



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

Facultad de Ciencias Veterinarias

Trabajo de Tesis realizado como requisito para optar al título de

DOCTOR EN CIENCIAS VETERINARIAS

ESTUDIO DE LOS FACTORES DE ADHERENCIA DE CEPAS DE *Escherichia coli*

PRODUCTORAS DE TOXINA SHIGA AISLADAS DE BOVINOS

AUTOR: GALLI, Lucía

DIRECTOR: LEOTTA, Gerardo Aníbal

CO-DIRECTOR: RIVAS, Marta

ASESOR EXTERNO: TORRES, Alfredo G.

LUGAR DE TRABAJO

Servicio Fisiopatogenia, Departamento Bacteriología, Instituto Nacional de

Enfermedades Infecciosas, ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”

2012

A Pablo, mi gran amor y sostén

AGRADECIMIENTOS

Estoy emocionada y contenta por terminar la tesis que arrancó hace aproximadamente 5 años, aunque ya hace un poco más que trabajo en FP, y cuando recuerdo algo de los comienzos se me viene a la cabeza la voz de un pica-sesos que me decía “anotate al doctorado”, gracias Gerar por todo tu apoyo y principalmente confiar en mi.

Tengo una lista interminable de gente a la que agradecerle. Para ser imparcial voy a hacer un muestreo al azar sin reposición de los nombres para que ninguno se ofenda y espero no olvidarme de nadie, sí, sí, nadie1, nadie 2, nadie 3....

En todo este tiempo recibí la confianza, el cariño y el apoyo incondicional de todos mis compañeros y amigos del Servicio Fisiopatogenia (FP, como me gusta decirle). Agradezco a Marta, Isa, Eli, Caro, Nati, Ari, Bety, Gise, Juli, Nati, Sofi, y al “bendito” Eduardo, sabelo que voy a extrañar las tardes sin radio América y nuestras charlas eternas. No puedo dejar de agradecerle a mis ex-compañeras Juli, Eli y Anita que formaron parte de los comienzos y cada una también dejó una marca personal en mi corazón. Cómo olvidar los días enteros picando colonias con Daniel y más aún armando las tablas de excel con las cepas!!!

Tampoco me olvido de Alfredo y todo el esfuerzo que hizo por ayudarme. De las interminables cadenas de mails discutiendo sobre los experimentos y de las rebanadas de seso por querer encontrar una explicación a todo. De Torre’s Lab, que apesar de haber estado muy poco tiempo con ellos supieron adoptarme como una más, nada hubiera sido lo mismo sin Marita, Carla, Roberto, Doug, Shane, Tiff y Katie.

Y si hablando de laboratorios se trata, no puedo dejar de mencionar a la gente del INTA, a Mariano, Elsa, Betina, Dani, Lori y Ana, que supieron entregarme un lugarcito y toda la ayuda del mundo.

Agradezco a todos los servicios del Malbrán que siempre me ayudaron cuando fui con alguna duda y sobre todo a Diego por su ayuda desinteresada.

A Laurita por los dibujos y la edición. Y principalmente quiero agradecerle a mi FAMILIA y AMIGOS por su apoyo incondicional. Estoy y estaré eternamente agradecida con todos!!!

Y si me olvidé de vos y estas leyendo esta tesis por alguna de esas casualidades de la vida, MUCHAS GRACIAS TAMBIEN!!!

CITAS BIBLIOGRÁFICAS CORRESPONDIENTES A LAS PUBLICACIONES PARCIALES DEL TRABAJO DE TESIS

- Galli L, Miliwebsky E, Irino K, Leotta GA, Rivas M. Virulence profile comparison between LEE-negative Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from cattle and humans. *Vet Microbiol.* 2010;143:307-313.
- Galli L, Torres AG, Rivas M. Identification of the long polar fimbriae gene variants in the locus of enterocyte effacement-negative Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from humans and cattle in Argentina. *FEMS Microbiol Lett.* 2010;308:123-129.

INDICE

LISTA DE ABREVIATURAS -----	IX
RESUMEN-----	13
1. INTRODUCCION -----	14
1.1.- <i>Escherichia coli</i> productor de toxina Shiga-----	16
1.2.- Reservorios y vías de transmisión de STEC -----	18
1.3.- Manifestaciones clínicas de la infección por STEC-----	22
1.4.- Estrategias de la infección por STEC -----	25
A) Patogénesis-----	25
B) Factores de virulencia-----	28
B.1.- Toxina Shiga -----	29
B.2.- Otras toxinas -----	30
B.3.- Factores de adherencia intestinal -----	31
Codificados dentro la región LEE -----	31
B.3.1.- Intimina como factor clave de colonización -----	31
Codificados fuera de la región LEE -----	33
B.3.2.- Fimbria polar larga (Lpf)-----	33
B.3.3.- Factor de <i>E. coli</i> enterohemorrágico para la adherencia-----	37
B.3.4.- Adhesina autoaglutinante de STEC-----	38
B.3.5.- Adhesina homóloga a IrgA -----	40
B.3.6.- Fimbria de tipo 1 -----	41
B.3.7.- Curli-----	42
B.3.8.- Flagelos-----	44
1.5.- Situación actual del SUH en Argentina -----	45
1.6.- Tratamiento-----	46
1.7.- Control de STEC en el ganado bovino-----	47
2. OBJETIVOS-----	48
3. MATERIALES Y METODOS -----	50
3.1.- Cepas bacterianas y plásmidos-----	50
3.2.- Medios y condiciones de crecimiento bacteriano -----	51
3.3.- Líneas celulares y cultivo de células-----	52

3.4.- Caracterización genotípica -----	53
3.4.1.- Aislamiento de ADN total -----	57
3.4.2.- Electroforesis y adquisición de imágenes -----	57
3.5.- Ensayo de aglutinación de las fimbrias de tipo 1 -----	57
3.5.1.- Determinación del estado de orientación de <i>fimA</i> -----	58
3.6.- Ensayo de expresión fenotípica de curli -----	58
3.7.- Secuenciación nucleotídica -----	59
3.8.- Adherencia bacteriana <i>in vitro</i> -----	59
3.8.1.- Ensayo cualitativo -----	59
3.8.2.- Ensayo cuantitativo-----	60
3.8.3.- Ensayo de competencia-----	61
3.9.- Invasión bacteriana <i>in vitro</i> -----	61
3.10.- Análisis estadístico de los resultados de adherencia e invasión -----	62
3.11.- Transformación de cepas bacterianas-----	62
3.11.1.- Aislamiento de ADN plasmídico-----	62
3.11.2.- Preparación de bacterias electrocompetentes -----	63
3.11.3.- Electroporación -----	64
3.12.- Construcción de una cepa mutante delecionada en <i>lpfA</i> _{O113} -----	65
3.12.1.- Purificación de fragmentos de ADN-----	65
3.12.2.- Construcción de la mutante <i>lpfA</i> -----	65
3.13.- Extracción de proteínas por calor-----	66
3.14.- Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturizante -----	67
3.15.- Secuenciación proteica-----	67
4. RESULTADOS-----	68
4.1.- Caracterización fenotípica y genotípica de las cepas-----	68
4.2.- Marcadores de virulencia -----	72
4.2.1.- Variantes de <i>lpfA</i> -----	74
4.3.- Comparación del perfil de virulencia de las cepas estudiadas -----	75
4.4.- Adherencia bacteriana <i>in vitro</i> -----	79
4.4.1.- Ensayos cualitativos de adherencia <i>in vitro</i> -----	79
4.5.- Secuenciación del gen <i>lpfA</i> _{O113} -----	81
4.5.1.- Construcción de la cepa mutada en <i>lpfA</i> _{O113} -----	82

4.6.- Contribución de Lpf a la adherencia de la cepa STEC O136:H12-----	83
5. DISCUSION-----	90
5.1.- Prevalencia de factores de virulencia de cepas STEC LEE-negativas-----	90
5.2.- Capacidad de adherencia de cepas STEC LEE-negativas-----	95
6. CONCLUSIONES -----	100
7. PERSPECTIVAS A FUTURO-----	102
8. BIBLIOGRAFIA -----	103

LISTA DE ABREVIATURAS

A/E	Adherencia y destrucción de microvellosidades (<i>attaching and effacing</i>).
ADN	Ácido desoxirribonucleico.
Amp	Ampicilina.
APEC	<i>Escherichia coli</i> patógena de aves (<i>avian pathogenic E. coli</i>).
ARN	Ácido ribonucleico.
ATS	Agar tripticasa de soja.
CDT	Toxina distensora citoletal (<i>cytolethal distending toxin</i>).
CH	Colitis hemorrágica.
CHO	Células de ovario de hamster Chino (<i>Chinese hamster ovary</i>).
Cm	Cloranfenicol.
CTS	Caldo tripticasa de soja.
CDC	Centro para la Prevención y el Control de Enfermedades (<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>).
D	Diarrea.
DAEC	<i>Escherichia coli</i> de adherencia difusa (<i>diffuse-adherent E. coli</i>).
DEC	<i>Escherichia coli</i> diarreigénicos (<i>diarrheagenic E. coli</i>).
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco (<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>).
dNTP	Desoxinucleótido trifosfato.
DO	Densidad óptica.
DS	Diarrea sanguinolenta.
EAEC	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativo (<i>enteroaggregative E. coli</i>).
EAST	Toxina estable al calor de <i>E. coli</i> enteroagregativo (<i>enteroaggregative E. coli heat-stable toxin</i>).
EDTA	Ácido etilen-diamino-tetra-acético (<i>ethylene diamine tetra acetic acid</i>).
EE.UU.	Estados Unidos de Norteamérica.
Efa	Factor de <i>E. coli</i> enterohemorrágico para la adherencia-1 (<i>enterohemorrhagic E. coli factor for adherence</i>).
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágico (<i>enterohemorrhagic E. coli</i>).
EIEC	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasivo (<i>enteroinvasive E. coli</i>).

EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatógeno (<i>enteropathogenic E. coli</i>).
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigénico (<i>enterotoxigenic E. coli</i>).
Esp	Proteína de secreción de <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli secreted proteins</i>).
ExPEC	<i>Escherichia coli</i> patógeno extraintestinal (<i>extraintestinal pathogenic E. coli</i>).
FAS	Tinción fluorescente de actina (<i>fluorescent actin staining</i>).
FDA	Administración de Alimentos y Drogas de EE.UU. (<i>U.S. Food and Drug Administration</i>).
Fur	Proteína reguladora de la captura de hierro (<i>ferric uptake regulator</i>).
Gb3	Receptor globotriaosilceramida.
Gm	Gentamicina.
H	Antígeno flagelar.
HNT	H-no tipificable.
HeLa	Células en cultivo de tejido provenientes de epitelio uterino.
H-NS	Proteína estructural de nucleóide parecida a histona (<i>histone-like nucleoid structuring protein</i>).
HEPES	4-(2-hidroxietil)piperazina-1-etanesulfónico.
IL	Interleuquina.
Iha	Adhesina homóloga a IrgA (<i>IrgA homologue adhesin</i>).
IVOC	Cultivo de órganos <i>in vitro</i> (<i>in vitro organ culture</i>).
K	Antígeno capsular.
Km	Kanamicina.
LB	Luria Bertani.
LEE	Locus de destrucción del enterocito (<i>locus for enterocyte effacement</i>).
Ler	Regulador codificado en LEE (<i>LEE-encoded regulator</i>).
Lpf	Fimbria polar larga (<i>long polar fimbriae</i>).
LPS	Lipopolisacárido.
MDBK	Células de riñón bovino (<i>Madin-Darby bovine kidney</i>).
MEM	Medio de Eagle modificado (<i>modified Eagle's medium</i>).
MOI	Multiplicidad de infección (<i>multiplicity of infection</i>).
MSHA	Hemaglutinación sensible a manosa (<i>mannose-sensitive hemagglutination</i>).

NM	No móvil.
NT	No tipificable.
O	Antígeno somático.
OMS	Organización Mundial de la Salud.
ONT	O-no tipificable.
OR	O-rugoso.
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida (<i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>).
PBS	Solución tamponada de fosfatos (<i>phosphate-buffered saline</i>).
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>polymerase chain reaction</i>).
PFGE	Electroforesis en campo pulsado (<i>pulsed-field gel electrophoresis</i>).
RC	Rojo Congo.
RF	Rojo de fenol.
RFLP	Fragmentos de restricción de largo polimórfico (<i>restriction fragment length polymorphism</i>).
RPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatógeno de conejos (<i>rabbit enteropathogenic E. coli</i>).
Saa	Adhesina autoaglutinante de STEC (<i>STEC autoagglutinating adhesin</i>).
SDS	Dodecil sulfato de sodio (<i>sodium dodecyl sulfate</i>).
SFB	Suero fetal bovino.
Sm	Estreptomina.
SPF	Libre de patógenos específicos (<i>specific pathogen free</i>).
SSTT	Sistema de secreción tipo III.
STEC	<i>Escherichia coli</i> productor de toxina Shiga (<i>Shiga toxin-producing E. coli</i>).
SUH	Síndrome urémico hemolítico.
Stx	Toxina Shiga (<i>Shiga toxin</i>).
TAE	Solución tamponada tris-acetato-EDTA.
Tir	Receptor translocado de intimina (<i>translocated intimin receptor</i>).
UFC	Unidad formadora de colonia.
VT	Verotoxinas (<i>Verotoxins</i>).
VTEC	<i>Escherichia coli</i> Verotoxigénico (<i>Verotoxigenic E. coli</i>).

v/v Volumen en volumen.
y col. y colaboradores.

