2c} se asoció principalmente con PT49 (52/172, 30,2%), seguido de PT4 (50/172, 29,1%), y PT2 (39/172, 22,7%), mientras que en las cepas de la especie bovina este genotipo *stx* estuvo principalmente relacionado con el PT2 de forma significativa (12/30, 40%). Es importante destacar que el genotipo *stx*_{2a} se asoció fuertemente con PT4 (32/47, 68,1%) en cepas humanas, y el genotipo *stx*_{2c} al PT39 (6/9, 66,7%) en cepas de la especie bovina, en ambos caso con una significancia de ($P < 0,0001$). El genotipo *stx*_{1a}/*stx*_{2a} de origen animal perteneció al PT21 (Tabla 9).

Tabla 9. Relación encontrada entre genotipos *stx* y PTs predominantes en aislamientos de *Escherichia coli* O157:H7 de origen humano y bovino.

genotipo <i>stx</i>	Origen	Nº	PT (%)
<i>stx</i> _{2a} / <i>stx</i> _{2c}	Humano	172	PT49 (30,2), PT4 (29,1), PT2 (22,7)
	Bovino	30	PT2 (40)^a , PT4 y PT49 (20, cada uno), PT26 (6,7)
<i>stx</i> _{2a}	Humano	47	PT4 (68,1)^a , PT2 (6,4), PT47, PT49, y PT54 (4,3, cada uno)
	Bovino	5	PT2, y PT33 (40, cada uno), PT8 (20)
<i>stx</i> _{2c}	Humano	2	PT8
	Bovino	9	PT39 (66,7)^a , PT43 (22,2), PT8 (11,1)
<i>stx</i> _{1a} / <i>stx</i> _{2a} / <i>stx</i> _{2c}	Humano	5	PT4 (60), PT26, y PT49 (20, cada uno)
	Bovino	4	PT10, PT26, PT31, PT39
<i>stx</i> _{1a} / <i>stx</i> _{2a}	Humano	0	
	Bovino	4	PT21^a
<i>stx</i> _{1a} / <i>stx</i> _{2c}	Humano	0	
	Bovino	1	PT39
<i>stx</i> ₂ NT ^b	Humano	0	
	Bovino	1	PT33

^aFrecuencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$). ^bNo tipificable.

Por *Xba*I-PFGE, las 280 cepas STEC O157 generaron 144 patrones diferentes con 75,32% de similitud. Ciento setenta y seis cepas se agruparon en 39 *clusters* y 104 cepas presentaron patrones únicos (Anexo). Veinte y seis *clusters* agruparon cepas aisladas exclusivamente de casos humanos, ocho *clusters* fueron específicos de cepas bovinas, y cinco *clusters* (VII, XIX, XXXI, XXXII, XXXIV) incluyeron cepas de ambos orígenes, humanas (40) y bovinas (12) (Tabla 10).

Tabla 10. Distribución de aislamientos de *Escherichia coli* O157:H7 de origen humano y bovino en *clusters* por *Xba*I-PFGE.

<i>Cluster</i>	Patrones de <i>Xba</i> I-PFGE	Genotipo- <i>stx</i>	PT	Origen (N°)
I	AREXHX01.0447	<i>stx</i> _{2a} / <i>stx</i> _{2c}	2	Humano (3)
II	AREXHX01.0545	<i>stx</i> _{2a} / <i>stx</i> _{2c}	2	Bovino (2)
III	AREXHX01.0049	<i>stx</i> _{2a} / <i>stx</i> _{2c}	RDNC	Humano (5)
IV	AREXHX01.0507	<i>stx</i> _{2c}	39	Bovino (6)
V	AREXHX01.0514	<i>stx</i> _{2c}	43	Bovino (2)
VI	AREXHX01.0007	<i>stx</i> _{2a} / <i>stx</i> _{2c}	4	Humano (2)
VII	AREXHX01.0011	<i>stx</i>_{2a}/<i>stx</i>_{2c}	4	Humano (12), Bovino (1)
		<i>stx</i> _{2a} / <i>stx</i> _{2c}	RDNC	Bovino (1)
		<i>stx</i> _{2a}	4	Humano (5)
		<i>stx</i> _{2a} / <i>stx</i> _{2c}	14	Humano (1)
VIII	AREXHX01.0064	<i>stx</i> _{2a}	4	Humano (13)
IX	AREXHX01.0420	<i>stx</i> _{1a} / <i>stx</i> _{2a} / <i>stx</i> _{2c}	4	Humano (3)
X	AREXHX01.0469	<i>stx</i> _{2a}	54	Humano (1)
		<i>stx</i> _{2a}	8	Humano (1)
XI	AREXHX01.0057	<i>stx</i> _{2a} / <i>stx</i> _{2c}	4	Humano (4)
		<i>stx</i> _{2a}	4	Humano (2)
		<i>stx</i> _{2a} / <i>stx</i> _{2c}	49	Humano (1)
XII	AREXHX01.0476	<i>stx</i> _{2a} / <i>stx</i> _{2c}	4	Humano (2)
XIII	AREXHX01.0086	<i>stx</i> _{2a} / <i>stx</i> _{2c}	2	Humano (2)
XIV	AREXHX01.0200	<i>stx</i> _{2a} / <i>stx</i> _{2c}	4	Humano (2)
		<i>stx</i> _{2a}	4	Humano (5)
XV	AREXHX01.0193	<i>stx</i> _{2a} / <i>stx</i> _{2c}	4	Humano (2)
XVI	AREXHX01.0341	<i>stx</i> _{2a} / <i>stx</i> _{2c}	4	Humano (3)
XVII	AREXHX01.0038	<i>stx</i> _{2a} / <i>stx</i> _{2c}	4	Humano (2)
XVIII	AREXHX01.0458	<i>stx</i> _{1a} / <i>stx</i> _{2a} / <i>stx</i> _{2c}	26	Bovino (1)
		<i>stx</i> _{2a} / <i>stx</i> _{2c}	26	Bovino (2)
XIX	AREXHX01.0543	<i>stx</i>_{2a}/<i>stx</i>_{2c}	4	Humano (1), Bovino (4)
XX	AREXHX01.0454	<i>stx</i> _{2a} / <i>stx</i> _{2c}	37	Humano (1)
		<i>stx</i> _{2c}	8	Humano (1)
XXI	AREXHX01.0058	<i>stx</i> _{2a} / <i>stx</i> _{2c}	26	Humano (1)
		<i>stx</i> _{2a} / <i>stx</i> _{2c}	4	Humano (1)
XXII	AREXHX01.0517	<i>stx</i> _{2a}	33	Bovino (2)
		<i>stx</i> ₂ NT ^c	33	Bovino (1)

Table 10. Distribución de aislamientos de *Escherichia coli* O157:H7 de origen humano y bovino en *clusters* por *Xba*I-PFGE (*coninuación*).

<i>Cluster</i>	Patrones de <i>Xba</i> I-PFGE	Genotipo- <i>stx</i>	PT	Origen (N°)
XXIII	AREXHX01.0460	<i>stx</i> _{2a} / <i>stx</i> _{2c}	2	Bovino (3)
XXIV	AREXHX01.0013	<i>stx</i> _{2a} / <i>stx</i> _{2c}	49	Humano (1)
		<i>stx</i> _{2a}	49	Humano (1)
XXV	AREXHX01.0427	<i>stx</i> _{2a}	4	Humano (1)
		<i>stx</i> _{1a} / <i>stx</i> _{2a} / <i>stx</i> _{2c}	4	Humano (1)
XXVI	AREXHX01.0001	<i>stx</i> _{2a} / <i>stx</i> _{2c}	2	Humano (1)
		<i>stx</i> _{2a} / <i>stx</i> _{2c}	24	Humano (1)
		<i>stx</i> _{2a} / <i>stx</i> _{2c}	49	Humano (1)
XXVII	AREXHX01.0144	<i>stx</i> _{2a} / <i>stx</i> _{2c}	2	Humano (5)
XXVIII	AREXHX01.0045	<i>stx</i> _{2a} / <i>stx</i> _{2c}	2	Humano (5)
XXIX	AREXHX01.0095	<i>stx</i> _{2a} / <i>stx</i> _{2c}	2	Humano (4)
XXX	AREXHX01.0143	<i>stx</i> _{2a} / <i>stx</i> _{2c}	2	Humano (2)
XXXI	AREXHX01.0076	<i>stx</i> _{2a} / <i>stx</i> _{2c}	2	Humano (1), Bovino (4)
XXXII	AREXHX01.0175	<i>stx</i> _{2a} / <i>stx</i> _{2c}	49	Humano (7), Bovino (1)
XXXIII	AREXHX01.0153	<i>stx</i> _{2a} / <i>stx</i> _{2c}	49	Humano (10)
		<i>stx</i> _{2a}	4	Humano (1)
		<i>stx</i> _{2a} / <i>stx</i> _{2c}	RDNC ^b	Humano(1)
XXXIV	AREXHX01.0022	<i>stx</i> _{2a} / <i>stx</i> _{2c}	49	Humano (9), Bovino (1)^a
		<i>stx</i> _{2a} / <i>stx</i> _{2c}	4	Humano (1)
		<i>stx</i> _{2a} / <i>stx</i> _{2c}	14	Humano (3)
XXXV	AREXHX01.0093	<i>stx</i> _{2a} / <i>stx</i> _{2c}	49	Humano (2)
XXXVI	AREXHX01.0189	<i>stx</i> _{2a} / <i>stx</i> _{2c}	49	Humano (2)
XXXVII	AREXHX01.0145	<i>stx</i> _{2a} / <i>stx</i> _{2c}	54	Humano (2)
XXXVIII	AREXHX01.0267	<i>stx</i> _{2a} / <i>stx</i> _{2c}	49	Bovino (3)
XXXIX	AREXHX01.0544	<i>stx</i> _{1a} / <i>stx</i> _{2a}	21	Bovino (4)

^aIdéntico perfil *Xba*I PFGE-*stx*-PT detectados en aislamientos de ambos orígenes es mostrado en negrita.

^bRDNC: del ingles, *React but does not conform to the current phage typing scheme*.

^cNT: No tipificable

Combinando las tres técnicas de subtipificación, se detectaron los siguientes perfiles de genotipo *stx*-PT-patrón *Xba*I-PFGE en cepas de ambos orígenes: *stx*_{2a}/*stx*_{2c}-PT4-AREXHX01.0011 (12 cepas humanas y una cepa bovina), *stx*_{2a}/*stx*_{2c}-PT4-AREXHX01.0543 (1 cepa humana y 4 cepas bovinas), *stx*_{2a}/*stx*_{2c}-PT2-AREXHX01.0076 (1 cepa humana y 4 cepas bovinas), *stx*_{2a}/*stx*_{2c}-PT49-AREXHX01.0175 (7 cepas humanas y una cepa bovina), y *stx*_{2a}/*stx*_{2c}-PT49-AREXHX01.0022 (9 cepas humanas y una cepa bovina) (Figura 7).

Se utilizó *BlnI* como segunda enzima de restricción en aquellas cepas con igual patrón de *XbaI*-PFGE. Todas las cepas humanas y bovinas del perfil *stx_{2a}/stx_{2c}*-PT49-AREXH01.0175 y del perfil *stx_{2a}/stx_{2c}*-PT49-AREXH01.0022, mostraron patrones de macrorestricción idénticos por lo que no pudieron ser discriminadas. La cepa bovina perteneciente al perfil *stx_{2a}/stx_{2c}*-PT4-AREXH01.0011 mostró idéntico patrón de *BlnI*-PFGE con cinco de las 12 cepas humanas. Las cepas humanas pertenecientes a los perfiles *stx_{2a}/stx_{2c}*-PT4-AREXH01.0543 y *stx_{2a}/stx_{2c}*-PT2-AREXH01.0076 pudieron ser discriminadas por *BlnI*-PFGE de las especies bovina, presentando patrones de macrorestricción con 91,9% y 89,5% de similitud respectivamente (Figura 8).

Por fuera de período de estudio, algunos aislamientos de origen bovino tuvieron 100% de similitud con patrones de PFGE de aislamientos de origen humano. Se observaron 8 clusters donde se encontraron relacionados aislamientos bovinos con aislamientos de origen humano y alimentos. Se encontraron idénticos patrones en aislamientos obtenidos con 13 años de diferencia (*cluster* 3). Hubo también asociación con cepas obtenidas de alimentos como es el caso de los *clusters* 5 y 8, de agua de río (*cluster* 7) y de bovinos durante otro muestreo (*cluster* 6). El *cluster* 8 está integrado también por aislamientos obtenidos de carne picada provenientes de Bolivia que presentaron similar resistencia antibiótica a los aislamientos bovinos (ácido nalidíxico, estreptomicina, trimetoprima sulfametoxazol *versus* ácido nalidíxico y ácido nalidíxico, trimetoprima sulfametoxazol (Figura 9).

La identificación de los factores de virulencia putativos, caracterizados originalmente en la cepa TW14359, se presenta en la Tabla 11. ECSP_3620, ECSP_0242 y ECSP_2687 se presentaron con una muy alta prevalencia en los aislamientos de ambos orígenes (>80%). Por el contrario ECSP_1773 fue el menos prevalente en los aislamientos independientemente de su origen. Se observó una

diferencia muy significativa en las frecuencias para los loci ECSP_3286 (86,2% vs. 55,5%, $P<0.0001$) y ECSP_2870/2872 (85,7% vs. 61,1%, $P<0.0002$), entre aislamientos humanos y bovinos, respectivamente.

Tabla 11. Frecuencia de detección de los factores de virulencia putativos en aislamientos de *Escherichia coli* O157:H7 de origen humano y bovino.

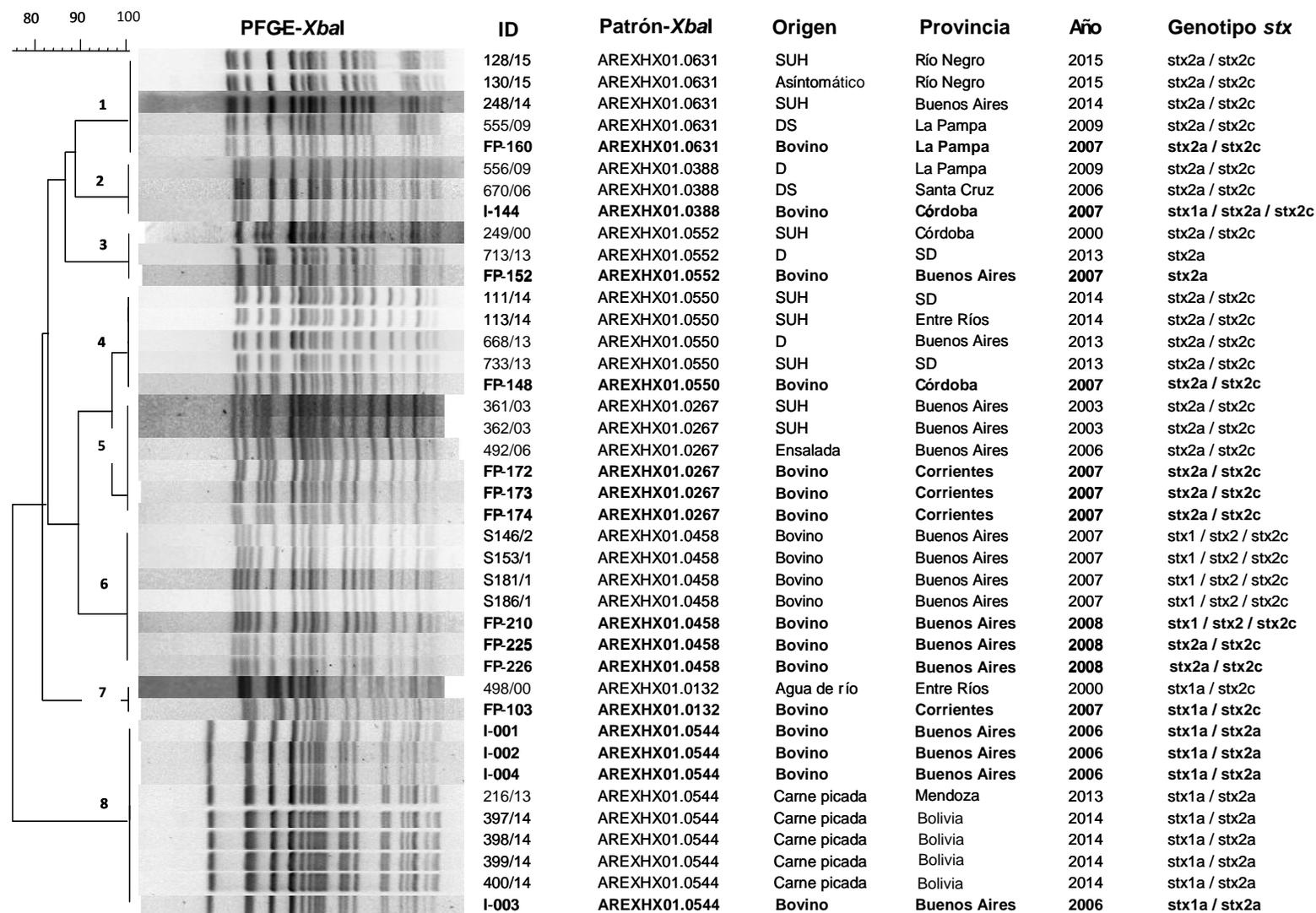
Factores de virulencia putativos	Nº de aislamientos (%)		P
	Humano (n=226)	Bovino (n=54)	
ECSP_3620	226 (100)	50 (92,6)	NA
ECSP_0242	224 (99,1)	49 (90,7)	NA
ECSP_2687	187 (82,7)	45 (83,3)	NA
ECSP_3286	195 (86,3)	30 (55,5)	<0,0001
ECSP_1773	77 (34)	18 (33,3)	NA
ECSP_2870/2872	193 (85,4)	33 (61,1)	0,0002

NA: No aplicable

Figura 8. Discriminación de aislamientos de *Escherichia coli* O157:H7 de origen humano y bovino con idéntico patrón de *Xba*I-PFGE, genotipo-*stx* y fagotipo, utilizando la enzima de restricción *Bln*I.