Unidades de medida

°C Grados centígrados.
ca. Circa.
h Horas
kDa Kilodaltones.
kpb Kilopares de bases.
pb Pares de bases.
mg Miligramos.
µg Microgramos.
ng Nanogramos.
min Minutos.
ml Mililitros.
µl Microlitros.
mM Milimolar.
µM Micromolar.
rpm Revoluciones por minuto.
seg Segundos.
v Voltios.

RESUMEN

“Estudio de los factores de adherencia de cepas de *Escherichia coli* productoras de toxina Shiga aisladas de bovinos”

Escherichia coli productor de toxina Shiga (STEC) es un patógeno de transmisión alimentaria con un demostrado carácter zoonótico que representa un grave problema para la Salud Pública, ya que ocasiona brotes y es responsable de la ocurrencia del potencial fatal síndrome urémico hemolítico (SUH). En Argentina el SUH es endémico y constituye la primera causa de insuficiencia renal aguda en niños menores de 5 años. El principal reservorio de STEC es el ganado bovino sano a pesar que un número limitado de serotipos fueron asociados con diarrea en terneros. El serotipo de STEC mayormente asociado a enfermedad humana es O157:H7, pero existen más de 100 serotipos no-O157 capaces de causar enfermedad en el hombre. La carencia de secuencias génicas completas de cepas STEC no-O157 limitó el descubrimiento científico sobre las diferencias de las bases genéticas respecto a la virulencia. Con el objetivo de dilucidar posibles mecanismos de patogenia de este grupo bacteriano heterogéneo, se determinó mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) la prevalencia de seis genes que codifican posibles adhesinas y tres toxinas en una colección de 200 cepas STEC no-O157 LEE-negativas aisladas de reservorio animal y de infecciones humanas, siendo *lpfA*_{O113} el gen identificado como más prevalente (99,5%). Además se demostró que las cepas STEC LEE-negativas bovinas poseen genes que codifican para adhesinas putativas y toxinas presentes en las cepas STEC LEE-negativas aisladas de casos de infección humana. Sin embargo, en el subgrupo de cepas estudiadas y bajo las condiciones ensayadas en el presente trabajo, Lpf2 no resultó ser la principal adhesina que participa en los mecanismos de pegado o interacción a células epiteliales *in vitro*.

Palabras claves:

STEC LEE-negativas, factores de virulencia, adhesinas, patogénesis, adherencia.

SUMMARY

‘Study of the adherence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle’

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) are zoonotic foodborne pathogens that are a serious public health concern because they cause outbreaks and the potentially fatal hemolytic uremic syndrome (HUS). In Argentina the HUS is endemic, and is the leading cause of acute renal failure among children. The main reservoir of STEC is healthy cattle while a limited number of serotypes have been associated with diarrhea in calves. The most common STEC serotype associated with human disease is O157:H7, but there is a growing recognition of over 100 non-O157 serotypes that also may result in human illness. The scarceness of whole genome sequence data for non-O157 STEC has limited the scientific discovery into the genetic basis of these differences in virulence. With the aim to elucidate possible mechanisms of pathogenesis of this heterogeneous bacterial group, the prevalence of six putative adhesin-encoding genes and three toxins were investigated in a 200-strain collection of LEE-negative non-O157 STEC strains isolated from cattle and human infections, being *lpfA*_{O113} the most prevalent virulence gene identified (99,5%). It was also showed that bovine LEE-negative STEC strains possess genes encoding for putative adhesins and toxins present in human LEE-negative STEC strains. However, in the subgroup of strains studied and under the conditions tested, Lpf2 not proved to be the main adhesin involved in the mechanisms of adherence or interaction with epithelial cells in vitro.

Key words:

LEE-negative STEC, virulence factors, adhesins, pathogenesis, adherence.

1. INTRODUCCION

Escherichia coli (*E. coli*) es probablemente el organismo más estudiado en Microbiología. Desde su primera descripción (Escherich, 1885), se convirtió en el organismo modelo de muchas investigaciones microbiológicas, tanto que a menudo se olvida que su principal nicho ecológico es el tracto alimenticio del hombre y de la mayoría de los animales de sangre caliente.

La mayoría de las cepas de *E. coli* son comensales, pero algunas de ellas pueden causar enfermedad tanto en el hombre como en animales. Hasta el presente, se reconocen seis categorías asociadas a infecciones gastrointestinales (DEC, por sus siglas en inglés *diarrheagenic E. coli*), aparte de aquellas causantes de infecciones urinarias, septicemia y meningitis (ExPEC, *E. coli* extraintestinales).

Los patotipos asociados a infecciones gastrointestinales se clasifican según sus manifestaciones clínicas, patogenicidad, y características epidemiológicas en:

- *E. coli* enteropatógeno (EPEC, por su siglas en inglés *enteropathogenic E. coli*).
- *E. coli* enterotoxigénico (ETEC, por su siglas en inglés *enterotoxigenic E. coli*).
- *E. coli* productor de toxina Shiga (STEC, por su siglas en inglés *Shiga toxin-producing E. coli*).
- *E. coli* enteroinvasivo (EIEC, por su siglas en inglés *enteroinvasive E. coli*).
- *E. coli* enteroagregativo (EAEC, por su siglas en inglés *enteroaggregative E. coli*).
- *E. coli* de adherencia difusa (DAEC, por su siglas en inglés *diffuse-adherent E. coli*).

En el intestino humano, ETEC, EPEC y EAEC colonizan el intestino delgado, mientras que EIEC y STEC colonizan el intestino grueso. Debido al gran número de

cepas DAEC, la localización exacta para la colonización intestinal de esta categoría no fue definida (Williams y col., 2011).

Los aislamientos se diferencian serológicamente por los antígenos somáticos (O), flagelar (H) y capsular (K). Hasta el presente se identificaron 181 antígenos O y 53 antígenos H (Scheutz, comunicación personal). Los antígenos O definen un serogupo, y una combinación específica de antígenos O y H definen el serotipo de un aislamiento.

En este trabajo nos focalizaremos específicamente en el grupo bacteriano *E. coli* productor de toxina Shiga.

1.1.- *Escherichia coli* productor de toxina Shiga

Las cepas STEC se caracterizan por su habilidad de producir al menos un tipo de toxina que pertenece a una clase de potentes citotoxinas que tienen la capacidad de inhibir la síntesis proteica en células eucariotas. Estas toxinas fueron denominadas en un primer momento como Verotoxinas (VT, por sus siglas en inglés *Verotoxins*), por su efecto citotóxico en células Vero (Knowalchuk y col., 1977). Pocos años después, se observó que también producían un efecto citotóxico en células HeLa, el cual podía ser neutralizado por anticuerpos anti-toxina Shiga de *Shigella dysenteriae* tipo 1 (O'Brien y col., 1982), y se las denominó toxinas Shiga (Stx, por sus siglas en inglés *Shiga toxins*). Por lo tanto, la denominación de VTEC (por sus siglas en inglés *Verotoxigenic E. coli*) y STEC son equivalentes y definen a todas las cepas *E. coli* que producen una o más toxinas de la familia Stx (VT).

STEC fue descrito por primera vez por Knowalchuk en 1977 (Knowalchuk y col., 1977), quien informó que cepas *E. coli* de los serogrupos O18, O26, O111 y

O128 aisladas de niños y cerdos con diarrea producían una toxina extracelular con propiedades citotóxicas sobre células Vero. Pero la importancia de STEC como patógeno humano cobró notoriedad recién en 1982, cuando se produjeron dos brotes de diarrea sanguinolenta severa, denominada colitis hemorrágica (CH), en los estados de Michigan y Oregon (EE.UU.) causados por el consumo de hamburguesas, identificándose por primera vez el serotipo O157:H7 como patógeno humano (Riley y col., 1983).

El término *Escherichia coli* enterohemorrágico (EHEC, por sus siglas en inglés *enterohemorrhagic E. coli*) es utilizado frecuentemente para describir un sub-grupo de cepas STEC responsables de causar enfermedad severa en el hombre como CH y síndrome urémico hemolítico (SUH), del cual *E. coli* O157:H7 es la cepa prototipo. Además de expresar Stx, este grupo bacteriano posee factores de virulencia adicionales, como la isla de patogenicidad LEE (por sus siglas en inglés *Locus for Enterocyte Effacement*), que codifica para un sistema de secreción tipo III y proteínas efectoras homólogas a aquellas producidas por EPEC (Kaper y col., 2004). Sin embargo, existen cepas STEC LEE-negativas capaces de causar enfermedad severa, por lo tanto resulta adecuada la utilización de un término más general, como STEC, para referirse a todas las cepas de *E. coli* capaces de producir Stx.

Dentro del grupo de las STEC, *E. coli* O157:H7 es el serotipo aislado más frecuentemente y al que se le atribuye la ocurrencia de la mayoría de los grandes brotes como los registrados en la costa oeste de Estados Unidos en 1993 (Barret y col., 1994) y en Japón en 1996 (Watanabe y col., 1996). Pero existen otros serotipos STEC no-O157 que también pueden causar enfermedad y la ocurrencia de grandes brotes, como el descrito a comienzos de mayo de 2011 en Alemania y que se

extendió a 13 países miembro de la Unión Europea, Canadá y EE.UU., asociado a *E. coli* O104:H4, causando aproximadamente 3.500 casos de infección, incluyendo 810 casos de SUH y 39 muertes. La particularidad de este brote fue el predominio de mujeres adultas implicadas, complicaciones neurológicas severas y las características de la cepa involucrada, ya que la misma no fue una “típica” STEC virulenta, sino un patotipo híbrido no habitual que portaba la codificación mediada por fagos para Stx2 pero con una base genética de EAEC, al cual se lo denominó *E. coli* enteroagregativo productor de toxina Shiga (Bielaszewska y col., 2011).

Si bien la mayoría de los estudios están orientados a la detección de *E. coli* O157, en la actualidad han aumentado los esfuerzos para detectar los diferentes serotipos de STEC. A diferencia de lo que ocurre con O157:H7, que no fermenta sorbitol y no posee actividad β -glucuronidasa, los serotipos de STEC no-O157 no presentan marcadores fenotípicos diferenciales comparados con las *E. coli* comensales. Por lo tanto, para su identificación se requiere la aplicación de estrategias más complejas, como: serotipificación, adherencia a células HEp-2, ensayo de FAS (por sus siglas es inglés *fluorescent actin staining*), diferentes técnicas de biología molecular para amplificar genes que codifican factores de virulencia específicos, entre otras.

1.2.- Reservorios y vías de transmisión de STEC

A diferencia de lo que ocurre con las infecciones causadas por otras cepas de *E. coli* enteropatógeno, aquellas asociadas a STEC poseen un carácter zoonótico demostrado. Aunque la mayoría de los animales son portadores asintomáticos de STEC, se reportaron casos de diarrea en terneros, cerdos, perros y gatos (Abaas y

col., 1989; Hammermueller y col., 1995). Por ejemplo, la enfermedad de los edemas del cerdo es causada por una variante específica de STEC (Frydendahl, 2002; Zweifel y col., 2006).

Los rumiantes en general, y el ganado vacuno en particular, son los principales reservorios de STEC. Sin embargo, en diferentes estudios de investigación se demostró que pueden encontrarse cepas de STEC en el tracto gastrointestinal de animales domésticos como ovejas, cabras, búfalos, cerdos, perros y gatos (Beutin y col., 1993; Caprioli y col., 2005; Bentancor y col., 2007; Oliveira y col., 2007). También pueden encontrarse cepas de STEC en animales de vida silvestre (Leotta y col., 2006).

En distintos países, entre los que se incluye a la Argentina, se realizaron numerosos estudios sobre la prevalencia de STEC que permitieron confirmar el rol del ganado vacuno como principal reservorio, aunque resulta difícil realizar comparaciones entre dichos estudios por las diferencias en las metodologías utilizadas y el muestreo (Ørskov y col., 1987; Wells y col., 1991; Beutin y col., 1993; Chapman y col., 1993; Cimolai y col., 1994; Parma y col., 2000; Meichtri y col., 2004; Masana y col., 2010; Masana y col., 2011).

Tanto el ganado de carne como el ganado lechero es portador de STEC. En un estudio realizado en nueve plantas de faena de la Argentina, se obtuvo una prevalencia de STEC O157 de 4,1% en muestras de materia fecal y de 2,6% en muestras de carcasa bovina, mientras que la prevalencia de STEC no-O157 fue de 22,3% y 9%, respectivamente (Masana y col., 2010; Masana y col., 2011). *E. coli* O157:H7 no es patógena para el ganado, con excepción de casos en neonatos bovinos (Dean-Nystrom y col., 1997), la colonización es transitoria, de menos de 2

meses de duración, y la portación fecal es más frecuente en el ganado joven (2 a 24 meses) que en el ganado adulto, lo cual se debería a una mayor susceptibilidad a la colonización. Se ha propuesto que la utilización de granos para engordar rápidamente al ganado en sistemas de cría intensiva es un factor que favorece al patógeno. Sin embargo, la evidencia científica sobre la controversia entre la alimentación con granos o pastos no es concluyente (Hovde y col., 1999).

La principal vía de transmisión (Figura 1) de STEC son los alimentos contaminados, como por ejemplo, carne molida, productos cárnicos crudos o insuficientemente cocidos, hamburguesas, embutidos fermentados, morcilla, leche no pasteurizada ni hervida, yogur, quesos, papas, lechuga, brotes de soja y rábano, jugos de manzana no pasteurizados, y agua, entre otros (Kaper y col., 2004; Caprioli y col., 2005).

La contaminación de los alimentos se debe principalmente al contacto con las heces de los animales. El consumo de carne molida o hamburguesas mal cocidas es la principal causa de infección por STEC. 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. En la Argentina, se detectó un 8,4% de STEC no-O157 en hamburguesas congeladas (Gómez y col., 2002); un 6,8% de STEC O157:H7 en hamburguesas crudas y cocidas (Chinen y col., 2009); y un 13,2% de STEC en productos cárnicos a nivel de boca de expendio (Jure y col., 2010).