	PFGE-XbaI	PFGE-BlnI	ID	Patrón-XbaI	Patrón-BlnI	Origen	Provincia	Mes/año	Genotipo <i>stx</i>	PT	ECSP 0242	ECSP 1773	ECSP 2687	ECSP 2870/2872	ECSP 3286	ECSP 3620 (noV)	
VII			I-040	AREXHX01.0011	AREXHA26.0008	Bovino	Buenos Aires	02-2007	stx2a / stx2c	4	+	-	+	+	+	+	
			205/07	AREXHX01.0011	AREXHA26.0111	SUH	Córdoba	12-2006	stx2a / stx2c	4	+	-	+	+	+	+	
			46/08	AREXHX01.0011	AREXHA26.0107	SUH	Buenos Aires	09-2008	stx2a / stx2c	4	+	-	+	+	+	+	
			758/07	AREXHX01.0011	AREXHA26.0092	SUH	Río Negro	10-2007	stx2a / stx2c	4	+	-	+	+	+	+	
			766/07	AREXHX01.0011	AREXHA26.0008	SUH	CABA	10-2007	stx2a / stx2c	4	+	-	+	+	+	+	
			777/07	AREXHX01.0011	AREXHA26.0008	SUH	Córdoba	10-2007	stx2a / stx2c	4	+	-	+	+	+	+	
			845/07	AREXHX01.0011	AREXHA26.0008	SUH	CABA	11-2007	stx2a / stx2c	4	+	-	+	+	+	+	
			1072/06	AREXHX01.0011	AREXHA26.0139	D	CABA	11-2006	stx2a / stx2c	4	+	-	+	+	+	+	
			170/07	AREXHX01.0011	AREXHA26.0106	DS	CABA	01-2007	stx2a / stx2c	4	+	-	+	+	+	+	
			23/08	AREXHX01.0011	AREXHA26.0092	D	San Luis	01-2008	stx2a / stx2c	4	+	-	+	+	+	+	
			799/07	AREXHX01.0011	AREXHA26.0008	DS	CABA	10-2007	stx2a / stx2c	4	+	-	+	+	+	+	
			815/07	AREXHX01.0011	AREXHA26.0008	DS	Buenos Aires	10-2007	stx2a / stx2c	4	-	-	+	+	+	+	
			1166/06	AREXHX01.0011	AREXHA26.0139	DS	CABA	12-2006	stx2a	4	+	-	+	+	+	+	
			1182/06	AREXHX01.0011	AREXHA26.0041	SUH	La Pampa	11-2006	stx2a	4	+	-	-	+	+	+	
			128/07	AREXHX01.0011	AREXHA26.0108	DS	Río Negro	01-2007	stx2a	4	+	-	-	+	+	+	
			129/07	AREXHX01.0011	AREXHA26.0108	DS	Río Negro	01-2007	stx2a	4	+	-	-	+	+	+	
			136/08	AREXHX01.0011	AREXHA26.0097	SUH	Buenos Aires	01-2008	stx2a	4	+	-	-	+	+	+	
			541/08	AREXHX01.0011	AREXHA26.0109	SUH	CABA	06-2008	stx2a / stx2c	14	+	-	-	+	+	+	
	XIX			I-037	AREXHX01.0011	AREXHA26.0008	Bovino	Buenos Aires	02-2007	stx2a / stx2c	RDNC	+	-	+	+	+	+
				346/08	AREXHX01.0011	AREXHA26.0008	D	Buenos Aires	04-2008	stx2a / stx2c	4	+	+	+	+	+	+
			1133/06	AREXHX01.0543	AREXHA26.0110	SUH	Chubut	11-2006	stx2a / stx2c	4	+	-	+	+	+	+	
			FP-014	AREXHX01.0543	AREXHA26.0088	Bovino	Buenos Aires	12-2006	stx2a / stx2c	4	+	-	+	+	+	+	
			FP-015	AREXHX01.0543	AREXHA26.0088	Bovino	Buenos Aires	12-2006	stx2a / stx2c	4	+	-	+	+	+	+	
			FP-029	AREXHX01.0543	AREXHA26.0088	Bovino	Santa Fe	01-2007	stx2a / stx2c	4	+	-	+	+	+	+	
			FP-030	AREXHX01.0543	AREXHA26.0088	Bovino	Santa Fe	01-2007	stx2a / stx2c	4	+	-	+	+	+	+	
XXXI			854/07	AREXHX01.0076	AREXHA26.0046	BD	Chubut	10-2007	stx2a / stx2c	2	+	+	+	+	+	+	
			I-104	AREXHX01.0076	AREXHA26.0085	Bovino	Buenos Aires	07-2007	stx2a / stx2c	2	+	+	+	+	+	+	
			I-105	AREXHX01.0076	AREXHA26.0085	Bovino	Buenos Aires	07-2007	stx2a / stx2c	2	+	+	-	+	+	+	
			I-106	AREXHX01.0076	AREXHA26.0085	Bovino	Buenos Aires	07-2007	stx2a / stx2c	2	+	+	+	+	+	+	
			I-107	AREXHX01.0076	AREXHA26.0085	Bovino	Buenos Aires	07-2007	stx2a / stx2c	.2	+	+	+	+	+	+	
XXXII			1186/06	AREXHX01.0175	AREXHA26.0052	SUH	CABA	12-2006	stx2a / stx2c	49	+	-	+	+	+	+	
			152/07	AREXHX01.0175	AREXHA26.0052	SUH	CABA	01-2007	stx2a / stx2c	49	+	-	+	+	+	+	
			207/07	AREXHX01.0175	AREXHA26.0052	SUH	CABA	02-2007	stx2a / stx2c	49	+	-	+	+	+	+	
			338/07	AREXHX01.0175	AREXHA26.0052	SUH	CABA	03-2007	stx2a / stx2c	49	+	-	+	+	+	+	
			60/08	AREXHX01.0175	AREXHA26.0052	SUH	Buenos Aires	01-2008	stx2a / stx2c	49	+	-	+	+	+	+	
			I-173	AREXHX01.0175	AREXHA26.0052	Bovino	Buenos Aires	04-2008	stx2a / stx2c	49	+	-	+	+	+	+	
			347/07	AREXHX01.0175	AREXHA26.0052	DS	Río Negro	01-2007	stx2a / stx2c	49	+	-	+	+	+	+	
			556/07	AREXHX01.0175	AREXHA26.0052	D	Mendoza	01-2007	stx2a / stx2c	49	+	-	+	+	+	+	
XXXIV			1087/06	AREXHX01.0022	AREXHA26.0052	DS	CABA	11-2006	stx2a / stx2c	49	+	-	+	+	+	+	
			16/07	AREXHX01.0022	AREXHA26.0052	SUH	Buenos Aires	12-2006	stx2a / stx2c	49	+	-	+	+	+	+	
			523/08	AREXHX01.0022	AREXHA26.0052	SUH	Mendoza	03-2008	stx2a / stx2c	49	+	-	+	+	+	+	
			60/07	AREXHX01.0022	AREXHA26.0019	SUH	Córdoba	12-2006	stx2a / stx2c	49	+	-	+	+	+	+	
			624/07	AREXHX01.0022	AREXHA26.0052	D	Mendoza	05-2007	stx2a / stx2c	49	+	-	+	+	+	+	
			675/07	AREXHX01.0022	AREXHA26.0052	Asintomático	Jujuy	08-2007	stx2a / stx2c	49	+	-	+	+	+	+	
			76/07	AREXHX01.0022	AREXHA26.0052	SUH	Buenos Aires	01-2007	stx2a / stx2c	49	+	-	+	+	+	+	
			FP-196	AREXHX01.0022	AREXHA26.0052	Bovino	Buenos Aires	12-2007	stx2a / stx2c	49	+	-	+	+	+	+	
			1051/06	AREXHX01.0022	AREXHA26.0107	SUH	CABA	11-2006	stx2a / stx2c	4	+	-	-	+	+	+	
			128/08	AREXHX01.0022	AREXHA26.0052	SUH	Neuquén	02-2008	stx2a / stx2c	14	+	-	+	+	+	+	
			163/08	AREXHX01.0022	AREXHA26.0176	SUH	Neuquén	03-2008	stx2a / stx2c	14	+	-	+	+	+	+	
			167/08	AREXHX01.0022	AREXHA26.0176	SUH	Buenos Aires	03-2008	stx2a / stx2c	14	+	+	+	+	+	+	
		204/07	AREXHX01.0022	AREXHA26.0112	SUH	Córdoba	12-2006	stx2a / stx2c	49	+	-	+	+	+	+		
		808/07	AREXHX01.0022	AREXHA26.0052	SUH	CABA	10-2007	stx2a / stx2c	49	+	-	+	+	+	+		

Figura 9. Patrones de *Xba*I-PFGE idénticos encontrados por fuera del período de estudio y los aislamientos de origen bovino del presente trabajo.



Se resaltan en negrita los aislamientos de origen bovino del período estudiado en este trabajo.

El análisis de los fagotipos y genotipos *stx* más frecuentes reveló una distribución similar de las cepas asociadas a las diferentes entidades clínicas. Solo se observó diferencia significativa entre PT4 y genotipo *stx*_{2a} y la presencia de enfermedad severa (SUH y DS). Las cepas STEC O157 con el genotipo *stx*_{2a}/*stx*_{2c} pertenecientes a los fagotipos PT4, PT49 y PT2 fueron las predominantes (Tabla 12).

Tabla 12. Relación entre genotipos *stx* y PT predominantes con diferentes entidades clínicas.

PT	genotipo <i>stx</i>	N° (%) por entidad clínica		
		SUH ^a n=122	DS ^b n=69	D ^c n=30
PT4	<i>stx</i> _{2a} / <i>stx</i> _{2c}	29 (23,8)	15 (21,7)	6 (20,0)
	<i>stx</i> _{2a}	22 (18,0)*	10 (14,5)*	0
	<i>stx</i> _{1a} / <i>stx</i> _{2a} / <i>stx</i> _{2c}	1 (0,8)	1 (1,4)	1 (3,3)
PT49	<i>stx</i> _{2a} / <i>stx</i> _{2c}	28 (23,0)	14 (20,3)	7 (23,3)
	<i>stx</i> _{2a}	0	1 (1,4)	1 (3,3)
	<i>stx</i> _{1a} / <i>stx</i> _{2a} / <i>stx</i> _{2c}	0	1 (1,4)	0
PT2	<i>stx</i> _{2a} / <i>stx</i> _{2c}	20 (16,4)	11 (15,9)	6 (20,0)
	<i>stx</i> _{2a}	2 (1,6)	0	1 (3,3)
PT54	<i>stx</i> _{2a} / <i>stx</i> _{2c}	5 (4,1)	3 (4,3)	0
	<i>stx</i> _{2a}	1 (0,8)	0	1 (3,3)
PT14	<i>stx</i> _{2a} / <i>stx</i> _{2c}	5 (4,1)	2 (3,1)	1 (3,3)

^aSUH: Síndrome urémico hemolítico. ^bDS: Diarrea sanguinolenta.

^cD: Diarrea no sanguinolenta. *Frecuencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$).

Se realizó un georeferenciamiento del origen de los aislamientos de STEC O157. Los casos clínicos se distribuyeron por todo el país detectándose en 16 de las 23 provincias que lo constituyen. La mayoría (47,9%) de los aislamientos de origen humano pertenecieron a casos provenientes de la provincia de Buenos Aires y Ciudad Autónoma de Buenos Aires (CABA).

Si bien más de la mitad de los aislamientos bovinos (51%) correspondieron a animales de la Provincia de Buenos Aires, el resto de ellos fueron solamente de otras 6 provincias (Figura 10).

En cuanto a la distribución estacional se observó que los aislamientos humanos tuvieron una mayor frecuencia en los meses de primavera y verano. En cuanto a los aislamientos bovinos permanecieron con una distribución relativamente igual a través de los meses (Figura 11).

Figura 10. Distribución geográfica de cepas STEC O157 aisladas de casos clínicos y de bovinos

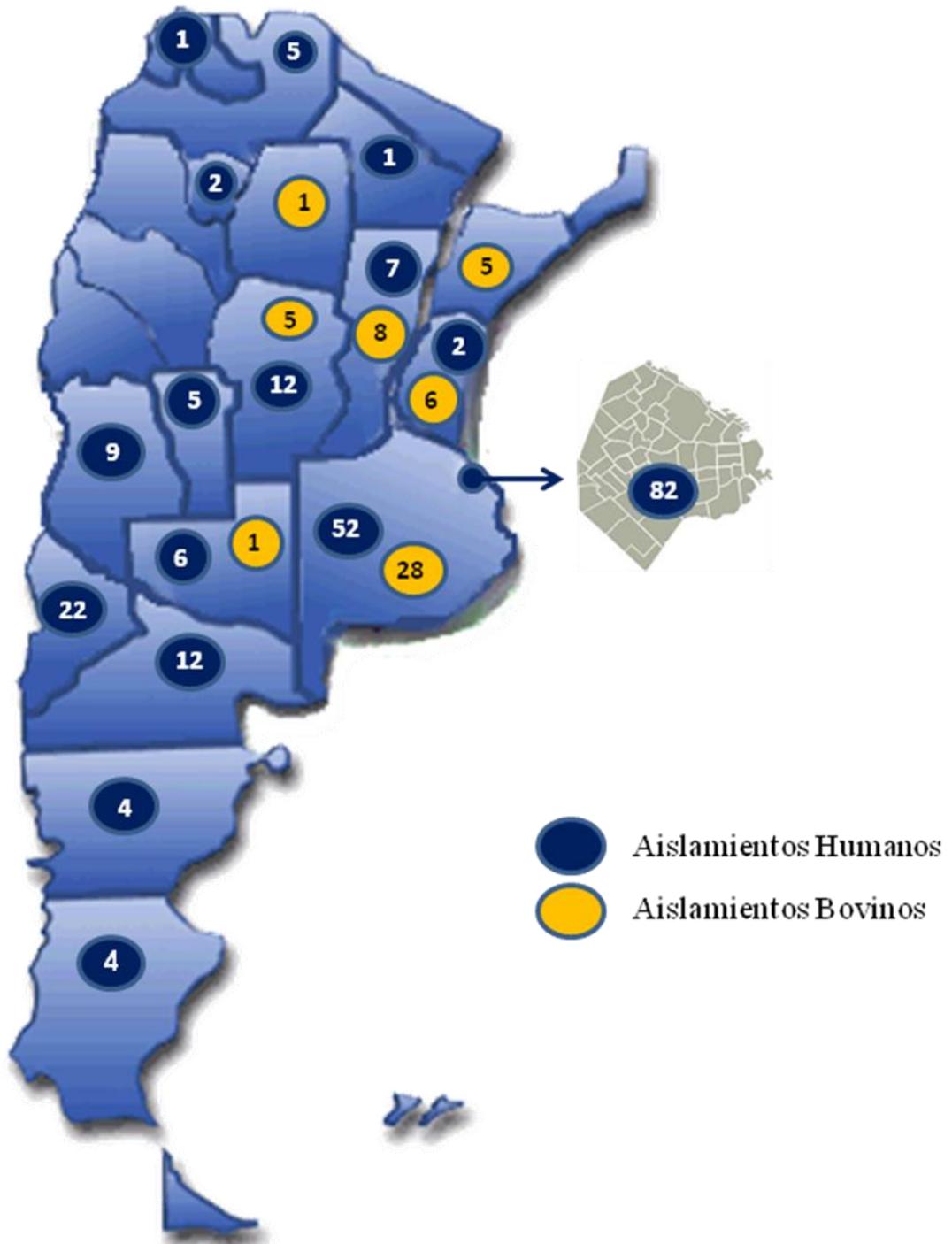
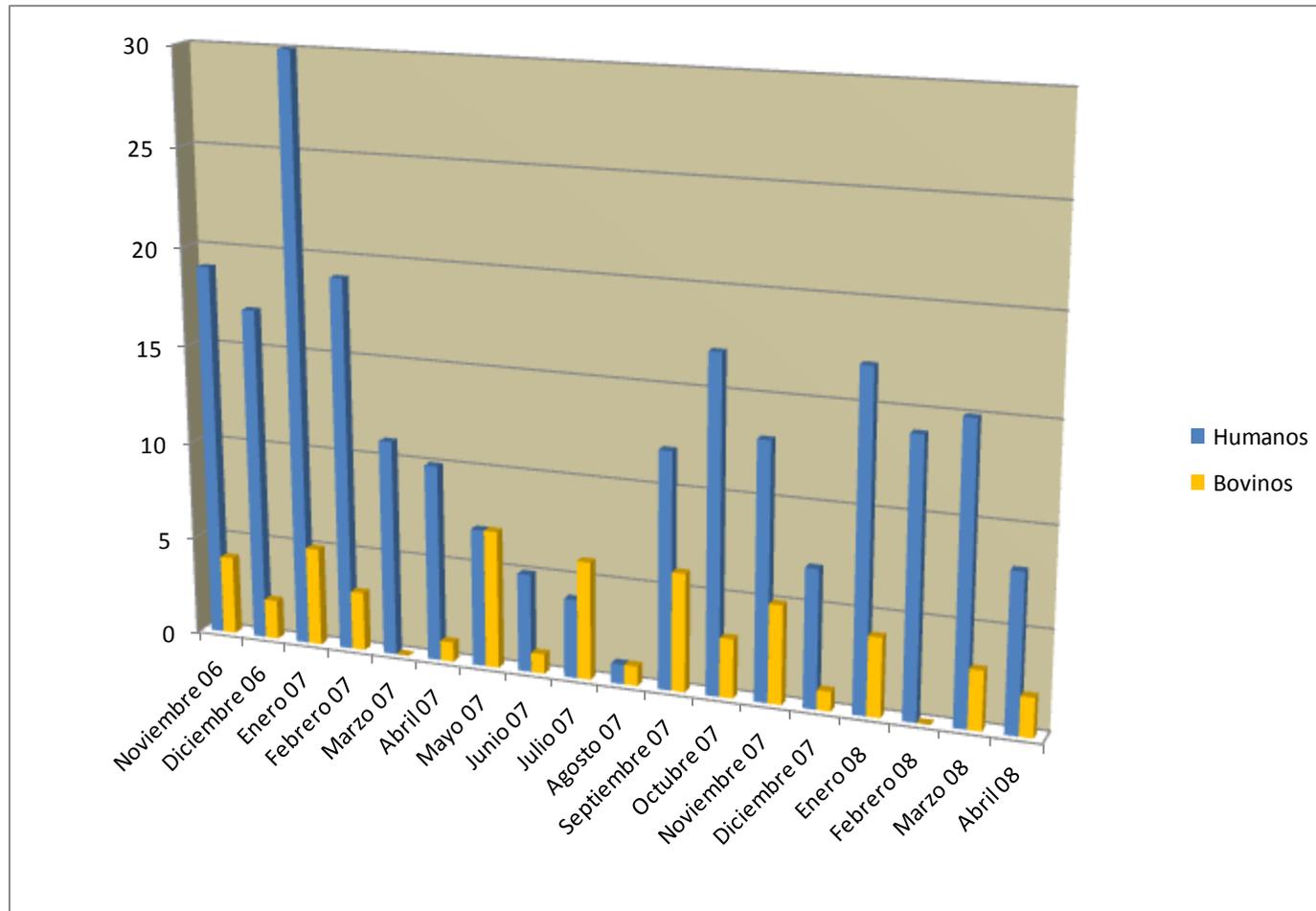


Figura 11. Distribución estacional de los aislamientos STEC O157 obtenidos de casos clínicos y de bovinos



DISCUSIÓN

En Argentina, los datos sobre las infecciones por STEC en humanos se obtienen a través de diferentes estrategias: (i) Sistema Nacional de Vigilancia de la Salud, Módulo C2 (SNVS-C2), que recoge datos sobre los casos clínicos de SUH. Desde el año 2000, la notificación es obligatoria, inmediata e individualizada (Resolución Ministerio Salud N°346/00); (ii) Vigilancia Centinela (UC-SUH), a través de 25 Unidades Centinela localizadas en 16 provincias; (iii) Sistema Nacional de Vigilancia basada en Laboratorio, Módulo SIVILA (SNVS-SIVILA); y (iv) Vigilancia molecular a través de PulseNet América Latina y el Caribe (PNALC) (Rivas *et al.*, 2011).