STEC es resistente a los ácidos y puede sobrevivir en alimentos fermentados y vegetales frescos. En estos últimos, la contaminación se debe a la fertilización de los cultivos con materia fecal animal utilizada como abono, o posiblemente también

durante la cosecha o procesamiento de los mismos, ya que se observó la presencia de los microorganismos en el interior del producto.

Otras formas de transmisión (Figura 1) incluyen la contaminación cruzada durante la preparación de los alimentos, el contacto directo del hombre con los animales, y persona a persona por la ruta fecal-oral. Es importante destacar que la dosis infectiva capaz de ocasionar enfermedad por parte de este grupo bacteriano es menor a 100 bacterias.

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 una temperatura interna de 63°C, constituye un punto crítico de control para asegurar la inactivación de *E. coli* O157:H7. Sin embargo, la Administración de Alimentos y Drogas (FDA, por sus siglas en inglés *Food and Drug Administration*) de EE.UU. recomendó incrementar la temperatura de cocción de las hamburguesas a 68,3°C después de un brote que abarcó cinco estados y afectó a más de 700 personas en ese país (Griffin y col., 1994).

La contaminación fecal del agua puede deberse a la descarga de materia fecal en aguas de recreación o agua de bebida sin tratamiento previo. En Argentina se aisló *E. coli* O157:H7 en el Río de La Plata, en áreas cercanas a las tomas de agua para consumo humano (López y col., 1998). Además, se analizaron 2 brotes de diarreas por STEC, asociados con aguas recreacionales (Miliwebsky y col., 2007). A pesar que *E. coli* O157:H7 es susceptible al agua clorada, cuando el

mantenimiento de las piscinas con desinfectantes es insuficiente, pueden llegar a ocurrir brotes debido a un ineficiente sistema de control.

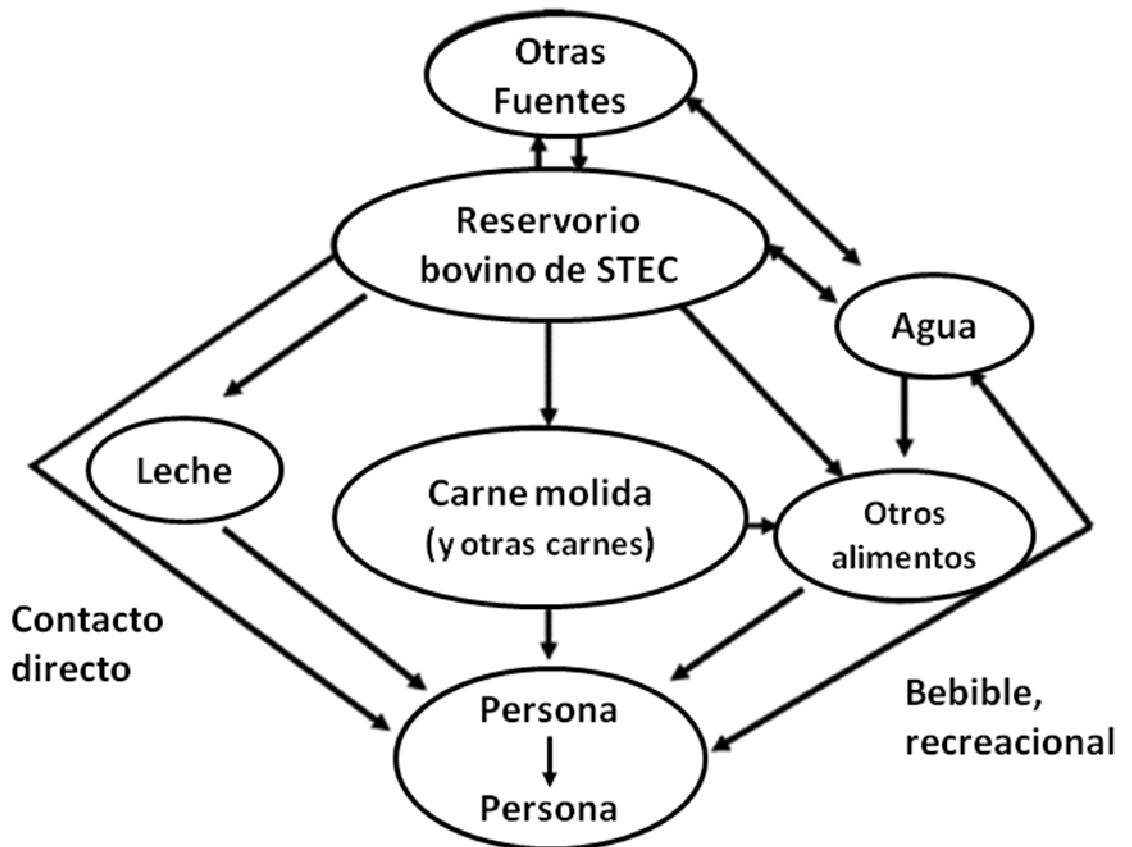


Figura 1. Vías de transmisión de STEC. La principal vía de transmisión de STEC la constituyen los alimentos contaminados. Otras formas de transmisión incluyen la contaminación cruzada durante la preparación de los alimentos, el contacto directo del hombre con los animales, y persona a persona por la ruta fecal-oral. Gyles (2007).

1.3.- Manifestaciones clínicas de la infección por STEC

La infección por STEC puede resultar en la portación asintomática del microorganismo; casos esporádicos o brotes de diarrea (D); CH o SUH, una complicación sistémica severa caracterizada por insuficiencia renal aguda, anemia

hemolítica microangiopática y trombocitopenia (Kaper y col., 2004). Los riñones constituyen el principal órgano afectado, pero también otros órganos como el páncreas, los pulmones, el corazón y el sistema nervioso central pueden resultar afectados.

La infección y desarrollo de la enfermedad puede ocurrir luego de la ingesta de una pequeña dosis bacteriana (tan baja como 50 unidades formadoras de colonias, UFC). El período de incubación promedio de la infección por STEC es de 3 días (con un rango de 1-8 días). Luego de ese período, un alto porcentaje de pacientes presenta diarrea acuosa y aproximadamente el 30% (80% en Argentina) evoluciona a diarrea sanguinolenta (DS) o CH en los días 5-6, presentando evidencia de edema de la mucosa colónica, dolores abdominales severos (frecuente en niños mayores), en algunos casos pueden presentarse vómitos e irritabilidad, pero no es frecuente la aparición de fiebre. 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. Aproximadamente la mitad de los pacientes con SUH requiere diálisis y el 75% requiere transfusión sanguínea (Rivas y col., 2011).

Entre los factores predictivos de evolución a SUH se incluyen: edades extremas (Cimolai y col., 1994; Buteau y col., 2000), leucocitosis (Bell y col., 1997; Buteau y col., 2000), tratamiento con agentes reductores de motilidad o antidiarreicos (Cimolai y col., 1994; Bell y col., 1997), fiebre (Bell y col., 1997), período prodrómico corto (Buteau y col., 2000), y en algunos casos diarrea sanguinolenta (Carter y col., 1987). El genotipo de la toxina de la cepa virulenta también influye en la evolución a SUH (Ostroff y col., 1989).

En algunos pacientes, los síntomas de SUH aparecen 6-8 días después del inicio de la diarrea e incluyen: anemia hemolítica microangiopática (hematocrito <30%), trombocitopenia (<150.000 plaquetas/mm³), e insuficiencia renal aguda (>1 mg/dl). En otros pacientes, puede observarse un período de silenciamiento entre la diarrea y la aparición de SUH; mientras que en otros pacientes el SUH aparece conjuntamente con el período de diarrea. En una proporción muy baja de casos de SUH no existe diarrea prodrómica (Tarr y col., 2005).

Esta enfermedad sindrómica puede presentar dos formas, una típica de etiología infecciosa, precedida por un período prodrómico con diarrea, generalmente sanguinolenta y de características endemoepidémicas (D+); y otra forma atípica (D-) desencadenada por varios factores, como drogas, transplantes de órganos, post parto, entre otros. STEC fue reconocido como agente causal de la forma infecciosa de SUH (Kaplan y col., 1990) y fueron Karmali y col. (1983) quienes reportaron la asociación entre SUH y cepas de STEC.

En los últimos años, el diagnóstico precoz de la enfermedad y el mejor manejo de la insuficiencia renal aguda y de la anemia disminuyó la letalidad durante el período agudo, siendo en la actualidad del 3 al 5%. Sin embargo, un 5% de niños con SUH desarrolla insuficiencia renal crónica, requiriendo en pocos años procedimientos dialíticos o trasplante renal. Otro 20% continúa con microhematuria y grados variables de proteinuria, pudiendo desarrollar insuficiencia renal crónica terminal en lapsos variables que pueden llegar a décadas (Spizzirri y col., 1997). Esta patología implica grandes costos económicos para los sistemas de salud, lo cual tiene un impacto importante en los países en desarrollo.

1.4.- Estrategias de la infección por STEC

A) Patogénesis

Al igual que con otras infecciones entéricas causadas por *E. coli*, el mecanismo de patogénesis consiste en la colonización del intestino y producción de daño al hospedador debido a la producción de toxina. Sin embargo, este es un mecanismo que involucra múltiples procesos y una compleja interacción entre factores bacterianos y del hospedador. Un resumen general de este proceso se puede observar en la Figura 2.

Durante la colonización, STEC sortea los mecanismos de defensa del hospedador para establecerse en el intestino. La acidez del tracto gastrointestinal constituye un importante mecanismo de defensa del hospedador, pero en general se puede decir que STEC es una bacteria ácido-resistente, permitiéndole la supervivencia al bajo pH del estómago (Large y col., 2005). La bacteria pasa a través del intestino delgado, donde se activan genes en respuesta a las señales ambientales.

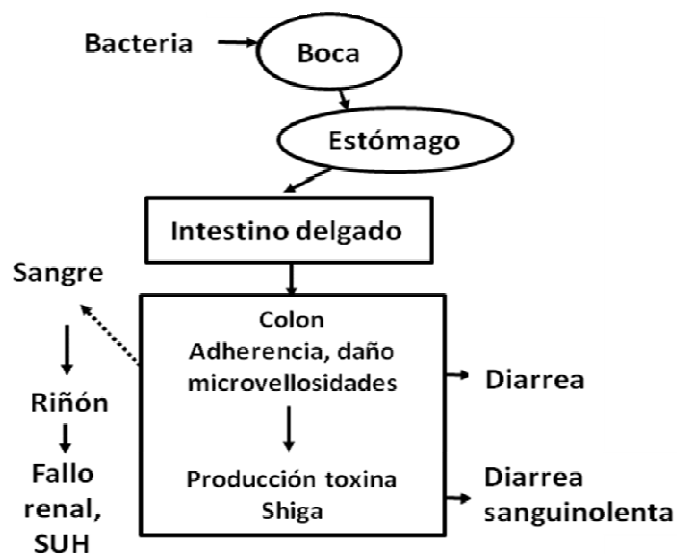


Figura 2. Visión general de la enfermedad en humanos producida por STEC. Gyles (2007).

La adherencia a células epiteliales intestinales es una de las características de la infección por STEC y ha sido ampliamente investigada utilizando líneas de cultivos celulares e *in vivo*. El patrón de adherencia e interacción con células epiteliales es notablemente diferente entre las cepas STEC LEE-positivas y LEE-negativas. En las cepas LEE-positivas, la adherencia inicial es mediada por la fimbria polar larga (Lpf, por sus siglas en inglés *Long polar fimbriae*; ver abajo sección sobre Lpf), seguida por la producción de una histopatología característica denominada lesión A/E (por sus siglas en inglés *attaching and effacing*), que involucra cambios estructurales en las células epiteliales y adherencia íntima de la bacteria al enterocito (Figura 3). Los cambios estructurales incluyen el barrido de las microvellosidades y la formación de pedestales, debido a la acumulación de filamentos de actina debajo de la membrana apical del enterocito. Los genes bacterianos requeridos para la formación de la lesión A/E se encuentran localizados en la isla de patogenicidad LEE, y están conservados en cepas EPEC y STEC capaces de inducir este tipo de lesión. Por el contrario, la adherencia de las cepas LEE-negativas no ha sido ampliamente investigada y sólo se realizaron trabajos puntuales para ciertos serotipos de STEC en los que no se observa la típica lesión A/E producida por las cepas LEE-positivas (Dytoc y col., 1994).