Entre 2004 y 2015, un total de 2047 cepas STEC O157 y no-O157 aisladas de casos de SUH (993), DS (526), D (319), portadores asintomáticos y pacientes con otras diagnósticos (209), fueron confirmadas por el SNVS-SIVILA y las UC-SUH en Argentina. Se identificaron distintos serotipos, pero O157:H7 fue el predominante (>72%), y O145:NM (>15%) fue el segundo serotipo más importante identificado. Entre las cepas de *E. coli* O157, el genotipo *stx_{2a}/stx_{2c}/eae/ehxA* fue prevalente (>80%). En dicho período, un total de 51 brotes de DS y SUH asociados con STEC O157 y no-O157 se registraron en jardines maternos y de infantes, intrafamiliares y la comunidad (Rivas *et al.*, 2014; Boletín Integrado de Vigilancia N° 328–SE 38-2016)

Algunos factores determinantes del patógeno y su reservorio, el huésped, y los comportamientos culturales y dietéticos han sido descritos como factores de riesgo para la adquisición de una enfermedad asociada a STEC. El inóculo bacteriano inicial, la cantidad y el tipo de Stx que produce, el serotipo infectante, la capacidad de *E. coli* para adquirir horizontalmente elementos genéticos móviles y la mejor la adaptación de las bacterias al huésped humano son descriptos como factores de riesgo. La edad del

huésped, su estado inmune, el uso de antibióticos y antiespasmódicos, el estrés y factores genéticos son también importantes. La prevalencia de STEC O157 en el ganado vacuno argentino y el alto consumo de carne, también suponen un riesgo para la población si las correctas medidas preventivas para evitar la enfermedad producida por este patógeno no son aplicadas. La detección de animales "super eliminadores", la alimentación y la época son factores que también deberían ser tenidos en cuenta. (Rivas *et al.*, 2014).

Se han desarrollado métodos de subtipificación como la fagotipificación, el análisis de las variantes de los genes *stx*, y PFGE, entre otros, que han sido ampliamente utilizados para poder diferenciar aislamientos y caracterizar subpoblaciones que permitan asociarlas en un contexto epidemiológico, identificar reservorios, patrones de transmisión y detectar brotes,. En el presente trabajo se han empleado estas técnicas, para caracterizar y comparar cepas STEC O157:H7 aisladas de infecciones humanas con aquellas que se encontraron en el reservorio bovino recuperadas en el mismo período de tiempo.

Estudios previos indican que el resultado clínico de la infección por STEC depende del genotipo *stx* de la cepa infectante (Jelacic *et al.*, 2003; Persson *et al.*, 2007), y que existe un mayor riesgo de evolución o progresión a SUH cuando los genes *stx*_{2a} y *eae* están presentes (Böerlin *et al.*, 1999). En el presente trabajo se encontró que *stx*_{2a}/*stx*_{2c} fue el genotipo predominante en las cepas aisladas de casos clínicos (76,1%) y en el reservorio bovino (55,5%). Por otra parte, *stx*_{2a} fue el segundo genotipo en frecuencia en cepas humanas (20,8%), mientras que el gen *stx*_{2c} fue importante en el reservorio animal (16,7%). Los aislamientos bovinos mostraron mayor variabilidad en su genotipo *stx*.

La importancia y frecuencia de detección del genotipo *stx*_{2a}/*stx*_{2c} ha sido descrita en numerosos países. En Finlandia, Eklund *et al.*, (2002) encontraron que el 64% de los aislamientos humanos STEC O157 portaron los genes *stx*_{2a}/*stx*_{2c}. En Suecia, Aspan *et al.*, (2010) informaron que cepas STEC O157:H7 humanas y bovinas, estudiadas en el período 1996-2002, fueron caracterizadas como PT4:*stx*_{2a}/*stx*_{2c}. Por otra parte, Manning *et al.* (2008) encontraron que este genotipo *stx* fue el más frecuente entre las cepas del clado 8 asociadas con dos brotes ocurridos en EE.UU. en 2006 y relacionados con vegetales frescos, produciendo una enfermedad humana inusualmente severa.

En Australia, Fegan *et al.* (2004) estudiaron la presencia de los genes *stx*₁, *stx*_{2a} y *stx*_{2c} en 102 aislamientos de *E. coli* O157, de origen humano y animal. Los autores reportaron la siguiente frecuencia de genotipos-*stx*, *stx*₁/*stx*_{2c} (74%), *stx*_{2c} (16%), *stx*₁/*stx*_{2a} (5%), *stx*_{2a}/*stx*_{2c} (3%), y *stx*₁ (3%). Mellor *et al.* (2012) observaron una diferencia significativa ($P < 0.0001$) en la frecuencia de detección de los *stx*-genotipos dominantes en Argentina (*stx*_{2a}/*stx*_{2c}) y Australia (*stx*₁/*stx*_{2c}). Sin embargo, no encontraron diferencias en la frecuencia de dichos genotipos en los aislamientos humanos y bovinos dentro de cada país. En Japón, Kawano *et al.* (2011) demostraron que STEC O157 del genotipo *stx*_{2c} estaba ampliamente distribuido en aislamientos de ambos orígenes en la Prefectura de Miyazaki, siendo más prevalente en el ganado (47%) que en humanos (35%). El genotipo *stx*_{2a}/*stx*_{2c} solo se detectó en el 4% de los aislamientos humanos y no fue detectado en bovinos.

Otros estudios han reportado diferencias en los genotipos *stx* de cepas STEC O157 aisladas de humanos y del ganado vacuno. En Dinamarca, Nielsen *et al.* (2002b) encontraron diferencias en la frecuencia de detección en cepas recuperadas de bovinos y aislamientos clínicos del mismo período. El ganado portó cepas STEC O157 *stx*_{2c} sola

(17,7%) o en asociación con stx_1 (82,3%). Mientras que en los aislamientos humanos predominó el genotipo stx_{2a}/stx_{2c} (54,5%), el resto de los aislamientos presentaron diversas combinaciones en iguales proporciones (stx_{2c} , stx_{2a} , $stx_1/stx_{2a}/stx_{2c}$ y stx_1/stx_{2c})

En Japón, Nakamura *et al.* (2008) encontraron que el genotipo stx_{2c} fue prevalente en aislamientos bovinos (58,5%) y de humanos asintomáticos (47,8%), mientras que en enfermedad humana stx_{2a} (68,6%) fue el genotipo predominante. El genotipo stx_{2a}/stx_{2c} fue aislado del ganado (10,4%), humanos asintomáticos (9,9%) y sintomáticos (12,6%). Posteriormente, Lee *et al.* (2011) mostraron claramente que el genotipo stx más frecuente en aislamientos humanos fue stx_{1a}/stx_{2a} (64,1%), seguido por stx_{2a}/stx_{2c} (14,1%), mientras que en el ganado predominó stx_{2c} (48,5%), seguido por stx_{1a}/stx_{2c} (19,7%).

Con respecto a la fagotipificación, en el presente estudio más del 80% de las cepas de origen humano fueron caracterizadas como PT2, PT4 y PT49. Estos mismos fagotipos constituyeron el 48,2% de los aislamientos bovinos. PT39 fue segundo en frecuencia en los aislamientos de este último origen, hallándose descrito con frecuencia en la literatura. Los fagotipos PT2, PT4, PT8 y PT14 se encontraron en más del 80% de los aislamientos de pacientes de diferentes regiones de Alemania (Bielaszewska *et al.*, 1998). Estos mismos PTs fueron identificados frecuentemente en aislamientos humanos y animales en el Reino Unido (Chalmers *et al.*, 1999), Bélgica (Chapman *et al.*, 2001), Holanda (Cheasty *et al.*, 2000), Finlandia (Heuvelink *et al.*, 1998), Suecia (Saari *et al.*, 2001) y Dinamarca (Roldgaard *et al.*, 2004). PT2 y PT8 fueron identificados como dominantes en Alemania y otros países europeos durante varios años, indicando una dispersión geográfica limitada (Beutin *et al.*, 2002). En Dinamarca, la mayoría de los aislamientos clínicos humanos (87%) pertenecieron a PT2, PT4, PT8 o PT14, mientras que sólo el 46% de las cepas de la especie bovina

pertencieron a estos PTs. PT8 y PT14 fueron encontrados en frecuencias similares en cepas bovinas (36%) y cepas humanas (40%). Sin embargo, los PT predominantes en cepas de origen humano, PT2 (19%) y PT4 (28%), sólo se identificaron en las cepas bovinas en el 2% y 8%, respectivamente (Roldgaard *et al.*, 2004). En España Mora *et al.* (2004) detectaron cepas STEC de los fagotipos PT2 y PT8 como predominantes en aislamientos clínicos (51%) y de bovinos (46%).

Sin embargo en Argentina, PT8 se encontró en una frecuencia muy baja tanto en bovinos (3,7%) como en humanos (1,3%), mientras que PT14 sólo se encontró en aislamientos de origen clínico (3,5%). Durante un estudio prospectivo caso-control de infecciones por STEC en niños argentinos, llevado a cabo en 2001-2002, Rivas *et al.* (2006) caracterizaron una cepa STEC O157, aislada de un caso de DS que evolucionó a SUH, como PT8:*stx*_{2a}/*stx*_{2c}, y tres aislamientos PT14:*stx*_{2a}/*stx*_{2c} provenientes de casos de DS. Durante un estudio realizado en 136 muestras de carne vacuna picada y salchicha fresca en boca de expendio, Chinen *et al.* (2001), detectaron 2/11 (18,2%) cepas caracterizadas como PT14: *stx*_{2a}/*stx*_{2c} y PT14:*stx*_{2c}. En el año 2009, Chinen *et al.* encontraron que el 10% de las cepas *E. coli* O157:H7 aisladas de hamburguesas de carne poco cocidas, provenientes de restaurantes de comidas rápidas, se caracterizaron como PT8:*stx*_{2a}/*stx*_{2c} y PT14:*stx*₁/*stx*_{2c}. Por otra parte, en España (Mora *et al.*, 2004), Alemania (Beutin *et al.*, 2002) y Dinamarca (Roldgaard *et al.*, 2004), encontraron que cepas perteneciente al PT8 mostraron una alta asociación con *stx*₁ y en su mayoría eran inmóviles. En el presente estudio, las 280 cepas fueron móviles siendo el flagelo H7 un importante factor de virulencia.

Entre 1998 y 2004, PT21/28 fue descrito como el PT más frecuente en Escocia, correspondiendo a más del 50% de los aislamientos humanos y bovinos, lo que confirma la relación estrecha entre la excreción de esta bacteria por el reservorio bovino

y la infección humana, y la localización de clones específicos de STEC O157 en determinadas regiones (Halliday *et al.*, 2006; Pearce *et al.*, 2009). En Argentina este fagotipo, nunca fue encontrado hasta el presente.

En el presente estudio hubo una marcada coincidencia entre los perfiles PT-*stx* de las cepas aisladas de enfermedad humana y aquellas aisladas de bovinos. Los perfiles PT49:*stx*_{2a}/*stx*_{2c} (30,2% vs. 20%), PT4:*stx*_{2a}/*stx*_{2c} (29,1% vs. 20%) y PT2:*stx*_{2a}/*stx*_{2c} (22,7% vs. 40%) fueron frecuentes en las cepas de ambos orígenes (Tabla 9), siendo significativa la asociación del PT4 con *stx*_{2a} en los aislamientos de origen humano y PT2 con *stx*_{2a}/*stx*_{2c} en los obtenidos del bovino. Sin embargo, algunos perfiles PT-*stx* se encontraron exclusivamente en el reservorio bovino.

Aspan *et al.* (2010) encontraron como prevalente el perfil PT4:*stx*_{2a}/*stx*_{2c} en bovinos durante un muestreo en frigoríficos y tambos de la costa sudoeste de Suecia, vinculados a casos humanos. Este perfil se destacó principalmente en la Ciudad de Halland, esto motivó a que se conociera a este clon con el nombre de “Halland type”.

En el presente estudio, no fue posible establecer una relación entre los PTs y el genotipo *stx*_{2a}/*stx*_{2c} detectados en aislamientos de enfermedad humana con la signología clínica, probablemente debido a la alta tasa del genotipo *stx*_{2a}/*stx*_{2c} (> 75%). Sí se observó una relación significativa entre PT4 y *stx*_{2a} y el desarrollo de enfermedad grave (SUH y DS). Beutin *et al.* (2002) también observaron una fuerte asociación entre la presencia del gen *stx*_{2a} y enfermedad humana severa, sin embargo *stx*_{2c} se asoció a casos de diarrea no complicada. Así mismo encontraron que los aislamientos de la mayoría de los pacientes con SUH (86,7%) fueron caracterizados como PT2 y PT4. Mora *et al.* (2004) describieron a PT2 (86%) y PT14 (100%) como fagotipos fuertemente asociados con enfermedad grave. En Escocia, PT21/28 se asoció principalmente a enfermedad severa (Halliday *et al.*, 2006; Pearce *et al.*, 2009). En Dinamarca, Roodgald *et al.* (2004)

encontraron que sólo el 13% de los aislamientos bovinos portaron el gen *stx*_{2a} en comparación al 55% de los aislamientos humanos, esta diferencia se relaciona también a la distinta prevalencia de PT2 y PT4 en cepas de ambos orígenes, sospechándose que estos PTs podrían provenir de otra fuente, como distinto reservorio animal o al consumo de carne importada de otras regiones. Sin embargo, no se pudieron establecer diferencias significativas entre la ocurrencia de D y DS y el genotipo *stx*, pero si la hubo entre casos de SUH y *stx*_{2a}. En Finlandia, el perfil de virulencia PT2:*stx*_{2a}/*stx*_{2c} fue asociado significativamente con SUH y DS, más que otros perfiles (Eklund *et al.*, 2002). En Japón, la mayoría de los aislamientos *stx*_{2c} fueron recuperados de portadores asintomáticos (70%) o con síntomas leves (26%) (Kawano *et al.*, 2011).

En Argentina la vigilancia molecular de STEC se implementó a través de PulseNet de América Latina y el Caribe. PFGE es considerada como técnica “gold standard” para la subtipificación de microorganismos patógenos transmitidos por alimentos. Desde el año 1988 a 2015 fueron incluidos en la Base de Datos Nacional (BDN) de O157 de Argentina, un total de 1267 patrones de *Xba*I-PFGE correspondientes a 2517 cepas STEC O157 aisladas de infecciones humanas (n=2098), alimentos (n=223), animales (n=141), y muestras ambientales (n=55).

En este trabajo, las cepas O157 mostraron un alto grado de diversidad. Por *Xba*I-PFGE, se estableció un total de 144 patrones de macrorrestricción diferentes entre las 280 cepas estudiadas. Las cepas que mostraron patrones idénticos se agruparon en *clusters*. Algunos patrones de PFGE pudieron diferenciarse por poseer diferentes genotipos *stx* y PT. Tal es el caso del patrón AREXH01.0022, que mostró combinaciones con *stx*_{2a}/*stx*_{2c} y PT2, PT4 y PT49, y el patrón AREXH01.0011 con genotipo *stx*_{2a} y *stx*_{2a}/*stx*_{2c} con PT4 y 14 entre otros, presentados en la Tabla 10. Los cinco patrones de PFGE comunes, establecidos en cepas de ambos orígenes, representan

un total de 426 (17%) cepas STEC O157 incluidas en la BDN, siendo el patrón AREXH01.0011 el prevalente en la base con 223 (8,9%) cepas del período 1992-2015, seguido por el patrón AREXH01.0022 con 131 (5,2%) cepas para el período 1995-2015. El patrón AREXH01.0175 corresponde a 40 (1,6%) aislamientos desde 2001 a 2015, y el patrón AREXH01.0076 a 27 (1,1%) aislamientos desde 2002 a 2015. El patrón AREXH01.0543 emergió durante el período de estudio de este trabajo. Estos cinco patrones se encontraron representados en la BDN por cepas aisladas de casos de SUH (n=169), DS (n=116), D (n=66), asintomáticos (n=10), carne picada cocida y cruda (n=29), y agua de río (n=9), lo que indica que están ampliamente distribuidas en la población humana, en los alimentos y el medio ambiente, y circulantes a través del tiempo, tanto en casos clínicos como en el reservorio animal. Previamente, Chinen *et al.* (2003) establecieron por PFGE una similitud del 97% entre una cepa aislada de ternero y una cepa aislada de un caso de SUH. En Japón, Kawano *et al.* (2011) obtuvieron una similitud mayor al 95% entre cepas aisladas de pacientes y ganado bovino. Así mismo, Muto *et al.* (2008) estudiaron un brote de DS que afectó a 4 niños que visitaron una granja, en la cual ordeñaron y manipularon animales, y encontraron que 12 aislamientos de bovinos presentaron un 100% de identidad con aislamientos recuperados de los niños afectados. En España, Mora *et al.* (2004) también obtuvieron 100% de identidad entre cepas de ambos orígenes, la mayoría de éstas perteneció a los fagotipos PT2 y PT8. Así mismo, Söderlund *et al.* (2012) en Suecia, encontraron patrones idénticos de PFGE entre un aislamiento de oveja, cuatro aislamientos de ganado vacuno del mismo frigorífico y un aislamiento detectado en un caso clínico.

Es importante destacar que el patrón AREXH01.0011 y otros patrones relacionados son parte de un clon hipervirulento descrito en otras partes del mundo. Este patrón es idéntico a los patrones SMI-H de Suecia, y EXH01.0047 de EE.UU. Las cepas

suecas del patrón SMI-H portan, al igual que el patrón AREXH01.0011, el genotipo *stx*_{2a}/*stx*_{2c} y pertenecen al PT4 (Löfdahl, 2008).

De las 226 cepas humanas analizadas, 30 (13,3%) mostraron combinaciones idénticas de PT-*Xba*I-PFGE-*stx* con 11 (20,4%) de las 54 cepas aisladas de ganado. En España, Mora *et al.* (2004) encontraron que un 29% de las cepas STEC O157:H7 de origen humano presentaban idéntica combinación de PT-patrón de PFGE con aislamientos de origen bovino, en un período de casi 20 años, aunque estos autores no incluyeron el genotipo *stx* como herramienta epidemiológica o de subtipificación complementaria.

Algunas cepas STEC O157 de ambos orígenes pudieron ser discriminadas con *Bln*I como segunda enzima de restricción. A pesar de mostrar diferencias, el porcentaje de similitud hallado debe ser evaluado en el contexto epidemiológico. Igualmente, en este trabajo no se pudo establecer un vínculo epidemiológico entre aislamientos humanos y bovinos de la misma región geográfica y período de tiempo. De todas maneras, se debe destacar que la similitud de perfiles genotipo *stx*-PT-patrón *Xba*I-PFGE detectados en las cepas humanas y bovinas estudiadas, reafirma que el ganado es un importante reservorio de STEC, asociado a enfermedad humana.

Algunos aislamientos de origen bovino cuyos patrones de PFGE no tuvieron 100% de similitud con patrones de aislamientos humanos dentro del período de estudio, si lo tuvieron por fuera del mismo. Es de destacar el mantenimiento de clones circulantes por períodos extensos de tiempo de más de 10 años.

Debido a la gravedad del brote por consumo de espinaca en los EE.UU. en 2006, la cepa TW14359 fue secuenciada, identificándose siete nuevos factores de virulencia putativos no caracterizados previamente en otros genomas de cepas STEC como EDL933 y Sakai (Kulasekara *et al.*, 2009). Las cepas humanas y bovinas aquí

estudiadas mostraron frecuencias más altas de estos factores de virulencia putativos comparadas con las encontradas en trabajos realizados en otras partes del mundo, a excepción del factor ECSP_1773 que codifica una proteína que interfiere con la respuesta inmune innata mediante la inhibición de la activación de NF- κ B, presente sólo en el 34% de las cepas humanas y el 33,3% de las bovinas. ECSP_0242 que codifica un factor de virulencia putativo común en eucariotas, facilitando las interacciones proteína-proteína, y ECSP_3620 (*norV*), el gen intacto de la reductasa del óxido nítrico, se detectaron en más de 90% de los aislamientos independientemente de su origen. Sólo 4 aislamientos de origen bovino presentaron la delección Δ *norV*. Estos hallazgos confirman la particular frecuencia elevada de factores de virulencia putativos en las cepas argentinas, descriptos previamente como relevantes en la patogénesis de las enfermedades asociadas a STEC (Pianciola *et al.*, 2014). Kulasekara *et al.* (2009) sugirieron que la presencia del profago *stx*₁ es selectiva para la delección de ECSP_3620 (Δ *norV*). Un gen *norV* intacto se correlaciona fuertemente no sólo con la ausencia de *stx*₁ sino también con la presencia de otros genes de virulencia putativos, con la excepción de ECSP_1773. Sin embargo, (Mellor *et al.*, 2012) mostraron que la presencia del alelo Δ *norV* en cepas australianas no está correlacionada con la presencia de *stx*₁. Estos aislamientos que portaron *stx*₁, también portaron un *norV* completo. En el presente estudio, el 100% de las cepas humanas portaron ECSP_3620, independientemente de su genotipo *stx*. En cambio sólo cuatro (7,4%) cepas bovinas *stx*₁-positivas fueron negativas para este factor.

Recientemente, Shimizu *et al.* (2012) demostraron el papel que el producto del gen intacto *norV* juega en el virulencia de *E. coli* O157, reduciendo el nivel de óxido nítrico (ON) en las células bacterianas dentro de los macrófagos, contrarrestando una de las vías más eficaces de la respuesta inmune contra la infección. También demostraron

que la ON reductasa aumenta la producción Stx2 dentro de los macrófagos. Ambos mecanismos constituyen una ventaja adaptativa de estos microorganismos que permiten la resistencia dentro de los macrófagos durante la infección, por lo que el gen *norV* es un importante factor de virulencia en la patogénesis de STEC.

En un estudio colaborativo sobre diversidad genética de cepas STEC O157, realizado entre Argentina y Australia, se comprobaron características comunes de las cepas del linaje LI/II de ambos países, incluyendo la presencia de los determinantes putativos de virulencia ECSP_3620, ECSP_0242, ECSP_2687, ECSP_2870 y ECSP_2872. Sólo uno (ECSP_3286) de los siete factores de virulencia fue más frecuente en los aislamientos argentinos (60%) que en los australianos (2%). El incremento en la frecuencia de este factor en las cepas argentinas podría deberse a la recientemente descubierta presencia del profago *stx_{2a}* en el sitio de inserción alternativo *argW*, encontrado también en la cepa TW14359. En cambio los aislamientos australianos poseyeron el sitio de inserción clásico *wrbA* descrito originalmente para el profago *stx_{2a}*. Solo la cepa australiana positiva para ECSP_3286 portó el gen *stx_{2a}* en el sitio alternativo *argW* (Mellor *et al.*, 2012). En el presente estudio, el factor ECSP_3286 fue más frecuente en las cepas humanas (86,3%) que en las bovinas (55,5%), siendo esta diferencia significativa estadísticamente ($P < 0,00001$).

Estudios de georeferenciamiento han sido realizados con el fin de establecer regiones con aislamientos de elevada virulencia o en asociación a brotes. En nuestro país, la región pampeana incluye las provincias de Buenos Aires, sur de Santa Fe, Córdoba y Entre Ríos y noreste de La Pampa, en donde se encuentra el 57% del total de cabezas vacunas (aproximadamente 31.492.000 cabezas). Más del 80% de las cepas STEC O157 de origen bovino estudiadas en este trabajo fueron aisladas de animales provenientes de esta región. No puede concluirse que los bovinos de esta zona posean

una mayor prevalencia de STEC O157 que bovinos de otras zonas, ya que el muestreo se realizó en frigoríficos cuyos animales provenían de esta región. Así mismo, algunos casos humanos están referenciados por el lugar de atención médica y no por la procedencia del paciente.

En Suecia, la prevalencia de STEC O157 en el ganado bovino en la ciudad de Halland (23,3%) fue más alta que en el resto del país (7,6%) ($P > 0.01$). En dicha ciudad, se observó también la mayor incidencia de casos de enfermedad humana por STEC O157 durante el período de estudio (1998-2000) dicha tasa osciló entre 2,5 y 4,0 casos por cada 100.000 habitantes. Estas cifras fueron entre cinco a ocho veces más alta que el promedio nacional durante el mismo período (Eriksson *et al.*, 2005). Jaros *et al.* (2014) encontraron diferencias marcadas en los aislamientos de STEC O157 de origen humano y bovinos entre la isla norte y la isla sur de Nueva Zelanda, lo que sugiere la transmisión localizada de STEC entre ganado y seres humanos. En México se investigó la prevalencia de STEC en pequeñas granjas dentro de comunidades rurales, que se encuentran en el valle agrícola de Culiacán a lo largo de la parte noroeste de la costa México, considerado una de las regiones agrícolas más importantes. Las muestras fueron recuperadas de cinco sitios de muestreo situados en las proximidades de ríos utilizados para el riego. *E. coli* O157:H7 fue un serotipo predominante que se aisló de 3 de los 5 sitios de muestreo. Estos aislamientos fueron recuperados de heces pollos, bovinos y ovinos. Los resultados de este estudio indicaron que STEC O157 se detectó en 5,4% (13/240) de las muestras analizadas. Por PFGE la mayoría de los aislamientos se agruparon en dos *clusters* con 98,6% de similitud determinando que los aislamientos de esta región están altamente relacionados. Algunos subtipos también fueron recuperados seis meses más tarde sugiriendo la persistencia y una transmisión potencial entre las especies. (Amézquita-López *et al.*, 2012).

Otros autores han realizado estudios abarcando grandes regiones o países. Mellor *et al.* (2015) analizaron aislamiento STEC O157 de origen humano y bovino provenientes de Australia, Argentina y EE.UU. donde encontraron diferencias sustanciales entre los aislamientos, en cuanto a sus genotipos y linajes, pudiendo estos hallazgos proporcionar una explicación para la menor incidencia de enfermedad en Australia con relación a Estados Unidos y Argentina.

Una influencia estacional, con aumentos de la prevalencia de STEC O157 en el ganado ocurre durante los meses más cálidos y con menor frecuencia en los meses fríos, como ha sido demostrada en algunos estudios (Barkocy-Gallagher *et al.*, 2003). Sin embargo, algunos estudios han informado que la prevalencia de *E. coli* O157 en el ganado vacuno no depende de la estación del año (Paiba *et al.*, 2002; Alam *et al.*, 2006). No es claro aún cuáles son los factores asociados al clima que contribuyen a la prevalencia alta de STEC O157 en el verano (Ferens *et al.*, 2011). Una hipótesis sugiere que el aumento de luz diaria produce variaciones hormonales con aumento en la prevalencia en comparación con animales controles (Edrington *et al.*, 2006), otro estudio demostró que el ganado tratado con hormona tiroidea exógena arrojó los mismos números de portación de STEC O157 como en animales controles en invierno (Edrington *et al.*, 2007). También se encontró una asociación entre la prevalencia de este patógeno y la dieta de temporada, donde la prevalencia fue mayor en ganado de engorde alimentado con granos húmedos durante los períodos de baja temperatura y ausencia de pastura natural. (Wells *et al.*, 2009). Ezawa *et al.* (2004) encontró que la prevalencia estacional de STEC O157 varió según los años investigados, estando aumentada en verano y en invierno, en comparación a la primavera en uno de los años de estudio. Ésto fue también relacionado a la permanencia de los animales en potreros o establos cerrados en los meses de bajas temperaturas favoreciéndose el contacto

estrecho entre los mismos y la posibilidad de consumo de alimento contaminado con heces.

En el presente estudio no hubo una marcada influencia estacional, permaneciendo la detección de STEC O157 en el bovino con una distribución relativamente igual a través de los meses. Sin embargo, el resultado debe considerarse con cautela, ya que no se hizo ningún intento de mantener constantemente otros factores, como el origen del ganado, la edad, la dieta y el tipo explotación ganadera en función de cada temporada (Masana *et al.*, 2010).

En este trabajo, se observó que los aislamientos humanos tuvieron una mayor frecuencia en los meses de primavera y verano, en concordancia con lo esperable a las enfermedades transmitidas por alimentos, siendo el aumento de la temperatura y la humedad factores de importancia para la sobrevivencia del patógeno.

En los datos aquí presentados solo 7 (3,1%) cepas humanas y 6 (11,1%) cepas bovinas estudiadas presentaron resistencia antibiótica. En ambos orígenes se observó resistencia a ampicilina, estreptomina y trimetoprima sulfametoxazol. Porcentajes mayores de resistencia fueron hallados en aislamientos de origen bovino (65%), siendo sulfisoxazol (61%) el antibiótico para el que se observó mayor resistencia, seguido por tetraciclina (12%) (Vidovic *et al.*, 2006). En un estudio realizado en 361 aislamientos *E. coli* O157 de origen humano, ganado vacuno, cerdos y alimentos, Schroeder *et al.* (2002) observaron la resistencia a tetraciclina en 9% de las cepas.

Bok *et al.*, 2015 encontraron también altos porcentajes de resistencia antibiótica en el reservorio bovino. En el ganado lechero observaron que el 82,3% de los aislamientos fueron resistentes al menos a un antibiótico analizado, mientras que el 17% presentó multiresistencia. En cambio el ganado de carne se observó un 58,5% de resistencia y 8,5% fue multiresistente. Esta diferencia es debida al uso más frecuente en

el ganado lechero para el tratamiento de mastitis. Los aislamientos derivados del ganado lechero tuvieron una diferencia estadísticamente significativa para ampicilina, cefuroxima, ceftazidima, neomicina, tetraciclina y sulfametoxazol, siendo neomicina el antibiótico con mayor resistencia en el ganado lechero (51%) que en el de carne (24,6%).

Aunque las infecciones por *E. coli* productor de toxina Shiga no implican el uso de la terapia antimicrobiana, *E. coli* O157 puede adquirir fácilmente genes de resistencia a las drogas en su hábitat natural y transferirlos a otros organismos de relevancia.

CONCLUSIONES

En Argentina, el ganado vacuno porta cepas STEC O157 del genotipo *stx*_{2a}/*stx*_{2c}, prevalente en los aislamientos clínicos y descrito por la literatura científica como hipervirulento, en frecuencias elevadas.

Este estudio mostró que el uso de técnicas de subtipificación, como fagotipificación, genotipificación de *stx* y PFGE, como herramientas epidemiológicas, pueden ayudar a detectar reservorios.

PFGE permitió generar distintos patrones dentro de un mismo PT. Así mismo un mismo patrón de PFGE tuvo diferentes combinaciones de genotipo *stx* y PT. Esto demuestra la importancia del uso de técnicas combinadas, no sólo para establecer subtipos de aislamientos específicos de diferentes orígenes, sino también para el análisis de brotes, y establecer variaciones temporales y geográficas de clones emergentes.

La posibilidad de subdividir a las cepas STEC O157 en diferentes subtipos de riesgo, utilizando métodos normalizados que produzcan resultados fácilmente comparables entre laboratorios, es altamente relevante en relación con la realización de evaluaciones riesgo confiables en el futuro.

La tipificación molecular ha mejorado nuestro conocimiento de la epidemiología de *E. coli* O157:H7 y sus mecanismos de transmisión.

Siendo Argentina un país ganadero, el conocimiento de los subtipos de STEC O157 en este reservorio, es de relevante importancia. Estudios de georeferenciamiento son necesarios para establecer clones circulantes en diferentes regiones no sólo dentro de un país sino también en países limítrofes o países con vínculos comerciales establecidos, para poder realizar una adecuada vigilancia epidemiológica e implementar rápidas medidas correctivas. Se ha descrito que determinados genotipos de *stx* son

prevalentes en diferentes localizaciones geográficas del mundo, lo que permitiría establecer un mapa de países de riesgo para enfermedades asociadas a STEC. Es de destacar que en aquellos países que presentan diferencias entre las características genóticas de los aislamientos clínicos y los del ganado bovino, debería investigarse la presencia de otros reservorios o bien el abastecimiento de carne vacuna proveniente de países cuyo ganado pudiera portar genotipos hipervirulentos.

Por otro lado, la alta demanda de carne por la comunidad Europea y otros países va acompañada de una mayor exigencia en cuanto la calidad sanitaria de estos productos. Los últimos eventos, como el brote por EAEC/STEC O104:H4 ocurrido en Alemania en 2011, han mejorado las metodologías para la detección de este microorganismo. La aplicación de BPM, así como la implementación de PPC y HACCP por parte de los frigoríficos, contribuye al sostén de calidad de la carne argentina. En esta investigación, fue posible vincular el 12% de las infecciones humanas reportadas, al reservorio bovino, mediante el análisis de una muestra muy pequeña del total de los bovinos faenados en Argentina en el período de estudio; estimada en alrededor de 21 millones de cabezas (IPCVA, 2011). A partir de estos datos, y estadísticas de sacrificio, podría estimarse aproximadamente una proporción de alrededor de 38.000 bovinos contaminados con STEC O157 en sus heces en el frigorífico, por caso humano reportado. Esto debe tenerse en cuenta para determinar el control y las pautas de prevención con el objetivo de reducir la carga de estas enfermedades en nuestro país.

Será necesario realizar estudios genómicos complementarios que permitan discriminar subtipos de STEC O157 exclusivos del ganado y aislados de enfermedad humana. Estudios de clados y linajes por polimorfismos de nucleótidos únicos (SNP), *Lineage Specific Polymorphism Assay* (LSPA-6), *Multiple Locus Variable-number Tandem Repeat Analysis* (MLVA) y estudio de los sitios de inserción de fagos *stx* entre

otros, han sido utilizados para discriminar subtipos que por otras técnicas resultaron idénticos. (Manning *et al.*, 2008; Clawson *et al.*, 2009; Whitworth *et al.*, 2010; Mellor *et al.*, 2012; Söderlund *et al.*, 2012, entre otros).