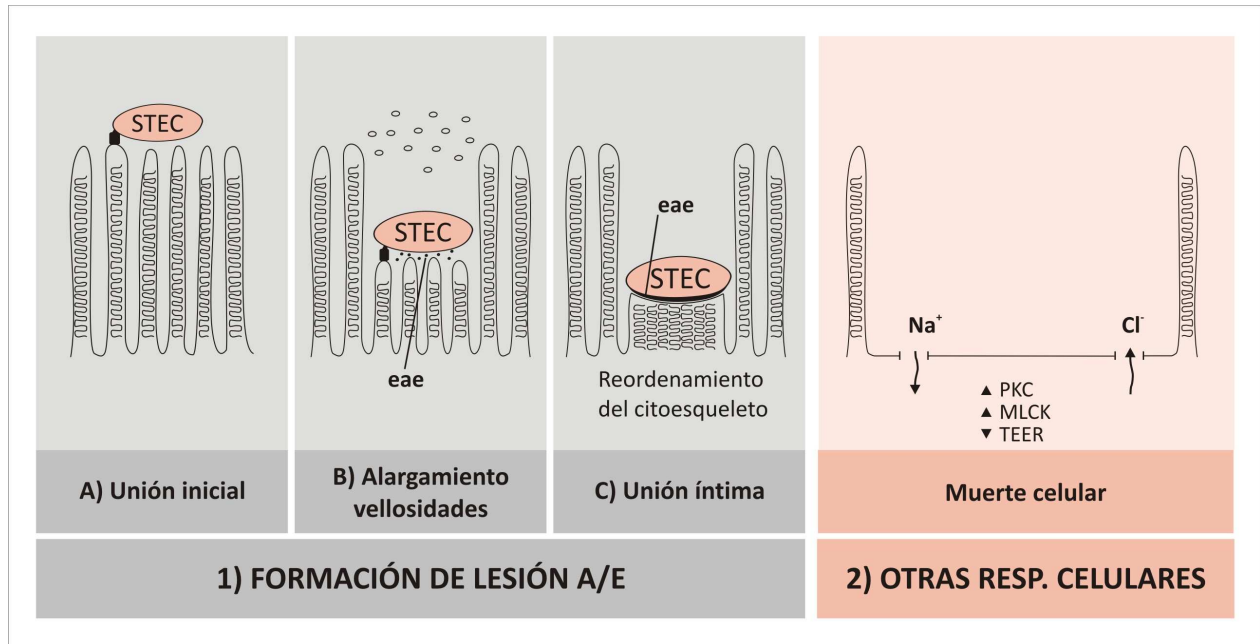


Figura 3. Representación gráfica de la colonización del epitelio intestinal por STEC₀₁₅₇. Pasos característicos de la lesión A/E y otras respuestas celulares. Adaptado de Knutton y col. (1987).

La producción de toxina Shiga constituye el factor crítico en las enfermedades causadas por STEC. Si se produce suficiente Stx, los resultados frecuentes son diarrea sanguinolenta, debido al daño localizado de los vasos sanguíneos del colon. En cambio, si entra suficiente Stx a la circulación, los sitios endoteliales ricos en el receptor específico globotriaosilceramida (Gb3) de la toxina van a resultar dañados.

La toxina Shiga liberada se une mediante la subunidad B a la célula epitelial del intestino por interacción con el receptor específico Gb3 que se encuentra en la membrana apical. La toxina es luego internalizada en una vesícula endocítica y transportada al aparato de Golgi, donde la subunidad A es escindida proteolíticamente liberando el fragmento A1, el cual actúa sobre la subunidad ribosomal 28S removiendo una adenina, lo que resulta en una inhibición irreversible de la síntesis proteica, provocando la muerte celular (Paton y Paton, 2006).

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 un daño en las células endoteliales de los vasos sanguíneos provocando diarrea sanguinolenta (Ray y Liu, 2001).

Stx entra a la circulación sanguínea y es transportada a distintos órganos blanco cuyas células endoteliales poseen el receptor Gb3. El lipopolisacárido (LPS) bacteriano y las citoquinas del huésped aumentan la sensibilidad a las Stx incrementando la disponibilidad de dichos receptores. En el riñón se encuentran altos niveles de Gb3, particularmente en la región cortical, donde se observan las principales lesiones en los pacientes con SUH. Las lesiones histopatológicas ocurren por interacción de la Stx con las células endoteliales de los vasos sanguíneos, éstas se hinchan y se desprenden a nivel del glomérulo. Simultáneamente, se produce un depósito de fibrina y de plaquetas en la microvasculatura renal, se oclucionan los capilares y se reduce el flujo sanguíneo, causando insuficiencia renal y ruptura de los glóbulos rojos. También se observan lesiones trombóticas, particularmente en la microvasculatura del intestino, cerebro y páncreas (Guth y col., 2011).

B) Factores de virulencia

Las toxinas Stx son consideradas el principal factor de virulencia de STEC, pero no las únicas responsables de la patogenicidad bacteriana completa. Tal es así, que se describieron factores de virulencia adicionales, incluyendo adhesinas, proteasas, sistemas de captura de hierro, LPS, flagelos y otras toxinas, que podrían contribuir en la patogénesis de las mismas (Guth y col., 2011).

La mayoría de los factores de virulencia/colonización se han descrito en aislamientos de *E. coli* O157:H7; sin embargo, es importante destacar el avance en el proceso de identificación y caracterización de factores de virulencia adicionales de cepas STEC no-O157.

B.1.- Toxina Shiga

Los miembros de la familia Stx poseen una estructura conservada de subunidades AB₅, codificadas por bacteriófagos insertos en el cromosoma bacteriano. La subunidad A (33 kDa) es la parte biológicamente activa y la subunidad pentamérica B (7,5 kDa cada monómero), es la responsable de la unión de la toxina al receptor celular específico Gb3 (O'Brien y Holmes, 1987).

Las Stx se pueden clasificar según sus secuencias aminoacídicas en dos grandes grupos, Stx1 y Stx2. Cada uno de estos grupos a su vez posee un creciente número de variantes. El grupo de las Stx1 está compuesto por los subtipos Stx1a, que es idéntica a Stx de *S. dysenteriae* tipo 1; Stx1c (Zhang y col., 2002); y Stx1d (Bürk y col., 2003). A pesar que Stx1 y Stx2 poseen el mismo mecanismo de acción, comparten sólo un 55% de similitud en la secuencia aminoacídica. El grupo de las Stx2 es más heterogéneo, y comprende a los subtipos Stx2a (O'Brien y col., 1984), Stx2b (Melton-Celsa y col., 1996; Pièrard y col., 1998), Stx2c (Schmitt y col., 1991), Stx2d (Kokai-Kun y col., 2000), Stx2e (Weinstein y col., 1988), Stx2f (Schmidt y col., 2000) y Stx2g (Leung y col., 2003). Las cepas STEC de origen humano, animal o de alimentos pueden producir variantes de Stx1 y Stx2, solas o combinadas. 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 *in vitro* e *in vivo*. Con lo que a esto respecta, se ha demostrado que Stx2 tiene una actividad

citotóxica de 100 a 1000 veces superior a Stx1 (Tesh y col., 1993). Más aún, las cepas productoras de Stx2a, Stx2c y Stx2d fueron asociadas con mayor frecuencia a casos de CH y SUH, cuando se compararon con otros subtipos de Stx1 y Stx2 (Schering y col., 2008). Por lo tanto, la caracterización de *stx* posee un importante valor predictivo de evolución a SUH en un paciente infectado por STEC (Friedrich y col., 2002).

B.2.- Otras toxinas

En la última década se descubrió un nuevo miembro de la familia de las toxinas CDT (por sus siglas en inglés *cytolethal distending toxin*), denominada CDT-V, en cepas STEC O157 y no-O157 asociadas a casos de SUH (Janka y col., 2003, Bielaszewska y col., 2004). Estudios de su posible función revelaron que la toxina daña el ADN eucariota, conduciendo a un arresto del ciclo celular en G2/M y posterior muerte celular (Bielaszewska y col., 2005). Estos datos demuestran que la proteína CDT-V daña directamente las células endoteliales y por lo tanto podría contribuir al desarrollo de SUH.

Un nuevo miembro de la familia de toxinas de tipo AB₅, denominada subtilasa, se descubrió por primera vez en una cepa STEC O113:H21 causante de un brote de SUH en Australia (Paton y col., 2004). Se realizaron numerosos estudios de prevalencia de los genes *subAB* en cepas STEC de un gran número de serotipos de diferentes países. Sin embargo, sólo se encontró en un subgrupo de cepas STEC LEE-negativas y en ciertos casos se puede ver asociada a *cdt-V* (Cergole-Novella y col., 2007; Galli y col., 2010a). Esta nueva toxina está compuesta por una subunidad A enzimáticamente activa, que es una serin-proteasa tipo subtilasa; y una subunidad B, que está relacionada a una posible proteína de exportación de *Yersinia pestis*. La

inyección intraperitoneal de SubAB en ratones causa una extensiva trombosis de la microvasculatura, y necrosis de los riñones, el hígado y el cerebro (Paton y col., 2004), semejantes a las lesiones observadas en los pacientes con SUH, y por lo tanto sugiriendo la contribución de esta toxina a la patogénesis de las cepas STEC.

La toxina estable al calor de *E. coli* enteroagregativo, EAST1 (por sus siglas en inglés *enteroaggregative E. coli heat-stable toxin 1*) se identificó por primera vez en una cepa EAEC aislada de un niño con diarrea en Chile (Savarino y col., 1991). Está codificada por el gen *astA*, que se lo puede encontrar de forma cromosomal y/o plasmídica, en una o más copias. EAST1 fue asociada con otros patotipos de *E. coli* además de EAEC, como STEC, ETEC, DAEC y EPEC; y también con *Salmonella*. Se aislaron cepas EAST1-positivas tanto de humanos como de animales sanos o enfermos (Veilleux y Dubreuil, 2005), sin embargo se vio asociada comúnmente con el ganado bovino y porcino.

B.3.- Factores de adherencia intestinal

Codificados dentro la región LEE

B.3.1.- Intimina como factor clave de colonización

Además de los genes *stx*, las cepas STEC más virulentas poseen el gen *eae*, que codifica para la proteína de membrana externa intimina. El gen *eae* se encuentra codificado en la isla de patogenicidad LEE, la cual contiene 41 genes organizados en 5 operones polisitrónicos denominados *LEE1*, *LEE2*, *LEE3*, *LEE4* y *LEE5* (Figura 4). Esta compleja isla de 35,6 kb se encuentra estrictamente regulada y contiene todos los genes necesarios para la formación de la lesión A/E (explicada anteriormente). Los operones *LEE1*, *LEE2* y *LEE3* codifican los genes de las proteínas del sistema de secreción tipo III (SSTT) que forman el complejo de aguja.

En el *LEE4* se codifican los genes de las proteínas que se secretan a través del SSTT, las cuales se conocen de forma colectiva con el nombre de Esp (del inglés, *E. coli secreted proteins*). En el operón *LEE5* se encuentran codificados los genes de las proteínas del sistema de adherencia propiamente dicho, la intimina y su receptor Tir (del inglés, *translocated intimin receptor*) (Castillo y col., 2005).

El aparato secretor consiste en una estructura molecular tipo aguja que comienza en el interior del citoplasma bacteriano, atraviesa las membranas interna y externa, y pasa a través de la membrana celular del hospedador. Las proteínas secretadas son transferidas desde el citoplasma bacteriano hasta la célula hospedadora a través de esta estructura, tal como ocurre con la proteína Tir, la cual es translocada por la bacteria a la célula hospedadora. Una vez allí, se inserta en la membrana plasmática exponiendo su región extracelular que funciona como receptor de la intimina (Kaper y col., 2004).

Aunque el papel esencial de la intimina y Tir es la unión íntima de la bacteria a los enterocitos y se haya reportado que cepas STEC O157:H7 mutantes para la intimina o Tir no sean capaces de colonizar el intestino en el modelo de infección de conejo (Ritchie y col., 2003), la presencia de la región LEE no sería esencial para la patogénesis, dado que un gran número de cepas STEC LEE-negativas son capaces de causar enfermedad severa y ocasionalmente brotes (Paton y col., 1999; Bielaszewska y col., 2011). Por lo tanto, en estas cepas otros factores de adherencia adicionales estarían involucrados en la patogénesis.

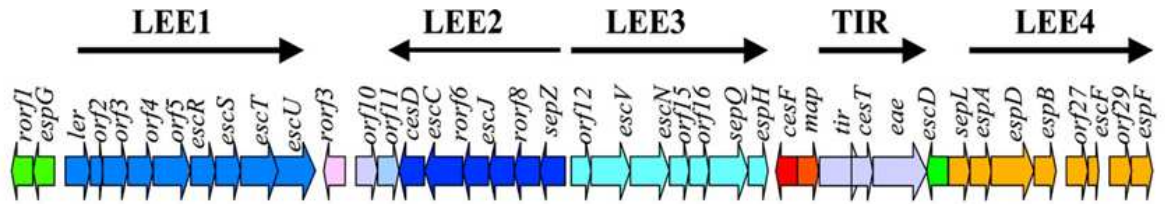


Figura 4. Organización de la isla de patogenicidad LEE. Castillo y col. (2005).

Codificados fuera de la región LEE

B.3.2.- Fimbria polar larga (Lpf)

A partir del análisis de secuencia del ácido desoxirribonucleico (ADN) de cepas O157:H7 se encontraron dos *locus* estrechamente relacionados con el operón Lpf de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (Baümmler y Heffron, 1995). El primero, denominado *lpf1*, se encuentra inserto entre las regiones intergénicas *yhjX-yhjW* (en relación al cromosoma de *E. coli* K-12) y está localizado en una isla de patogenicidad de O157 denominada OI-141, por lo cual en un comienzo recibió el nombre de *lpf*_{OI-154}. El mismo posee seis genes (*lpfABCC'DE*) similares en secuencia y orden a los de *Salmonella*, salvo que el gen *lpfC* se encuentra truncado (Torres y col., 2002). La expresión del operón *lpf1* en una cepa de *E. coli* no fimbriada (ORN172) reveló una adherencia aumentada *in vitro* (Torres y col., 2002). Además, mediante mutagénesis de la principal subunidad fimbrial, *lpfA1*, tanto en cepas O157:H7 *stx*-positivas como *stx*-negativas, se vió que exhibían una capacidad de adherencia reducida *in vitro* y el patrón de adherencia era difuso en vez de localizado (Torres y col., 2002; Torres y col., 2004). En un estudio reciente se demostró que las cepas STEC O157:H7 presentan una adherencia elevada *in vitro* cuando las líneas celulares son pre-incubadas con proteínas de matriz extracelular (Farfan y col., 2011). Además se observó una reducción en el pegado de las cepas

mediante mutación de la principal subunidad fimbrial de Lpf, utilizando anticuerpos específicos contra LpfA1, y mediante la adición de manosa (Farfan y col., 2011).