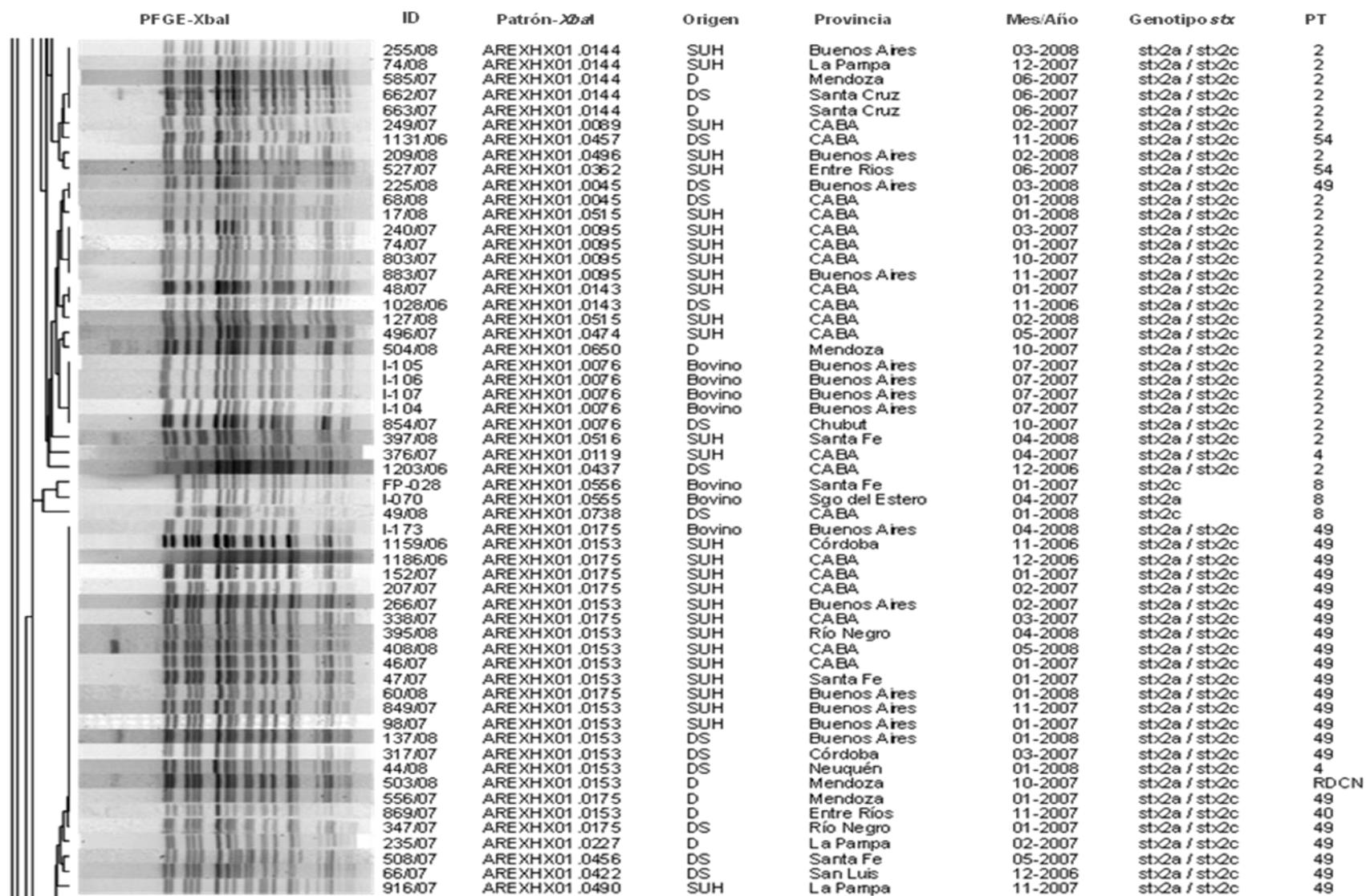
ANEXO

Dice (Opt:1.50%) (Tol 1.5%- 1.5%) (H>0.0% S>0.0%) [D.0%-98.3%]

PFGE Xbal	ID	Patrón-Xbal	Origen	Provincia	Mes/Año	Genotipo stx	PT
	392.07	AREXHX01.0447	Asintomático	Buenos Aires	02-2007	stx2a / stx2c	2
	391.07	AREXHX01.0447	Asintomático	Buenos Aires	02-2007	stx2a / stx2c	2
	291.07	AREXHX01.0447	SUH	Buenos Aires	02-2007	stx2a / stx2c	2
	280.07	AREXHX01.0449	SUH	Buenos Aires	02-2007	stx2a / stx2c	2
	368.07	AREXHX01.0450	DS	Buenos Aires	04-2007	stx2a / stx2c	2
	528.07	AREXHX01.0464	SUH	CABA	05-2007	stx2a / stx2c	54
	1014	AREXHX01.0545	Bovino	Buenos Aires	01-2007	stx2a / stx2c	2
	1015	AREXHX01.0545	Bovino	Buenos Aires	01-2007	stx2a / stx2c	2
	885.07	AREXHX01.0278	SUH	Buenos Aires	11-2007	stx2a / stx2c	14
	526.08	AREXHX01.0667	D	Mendoza	04-2008	stx2a	54
	718.07	AREXHX01.0194	DS	CABA	09-2007	stx2a / stx2c	14
	FP-130	AREXHX01.0549	Bovino	Buenos Aires	07-2007	stx2a / stx2c	2
	232.07	AREXHX01.0482	DS	CABA	02-2007	stx2a / stx2c	2
	377.07	AREXHX01.0483	D	CABA	04-2007	stx2a / stx2c	49
	213.07	AREXHX01.0448	SUH	Neuquén	02-2007	stx2a	RDNC
	888.07	AREXHX01.0134	SUH	Buenos Aires	11-2007	stx2a	2
	206.08	AREXHX01.0279	DS	CABA	03-2008	stx2a / stx2c	RDNC
	176.07	AREXHX01.0049	DS	Neuquén	01/2007	stx2a / stx2c	RDNC
	267.07	AREXHX01.0049	DS	Buenos Aires	03-2007	stx2a / stx2c	RDNC
	271.08	AREXHX01.0049	DS	CABA	02-2008	stx2a / stx2c	RDNC
	69.08	AREXHX01.0049	DS	CABA	01-2008	stx2a / stx2c	RDNC
	825.07	AREXHX01.0049	D	Río Negro	10-2007	stx2a / stx2c	RDNC
	1202.06	AREXHX01.0371	DS	CABA	12-2006	stx2a / stx2c	4
	FP-248	AREXHX01.0553	Bovino	Córdoba	01-2008	stx2a / stx2c	2
	256.08	AREXHX01.0104	DS	Buenos Aires	04-2008	stx2a / stx2c	54
	914.07	AREXHX01.0495	DS	Buenos Aires	11-2007	stx2a / stx2c	54
	495.07	AREXHX01.0480	SUH	CABA	05-2007	stx2a	RDNC
	79.07	AREXHX01.0525	DS	CABA	01-2007	stx2a / stx2c	14
	189.07	AREXHX01.0478	SUH	Santa Fe	01-2007	stx2a	2
	4.08	AREXHX01.0737	DS	Buenos Aires	12-2008	stx2a	RDNC
	FP-096	AREXHX01.0507	Bovino	Entre Ríos	05-2006	stx2c	39
	FP-097	AREXHX01.0507	Bovino	Entre Ríos	05-2007	stx2c	39
	FP-098	AREXHX01.0507	Bovino	Entre Ríos	05-2007	stx2c	39
	FP-099	AREXHX01.0507	Bovino	Entre Ríos	05-2007	stx2c	39
	FP-101	AREXHX01.0507	Bovino	Entre Ríos	05-2007	stx2c	39
	FP-102	AREXHX01.0507	Bovino	Entre Ríos	05-2007	stx2c	39
	FP-103	AREXHX01.0132	Bovino	Corrientes	05-2007	stx1 / stx2c	39
	FP-246	AREXHX01.0514	Bovino	Córdoba	01-2008	stx2c	43
	FP-247	AREXHX01.0514	Bovino	Córdoba	01-2008	stx2c	43
	102.08	AREXHX01.0512	D	Buenos Aires	02-2008	stx2a	2
	FP-114	AREXHX01.0548	Bovino	Santa Fe	06-2007	stx2a / stx2c	39
	1209.06	AREXHX01.0528	DS	Río Negro	12-2006	stx2a / stx2c	4
	153.07	AREXHX01.0007	SUH	Salta	01-2007	stx2a / stx2c	4
	03.08	AREXHX01.0007	DS	CABA	12-2008	stx2a / stx2c	4
	1037	AREXHX01.0011	Bovino	Buenos Aires	02-2007	stx2a / stx2c	RDNC
	1040	AREXHX01.0011	Bovino	Buenos Aires	02-2007	stx2a / stx2c	4
	1182.06	AREXHX01.0011	SUH	La Pampa	11-2006	stx2a	4
	136.08	AREXHX01.0011	SUH	Buenos Aires	01-2008	stx2a	4
	205.07	AREXHX01.0011	SUH	Córdoba	12-2006	stx2a / stx2c	4
	46.08	AREXHX01.0011	SUH	Buenos Aires	01-2008	stx2a / stx2c	4
	541.08	AREXHX01.0011	SUH	CABA	06-2008	stx2a / stx2c	14
	758.07	AREXHX01.0011	SUH	Río Negro	09-2007	stx2a / stx2c	4
	766.07	AREXHX01.0011	SUH	CABA	10-2007	stx2a / stx2c	4
	777.07	AREXHX01.0011	SUH	Córdoba	10-2007	stx2a / stx2c	4
	845.07	AREXHX01.0011	SUH	CABA	11-2007	stx2a / stx2c	4
	877.07	AREXHX01.0015	SUH	Neuquén	11-2007	stx2a / stx2c	4

PFGE-Xbal	ID	Patrón-Xbal	Origen	Provincia	Mes/Año	Genotipo str	PT
	1072/06	AREXHX01.0011	D	CABA	11-2006	stx2a / stx2c	4
	1166/06	AREXHX01.0011	DS	CABA	12-2006	stx2a	4
	128/07	AREXHX01.0011	DS	Río Negro	01-2007	stx2a	4
	129/07	AREXHX01.0011	DS	Río Negro	01-2007	stx2a	4
	170/07	AREXHX01.0011	DS	CABA	01-2007	stx2a / stx2c	4
	171/08	AREXHX01.0006	DS	CABA	03-2008	stx2a / stx2c	4
	23/08	AREXHX01.0011	D	San Luis	01-2008	stx2a / stx2c	4
	799/07	AREXHX01.0011	DS	CABA	10-2007	stx2a / stx2c	4
	815/07	AREXHX01.0011	DS	Buenos Aires	10-2007	stx2a / stx2c	4
	346/08	AREXHX01.0011	D	Buenos Aires	04-2008	stx2a / stx2c	4
	182/08	AREXHX01.0121	SUH	CABA	03-2008	stx2a / stx2c	4
	198/07	AREXHX01.0064	SUH	Buenos Aires	01-2007	stx2a	4
	200/07	AREXHX01.0064	SUH	Buenos Aires	01-2007	stx2a	4
	201/07	AREXHX01.0064	SUH	Buenos Aires	20-2007	stx2a	4
	208/07	AREXHX01.0064	SUH	CABA	02-2007	stx2a	4
	209/07	AREXHX01.0064	SUH	CABA	02-2007	stx2a	4
	24/08	AREXHX01.0420	SUH	Buenos Aires	01-2008	stx2a	4
	687/07	AREXHX01.0420	SUH	Neuquén	09-2007	stx2a	4
	72/07	AREXHX01.0064	SUH	CABA	01-2007	stx2a	4
	725/07	AREXHX01.0064	SUH	CABA	09-2007	stx2a	4
	729/07	AREXHX01.0064	SUH	Córdoba	09-2007	stx2a	4
	730/07	AREXHX01.0064	SUH	Santa Fe	09-2007	stx2a	4
	740/07	AREXHX01.0064	SUH	CABA	09-2007	stx2a	4
	746/07	AREXHX01.0064	SUH	CABA	10-2007	stx2a	4
	273/08	AREXHX01.0420	D	CABA	02-2008	stx1a / stx2a / stx2c	4
	1204/06	AREXHX01.0064	SUH	CABA	12-2006	stx2a	4
	173/07	AREXHX01.0064	SUH	CABA	01-2007	stx2a	4
	165/07	AREXHX01.0547	SUH	CABA	01-2007	stx2a / stx2c	4
	202/08	AREXHX01.0657	SUH	CABA	03-2008	stx1a / stx2a / stx2c	4
	106/08	AREXHX01.0600	DS	Neuquén	02-2008	stx2a / stx2c	RDCN
	486/07	AREXHX01.0469	SUH	Buenos Aires	05-2007	stx2a	54
	487/07	AREXHX01.0469	D	Santa Cruz	04-2007	stx2a	8
	600/07	AREXHX01.0024	SUH	CABA	07-2007	stx2a / stx2c	4
	1108/06	AREXHX01.0055	SUH	Buenos Aires	11-2006	stx2a / stx2c	4
	443/08	AREXHX01.0057	SUH	Buenos Aires	02-2008	stx2a / stx2c	4
	57/08	AREXHX01.0057	SUH	CABA	01-2008	stx2a	4
	1035/06	AREXHX01.0057	DS	Sala	11-2006	stx2a / stx2c	49
	226/07	AREXHX01.0057	DS	CABA	02-2007	stx2a / stx2c	4
	732/07	AREXHX01.0057	DS	Buenos Aires	09-2007	stx2a	4
	878/07	AREXHX01.0057	DS	Neuquén	11-2007	stx2a / stx2c	4
	1114/06	AREXHX01.0057	SUH	Buenos Aires	11-2006	stx2a / stx2c	4
	884/07	AREXHX01.0494	SUH	Buenos Aires	11-2007	stx2a / stx2c	4
	853/07	AREXHX01.0012	SUH	Sala	11-2007	stx2a	4
	475/07	AREXHX01.0476	D	CABA	04-2007	stx2a / stx2c	4
	477/07	AREXHX01.0476	DS	San Luis	04-2007	stx2a / stx2c	4
	FP-1 60	AREXHX01.0631	Bovino	La Pampa	09-2007	stx2a / stx2c	4
	234/07	AREXHX01.0086	SUH	Neuquén	02-2007	stx2a / stx2c	2
	646/07	AREXHX01.0086	D	Neuquén	07-2007	stx2a / stx2c	2
	499/08	AREXHX01.0023	D	Mendoza	06-2008	stx2a / stx2c	2
	I-1 44	AREXHX01.0388	Bovino	Córdoba	11-2007	stx1a / stx2a / stx2c	10
	FP-1 61	AREXHX01.0559	Bovino	Buenos Aires	09-2007	stx1a / stx2a / stx2c	39
	1032/06	AREXHX01.0200	SUH	Neuquén	11-2006	stx2a / stx2c	4
	254/07	AREXHX01.0200	SUH	Neuquén	02-2007	stx2a	4
	688/07	AREXHX01.0200	SUH	Neuquén	07-2007	stx2a	4
	185/07	AREXHX01.0200	DS	CABA	02-2007	stx2a / stx2c	4
	247/07	AREXHX01.0200	DS	Neuquén	03-2007	stx2a	4
	255/07	AREXHX01.0200	DS	Neuquén	03-2007	stx2a	4

PFGE-XbaI	ID	Patrón-XbaI	Origen	Provincia	Mes/Año	Genotipo stx	PT
	947/07	AREXHX01.0200	DS	CABA	12-2007	stx2a	4
	246/07	AREXHX01.0440	DS	Neuquén	03-2007	stx2a	4
	1070/06	AREXHX01.0193	SUH	CABA	11-2006	stx2a / stx2c	4
	806/07	AREXHX01.0193	SUH	CABA	09-2007	stx2a / stx2c	4
	1109/06	AREXHX01.0341	SUH	Buenos Aires	11-2006	stx2a / stx2c	4
	812/07	AREXHX01.0341	SUH	CABA	10-2007	stx2a / stx2c	4
	42/07	AREXHX01.0341	DS	Buenos Aires	01-2007	stx2a / stx2c	4
	62/08	AREXHX01.0508	DS	CABA	10-2008	stx2a / stx2c	4
	169/07	AREXHX01.0038	SUH	Buenos Aires	01-2007	stx2a / stx2c	4
	820/07	AREXHX01.0038	SUH	CABA	10-2007	stx2a / stx2c	4
	876/07	AREXHX01.0470	SUH	Neuquén	10-2007	stx2a / stx2c	4
	259/08	AREXHX01.0504	DS	Neuquén	04-2008	stx2a / stx2c	4
	962/07	AREXHX01.0530	D	Buenos Aires	12-2007	stx2a	10
	204/08	AREXHX01.0503	SUH	CABA	03-2008	stx2a / stx2c	4
	FP-210	AREXHX01.0458	Bovino	Buenos Aires	01-2008	stx1a / stx2a / stx2c	26
	FP-225	AREXHX01.0458	Bovino	Buenos Aires	03-2008	stx2a / stx2c	26
	FP-226	AREXHX01.0458	Bovino	Buenos Aires	03-2008	stx2a / stx2c	26
	15/07	AREXHX01.0297	SUH	Buenos Aires	11-2007	stx1a / stx2a / stx2c	26
	243/07	AREXHX01.0511	SUH	Buenos Aires	01-2007	stx2a / stx2c	4
	FP-014	AREXHX01.0543	Bovino	Buenos Aires	12-2006	stx2a / stx2c	4
	FP-015	AREXHX01.0543	Bovino	Buenos Aires	12-2006	stx2a / stx2c	4
	FP-029	AREXHX01.0543	Bovino	Santa Fe	01-2007	stx2a / stx2c	4
	FP-030	AREXHX01.0543	Bovino	Santa Fe	01-2007	stx2a / stx2c	4
	1133/06	AREXHX01.0543	SUH	Chubut	11-2006	stx2a / stx2c	4
	4/07	AREXHX01.0454	DS	San Luis	12-2007	stx2a / stx2c	37
	07/07	AREXHX01.0454	D	CABA	12-2007	stx2c	8
	738/07	AREXHX01.0477	D	Salta	09-2007	stx2a / stx2c	4
	95/08	AREXHX01.0502	SUH	Córdoba	01-2008	stx2a / stx2c	4
	1181/06	AREXHX01.0058	SUH	La Pampa	11-2006	stx2a / stx2c	26
	21/07	AREXHX01.0058	D	La Pampa	12-2007	stx2a / stx2c	4
	FP-150	AREXHX01.0517	Bovino	Buenos Aires	09-2007	stx2a	33
	FP-155	AREXHX01.0517	Bovino	Buenos Aires	09-2007	stx2 NT	33
	FP-162	AREXHX01.0517	Bovino	Buenos Aires	09-2007	stx2a	33
	FP-167	AREXHX01.0460	Bovino	Santa Fe	10-2007	stx2a / stx2c	2
	FP-168	AREXHX01.0460	Bovino	Santa Fe	10-2007	stx2a / stx2c	2
	FP-169	AREXHX01.0460	Bovino	Santa Fe	10-2007	stx2a / stx2c	2
	FP-152	AREXHX01.0552	Bovino	Buenos Aires	09-2007	stx2a	2
	28/07	AREXHX01.0002	DS	CABA	12-2006	stx2a / stx2c	2
	80/08	AREXHX01.0233	DS	Chubut	01-2008	stx2a	47
	518/07	AREXHX01.0485	DS	CABA	06-2007	stx2a / stx2c	49
	702/07	AREXHX01.0468	D	Santa Fe	09-2007	stx2a / stx2c	49
	648/07	AREXHX01.0013	D	Córdoba	07-2007	stx2a / stx2c	49
	771/07	AREXHX01.0013	D	Santa Cruz	10-2007	stx2a	49
	149/08	AREXHX01.0052	DS	Tucumán	02-2008	stx2a	49
	1176/06	AREXHX01.0436	SUH	Buenos Aires	12-2006	stx2a / stx2c	2
	14/07	AREXHX01.0459	SUH	Buenos Aires	11-2006	stx2a	47
	1055/06	AREXHX01.0427	DS	CABA	11-2006	stx2a	4
	134/08	AREXHX01.0427	DS	CABA	01-2008	stx1a / stx2a / stx2c	4
	101/08	AREXHX01.0501	SUH	Córdoba	01-2008	stx2a	4
	FP-206	AREXHX01.0560	Bovino	Buenos Aires	03-2008	stx2a / stx2c	2
	946/07	AREXHX01.0001	SUH	Salta	12-2007	stx2a / stx2c	2
	206/07	AREXHX01.0001	DS	CABA	02-2007	stx2a / stx2c	24
	56/07	AREXHX01.0001	SUH	Córdoba	12-2006	stx2a / stx2c	49
	728/07	AREXHX01.0018	DS	CABA	09-2007	stx2a / stx2c	2
	159/07	AREXHX01.0513	D	San Luis	01-2007	stx2a / stx2c	2
	178/07	AREXHX01.0493	SUH	Neuquén	01-2007	stx2a / stx2c	39