El segundo operón se denominó *lpf2*, se encuentra localizado en una isla específica de O157 denominada OI-154, por lo cual al comienzo se lo denominó *lpf_{OI-154}*, y se encuentra inserto entre la región intergénica *glmS-pstS* (Torres y col., 2004). A diferencia de *lpf1*, el locus *lpf2* contiene 5 genes (*lpfABCDD*), pero carece de un gen homólogo de *lpf1E* y en su lugar, *lpfD* está duplicado. Contrariamente de lo ocurrido con *lpf1*, la expresión del operón *lpf2* en una cepa de *E. coli* no fimbriada reveló una adherencia disminuída *in vitro*, con aparición de finas estructuras tipo fimbrias en la superficie de la bacteria, pero diferentes estructuralmente a aquellas observadas cuando se clonó *lpf1*. Sin embargo, la mutación de la principal subunidad fimbrial, *lpfA2*, resultó en una reducción en la adherencia inicial a células Caco-2, aunque la adherencia a células HeLa no se vió afectada (Torres y col., 2004).

En cepas no-O157 también se identificaron genes homólogos a *lpf*. Se encontró que una cepa de STEC O113:H21 exhibía una capacidad de adherencia reducida a células CHO-K1 mediante ensayos de mutagénesis al azar (Doughty y col., 2002). Cuando los investigadores analizaron la secuencia, demostraron que la cepa tenía un operón *lpf* compuesto de cuatro genes (*lpfABCD*), y con la misma localización de *lpf2* de STEC O157:H7 (*glmS-pstS*), por lo que se lo distinguió con el nombre de *lpf_{O113}* (Doughty y col., 2002). La expresión del operón *lpf_{O113}* en una cepa de *E. coli* no fimbriada (ORN103) reveló que las bacterias se adherían de forma localizada y al mutar la principal subunidad de la fimbria, *lpfA_{O113}*, se observó que las

cepas tenían menos capacidad de formar microcolonias, indicando que esta fimbria podría estar promoviendo las interacciones bacterianas (Doughty y col., 2002).

Para determinar el rol de Lpf en la patogénesis se realizaron diversos estudios en modelos animales de infección o *ex vivo*. En un estudio realizado por Jordan y col. (2004), se demostró que cepas O157:H7 con los genes *lpfA1* y *lpfA2* mutados eran recuperadas en menor proporción, y causaban menos lesión A/E que la cepa silvestre cuando eran inoculadas en ovejas y cerdos gnotobióticos (Jordan y col., 2004). En otro estudio realizado por Fitzhenry y col. (2006), se demostró mediante cultivo de órganos *in vitro* (IVOC, por sus siglas en inglés *in vitro organ culture*) que los operones *lpf* median el tropismo intestinal de STEC O157:H7, reteniendo la adherencia a los folículos asociados al epitelio y extendiéndose además al intestino delgado.

Estudios posteriores realizados por Torres y col. (2007a) determinaron la contribución de Lpf en la colonización, mediante la inoculación experimental de corderos de 6 semanas de vida con cepas de *E. coli* O157:H7 mutantes para *lpfA1*, *lpfA2*, y para ambos genes (*lpfA1* y *lpfA2*) (Torres y col., 2007a). A pesar que las cepas mutantes simple para *lpfA*, particularmente *lpfA1*, exhibieron una reducción en el número de bacterias recuperadas de la materia fecal de los corderos infectados, la doble mutante *lpfA1 lpfA2* tuvo efectos mucho más pronunciados (Torres y col., 2007a). Sin embargo, la infección con la cepa silvestre y las mutantes de *lpf* en el sistema IVOC de corderos, reveló que tanto la cepa silvestre como la doble mutante para *lpf* adherían preferentemente en el recto medio, pero también al duodeno, jejunio, ileon y el colon, indicando que la reducción en la persistencia no se debía a la falta de colonización del tracto gastrointestinal de los corderos (Torres y col., 2007a).

Como se mencionó anteriormente, al encontrarse operones *lpf* homólogos en otras cepas de *E. coli*, su rol en la patogénesis también fue investigado. Por ejemplo, las cepas *E. coli* enteropatógenas poseen un *locus lpf* homólogo al operón de *Salmonella*. El análisis de una cepa EPEC mutante en *lpf*, no reveló cambios en la adherencia a células HeLa o células de biopsia intestinal humana mediante el sistema IVOC, comparado con la cepa silvestre, sugiriendo que este operón no es necesario para la adherencia de EPEC y la formación de lesión A/E *in vitro* (Tatsuno y col., 2006). Las cepas de *E. coli* enteropatógenas de conejo (RPEC, por sus siglas en inglés *rabbit enteropathogenic E. coli*) poseen 2 *loci lpf*. El primero codifica para los genes *lpfABCDE* (*lpf_{R141}*), altamente homólogos a los genes *lpf1* de STEC O157:H7 (Newton y col., 2004). El segundo *locus* (*lpf_{R154}*), es idéntico a *lpf_{O113}* de STEC O113:H21. La mutación de los operones *lpf_{R141}* y *lpf_{R154}* no resultó en una adherencia disminuída a células en cultivo *in vitro*. Sin embargo, se produjo una significativa reducción en la severidad de la diarrea de los conejos (Newton y col., 2004).

La nomenclatura de *lpf* es compleja debido a las diferentes designaciones de los mismos operones por distintos grupos de investigación. Por ejemplo, el *locus lpf1* también fue denominado *lpf_{O157/O1-141}* (Toma y col., 2006), *lpf_{O26}* en cepas STEC O26:H11 (Bardiau y col., 2009), y *lpf_{R141}* en cepas REPEC (Newton y col., 2004). De igual manera, el *locus lpf2* fue denominado también como *lpf_{O157/O1-154}* (Toma y col., 2006), *lpf_{O113}* en cepas STEC O113:H21 (Doughty y col., 2002), *lpf_{R154}* en REPEC (Newton y col., 2004), y *stg* en APEC (*Avian Pathogenic E. coli*) (Lymberopoulos y col., 2006). Por lo tanto, con el fin de estandarizar la nomenclatura, en un estudio reciente se analizó la secuencia de ADN de distintos genes *lpfA1* y *lpfA2*, y se

identificaron algunos polimorfismos que permitieron clasificar la principal subunidad fimbrial en distintas variantes (Torres y col., 2009). Se describieron 5 tipos de *lpfA1* (denominadas *lpfA1-1*, *lpfA1-2*, *lpfA1-3*, *lpfA1-4* y *lpfA1-5*), y 3 tipos de *lpfA2* (identificadas como *lpfA2-1*, *lpfA2-2*, y *lpfA2-3*). Las distintas variantes de *lpfA1* y *lpfA2* se asociaron con variantes específicas del gen *eae* (Torres y col., 2009). Sin embargo, en otro estudio posterior con una colección de cepas STEC LEE-negativas, no se pudo establecer asociación de alguna variante de *lpfA* y gravedad de la enfermedad (Galli y col., 2010b).

Cabe aclarar que la nomenclatura *lpfA*_{O113} utilizada a lo largo del manuscrito se debe a que originalmente se llamaba de este modo, pero en realidad las cepas *lpfA*_{O113}-positivas pueden tener variantes diferentes de *lpfA2*.

B.3.3.- Factor de *E. coli* enterohemorrágico para la adherencia

Otra estrategia utilizada para la identificación de nuevos factores de adherencia es el análisis de aquellas cepas con una elevada capacidad de adherencia. En un estudio de mutagénesis mediada por transposones se identificó una cepa STEC O111:HNM con una elevada capacidad de adherencia a células CHO (*Chinese hamster ovary*), conduciendo a la identificación de un gen de 9.669 pb que codifica para una proteína de 365 kDa (Nicholls y col., 2000). Cuando se comparó la capacidad de adherencia de una cepa silvestre y aquella mutante para este gen, se observó una capacidad de adherencia reducida de la cepa mutante, pero el fenotipo de la lesión A/E permaneció siendo el mismo. A este gen se lo denominó factor de *E. coli* enterohemorrágico para la adherencia 1 (por sus siglas en inglés, *enterohemorrhagic E. coli factor for adherence 1* o *efa-1*), y se lo encontró en cepas EPEC y STEC no-O157 (Nicholls y col., 2000). En las cepas EPEC, se encontró que Efa-1 tenía un

97,4% de similitud con la proteína LifA (también denominada como linfoestatina), que inhibe la proliferación de linfocitos y la síntesis de citoquinas pro-inflamatorias como IL-2, IL-4, IL-5, e interferón gamma (Klapproth y col., 2000; Abu-Median y col., 2006). Las cepas *E. coli* O157:H7 poseen una versión truncada del gen cromosomal *efa-1*, y algunos estudios sugieren que la proteína Efa-1 truncada podría llegar a tener algunas propiedades tales como las observadas para la proteína de tamaño completo (Stevens y col., 2004).

Un gen homólogo a *efa-1/lifA* también existe en el plásmido pO157 y se lo denominó *toxB*. La proteína ToxB exhibe un 28% de similitud aminoacídica con la proteína Efa-1/LifA y contribuye a la adherencia a células epiteliales intestinales (Tatsuno y col., 2001). Sin embargo, en estudios de modelo animal, se demostró que ToxB no es esencial para la colonización intestinal de ovejas y terneros (Stevens y col., 2004), y ninguna actividad del tipo linfoestatina fue encontrada en cepas de *E. coli* O157:H7 (Abu-Median y col., 2006). Estudios recientes sugieren la presencia de un motivo o dominio que podría estar asociado a la adherencia celular, actividad de linfoestatina o inducción de efectores del sistema de secreción tipo III en cepas STEC (Deacon y col., 2010). Por lo tanto, la determinación de función de ciertos dominios de las proteínas Efa-1/LifA/ToxB, serán útiles para entender las posibles funciones de estas proteínas versátiles en la patogénesis de cepas STEC.

B.3.4.- Adhesina autoaglutinante de STEC

Si bien se determinó el fenotipo de adherencia de algunas cepas STEC LEE-negativas (Paton y col., 2001), poco se conoce sobre los mecanismos reales en cuestión. La capacidad de adherencia de una cepa STEC O113:H21 (98NK2), LEE-negativa, causante de un brote de SUH en Australia, exhibió una capacidad de

adherencia *in vitro* similar a cepas STEC LEE-positivas de referencia (Paton y col., 1999). Estudios posteriores sobre esa cepa determinaron la existencia de un megaplásmido que codifica para una proteína de 516 aa denominada Saa (por sus siglas en inglés *STEC autoagglutinating adhesin*), con un bajo porcentaje de similitud aminoacídica con la proteína YadA, una proteína extracelular plasmídica de *Yersinia enterocolitica*, implicada en adherencia a células epiteliales e invasión (Tamm y col., 1993); y Eib, una familia de proteínas de unión a inmunoglobulina de *E. coli*. La expresión de Saa en una cepa de *E. coli* (JM109) reveló una capacidad de adherencia aumentada a células HEp-2 respecto de la cepa silvestre y el patrón de adherencia resultó semi-localizado. La mutagénesis del gen *saa* en 98NK2, o la eliminación del megaplásmido a través de la técnica de curado, reflejó una reducción significativa en la capacidad de adherencia de la cepa. La proteína Saa producida por otras cepas STEC se diferencian en el tamaño (460 a 534 aa), como consecuencia de una variación en el número de repeticiones y/u otras inserciones o deleciones en el extremo 3' (Paton y col., 2001). También se sugirió que las cepas STEC con un menor número de repeticiones, poseen una menor capacidad de adherencia a células HEp-2 que las cepas con genes *saa* de mayor tamaño (Paton y col., 2001). El gen *saa* se encontró en una amplia gama de fuentes y variedad de serotipos de cepas STEC LEE-negativas (Jenkins y col., 2003; Toma y col., 2004; Galli y col., 2010a), y fue propuesto como la posible adhesina de este tipo de cepas. Sin embargo, en estudios posteriores se demostró que cepas mutantes en este gen no mostraban una reducción en la capacidad de adherencia cuando eran comparadas con las cepas silvestres correspondientes (Toma y col., 2008). Inclusive, se observó que cepas de STEC *saa*-positivas exhibían diferentes

propiedades de adherencia a células epiteliales que no podían atribuirse al número de repeticiones en el extremo C-terminal o a la expresión de Saa, sugiriendo que existen múltiples mecanismos de adherencia en las cepas *saa*-positivas (Toma y col., 2008).

B.3.5.- Adhesina homóloga a IrgA

Los mecanismos de adherencia de las cepas STEC sólo se encuentran parcialmente dilucidados. En la construcción de una biblioteca de ADN de *E. coli* O157:H7, se hallaron dos cósmidos que contenían un gen cromosomal que codificaba para una proteína similar a IrgA (por sus siglas en inglés *iron regulated gene A*) de *Vibrio cholerae* (Goldberg y col., 1992), y cuyo producto fue denominado Iha (por sus siglas en inglés *IrgA homologue adhesin*) (Tarr y col., 2000). La proteína Iha tiene un tamaño de 67 kDa en *E. coli* O157:H7 y de 78 kDa en cepas de *E. coli* de laboratorio. El gen *iha* fue encontrado en una amplia variedad de serotipos de cepas STEC e inclusive en cepas ExPEC, y se localiza adyacente al *loci* de resistencia a telurito.

La expresión de Iha en una cepa no fimbriada de *E. coli* reveló un patrón de adherencia difuso a células MDBK (por sus siglas en inglés *Madin-Darby bovine kidney*). Además, la mutación de *iha* en una cepa O157:H7 resultó en una reducción no significativa de la adherencia a células HeLa (Tarr y col., 2000). En un estudio posterior, se demostró la importancia de *iha* en la patogénesis de las infecciones urinarias, aunque se requieren más estudios que prueben la posible función de esta adhesina en cepas silvestres (Johnson y col., 2005).

B.3.6.- Fimbria de tipo 1

La capacidad de una cepa patógena para unirse a la mucosa intestinal del hospedador es un paso crítico en la patogénesis de muchas infecciones bacterianas. Sin embargo, esta característica también está presente en cepas comensales, ya que necesitan adherirse y colonizar nichos específicos. Tanto cepas comensales como patógenas tienen posibles adhesinas que podrían participar en el proceso de adherencia. El ejemplo más estudiado son las fimbrias de tipo 1, que se pueden encontrar en la mayoría de las bacterias gram negativas, incluyendo *E. coli*, *Salmonella* spp., *Klebsiella* spp. y *Vibrio cholerae*. Estas fimbrias fueron las primeras en ser identificadas por su capacidad de aglutinar eritrocitos. Sin embargo, esta aglutinación puede ser inhibida por la presencia de manosa, fenómeno que se denominó aglutinación manosa-sensible o MSHA (por sus siglas en inglés *mannose-sensitive hemagglutination*) (Edwards y Puente, 1998).

Las fimbrias de tipo 1 están codificadas por un *cluster* de genes *fim*, que incluyen al menos 9 genes requeridos para la biosíntesis, y están compuestas principalmente por FimA, la principal subunidad estructural. La función de adhesina manosa-sensible se la confiere una pequeña cantidad de la proteína FimH que se encuentra en la punta de la fimbria (Jones y col., 1995). La expresión de esta fimbria es variable dependiendo de la orientación de un elemento invertible de 314 pb localizado entre dos repeticiones invertidas de 9 pb (Abraham y col., 1985). Este elemento contiene el promotor que dirige la transcripción de los genes que codifican para las subunidades que componen la fimbria en una orientación (encendido), pero no en la otra (apagado) (Figura 5). Esta inversión es catalizada por dos recombinasas sitio-específicas, FimB y FimE, codificadas río arriba de este elemento

invertible. FimB puede catalizar la inversión en ambas direcciones, tanto de encendido como de apagado de la expresión de la fimbria, mientras que FimE sólo puede catalizar la inversión en una dirección (de encendido a apagado) (McClain y col., 1991; Gally y col., 1996). El análisis de la secuencia nucleotídica del elemento invertible de cepas de *E. coli* O157:H7 y O157:HNM, reveló que poseen un deleción de 16 pb que hace que el estado de orientación sea el de apagado. Estos resultados sugieren que la expresión de la fimbria de tipo 1 esté regulada de forma diferente en distintos patógenos que causan infección entérica (Iida y col., 2001).

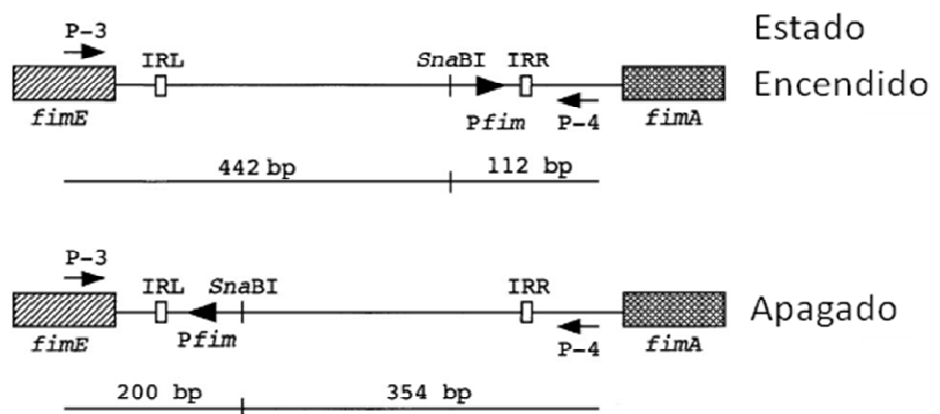


Figura 5. Orientación del elemento invertible que determina la variación de fase de la fimbria de tipo 1. Representación esquemática del promotor de *fim* mostrando los cebadores y sitios de restricción de *Sna*BI. La orientación puede determinarse por una PCR combinada con una restricción enzimática, ya que *Sna*BI corta simétricamente. IRL e IRR, repeticiones invertidas Izquierdas y derechas. Iida y col. (2001).

B.3.7.- Curli

Las bacterias entéricas como *E. coli* y *Salmonella* spp. expresan fimbrias de origen proteico denominadas curli, que están involucradas en la adherencia a superficies, contacto celular y formación de biopelículas (*biofilms*). Curli también media la

adherencia e invasión celular al hospedador y son potentes inductoras de la respuesta inflamatoria del hospedador. También se demostró que curli puede promover la adherencia a células vegetales (Barnhart y Chapman, 2006). Bioquímicamente y estructuralmente, pertenecen a una clase creciente de fibras conocidas como amiloides.

Las bacterias que expresan curli presentan una coloración rojiza cuando son crecidas en placas suplementadas con el colorante rojo Congo (RC), proveyendo un método fácil para identificar fenotípicamente la producción de curli (Collinson y col., 1993). Al menos 6 proteínas, codificadas por los operones *csgBA* y *csgDEFG*, están involucradas en la formación de curli. Se identificaron operones homólogos en *Salmonella* spp., denominados *agfBA* y *agfDEFG* (Collinson y col., 1996; Römling y col., 1998). El operón *csgBA* codifica la subunidad estructural principal, CsgA y la proteína nucleadora CsgB. En ausencia de CsgB curli no se ensambla y la subunidad principal, CsgA, se secreta de la célula en una forma no polimerizada (Barnhart y Chapman, 2006). Sin embargo, CsgA y CsgB no necesitan ser expresadas por la misma célula para que ocurra el ensamblado de curli, fenómeno denominado complementación interbacteriana. El operón *csgDEFG* codifica 4 proteínas accesorias requeridas para la formación de curli. La proteína CsgD actúa como regulador transcripcional positivo del operón *csgBA*. CsgG es una lipoproteína de membrana externa requerida para la estabilidad y secreción de CsgA y CsgB. Cepas mutantes en *csgG* se observan de color blancas en las placas indicadoras de RC y no se observan fimbrias por microscopía electrónica. CsgE y CsgF son proteínas periplásmicas que interactúa con CsgG. Las mutantes en *csgF* presentan un fenotipo similar a las mutantes en *csgB* porque secretan CsgA de forma no

polimerizada, presentando ambas una coloración rosada (Barnhart y Chapman, 2006).

La temperatura óptima de expresión de curli es por debajo de los 30°C. Sin embargo, se demostró que también se puede expresar a 37°C. Los medios limitados en nutrientes y sal estimulan la expresión de curli y se observó que la expresión máxima se produce durante la fase estacionaria de crecimiento. Sin embargo, también se demostró que la expresión es dependiente de la cepa y de las condiciones ambientales del hospedador (Barnhart y Chapman, 2006).

B.3.8.- Flagelos

El rol de los flagelos en la adherencia y colonización intestinal de las cepas STEC continúa siendo controversial. En un comienzo, se observó que anticuerpos específicos contra el antígeno H7 no inhibían significativamente la adherencia *in vitro* de STEC O157:H7. Sin embargo, en otro estudio, la delección del gen *fliC* de STEC O157:H7 causó una reducción significativa en la capacidad de adherencia de la cepa a células intestinales bovinas comparado con la cepa silvestre, sugiriendo que el flagelo H7 posee propiedades de adherencia (Erdem y col., 2007). Estudios adicionales, confirmaron que el flagelo H7 actúa como una adhesina sobre el epitelio intestinal bovino, admitiendo su participación en los primeros pasos de colonización del reservorio animal (Mahajan y col., 2009).

En ensayos *in vivo*, se demostró que el flagelo era necesario para la persistencia de una cepa de *E. coli* O157:H7 *stx*-negativa en el intestino de pollos SPF (por sus siglas en inglés *specific pathogen free*) (Best y col., 2005). Mientras que en estudios realizados en el modelo animal de ratón tratados con estreptomicina se observó que no existían diferencias a nivel de colonización intestinal en una cepa

STEC O113:H21 y su respectiva $\Delta fliC$, pero la cepa mutante era menos virulenta que la cepa silvestre (Rogers y col., 2006). Estudios posteriores revelaron que una mutación del gen $fliC_{H21}$ resultaba en una disminución significativa en la capacidad de invasión de la cepa STEC O113:H21, sugiriendo que FliC juega un rol importante en la infección de este grupo bacteriano, permitiéndole penetrar el epitelio intestinal (Luck y col., 2006). Sin embargo, el flagelo no debe cumplir un rol esencial en la patogénesis en humanos, ya que se encontraron cepas no móviles, como O157:HNM fermentadora de sorbitol, asociadas a casi el 40% de casos de SUH en Alemania (Karch y Bielaszewska, 2001).

1.5.- Situación actual del SUH en Argentina

En Argentina, el SUH es endémico y constituye la primera causa pediátrica de insuficiencia renal aguda y la segunda de insuficiencia renal crónica. Además, es responsable del 20% de los trasplantes renales en niños y adolescentes. Se producen alrededor de 500 casos nuevos por año con un importante subregistro, acumulándose más de 7.000 casos desde 1965 hasta el presente (Comité de Nefrología, 1995). Los niños afectados son menores de 5 años, fundamentalmente entre 6 y 36 meses, de ambos sexos y cualquier condición social (Rivas y col., 2011).

La enfermedad está distribuída en todo el país, pero la frecuencia es mayor en las provincias del centro y sur durante los meses cálidos, aunque se registran casos durante todo el año. La incidencia fue aumentando a través de los años, esto puede estar relacionado con el desconocimiento etiológico que imperó hasta hace pocos años, mientras que la letalidad disminuyó en los últimos años, debido al

diagnóstico precoz de la enfermedad, la instauración temprana de la diálisis en los casos de oliguria severa o anuria y al manejo de la anemia hemolítica. En estudios realizados para establecer la etiología del SUH en niños argentinos (López y col., 1989; Rivas y col., 2011), se encontraron evidencias acumulativas de infección por STEC en el 60% de los casos, siendo O157:H7 el serotipo más frecuente. *Shigella dysenteriae* tipo 1, también asociada a casos de SUH en otros países, no fue aislada en nuestro país asociada a esta enfermedad.

La tasa de hospitalización para el año 2009 fue de 12 casos por cada 100.000 niños menores de 5 años. Se notificaron 487 casos de los cuales el 58,5% correspondió al sexo femenino y una edad promedio de $37,0 \pm 49,5$ meses. La mayoría de los casos ocurrieron durante los meses cálidos, en los períodos de enero a abril y de noviembre a diciembre. La letalidad en la fase aguda fue del 2,9%. El Laboratorio de Referencia Nacional recibió muestras de 324 pacientes con diagnóstico de SUH, estableciéndose la infección por STEC en el 38,6% de los mismos, por uno o más de los tres criterios diagnósticos utilizados (Fuente: Servicio Fisiopatogenia, INEI-ANLIS “Dr. C. G. Malbrán”).

1.6.- Tratamiento

Hasta el presente, no existe una terapia específica para las infecciones por STEC. Si bien, *E. coli* O157 es susceptible a la mayoría de los agentes antimicrobianos utilizados comúnmente, aún no se confirmó que la antibioticoterapia aporte algún beneficio para el paciente. Por otra parte, algunos autores demostraron que dicho tratamiento puede precipitar la evolución a SUH. Por ejemplo trimetoprima-sulfametoxazol estimula la liberación de Stx *in vitro* (Wong y col., 2000). Es por ello

que se debe realizar una cuidadosa utilización de los antimicrobianos hasta que se demuestre la eficacia de los mismos mediante la realización de estudios de intervención controlados. Tampoco se deben usar agentes antidiarreicos, que disminuyen la motilidad intestinal, pues estudios retrospectivos señalan un riesgo aumentado de evolución a SUH.

El tratamiento comprende medidas terapéuticas destinadas a corregir las alteraciones hidroelectrolíticas, hematológicas, neurológicas o de hipertensión arterial durante el período agudo, y otras dirigidas a modificar la etiopatología de la enfermedad.

1.7.- Control de STEC en el ganado bovino

Como se mencionó anteriormente, el ganado bovino es considerado el principal reservorio y el origen de la infección por STEC para el hombre. Hasta el presente, las estrategias de intervención para evitar la contaminación de los productos cárnicos se centralizó en la playa de faena con la aplicación de prácticas que evitan la contaminación y proliferación de STEC. Actualmente, se considera que el control de STEC en el ganado bovino debe empezar dentro del establecimiento productor. Este podría ser uno de los puntos de intervención más importantes para disminuir la incidencia de infección en el hombre. Prebióticos, bacteriófagos, modificaciones en el manejo de los animales y nuevas formulaciones vacunales son algunas de las estrategias propuestas para el control de STEC en el ganado bovino (Mercado, 2006). La aplicación de estas estrategias puede contribuir a disminuir la incidencia de esta zoonosis.

2. OBJETIVOS

2.1.- Objetivo general

Estudiar las adhesinas y los factores de adherencia putativos de cepas STEC LEE-negativas aisladas de ganado bovino destinado a consumo humano, con el objetivo de dilucidar posibles mecanismos de patogenia de este grupo bacteriano heterogéneo. Para ello nos planteamos estudiar centralmente dos aspectos: uno referido a conocer la prevalencia de adhesinas en cepas STEC LEE-negativas aisladas de bovinos y compararlas con cepas STEC LEE-negativas aisladas de humanos con diagnóstico de enfermedad por STEC; y el otro, consiste en establecer la capacidad de adherencia *in vitro* de un subgrupo bacteriano y desarrollar las bases para una estrategia alternativa de prevención.