PFGE-XbaI	ID	Patrón-XbaI	Origen	Provincia	Mes/Año	Genotipo stx	PT
	FP-196	AREXHX01.0022	Bovino	Buenos Aires	12-2007	stx2a / stx2c	49
	1051.06	AREXHX01.0022	SUH	CABA	11-2006	stx2a / stx2c	4
	128.08	AREXHX01.0022	SUH	Neuquén	02-2008	stx2a / stx2c	14
	167.07	AREXHX01.0022	SUH	Buenos Aires	12-2007	stx2a / stx2c	49
	163.08	AREXHX01.0022	SUH	Neuquén	03-2008	stx2a / stx2c	14
	164.08	AREXHX01.0093	SUH	Río Negro	03-2008	stx2a / stx2c	49
	167.08	AREXHX01.0022	SUH	Buenos Aires	03-2008	stx2a / stx2c	14
	204.07	AREXHX01.0022	SUH	Córdoba	12-2006	stx2a / stx2c	49
	523.08	AREXHX01.0022	SUH	Mendoza	03-2008	stx2a / stx2c	49
	607.07	AREXHX01.0022	SUH	Córdoba	12-2006	stx2a / stx2c	49
	767.07	AREXHX01.0022	SUH	Buenos Aires	01-2007	stx2a / stx2c	49
	1087.06	AREXHX01.0022	DS	CABA	11-2006	stx2a / stx2c	49
	624.07	AREXHX01.0022	D	Mendoza	05-2007	stx2a / stx2c	49
	675.07	AREXHX01.0022	Asintomático	Jujuy	08-2007	stx2a / stx2c	49
	240.08	AREXHX01.0093	Asintomático	Río Negro	04-2008	stx2a / stx2c	49
	808.07	AREXHX01.0022	SUH	CABA	10-2007	stx2a / stx2c	49
	807.07	AREXHX01.0269	SUH	Salta	01-2007	stx2a / stx2c	49
	381.07	AREXHX01.0014	SUH	Chaco	03-2007	stx2a / stx2c	36
	553.07	AREXHX01.0189	SUH	Mendoza	04-2007	stx2a / stx2c	49
	666.07	AREXHX01.0189	SUH	CABA	05-2007	stx2a / stx2c	49
	837.08	AREXHX01.0499	SUH	CABA	02-2008	stx2a / stx2c	49
	798.07	AREXHX01.0486	DS	CABA	10-2007	stx2a / stx2c	49
	457.08	AREXHX01.0465	SUH	Santa Fe	01-2008	stx2a	RDCN
	921.07	AREXHX01.0492	DS	Córdoba	12-2007	stx2a / stx2c	49
	221.08	AREXHX01.0488	SUH	Buenos Aires	02-2008	stx2a / stx2c	49
	FP-049	AREXHX01.0551	Bovino	Santa Fe	02-2007	stx2a / stx2c	49
	165.08	AREXHX01.0500	Asintomático	Río Negro	03-2008	stx2a / stx2c	49
	215.07	AREXHX01.0510	DS	Neuquén	02-2007	stx1a / stx2a / stx2c	49
	112.07	AREXHX01.0455	DS	Chubut	01-2007	stx2a / stx2c	49
	344.07	AREXHX01.0526	D	Buenos Aires	03-2007	stx2a / stx2c	49
	430.07	AREXHX01.0479	DS	CABA	03-2007	stx2a / stx2c	49
	183.07	AREXHX01.0546	SUH	Neuquén	02-2007	stx2a / stx2c	49
	126.07	AREXHX01.0481	SUH	CABA	01-2007	stx2a / stx2c	2
	272.08	AREXHX01.0146	DS	CABA	03-2008	stx2a / stx2c	2
	301.07	AREXHX01.0145	SUH	CABA	03-2007	stx2a / stx2c	54
	458.07	AREXHX01.0145	SUH	Buenos Aires	04-2007	stx2a / stx2c	54
	251.08	AREXHX01.0659	SUH	Buenos Aires	04-2008	stx2a / stx2c	50
	1071.06	AREXHX01.0533	SUH	CABA	11-2006	stx2a / stx2c	2
	317.07	AREXHX01.0098	DS	CABA	01-2007	stx2a / stx2c	2
	241.08	AREXHX01.0522	DS	Río Negro	04-2008	stx2a / stx2c	49
	FP-148	AREXHX01.0550	Bovino	Córdoba	08-2007	stx2a / stx2c	RDCN
	367.08	AREXHX01.0497	SUH	Buenos Aires	01-2008	stx2a / stx2c	54
	FP-172	AREXHX01.0267	Bovino	Corrientes	11-2007	stx2a / stx2c	49
	FP-174	AREXHX01.0267	Bovino	Corrientes	11-2007	stx2a / stx2c	49
	FP-173	AREXHX01.0267	Bovino	Corrientes	11-2007	stx2a / stx2c	49
	894.07	AREXHX01.0268	D	Río Negro	11-2007	stx2a / stx2c	14
	187.07	AREXHX01.0338	DS	Buenos Aires	02-2007	stx2a / stx2c	4
	FP-131	AREXHX01.0558	Bovino	Buenos Aires	07-2007	stx2a / stx2c	51
	FP-253	AREXHX01.0554	Bovino	Buenos Aires	04-2008	stx2a	2
	I-001	AREXHX01.0544	Bovino	Buenos Aires	11-2006	stx1a / stx2a	21
	I-002	AREXHX01.0544	Bovino	Buenos Aires	11-2006	stx1a / stx2a	21
	I-004	AREXHX01.0544	Bovino	Buenos Aires	11-2006	stx1a / stx2a	21
	I-003	AREXHX01.0544	Bovino	Buenos Aires	11-2006	stx1a / stx2a	21
	FP-171	AREXHX01.0557	Bovino	Corrientes	11-2007	stx1 / stx2a / stx2c	31

REFERENCIAS

- Ahmed R, Bopp C, Borczyk A. Phage-typing scheme for *Escherichia coli* serotype O157:H7. *J. Infect. Dis.* 1987; 155:806-809.
- Alam MJ, Zurek L. Seasonal prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in beef cattle feces. *J. Food Prot.* 2006; 69:3018–3020.
- Amézquita-López BA, Quiñones B, Cooley MB, León-Félix J, Castro-del Campo N, Mandrell RE, Jiménez M, Chaidez C, Genotypic analyses of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 and Non-O157 recovered from feces of domestic animals on rural farms in Mexico. *PLoS ONE.* 2012; 7(12): e51565. doi:10.1371/journal.pone.0051565.
- Antman J, Geffner L, Pianciola L, Rivas M. Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) en Argentina, 2010-2013. Extracto del Boletín Integrado de Vigilancia N° 222 - SE 30 Agosto 2014. Disponible en: <http://www.msal.gov.ar/zoonosis/index.php/informacion-para-equipos-de-salud/sindrome-uremico-hemolitico>
- Arthur TM, Brichta-Harhay DM, Bosilevac JM, Kalchayanand N, Shackelford SD, Wheeler TL, Koohmaraie M. Super shedding of *Escherichia coli* O157:H7 by cattle and the impact on beef carcass contamination. *Meat Sci.* 2010; 86:32–37.
- Aspan A, Erikson E. Verotoxigenic *Escherichia coli* O157:H7 from Swedish cattle; isolates from prevalence studies versus strains linked to human infection- A retrospective study. *BCM Vet. Res.* 2010; 6:7-16.
- Barkocy-Gallagher GA, Arthur TM, Rivera-Betancourt M, Nou X, Shackelford SD, Wheeler TL, Koohmaraie, M. Seasonal prevalence of Shiga toxin-producing

- Escherichia coli* including O157 and non-O157 serotypes, and *Salmonella* in commercial beef processing plants. *J. Food Prot.* 2003; 66:1978–1986.
- Barlow RS, Mellor GE. Prevalence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* serotypes in Australian beef cattle. *Foodborne Pathog. Dis.* 2010; 7:1239–1245.
- Barret TJ, Lior H, Green JH, Khakhria R, Wells JG, Bell BP, Greene KD, Lewis J, Griffin PM. Laboratory investigation of a multistate food-borne outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 by using pulsed-field gel electrophoresis and phage typing. *J. Clin. Microbiol.* 1994; 32:3013-3017.
- Besser TE, Richards BL, Rice DH, Hancock DD. *Escherichia coli* O157:H7 infection of calves: infectious dose and direct contact transmission. *Epidemiol. Infect.* 2001; 127:555-560.
- Besser TE, Shaikh N, Holt NJ, Tarr PI, Konkel ME, Malik-Kale P, Walsh CW, Whittam TS, Bono JL. Greater diversity of Shiga toxin-encoding bacteriophage insertion sites among *Escherichia coli* O157:H7 isolates from cattle than in those from humans. *Appl. Environ. Microbiol.* 2007; 73:671–679.
- Bentancor A, Rumi MV, Carbonari C, Gerhardt E, Larzábal M, Vilte DA, Pistone-Creydt V, Chinen I, Ibarra C, Cataldi A, Mercado EC. Profile of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from dogs and cats and genetic relationships with isolates from cattle, meat and humans. *Vet. Microbiol.* 2012; 4; 156(3-4):336-342. doi: 10.1016/j.vetmic.2011.10.030.
- Beutin LM, Montenegro A, Ørskov I, Prada J, Zimmermann S, Stephan R. Close association of Verotoxin (Shiga-like toxin) production with enterohemolysin production in strains of *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 1989; 27:2559-2564.

- Beutin L, Geier D, Steinrück H, Zimmermann S, Scheutz F. Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga-like toxin)-producing *Escherichia coli* in seven different species of healthy domestic animals. *J. Clin. Microbiol.* 1993; 31: 2483-2488.
- Beutin L, Kaulfuss S, Cheasty T, Brandenburg B, Zimmermann S, Gleier K, Willshaw GA, Smith HR. Characteristics and association with disease of two major subclones of Shiga toxin (verocytotoxin)-producing strains of *Escherichia coli* (STEC) O157 that are present among isolates from patients in Germany. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2002; 44:337-346.
- Bielaszewska, M., H. Schmidt, M. A. Karmali, R. Khakhria, J. Janda, K. Blahova, and H. Karch. Isolation and characterization of sorbitol fermenting Shiga toxin (verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* O157:H strains in the Czech Republic. *J. Clin. Microbiol.* 1998; 36:2135–2137.
- Bielaszewska M, Fell M, Greune L, Prager R, Fruth A, Tschäpe H, Schmidt MA, Karch H. Characterization of cytolethal distending toxin genes and expression in shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains of non-O157 serogroups. *Infect Immun.* 2004; 72(3):1812-1816.
- Böerlin P, McEwen SA, Böerlin-Petzold F, Wilson JB, Johnson RP, Gyles CL. Association between virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and disease in humans. *J. Clin. Microbiol.* 1999; 37:497-503.
- Bok E, Mazurek J, Stosik M, Wojciech M, Baldy-Chudzik K. Prevalence of virulence determinants and antimicrobial resistance among commensal *Escherichia coli* derived from dairy and beef cattle. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 2015; 12, 970-985; doi:10.3390/ijerph120100970.
- Boletín Integrado de Vigilancia | N° 328 – SE 38 – 2016. Página 101 de 120. IV. INFORMES ESPECIALES. Síndrome Urémico Hemolítico y enfermedad producida

por *Escherichia coli* productor de verocitotoxina (VTEC) / *E. coli* productor de toxina de Shiga (STEC). Informe del Ministerio de Salud de la Nación en respuesta a la solicitud de datos por parte de la FAO/OMS. José Carrizo Olalla, Natalia Casas, Natalia N. Ferro, Carlos Giovacchini, Isabel Chinen, Elizabeth Miliwebsky, Marta Rivas, Josefina Cabrera Durango, Erika J. Marco, Verónica Sardi.

Bono JL, Keen JE, Clawson ML, Durso LM, Heaton MP, Laegreid WW. Association of *Escherichia coli* O157:H7 tir polymorphisms with human infection. BMC Infect. Dis. 2007; 7:98. doi:10.1186/1471-2334-7-98.

Boqvist S, Aspan A, Eriksson E. Prevalence of verotoxigenic *Escherichia coli* O157:H7 in fecal and ear samples from slaughtered cattle in Sweden. J. Food Prot. 2009; 72(8):1709-1712.

Borie C, Monreal Z, Guerrero P, Sanchez M.L, Martinez J, Arellano C, Prado V. Prevalencia y caracterización de *Escherichia coli* enterohemorrágica aisladas de bovinos y cerdos sanos faenados en Santiago, Chile. Arch. Med. Vet. 1997; vol.29, no.2, p.205-212. ISSN 0301-732X.

Breum SØ, Boel J. Prevalence of *Escherichia coli* O157 and verocytotoxin producing *E. coli* (VTEC) on Danish beef carcasses. Int J Food Microbiol. 2010; 30:141(1-2):90-96. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.03.009.

Brooks JT, Sowers EG, Wells JG, Greene KD, Griffin PM, Hoekstra RM, Strockbine NA. Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in the United States, 1983–2002. J. Infect. Dis. 2005; 192:1422–1429.

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

- Carroll AM, Gibson A, McNamara EB. Laboratory-based surveillance of human verocytotoxigenic *Escherichia coli* infection in the Republic of Ireland, 2002–2004. *J. Med. Microbiol.* 2005; 54:1163–1169.
- Centers for Disease Control and Prevention. Ongoing multistate outbreak of *Escherichia coli* serotype O157:H7 infections associated with consumption of fresh spinach—United States, September 2006. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. 2006; 55:1045–1046.
- Centers for Disease Control and Prevention. Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet): FoodNet Surveillance Report for 2011 (Final Report). Atlanta, Georgia: U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA. 2012; http://www.cdc.gov/foodnet/PDFs/2011_annual_report_508c.pdf.
- Cerqueira AMF, Guth BEC, Joaquim RM, Andrade JRC: High occurrence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in healthy cattle in Rio de Janeiro State, Brazil. *Vet Microbiol.* 1999; 70:111-121.
- Chalmers RM, Parry SM, Salmon RL, Smith RMM, Willshaw GA, Cheasty T. The surveillance of verotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in Wales, 1990 to 1998. *Emerg. Infect. Dis.* 1999; 5(4): 566-569
- Chapman PA, Siddons CA, Wright DJ, Norman P, Fox J, Crick E. Cattle as a possible source of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 infections in man. *Epidemiol. Infect.* 1993; 111:439-447.
- Chapman PA, Cerdan Malo AT, Ellin M, Harkin AR. *Escherichia coli* O157 in cattle and sheep at slaughter, on beef and lamb carcasses and in raw beef and lamb products in South Yorkshire, UK. *Int J Food Microbiol.* 2001; 64:139–150.
- Cheasty T, Allerberger F, Beutin L, Caprioli A, Heuvelink AE, Karch H, Lofdahl S, Pierard D, Scheutz F, Siitonen A, Smith H. VTEC O157 phage types isolated from 15

European countries 1997–1999. 4th International Symposium and Workshop on Shiga Toxin (Verotoxin)-producing *Escherichia coli* infections October 29 – November 2, 2000, Kyoto, Japan, p. 126.

Chinen I, Tanaro JD, Miliwebsky E, Lound HL, Chillemi G, Ledri S, Baschkier A, Scarpin M, Manfredi E, Rivas M. Isolation and characterization of *Escherichia coli* O157:H7 from retail meats in Argentina. *J. Food Prot.* 2001; 64:1346-1351.

Chinen I, Otero JL, Miliwebsky ES, Roldan ML, Baschkier A, Chillemi GM, Noboli C, Frizzo L, Rivas M. Isolation and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 from calves in Argentina. *Res. Vet. Sci.* 2003; 74:283–286.

Chinen I, Epsztein S, Melamed CL, Aguerre L, Martinez Espinosa E, Motter MM, Baschkier A, Manfredi E, Miliwebsky E, and Rivas M. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 in beef and chicken burgers, and chicken carcasses in Buenos Aires, Argentina. *I. J. Food Microbiol.* 2009; 132:167-171.

Clawson ML, Keen JE, Smith TP, Durso LM, McDanel TG, Mandrell RE, Davis MA, Bono JL. Phylogenetic classification of *Escherichia coli* O157:H7 strains of human and bovine origin using a novel set of nucleotide polymorphisms. *Genome Biol.* 2009; 10(5):R56. doi: 10.1186/gb-2009-10-5-r56. Epub 2009 May 22.

Clements A, Young JC, Constantinou N, Frankel G. Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Gut Microbes.* 2012; 3(2):71-87

Cobbold RN, Hancock DD, Rice DH, Berg J, Stilborn R, Hovde CJ, and Besser TE. Rectoanal junction colonization of feedlot cattle by *Escherichia coli* O157:H7 and its association with supershedders and excretion dynamics. *Appl Environ Microbiol.* 2007; 73:1563–1568.