Consideramos que el conocimiento de las moléculas implicadas en la fisiopatogenia bacteriana constituye la base racional para el desarrollo de estrategias preventivas viables.

2.2.- Objetivos específicos

Enmarcado dentro del objetivo general podemos elaborar dos objetivos específicos centrales:

Objetivo A

Conocer la prevalencia de las adhesinas en cepas STEC LEE-negativas aisladas de bovinos y humanos con diagnóstico de infección por STEC.

A.1.- Caracterizar las cepas en estudio mediante técnicas fenotípicas, genotípicas y de subtipificación molecular.

- A.2.- Identificar los genes que codifican para las adhesinas y los factores de adherencia putativos presentes en las cepas en estudio.
- A.3.- Comparar el perfil de virulencia de las cepas en estudio y determinar las adhesinas más prevalentes entre las cepas de origen bovino y humano.

Objetivo B

Establecer la capacidad de adherencia *in vitro* de un subgrupo de cepas STEC LEE-negativas.

- B.1.- Seleccionar las cepas STEC con perfiles de adhesinas únicos, y determinar su capacidad de adherencia *in vitro*.
- B.2.- Obtener la cepa mutante negativa para la adhesina identificada como más prevalente.
- B.3.- Desafiar líneas celulares con la cepa silvestre y su respectiva mutante negativa.
- B.4.- Comparar los resultados obtenidos en el objetivo anterior.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1.- Cepas bacterianas y plásmidos

Se utilizaron 200 cepas pertenecientes a la colección del Servicio Fisiopatogenia del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas - ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán". Se estudiaron 153 cepas STEC no-O157, LEE-negativas, aisladas de materia fecal y carcasas bovinas durante los años 2005-2006, y 47 cepas STEC no-O157, LEE-negativas, aisladas de casos clínicos de infección humana durante los años 2001-2008 [SUH (n=19); D (n=17); DS (n=2); asintomáticos (n=9)]. El número de identificación, origen y características relevantes de las cepas bacterianas estudiadas se encuentran detalladas en el Anexo 1.

Los plásmidos utilizados en este estudio se encuentran listados en la Tabla 1.

Las cepas *E. coli* EDL933, O157:H7 (*iha*, *efa1*, *toxB*, *lpfA1-3*, *lpfA2-2*, *csgA*); 93-016, O113:H21 (*lpfA2-1* [*lpfA*_{O113}], *fimA*, *subAB*, *cdt-V*); E2348/69, O127:H6 (*ee*, *lpfA1-1*); H30, O26:H11 (*lpfA1-2*); 344/09, O103:H2 (*lpfA1-4*); 136/05, O145:HNM (*lpfA1-5*); 883/05, O143:HNM (*lpfA2-3*); 434-1, O2:H8 (*saa*); EIEC C481 (*astA*) y *E. coli* K12 (JM109, Promega, Madison, WI, EE.UU.); fueron utilizadas como controles positivos y negativo, repectivamente.

La cepa STEC EH41 (O113:H21), EH41 Δ *lpfA*_{O113} y el plásmido pWSK:*lpf* (para complementar la mutante de *lpfA*_{O113}), fueron proporcionados por la Dra. Elizabeth L. Hartland, Universidad de Melbourne, Australia.

Las cepas EHEC 86-24 (O157:H7), AGT210 (Δ *lpfA1/2*), SJL102 (Δ *csgA*); y los plásmidos pKD4 y pKM201 fueron proporcionados por el Dr. Alfredo G. Torres,

Universidad de Texas Medical Branch, EE.UU. Todas las cepas se mantuvieron a -80°C en CTS con 40% de glicerol.

Las cepas utilizadas fueron identificadas por pruebas bioquímicas (Ewing y Edwards, 1986) y seroagrupadas según su antígeno somático (O) y flagelar (H), con los antisueros, O1-O181 y H1-H56, preparados en el Instituto Adolfo Lutz de Brasil. Para la detección del antígeno O se utilizó la técnica de aglutinación en lámina con antisuero policlonal anti-O y para la detección del antígeno H se utilizó la técnica de aglutinación en tubo con antisuero anti-H (Ørskov y Ørskov, 1984). La capacidad de producción de toxina Shiga de las cepas STEC se determinó mediante ensayos de citotoxicidad específica en células Vero (Karmali y col., 1985).

Plásmidos	Características relevantes	Fuente/referencia
pKM201	Plásmido <i>helper red</i> , derivado pMAK700, Amp ^r , bajo número copia, origen de replicación sensible a la temperatura (crece a 30°C)	Hamilton y col., 1989
pWSK: <i>lpf</i>	Vector de clonación pWSK29, Amp ^r , bajo número copia, portando el operón <i>lpfABCD</i> _{O113}	Doughty y col., 2002
pKD4	Plásmido templado para la amplificación por PCR del <i>cassette</i> de kanamicina para la recombinación mediada por <i>lambda red</i> .	Datsenko y Wanner, 2000

Tabla 1. Plásmidos utilizados en este estudio.

3.2.- Medios y condiciones de crecimiento bacteriano

Todas las cepas fueron incubadas en atmósfera aerobia a 37°C en medio líquido o sólido, salvo cuando fuera indicada una restricción de temperatura. Los medios utilizados para el crecimiento bacteriano fueron caldo tripticasa de soja (CTS) o caldo Luria Bertani (LB). La formulación del caldo LB (pH 7,0) fue 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, y 10 g de NaCl por litro de medio (Sambrook y col., 1989). Se adicionaron 15 g de bacto-agar por litro de caldo LB para preparar LB-agar. La

formulación del CTS consistió en 30 g de tripticasa de soja por litro de medio (Becton Dickinson Co., Sparks, MD, EE.UU.). Se adicionaron 15 g de bacto-agar por litro de CTS para preparar agar tripticasa de soja (ATS). La triptona, el extracto de levadura, el NaCl y el bacto-agar fueron adquiridos de Fisher Scientific (Fair Lawn, NJ, EE.UU.).

El medio SOC (Sambrook y col., 1989) para electroporación se preparó con 20 g de triptona; 5 g de extracto de levadura; 0,5 g de NaCl; 0,186 g de KCl; 0,95 g de MgCl₂; 1,20 g de MgSO₄ y 3,6 g de glucosa por litro de medio.

Las placas indicadoras rojo Congo se prepararon a partir de LB-agar sin NaCl, 40 µg/ml de rojo Congo (MP Biomedicals Inc, Solon, OH, EE.UU.) y 20 µg/ml de azul brillante de Coomassie (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EE.UU.).

Cuando fue necesario, tanto los medios líquidos como sólidos fueron suplementados con los siguientes antibióticos o compuestos: 50 µg/ml de kanamicina (Km); 100 µg/ml de ampicilina (Amp); 100 µg/ml de estreptomina (Sm); 100 µg/ml de gentamicina (Gm); 0,5% de manosa (MP Biomedicals Inc., Solon, OH, EE.UU.); 10 mg/ml de levadura (Calsa, Lanús, Argentina). Los antibióticos fueron adquiridos de Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, EE.UU.).

3.3.- Líneas celulares y cultivo de células

Se utilizaron las siguientes líneas celulares: HEp-2 (carcinoma de laringe), clon CRL 2102 de Caco-2 (adenocarcinoma de colon), T84 (carcinoma de colon). Todas las líneas celulares fueron incubadas a 37°C en presencia de 5% CO₂.

La línea celular HEp-2 fue mantenida en medio de Eagle modificado (MEM, por sus siglas en inglés *modified Eagle's medium*) (Gibco, Carlsbad, CA, EE.UU.),

conteniendo 10% de suero fetal bovino (SFB) (Gibco, Carlsbad, CA, EE.UU.), 2 mM de L-glutamina, 10 mg/l de rojo de fenol (RF) y 1% de una mezcla de antibióticos-antimicóticos (100 U penicilina base; 100 µg Sm base; 0,25 µg/ml anfotericina B) (Gibco, Carlsbad, CA, EE.UU.). La línea intestinal CRL 2102 fue mantenida de forma indiferenciada en medio MEM (Gibco), conteniendo 20% de SFB (Gibco), 2 mM de L-glutamina, 10 mg/L de RF y 1% de una mezcla de antibióticos/antimicóticos (Gibco). La línea intestinal T84 fue mantenida en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, por sus siglas en inglés *Dulbecco's modified Eagle's medium*), más una mezcla de nutrientes de Ham F-12 (DMEM/F12 en una proporción 1:1) (Gibco, Carlsbad, CA, EE.UU.), conteniendo 10% de SFB (Gibco); 2,5 mM de L-glutamina; 15 mM de HEPES; 8,1 mg/L de RF y 1% de una mezcla de antibióticos/antimicóticos (Gibco).

3.4.- Caracterización genotípica

Se confirmó la portación del gen *stx* de las cepas productoras de toxina Shiga mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés *polymerase chain reaction*) múltiple, previamente validada por Leotta y col. (2005).

La subtipificación de los aislamientos se realizó por PCR, seguida de una restricción enzimática que genera fragmentos de largo polimórfico (PCR-RFLP, por sus siglas en inglés *restriction fragment length polymorphism*); y electroforesis en campo pulsado (PFGE, por sus siglas en inglés *pulsed-field gel electrophoresis*). Mediante PCR-RFLP se determinaron las variantes de *stx*₁ y *stx*₂ (Tyler y col., 1991; Pièrard y col., 1998; Zhang y col., 2002; Jelacic y col., 2003). El análisis de los

fragmentos de macrorestricción generados por PFGE se realizó utilizando el protocolo estandarizado por PulseNet para *E. coli* O157:H7 (Ribot y col., 2006).

La identificación de las adhesinas y factores de virulencia adicionales se realizó por PCR utilizando las concentraciones de los cebadores (Operon, Huntsville, AL, EE.UU.) y las condiciones de amplificación que se detallan en la Tabla 2. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 25 µl, conteniendo 1 µl de sobrenadante de lisado bacteriano (ver aislamiento de ADN total, sección 3.4.1); 20 mM Tris-HCl (pH 8,4); 50 mM KCl; 1,5-2 mM MgCl₂; desoxinucleótidos trifosfato (dNTP) 0,1 mM cada uno (Invitrogen, Brasil); y 1 U de *Taq* (*Thermus aquaticus*) ADN polimerasa recombinante (Invitrogen, Brasil). Para todas las reacciones de amplificación se utilizó un termociclador *My Cycler*TM *Thermal cycler* (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE.UU.).

Las condiciones individuales de algunas PCR se describen en las próximas secciones.

Nombre	Secuencia (5'-3')	Blanco(s)	Programa Amplificación	[μ M]	Tamaño Amplicón (pb)	Referencia
stx1a stx1b	GAAGAGTCCGTGGGATTACG AGCGATGCAGCTATTAATAA	<i>stx</i> ₁	94°C, 5 min (1 ciclo); 94°C, 30 seg, 58°C, 30 seg, 72°C, 30 seg (30 ciclos); 72°C, 2 min (1 ciclo)	2	130	Leotta y col., 2005
stx2a stx2b	TTAACCACACCCACCGGGCAGT GCTCTGGATGCATCTCTGGT	<i>stx</i> ₂	Idem <i>stx</i> ₁	0,4	346	Leotta y col., 2005
KS7 KS8	CCCGGATCCATGAAAAAACATTATTAATAGC CCCGAATTCAGCTATTCTGAGTCAACG	<i>stx</i> _{1a} , <i>stx</i> _{1c}	94°C, 5 min (1 ciclo); 94°C, 30 seg, 52°C, 1 min, 72°C, 40 seg (30 ciclos); 72°C, 2 min (1 ciclo)	0,6	282	Zhang y col., 2002
VT2v-a VT2v-b	CATTCAGAGTAAAAGTGGCC GGGTGCCTCCCGGTGAGTTC	<i>stx</i> _{2c(vh-a)} , <i>stx</i> _{2c(vh-b)} , <i>stx</i> _{2b-O118} , <i>stx</i> _{2b-OX3a}	94°C, 5 min (1 ciclo); 94°C, 30 seg, 55°C, 30 seg, 72°C, 30 seg (30 ciclos); 72°C, 2 min (1 ciclo)	0,4	385	Tyler y col., 1991
VT2v-c VT2v-d	AAGAAGATGTTTATGGCGGT CACGAATCAGGTTATGCCTC	<i>stx</i> _{2a} , <i>stx</i> _{2c(vh-a)} , <i>stx</i> _{2c(vh-b)}	94°C, 5 min (1 ciclo); 94°C, 30 seg, 55°C, 30 seg, 72°C, 30 seg (30 ciclos); 72°C, 2 min (1 ciclo)	0,6	285	Tyler y col., 1991
VT2v-e VT2v-f	AATACATTATGGGAAAAGTAATA TTAAACTGCACTTCAGCAAAT	<i>stx</i> _{2a} , <i>stx</i> _{2c(vh-a)} , <i>stx</i> _{2c(vh-b)} <i>stx</i> _{2b-O118} , <i>stx</i> _{2b-OX3a}	94°C, 5 min (1 ciclo); 94°C, 30 seg, 55°C, 30 seg, 72°C, 30 seg (30 ciclos); 72°C, 2 min (1 ciclo)	1	348	Pièrard y col., 1998
SLT-II-vc CKS2	ACCACTCTGCAACGTGTGCGC ACTGAATTGTGACACAGATTA	<i>stx</i> _{2d} , <i>stx</i> _{2d1(vh-a)} , <i>stx</i> _{2d2(vh-b)}	94°C, 5 min (1 ciclo); 94°C, 30 seg, 58°C, 90 seg, 72°C, 90 seg (30 ciclos); 72°C, 2 min (1 ciclo)	2	890	Jelacic y col., 2003
SK1 SK2	CCCGAATTCGGCACAAGCATAAGC CCCGGATCCGTCTCGCCAGTATTCG	<i>eae</i>	95°C, 5 min (1 ciclo); 95°C, 30 seg, 54°C, 1 min, 72°C, 2 min (30 ciclos); 72°C, 2 min (1 ciclo)	0,4	864	Karch y col., 1993
SAADF SAADR	CGTGATGAACAGGCTATTGC ATGGACATGCCTGTGGCAAC	<i>saa</i>	93°C, 5 min (1 ciclo); 93°C, 1 min, 55°C, 1 min, 72°C, 1 min (25 ciclos); 72°C, 2 min (1 ciclo)	0,5	119	Toma y col., 2004
iha-I iha-II	CAGTTCAGTTTCGCATTACCC GTATGGCTCTGATGCGATG	<i>iha</i>	Idem <i>saa</i>	0,5	1.305	Toma y col., 2004
toxB.911F toxB.1468R	ATACCTACCTGCTCTGGATTGA TTCTTACCTGATCTGATGCAGC	<i>tox</i> _B	Idem <i>saa</i>	0,5	602	Toma y col., 2004
88T14 88T9	GAGACTGCCAGAGAAAAG GGTATTGTTGCATGTTTCAG	<i>efa</i> ₁	Idem <i>saa</i>	0,2	479	Toma y col., 2004
lpfA-F lpfA-R	ATGAAGCGTAATATTATAG TTATTTCTTATATTTCGAC	<i>lpfA</i> _{O113}	94°C, 2 min (1 ciclo); 94°C, 1 min, 52°C, 50 seg, 72°C, 1 min (30 ciclos); 72°C, 2 min (1 ciclo)	4	573	Toma y col., 2004
LPFA1-AF LPFA1-AR	AGTTGGTGATAAATCACCAT GTGCTGGATTCCACTATTTCATCG	<i>lpfA</i> ₁₋₁	94°C, 5 min (1 ciclo); 94°C, 30 seg, 59°C, 30 seg, 72°C, 30 seg (35 ciclos); 72°C, 10 min (1 ciclo)	1	222	Torres y col., 2009
LPFA1-B1F LPFA1-B1R	AAGTCTGTATTTACTGCTATG GAAATACAGAACGGTCTGA	<i>lpfA</i> ₁₋₂	94°C, 5 min (1 ciclo); 94°C, 30 seg, 57°C, 30 seg, 72°C, 30 seg (35 ciclos); 72°C, 10 min (1 ciclo)	1	273	Torres y col., 2009