Doughty S, Sloan J, Bennet-Wood V, Robertson M, Robins-Brown RM, Hartland EL. Identification of a novel fimbrial gene cluster related to long polar fimbriae in locus of

- enterocyte effacement- negative strains of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 2002; 70:6761-6769.
- Dargatz DA, Bai J, Lubbers BV, Koprak CA, An B, Anderson GA. Prevalence of *Escherichia coli* O-types and Shiga toxin genes in fecal samples from feedlot cattle. *Foodborne Pathog. Dis.* 2013; 10:392-396.
- Duffy G, Cummins E, Nally P, OB S, Butler F. A review of quantitative microbial risk assessment in the management of *Escherichia coli* O157:H7 on beef. *Meat Sci.* 2006; 74:76–88.
- Edrington TS, Callaway TR, Ives SE, Engler MJ, Loofer ML, Anderson RC, Nisbet DJ. Seasonal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in ruminants: a new hypothesis. *Foodborne Pathog Dis.* 2006; 3:413–421.
- Edrington TS, Callaway TR, Hallford DM, Anderson RC, Nisbet DJ. Influence of exogenous triiodothyronine (T3) on fecal shedding of *Escherichia coli* O157 in cattle. *Microb. Ecol.* 2007; 53:664–669.
- Eklund M, Leino K, Siitonen A. Clinical *Escherichia coli* strains carrying *stx* genes: *stx* variants and *stx*-positive virulence profiles. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40:4585-4593.
- Elder RO, Keen JE, Siragusa GR, Barkocy-Gallagher GA, Koohmaraie M, Laegreid WW. Correlation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 prevalence in feces, hides, and carcasses of beef cattle during processing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2000; 97:2999–3003.
- Eriksson E, Aspan A, Gunnarsson A, Vågsholm I: Prevalence of verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) O157 in Swedish dairy herds. *Epidemiol Infect.* 2005; 133:349-358.

- Eriksson E, Söderlund R, Boqvist S, Aspan A. Genotypic characterization to identify markers associated with putative hypervirulence in Swedish *Escherichia coli* O157:H7 cattle strains. *J. Appl. Microbiol.* 2011; 110(1):323–332.
- Ethelberg S, Olsen KE, Scheutz F, Jensen C, Schiellerup P, Enberg J, Petersen AM, Olesen B, Gerner-Smidt P, Mølbak K. Virulence factors for hemolytic uremic syndrome, Denmark. *Emerg. Infect. Dis.* 2004; 10(5), 842-847.
- Etoh Y, Hirai S, Ichihara S, Maeda E, Yokoyama E, Sera N, Horikawa K, Yamamoto T. Evolutionary model of the divergence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 lineage I/II clades reconstructed from high resolution melting and Shiga-like toxin 2 analyses. *Infect. Genet. Evol.* 2014; 24:140–145
- European Centre for Disease Prevention and Control. 2013. Annual epidemiological report 2012. Reporting on 2010 surveillance data and 2011 epidemic intelligence data. ECDC, Stockholm, Sweden. <http://ecdc.europa.eu/en/Publications/Annual-Epidemiological-Report-2012.pdf>.
- Ewing WH. Edwards and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae. 4th edition. New York, NY: Elsevier. 1986; pp. 92-134.
- Exeni R. Síndrome Urémico Hemolítico. *Arch. Latinoam. Nefrol. Pediát.* 2001; 1:35-56.
- Ezawa A, Gocho F, Saitoh M, Tamura T, Kawata K, Takahashi T, Kikuchi N. A three-year study of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 on a farm in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 2004; 66(7):779-84.
- Fegan N, Vanderlinde P, Higgs G, Desmarchelier P. The prevalence and concentration of *Escherichia coli* O157 in faeces of cattle from different production systems at slaughter. *J. Appl. Microbiol.* 2004; 97:362–370.
- Ferens W, Hovde CJ. *Escherichia coli* O157:H7: Animal reservoir and sources of human infection. *Foodborne Pathog. Dis.* 2011; 8:465-487

- Frankel G, Phillips AD, Trabulsi LR, Knutton S, Dougan G, Matthews SE. Intimin and the host cell-is it bound to end in Tir(S)??. *Trends Microbiol.* 2001; 9:214-218.
- Friedrich AW, Bielaszewska M, Zhang WL, Pulz M, Kuczius T, Ammon A, Karch H. *Escherichia coli* harboring Shiga toxin 2 gene variants: frequency and association with clinical symptoms. *J. Infect. Dis.* 2002; 185:74-84.
- Gannon VP, D'Souza S, Graham T, King RK, Rahn K, Read S. Use of the flagellar H7 gene as a target in multiplex PCR assays and improved specificity in identification of enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains. *J. Clin. Microbiol.* 1997; 35:656-662.
- Gannon, VP, Graham JTA, King R, Michel P, Read S, Ziebell K, Johnson RP. *Escherichia coli* O157:H7 infection in cows and calves in a beef cattle herd in Alberta, Canada. *Epidemiol. Infect.* 2002; 129:163–172.
- Garmendia J, Frankel G, Crepin V.F. Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *E. coli* infections: translocation, translocation, translocation. *Infect. Immun.* 2005; 73:2573-2585.
- Gasser C, Gautier E, Steck A, Siebenmann RE, Oechslin R. Hämolytisch urämische Syndrome: bilaterale Nierenrindennekrosen bei akute erworbenen hämolitischen Anämien. *Schweizer. Med. Wochenschr.* 1955; 85:905-909.
- Gianantonio CA, Vitacco M, Mendilaharzu F, Gallo G. The hemolytic-uremic syndrome. Renal status of 76 patients at long-term follow-up. *J Pediatr.* 1968; 72(6):757-765.
- Government of Canada, National Integrated Enteric Pathogen Surveillance System (C-EnterNet). 2012. 2011 Short Report. Guelph, ON: Public Health Agency of Canada, Guelph, ON. <http://www.phac-aspc.gc.ca/c-enternet/publications-eng.php#a2>.
- Griffin PM, Tauxe RV. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. *Epidemiol. Rev.* 1991; 13:60-98.

- Griffin, PM, Bell BP, Cieslak PR, Tuttle J, Barrett TJ, Doyle MP, McNamara AM, Shefer AM, Wells JG. Large outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 in the Western United States: the big picture. In: Recent Advances in Verotoxin-producing *Escherichia coli* infections (Karmali, M.A., Goglio, A.G., Eds.). 1994; 7–12 Elsevier Sciences, B.V, Amsterdam, The Netherlands.
- Guth BEC, Prado V, Rivas M. 2010a. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, p 65–83. In Torres AG (ed), Pathogenic *Escherichia coli* in Latin America. Betham Science Publishers Ltd., Sharjah, United Arab Emirates.
- Guth BEC, Picheth CF, Gomes TAT. 2010b. *Escherichia coli* situation in Brazil, p 162–178. In Torres AG (ed), Pathogenic *Escherichia coli* in Latin America. Betham Science Publishers Ltd., Sharjah, United Arab Emirates.
- Gyles CL. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: An Overview. J. Anim. Sci. 2007; 85:E45-E62.
- Halliday JEB, Chase-Topping ME, Pearce MC, Mckendrick IJ, Allison L, Fenlon D, Low C, Mellor DJ, Gunn GJ, Woolhouse MEJ. Herd-level factors associated with the presence of phage type 21/28 *E. coli* O157 on Scottish farms. BMC. Microbiology. 2006; 6:99.
- Hartland EL, Batcherlor M, Delahay RM, Hale C, Matthews S, Dougan G, Knutton S, Connerton I, Frankel G. 1. Binding of intimin from enteropathogenic *Escherichia coli* to Tir and to host cells. Mol. Microbiol. 1999; 32:151-158.
- Heuvelink AE, Van den Biggelaar FL, de Boer E, Herbes RG, Melchers WJ, Huis in't Veld JH, Monnens LA. Isolation and characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 strains from Dutch cattle and sheep. J. Clin. Microbiol. 1998; 36:878–882.

- Icardo M, Agüero G, Chinen I, Miliwebsky E, Pedroni E, Sosa-Estani S, Rivas M. Brote de diarrea por *Escherichia coli* O157:H7 en un Jardín Maternal. Paraná-Entre Ríos, Enero 2004. XVII Congreso Latinoamericano y X Congreso Argentino de Microbiología. Buenos Aires: 17-21 de octubre de 2004.
- IPCVA, 2011. Instituto de Promoción de la Carne Vacuna Argentina. Available at http://www.ipcva.com.ar/estadisticas/vista_faena.php
- Jaros P, Cookson AL, Campbell DM, Duncan GE, Prattley D, Carter P, Besser TE, Shringi S, Hathaway S, Marshall JC, French NP. Geographic divergence of bovine and human Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 genotypes, New Zealand. *Emerg. Infect. Dis.* 2014; 20 (12):1980-1989
- Jelacic JK, Damrow T, Chen GS, Jelacic S, Bielaszewska M, Ciol M, Carvalho HM, Melton-Celsa AR, O'Brien AD, Tarr PI. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Montana: bacterial genotypes and clinical profiles. *J. Infect. Dis.* 2003; 188:719-729.
- Jenkis C, Willshaw GA, Evans J, Cheasty T, Chart H, Shaw DJ, Dougan G, Frankel G, Smith HR. Subtyping of virulence genes in verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) other than serogrup O157 associated with disease in the United Kingdom. *J. Med. Microbiol.* 2003; 52: 941-947.
- Joensen KG, Tetzschner AMM, Iguchi A, Aarestrup FM, Scheutz F. Rapid and easy *in silico* serotyping of *Escherichia coli* using whole 3 genome sequencing (WGS) data. *J. Clin. Microbiol.* 2015 doi:10.1128/JCM.00008-15.
- Kaper JB, Nataro JP, Mobley HLT. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Rev. Micro.* 2004; 2:123-140.
- Karch H, Bohm H, Schmidt H, Gunzer F, Aleksic S, Heesemann J. Clonal structure and pathogenicity of Shiga-like toxin-producing, sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157:H7. *J. Clin. Microbiol.* 1993; 31:1200-1205.

- Karmali MA, Steele BT, Petric M, Lim C. Sporadic cases of haemolytic-uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. *Lancet* 1983; 1(8325):619-620.
- Karmali MA, Petric M, Lim C, Cheung R, Arbus GS. Sensitive method for detecting low numbers of verotoxin-producing *Escherichia coli* in mixed cultures by use of colony sweeps and polymyxin extraction of verotoxin. *J. Clin. Microbiol.* 1985; 22:614-619.
- Karmali MA, Mascarenhas M, Shen S, Ziebell K, Johnson S, Reid-Smith R, Isaac-enton J, Clark C, Rahn K, Kaper JB. 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. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41:4930–4940.
- Kawano K, Ono H, Iwashita O, Kurogi M, Haga T, Maeda K, Goto Y. *stx* genotype and molecular epidemiological analyses of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7/H- in human and cattle isolates. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2011; 31:119–127.
- Khakhria R, Duch D, and Lior H. Extended phage-typing scheme for *Escherichia coli* O157:H7. *Epidemiol.Infect.* 1990; 105:511-520.
- Knowalchuk J, Speir JJ, Stavric S. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 1977; 18:775-779.
- Krishnan C, Fitzgerald VA, Dakin SJ, Behme RJ. Microbiology laboratory investigation of outbreak of hemorrhagic colitis caused by *Escherichia coli* O157:H7. *J. Clin. Microbiol.* 1987; 25 (6):1043-1047
- Kulasekara BR, Jacobs M, Zhou Y, Wu Z, Sims E, Saenphimmachak C, Rohmer L, Ritchie JM, Radey M, McKeivitt M, Freeman TL, Hayden H, Haugen E, Gillett W, Fong C, Chang J, Beskhlebnaya V, Waldor MK, Samadpour M, Whittam TS, Kaul R, Brittnacher M, and Miller SI. Analysis of the genome of the *Escherichia coli* O157:H7

- 2006 spinach-associated outbreak isolate indicates candidate genes that may enhance virulence. *Infect Immun.* 2009; 77:3713-3721.
- Lee K, French NP, Hara-Kudo Y, Iyoda S, Kobayashi H, Sugita-Konishi Y, Tsubone H, Kumagai S. Multivariate analyses revealed distinctive features differentiating human and cattle isolates of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 in Japan. *J. Clin. Microbiol.* 2011; 49:1495–1500.
- LeJeune JT, Hancock D, Wasteson Y, Skjerve E, Urdahl AM: Comparison of *E. coli* O157 and shiga toxin encoding genes (*stx*) prevalence between Ohio, USA and Norwegian dairy cattle. *Int. J. Food Microbiol.* 2006; 109:19-24.
- Leotta GA, Chinen I, Epszteyn S, Miliwebsky E, Melamed IC, Motter M, Ferrer M, Marey E, Rivas M. Validación de una técnica de PCR múltiple para la detección de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga. *Rev. Argent. Microbiol.* 2005; 37:1-10.
- Löfdahl S. How global is VTEC? In: *Epidemiology and transmission of VTEC and other pathogenic Escherichia coli*. Stockholm, Sweden, pp. 65-67. 2008.
- Lopez F, Isequilla PE, Kaplan D. Enfermedades de transmisión hídrico en el Río de La Plata, Diagnóstico de situación Enero-Junio 1998. Gobierno de la Ciudad de Buenos Aires. 1998.
- López O, Duverne L, Chinen I, Carbonari C, Mazieres J, Deza N, Baschkier A, Carullo G, Miliwebsky E, Rivas M. Shedding and characterization of shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from beef cattle in one feedlot of Argentina. Trabajo N° 0276, libro de resúmenes. 7th International Symposium on Shiga Toxin (Verocytotoxin)-Producing *Escherichia coli* infections, VTEC2009, Bs.As., Mayo 2009.
- Masana MO, Leotta GA, Del Castillo LL, D’Astek BA, Palladino PM, Galli L, Vilacoba E, Carbonari C, Rodríguez HR, Rivas M. Prevalence, characterization, and genotypic

- analysis of *Escherichia coli* O157:H7/NM from selected beef exporting abattoirs of Argentina. *J. Food Protect.* 2010; 73:649-656.
- Masana MO, D'Astek BA, Palladino PM, Galli L, Del Castillo LL., Carbonari C, Leotta GA, Vilacoba E, Irino K, Rivas M. Genotypic characterization of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef abattoirs of Argentina *J. Food Protect.* 2011; 74:2008–2017
- Manning SD, Motiwala AS, Springman AC, Qi W, Lacher DW, Ouellette LM, Mladonicky JM, Somsel P, Rudrik JT, Dietrich SE, Zhang W, Swaminathan B, Alland D, Whittam TS. Variation in virulence among clades of *Escherichia coli* O157:H7 associated with disease outbreaks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008; 105:4868–4873.
- Matthews L, McKendrick IJ, Ternent H, Gunn GJ, Synge B, Woolhouse ME. Super-shedding cattle and the transmission dynamics of *Escherichia coli* O157. *Epidemiol. Infect.* 2006; 134:131–142.
- Meichtri L, Miliwebsky E, Gioffré A, Chinen I, Baschkier A, Chillemi G, Guth BEC, Masana M, Cataldi A, Rodríguez HR, Rivas M. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in healthy young beef steers from Argentina: prevalence and virulence properties. *J. Food Microbiol.* 2004; 96:189-198.
- Mellor GE, Sim EM, Barlow RS, D'Astek BA, Galli L, Chinen I, Rivas M, Gobius KS. Phylogenetically related Argentinean and Australian *Escherichia coli* O157 isolates are distinguished by virulence clades and alternative Shiga toxin 1 and 2 prophages. *Appl. Environ. Microbiol.* 2012; 27; 78(13):4724-4731.
- Mellor GE, Besser TE, Davis MA, Beavis B, Jung W, Smith HV, Jennison AV, Doyle CJ, Chandry PS, Gobius KS, Fegan N. Multilocus genotype analysis of *Escherichia coli* O157 isolates from Australia and the United States provides evidence of geographic divergence. *Appl. Environ. Microbiol.* 2013; 79(16):5050-5058.

- Mellor GE, Fegan N, Gobius KS, Smith HV, Jennison AV, D'Astek BA, Rivas M, Shringi S, Baker KNK, Besser TE. 2015. Geographically distinct *Escherichia coli* O157 isolates differ by lineage, Shiga toxin genotype, and total Shiga toxin production. *J. Clin. Microbiol.* 53:579–586. doi:10.1128/JCM.01532-14.
- Melton-Celsa AR. 2014. Shiga toxin (Stx) classification, structure, and function. *Microbiol. Spectrum* 2(3): EHEC-0024-2013. doi:10.1128/microbiolspec.EHEC-0024-2013.
- Miliwebsky E, Deza N, Chinen I, Martinez Espinosa E, Gómez D, Pedroni E, Caprile L, Baschkier A, Manfredi E, Leotta GA, Rivas M. Prolonged fecal shedding of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* among children attended in day-care centers, Argentina. *Rev. Argent. Microbiol.* 2007; 39:90-92.
- Monaghan A, Byrne B, Fanning S, Sweeney T, McDowell D, Bolton DJ. Serotypes and virulence profiles of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from bovine farms. *Appl. Environ. Microbiol.* 2011; 77:8662–8668.
- Mora A, Blanco M, Blanco JE, Alonso MP, Dhahi G, Thomson-Carter F, Usera MA, Bartolomé R, Prats G, Blanco J. Phage types and genotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 isolates from humans and animals in Spain: Identification and characterization of two predominating phage types (PT2 and PT8). *J. Clin. Microbiol.* 2004; 42:4007-4015.
- Moxley RA, Acuff GR. 2014. Peri- and postharvest factors in the control of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef. *Microbiol. Spectrum* 2(6): EHEC-0017-2013. doi:10.1128/microbiolspec.EHEC-0017-2013.
- Muto T, Matsumoto Y, Yamada M, Ishiguro Y, Kitazume H, Sasaki K, Toba M. Outbreaks of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 infections among children with animal

- contact at a dairy farm in Yokohama City, Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.* 2008; 61 (2): 161-162.
- Nakamura H, Ogasawara J, Kita T, Hase A, Nishikawa Y. Typing of Stx2 genes of *Escherichia coli* O157 isolates from cattle. *Jpn. J. Infect. Dis.* 2008; 61:251–252.
- Narvaez-Bravo C1, Miller MF, Jackson T, Jackson S, Rodas-Gonzalez A, Pond K, Echeverry A, Brashears MM. Salmonella and *Escherichia coli* O157:H7 prevalence in cattle and on carcasses in a vertically integrated feedlot and harvest plant in Mexico. *J Food Prot.* 2013; 76(5):786-95. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-12-079.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-first Informational Supplement, volume 31, No.1. Approved Standard M100-S21. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2011.
- Naylor SW, Gally DL, Low JC. Enterohaemorrhagic *E. coli* in veterinary medicine. *Int. J. Med. Microbiol.* 2005; 295:419–441.
- Nicholls L, Grant TH, Robins-Browne RM. Identification of a novel genetic locus that is required for *in vitro* adhesion of a clinical isolated of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* to epithelial cells. *Mol. Microbiol.* 2000; 35: 275-288.
- Nielsen EM, Tegtmeier C, Andersen HJ, Gronbaek C, Andersen JS. Influence of age, sex and herd characteristics on the occurrence of Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in Danish dairy farms. *Vet. Microbiol.* 2002a; 88:245–257.
- Nielsen E.M., Scheutz F. Characterisation of *Escherichia coli* O157 isolates from Danish cattle and human patients by genotyping and presence and variants of virulence genes *Vet. Microbiol.* 2002b; 88:259–273.
- Nishikawa Y, Zhou Z, Hase A, Ogasawara J, Cheasty T, Haruki K. Relationship of genetic type of Shiga toxin to manifestation of bloody diarrhea due to

- enterohemorrhagic *Escherichia coli* serogroup O157 isolates in Osaka City, Japan. *J. Clin. Microbiol.* 2000; 38: 2440-2442.
- Notario R, Fain Binda JC, Prado JV, Maritza Ríos V, Noemi Borda O, Telma Gambandé G. Prevalencia de *Escherichia coli* Enterohemorrágico en una zona ganadera de Argentina. Caracterización genotípica de las cepas de origen animal. *Rev. Med. Chile.* 2000; 128:1335–1341.
- O'Brien AD, La Veck GD, Thompson MR, Formal SB. Production of *Shigella dysenteriae* type-1- like cytotoxin by *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.* 1982; 146:763-769.
- Omisakin F, MacRae M, Ogden ID, Strachan NJC. Concentration and prevalence of *Escherichia coli* O157 in cattle feces at slaughter. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003; 69:2444–2447.
- Oporto B, Esteban JI, Aduriz G, Juste RA, Hurtado A. *Escherichia coli* O157:H7 and Non-O157 Shiga toxin-producing *E. coli* in healthy cattle sheep and swine herds in northern Spain. *Zoonoses Public Health.* 2008; 55:73-81.
- Ørskov F, Ørskov I. Serotyping of *Escherichia coli*. In: *Methods in Microbiology*. Bergan T (ed). London: Academic Press.1984; 43–112.
- Ørskov F, Ørskov I, Villar JA. Cattle as reservoirs of verotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. *Lancet* 1987; ii:276.
- Ostroff SM, Tarr PI, Neill MA, Lewis JH, Hargrett-Bean N, Kobayashi JM. Toxin genotypes and plasmid profiles as determinants of systemic sequelae in *Escherichia coli* O157:H7 infections. *J. Infect. Dis.* 1989; 160: 994-998.
- Oteiza JM, Chinen I, Miliwebsky E, Rivas M. Isolation and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from precooked sausages (Morcillas). *Food Microbiol.* 2006; 23:283-288.

- Paiba GA, Gibbens JC, Pascoe SJS, Wilesmith JW, Kidd SA, Byrne C, Ryan JBM, Smith RP, McLaren IM, Futter RJ, Kay ACS, Jones YE, Chappell SA, Willshaw GA, Cheasty T. Faecal carriage of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in cattle and sheep at slaughter in Great Britain. *Vet. Rec.* 2002; 150:593–598.
- Paiba GA, Wilesmith JW, Evans SJ, Pascoe SJS, Smith RP, Kidd SA, Ryan JBM, McLaren IM, Chappell SA, Willshaw GA, Cheasty T, French NP, Jones TWH, Buchanan HF, Challoner DJ, Colloff AD, Cranwell MP, Daniel RG, Davies IH, Duff JP, Hogg RAT, Kirby FD, Millar MF, Monies RJ, Nicholls MJ, Payne JH. Prevalence of faecal excretion of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157 in cattle in England and Wales. *Vet. Rec.* 2003; 153:347-353.
- Palermo MS, Exeni RA, Fernández GC. Hemolytic Uremic Syndrome: pathogenesis and update of interventions. *Expert Rev. Anti. infect. Ther.* 2009; 7(6):697-707.
- Parma AE, Sanz ME, Blanco JE, Blanco J, Blanco M, Padola NL, Echeverria AI. Virulence genotypes and serotypes of verotoxigenic *Escherichia coli* isolated from cattle and foods in Argentina. *Eur. J. Epidemiol.* 2000; 16:757-762.
- Paton A, Paton J. Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using Multiplex PCR assays for *stx*₁, *stx*₂, *eae*, enterohemorrhagic *E. coli* *hlyA*, *rfb*_{O111}, and *rfb*_{O157}. *J. Clin. Microbiol.* 1998a; 36:598-602.
- Paton JC, Paton AW. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *J. Clin. Microbiol. Rev.* 1998b; 11:450-479.
- Paton AW, Srimanote P, Talbot UM, Wang H, Paton JC. A new family of potent AB(5) cytotoxins produced by Shiga toxigenic *Escherichia coli*. *J Exp Med.* 2004; 200(1):35-46.
- Paton JC, Paton AW. Shiga toxin 'goes retro' in human primary kidney cells. *Kidney Int.* 2006; 70(12):2049-2051.

- Pearce MC, Chase-Topping ME, McKendrick IJ, Mellor DJ, Locking ME, Allison L, Ternent HE, Matthews L, Knight HI, Smith AW, Synge BA, Reilly W, Low JC, Reid SWJ, Gunn GJ, Woolhouse MEJ. Temporal and spatial patterns of bovine *Escherichia coli* O157 prevalence and comparison of temporal changes in the patterns of phage types associated with bovine shedding and human *E. coli* O157 cases in Scotland between 1998-2000 and 2002-2004. *BMC Microbiology*. 2009; 9:276-288
- Persson S, Olsen KE, Ethelberg S, Scheutz F. Subtyping methods for *Escherichia coli* Shiga toxin (Verocytotoxin) 2 variants and correlation to clinical manifestations: *J. Clin. Microbiol.* 2007; 45:2020-2024.
- Pennington, H. *Escherichia coli* O157. *Lancet* 2010; 376:1428-1435.
- Pianciola L, Chinen I, Mazzeo M, Miliwebsky E, González G, Müller C, Carbonari C, Navello M, Zitta E, Rivas M. Genotypic characterization of *Escherichia coli* O157:H7 strains that cause diarrhea and hemolytic uremic syndrome in Neuquén, Argentina. *International Journal of Medical Microbiology*. 2014; 304:499–504
- Ramachandran V, Hornitzky MA, Bettelheim KA, Walker MJ, Djordjevic SP. The common ovine Shiga toxin 2 – containing *Escherichia coli* serotypes and human isolates of the same serotypes possess a Stx2d toxin type. *J. Clin. Microbiol.* 2001; 39:1932-1937.
- Ramonedá M, Foncuberta M, Simón M, Sabaté S, Ferrer MD, Herrera S, Landa B, Musté N, Martí R, Trabado V, Carbonell O, Vila M, Espelt M, Ramírez B, Durán J. Prevalence of verotoxigenic *Escherichia coli* O157 (VTEC O157) and compliance with microbiological safety standards in bovine carcasses from an industrial beef slaughter plant. *Lett Appl Microbiol.* 2013; 56(6):408-13. doi: 10.1111/lam.12062.
- Rangel JM, Sparling PH, Crowe C, Griffin PM, Swerdlow DL. Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks, United States, 1982-2002. *Emerg. Infect. Dis.*

2005; 11:603-609.

Rearte D. 2007. La producción de carne en Argentina. http://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/origenes_evolucion_y_estadisticas_de_la_ganaderia/48-ProdCarneArg_esp.pdf.

Reference Laboratory for *Escherichia coli* (EcL). Faculty of Veterinary Medicine, Université de Montréal. <http://www.ecl-lab.ca/en/ecoli/pathogenesis.asp>.

Reiland HA, Omolo MA, Johnson TJ, Baumler DJ. A Survey of *Escherichia coli* O157:H7 Virulence Factors: The First 25 Years and 13 Genomes. *Advances in Microbiology Advances in Microbiology*. 2014; 4:390-423.

Ribot EM, Fair MA, Gautom R, Cameron DN, Hunter SB, Swaminathan B, Barrett TJ. Standardization of Pulsed-Field Gel Electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. *Foodborne Pathog. Dis.* 2006; 3:59-67.

Riley LW, Temis RS, Helgerson, Helgerson SD, McGee HB, Wells JG, Davis BR, Hebert RJ, Olcott ES, Johnson LM, Hargrett NT, Blake PA, Cohen ML. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* O157:H7 serotype. *N. Engl. J. Med.* 1983; 308:681-685.

Rivas M, Miliwebsky E, Chinen I, Roldán CD, Balbi L, García B, Fiorilli G, Sosa-Estani S, Kincaid J, Rangel J, Griffin PM, Case-Control Study Group. Characterization and epidemiologic subtyping of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from hemolytic uremic syndrome and diarrhea cases in Argentina. *Foodborne Pathog. Dis.* 2006; 3:88-96.

Rivas M, Chinen I, Miliwebsky E, Galli L, Repetto HA, Masana MO. Epidemiology of Argentinean STEC. In: *Population Genetics of Bacteria: A Tribute to Thomas S. Whittam*. Walk ST, Feng PCH (eds.). Washington, DC: ASM Press, 2011; 109-132.

- Rivas M, Chinen I, Miliwebsky E, Masana M. 2014. Risk factors for Shiga toxin-producing *Escherichia coli*-associated human diseases. *Microbiol Spectrum* 2(5):EHEC-0002-2013.doi:10.1128/microbiolspec.EHEC-0002-2013
- Roldgaard BB, Scheutz F, Boel J, Aabo S, Schultz AC, Cheasty T, Møller Nielsen E, Olsen KEP, Christensen BB. VTEC O157 subtypes associated with the most severe clinical symptoms in humans constitute a minor part of VTEC O157 from Danish cattle. *Int. J. Med. Microbiol.* 2004; 294:255-259.
- Rowe PC, Orrbine E, Wells GA, McLaine PN. Epidemiology of hemolytic-uremic syndrome in Canadian children from 1986 to 1988. The Canadian Pediatric Kidney Disease Reference Centre. *J. Pediatr.* 1991; 119:218-224.
- Saari M, Cheasty T, Leino K, Siitonen A. Phage types and genotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 in Finland. *J. Clin. Microbiol.* 2001; 39:1140–1143.
- Sami M, Firouzi R, Shekarforoush SS: Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 on dairy farms in Shiraz, Iran by immunomagnetic separation and multiplex PCR. *Iran. J. Vet. Res.* 2007; 8:319-324.
- Sanz ME, Viñas RM, Parma A. Prevalence of bovine verotoxin-producing *Escherichia coli* in Argentina. *Eur. J. Epidemiol.* 1998; 14:399–403.
- Sasaki Y, Murakami M, Maruyama N, Yamamoto K, Haruna M, Ito K, Yamada Y. Comparison of the Prevalence of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* strains O157 and O26 between Beef and Dairy Cattle in Japan. doi: 10.1292/jvms.12-0514; *J. Vet. Med. Sci.* 2013; 75(9): 1219–1221.
- Scheutz F, Teel LD, Beutin L, Pierard D, Buvens G, Karch H, Mellmann A, Caprioli A, Tozzoli R, Morabito S, Strockbine NA, Melton-Celsa AR, Sanchez M, Persson S, O'Brien AD. Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing Stx nomenclature. *J. Clin. Microbiol.* 2012; 50:2951–2963.

- Schmidt H, Beutin L, Karch H. Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933. *Infect. Immun.* 1995; 63:1055-1061.
- Schroeder, C. M., Zhao C., DebRoy C., Torcolini J., Zhao S., White D. G., Wagner D. D., McDermott P. F., Walker R. D., Meng J. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* O157 isolated from humans, cattle, swine, and food. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002; 68:576–581..
- Shringi S, Garcia A, Lahmers KK, Potter KA, Muthupalani S, Swennes AG, Hovde CJ, Call DR, Fox JG, Besser TE. Differential virulence of clinical and bovine-biased enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 genotypes in piglet and Dutch belted rabbit models. *Infect. Immun.* 2012; 80: 369–380.
- Shimizu T, Tsutsuki H, Matsumoto A, Nakaya H, Noda M. The nitric oxide reductase of enterohemorrhagic *Escherichia coli* plays an important role for the survival within macrophages. *Mol. Microbiol.* 2012; 85:492–512.
- Siegler RL, Pavia AT, Christofferson RD, Milligan MK. A 20-year population-based study of postdiarrheal hemolytic uremic syndrome in Utah. *Pediatrics.* 1994; 94:35-40.
- Söderlund R, Hedenström I, Nilsson Anna, Eriksson E, Aspán A. Genetically similar strains of *Escherichia coli* O157:H7 isolated from sheep, cattle and human patients. *BMC Veterinary Research.* 2012; 8:200. DOI: 10.1186/1746-6148-8-200
- Spizzirri FD, Rahman RC, Bibiloni N, Ruscasso JD, Amoreo OR. Childhood hemolytic uremic syndrome in Argentina: long term follow-up and prognostic features. *Pediatr. Nephrol.* 1997; 11:156-160.
- Strockbine N, Marques L, Newland J, Williams Smith H, Holmes RK, O'Brien AD. Two toxin-producing phages from *Escherichia coli* O157:H7 strain 933 encode antigenically distinct toxins with similar biologic activities. *Infect. Immun.* 1986; 53:135-40.

- Tanaro JD, Leotta GA, Lound LH, Galli L, Piaggio MC, Carbonari CC, Araujo S, Rivas M. *Escherichia coli* O157 in bovine feces and surface water streams in a beef cattle farm of Argentina. *Foodborne Pathog. Dis.* 2010; 7:475-477.
- Tarr P. *Escherichia coli* O157:H7: Clinical, diagnostic and epidemiological aspects of human infections. *Clin Infect Dis.* 1995; 20:1-10.
- Tarr PI, Bilge SS, Vary JC, Jelacic S, Habeeb RL, Ward TR, Baylor MR, Besser TE. Iha: a novel *Escherichia coli* O157:H7 adherence- conferring molecule encoded on a recently acquired chromosomal island of conserved structure. *Infect. Immun.* 2001; 68:1400-1407.
- Thomas KM, McCann MS, Collery MM, Logan A, Whyte P, McDowell DA, Duffy G. Tracking verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157, O26, O111, O103 and O145 in Irish cattle. *Int. J. Food Microbiol.* 2012; 153(3):288-296.
- Torres AG, Giron JA, Perna NT, Burland V, Blattner FR, Avelino-Flores F, Kaper JB. Identification and characterization of *lpfABCCDE*, a fimbrial operon of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect. Immun.* 2002; 70:5416-5427.
- Tuttle J, Gomez T, Doyle MP, Wells JG, Zhao T, Tauxe RV, Griffin PM. Lessons from a large outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections: insights into the infectious dose and method of widespread contamination of hamburger patties. *Epidemiol. Infect.* 1999; 122:185-192.
- Tyler SD, Johnson WM, Lior H, Wang G, Rozee KR. Identification of Verotoxin type 2 variant B subunit genes in *Escherichia coli* by the polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. *J. Clin. Microbiol.* 1991; 29:1339-1343.

- Vally H, Hall G, Dyda A, Raupach J, Knope K, Combs B, Desmarchelier P. Epidemiology of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Australia, 2000–2010. BMC Public Health. 2012; 12:63–74.
- Varela G, Gómez-Duarte OG, Ochoa T. 2010. Diarrheigenic *Escherichia coli* in children from Uruguay, Colombia and Perú, p 209–222. In Torres AG (ed), Pathogenic *Escherichia coli* in Latin America. Betham Science Publishers Ltd., Sharjah, United Arab Emirates.
- Vidovic S, Korber DR: Prevalence of *Escherichia coli* O157 in Saskatchewan cattle: Characterization of isolates by using Random Amplified Polymorphic DNA PCR, antibiotic resistance profiles, and pathogenicity determinants. Appl. Environ. Microbiol. 2006; 6(72):4347–4355.
- Wang H, Paton JC, Paton AW. Pathologic changes in mice induced by subtilase cytotoxin, a potent new *Escherichia coli* AB5 toxin that targets the endoplasmic reticulum. J. Infect. Dis. 2007; 196:1093–1101
- Watanabe H, Wada A, Inagaki Y, Itoh K, Tamura K. Outbreaks of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 infection by two different genotype strains in Japan. Lancet 1996; 348: 381-382.
- Wells JE, Shackelford SD, Berry ED, Kalchayanand N, Guerini MN, Varel VH, Arthur TM, Bosilevac JM, Freetly HC, Wheeler TL, Ferrell CL, Koohmaraie M. Prevalence and level of *Escherichia coli* O157:H7 in feces and on hides of feedlot steers fed diets with or without wet distillers grains with solubles. J. Food Prot 2009a; 72:1624–1633.
- Whitworth J, Zhang Y, Bono J, Pleydell E, French N, Besser T. Diverse genetic markers concordantly identify bovine origin *Escherichia coli* O157 genotypes underrepresented in human disease. Appl. Environ. Microbiol. 2010; 76(1):361–365.

Williams ND, Torres AG, Lloyd SJ. Pathogenic *Escherichia coli* in Latin America, CHAPTER 2 Evolution and Epidemiology of Diarrheagenic *Escherichia coli* 2010, 8-24 Alfredo G. Torres (Ed) Bentham Science Publishers Ltd.

World Health Organization (WHO). Prevention and control of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) infections. Report of a WHO Consultation. World Health Organization, Geneva, 1997.

Zhang W, Bielaszewska M, Thorsten K, Karch H. Identification, characterization, and distribution of a Shiga toxin 1 gene variant (*stx1c*) in *Escherichia coli* strains isolated from humans. J. Clin. Microbiol. 2002; 40:1441-1446.