Nombre	Secuencia (5'-3')	Blanco(s)	Programa Amplificación	[μ M]	Tamaño Amplicón (pb)	Referencia
LPFA1-CF LPFA1-CR1	GGTTGGTGACAAATCCCCG CGTCTGGCCTTTACTCAGA	<i>lpfA1-3</i>	94°C, 5 min (1 ciclo); 94°C, 30 seg, 62°C , 30 seg, 72°C, 30 seg (35 ciclos); 72°C, 10 min (1 ciclo)	1	244	Torres y col., 2009
LPFA1-B2F LPFA1-B2R	AAGTCTGTGTTTACCACTACT AAAATACAGAACAGTCTGG	<i>lpfA1-4</i>	94°C, 5 min (1 ciclo); 94°C, 30 seg, 52°C , 30 seg, 72°C, 30 seg (35 ciclos); 72°C, 10 min (1 ciclo)	1	273	Torres y col., 2009
LPFA1-CF LPFA1-CR1	GGTTGGTGACAAATCCCCG GAGAACCGTCTGGCCTGTTT	<i>lpfA1-5</i>	94°C, 5 min (1 ciclo); 94°C, 30 seg, 60°C , 30 seg, 72°C, 30 seg (35 ciclos); 72°C, 10 min (1 ciclo)	1	250	Torres y col., 2009
LPFA2-B1F LPFA2-B1R	GGTAGTCTGGCGTCGCCACAGA AATACGAATACCAACGCCG	<i>lpfA2-1</i>	94°C, 5 min (1 ciclo); 94°C, 30 seg, 60°C , 30 seg, 72°C, 30 seg (35 ciclos); 72°C, 10 min (1 ciclo)	1	207	Torres y col., 2009
LPFA2-CF LPFA2-CR	CTACAGGCGGCTGATGGAACA GCTAATACCAGCGGCAGCATCGT	<i>lpfA2-2</i>	94°C, 5 min (1 ciclo); 94°C, 30 seg, 72°C , 30 seg, 72°C, 30 seg (35 ciclos); 72°C, 10 min (1 ciclo)	1	297	Torres y col., 2009
LPFA2-B2F LPFA2-B2R	GGTAGTCTGGCGTCACCACAGC AATACGAATACCGACACCC	<i>lpfA2-3</i>	94°C, 5 min (1 ciclo); 94°C, 30 seg, 52°C , 30 seg, 72°C, 30 seg (35 ciclos); 72°C, 10 min (1 ciclo)	1	207	Torres y col., 2009
east11a east11b	CCATCAACACAGTATATCCGA GGTCGCGAGTGACGGCTTTGT	<i>astA</i>	Idem <i>saa</i>	1	111	Yamamoto y col., 1996
csgA F csgA R	TGGTAACAGCGCCACTCTTG GACGGTGAATTAGATGCAGTC	<i>csgA</i>	94°C, 2 min (1 ciclo); 94°C, 1 min, 60°C , 1 min, 72°C, 1 min (30 ciclos); 72°C, 10 min (1 ciclo)	0,5	111	Lloyd y col., 2012
P3 P4	GTGCATCGAAATATTCGCCATACT AGTCGTTCTGTACACTTTGTTTTG	<i>fimA</i>	94°C, 5 min (1 ciclo); 94°C, 1 min, 60°C , 1 min, 72°C, 1 min (30 ciclos); 72°C, 5 min (1 ciclo)	0,6	554	lida y col., 2001
subHCD F subSCD R	TATGGCTTCCCTCATTGCC TATAGCTGTTGCTTCTGACG	<i>subAB</i>	95°C, 2 min (1 ciclo); 95°C, 1 min, 65°C , 2 min, 72°C, 1,5 min (10 ciclos); 95°C, 1 min, 60°C , 2 min, 72°C, 1,5 min (25 ciclos)	0,5	556	Paton y col., 2004
cdt-V F cdt-V R	TTCATTGTTGCGCTCCTG TTTATAAGCTGGTATCCTG	<i>cdt-V</i>	Idem <i>eae</i>	0,4	755	Cergole-Novella y col., 2007
hlyA1 hlyA4	GGTGCAGCAGAAAAAGTTGTAG TCTCGCCTGATAGTGTGGTA	<i>ehxA</i>	94°C, 5 min (1 ciclo); 94°C, 30 seg, 58°C , 90 seg, 72°C, 90 seg (30 ciclos); 72°C, 3 min (1 ciclo)	0,4	1.551	Schmidt y col., 1995

Tabla 2. Secuencias de los cebadores y condiciones de ciclado para las PCR realizadas en este trabajo. Las diferentes temperaturas de pegado de los cebadores se encuentran resaltadas

3.4.1.- Aislamiento de ADN total

Un mililitro de cada cultivo bacteriano crecido en CTS a 37°C durante 18 h se centrifugó durante 5 min a 12.000 rpm. El sedimento celular se resuspendió en 150 µl de *buffer* tritón X-100 al 1% en TE 1X [10 mM Tris-HCl (pH 8,0); 1 mM EDTA (pH 8,0)], se calentó a ebullición (100°C) durante 15 min, y se centrifugó a 12.000 rpm por 5 min. El ADN contenido en el sobrenadante se separó y almacenó a -20°C por un período máximo de 3 meses. Luego, 1 µl de ese sobrenadante se utilizó como ADN templado en las reacciones de PCR.

3.4.2.- Electroforesis y adquisición de imágenes

Se agregaron 5 µl de una solución de xilene cyanol 0,25% y glicerol 30% en agua, a 25 µl del ADN amplificado, sembrándose 10 µl en un gel de agarosa (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EE.UU.) al 2% en *buffer* TAE 1X [40 mM tris-acético; 1mM EDTA (pH 8,0)] y adicionado con 0,5 µg de bromuro de etidio/ml (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EE.UU.). La electroforesis se realizó a 80 v/cm durante 50 min utilizando una fuente de poder *PowerPac* (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE.UU.). Se utilizó el marcador de peso molecular *Cienmarker* (Biodynamics SRL, Argentina). Para documentar los geles se utilizó un transiluminador modelo 2000 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE.UU.) y el sistema Olympus C-5060, 5,1 MP (Olympus, Japón). El análisis de los geles se realizó con el programa DIGI Doc-It versión 2.4.0 (UVP, Upland, CA, EE.UU.).

3.5.- Ensayo de aglutinación de las fimbrias de tipo 1

Una colonia aislada fue utilizada para inocular 5 ml de caldo LB y cultivada durante 18 h a 37°C. Luego, ese cultivo se repicó 2 veces consecutivas en el mismo medio y

condiciones descritas anteriormente. El ensayo de aglutinación se realizó sobre una placa de vidrio mezclando 20 µl del cultivo bacteriano activado con igual volumen de una suspensión de levaduras en PBS 1X (10 mg/ml). La inhibición de la aglutinación, fue confirmada utilizando 3% de D-manosa (MP Biomedicals Inc.) en la suspensión de levadura.

3.5.1.- Determinación del estado de orientación de *fimA*

La orientación del elemento invertible del promotor de *fimA* fue determinado utilizando una PCR-RFLP. Este método se basa en la orientación dependiente de la localización de un sitio único de restricción de *SnaBI* que se encuentra en el fragmento de ADN amplificado. Para ello, se amplificó la región del promotor de *fimA* que permite determinar la orientación con los cebadores P3 y P4 (Tabla 2) generando un producto de 554 pb. Del producto de amplificación, 10 µl se digirieron con 4 U de la enzima *SnaBI* (Eco105I) (Fermentas). Los productos de digestión se resolvieron en un gel de agarosa (Sigma-Aldrich Co.) al 2%.

3.6.- Ensayo de expresión fenotípica de curli

El ensayo de unión a rojo Congo se realizó según el protocolo descrito por Jonas y col. (2007). Brevemente, los cultivos bacterianos se crecieron en caldo LB con agitación, a 37°C, durante 18 h. Luego, se diluyeron 1:1 en agua destilada estéril y se sembraron gotas de 6 µl aproximadamente en placas de rojo Congo. Las placas se incubaron a 30°C ó 37°C y se fotografiaron a las 24 h con una cámara Lumix DMC-TZ4 (Panasonic, Japón).

3.7.- Secuenciación nucleotídica

La secuencia de ADN del gen *lpfA* de la cepa 187/06(22) fue determinada mediante el método de terminación di-deoxi de Sanger, utilizando un secuenciador automático Hitachi 3500 *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.), los cebadores *lpfA-F*, *lpfA-R* (Tabla 2) y las condiciones que se detallan a continuación. Se realizaron dos mezclas de reacción de secuenciación madres, una para la hebra codificante y otra para la hebra no codificante. La mezcla de reacción se realizó en un volumen final de 10 μ l, conteniendo 7 ng/ μ l de ADN templado (producto de amplificación por PCR *lpfA*_{O113}), 1 μ M de cada cebador, 1 μ l de la mezcla *BigDye*TM *terminator* versión 3.1 2,5X (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.) y 2 μ l de *buffer* 5X (Applied Biosystems). Las condiciones de amplificación fueron 96°C por 1 min, seguido de 40 ciclos a 96°C por 10 seg, 50°C por 5 seg y 60°C por 2 min. La purificación de los productos de la reacción de secuenciación se realizó mediante precipitación con etanol. Las secuencias de ADN generadas se analizaron con el programa *Bioedit* versión 7.0.4.1 (Hall, 1999) y a través del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés *National Center for Biotechnology Information*) mediante la herramienta BLAST para acceder a la base de datos de secuencias genéticas.

3.8.- Adherencia bacteriana *in vitro*

3.8.1.- Ensayo cualitativo

Los ensayos cualitativos de adherencia bacteriana a células en cultivo *in vitro*, se realizaron siguiendo el protocolo descrito por Doughy y col. (2002), con algunas modificaciones. Se colocaron vidrios estériles de 12 mm de diámetro en placas de 24

pocillos (Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, Alemania ó Falcon™ BD, Franklin Lakes, NJ, EE.UU.), las cuales fueron posteriormente inoculadas con 10^5 células HEp-2 por pocillo e incubadas a 37°C, 5% CO₂, hasta alcanzar aproximadamente un 80% de confluencia. Las monocapas semiconfluentes se lavaron 3 veces con *buffer* fosfato salino (PBS, por sus siglas en inglés *phosphate-buffered saline*) (NaCl 8 g; KCl 0,2 g; Na₂HPO₄ 1,44 g; KH₂PO₄ 0,24 g; pH 7,4), se infectaron con ca. 10^7 bacterias de un cultivo crecido por 18 h (MOI 100), y se incubaron 90 min a 37°C, 5% CO₂ en presencia/ausencia de manosa al 1%. Pasado el período de incubación, las células fueron lavadas 3 veces con PBS 1X para remover las bacterias no adheridas o adheridas inespecíficamente, y se incubaron por 4 h más en las mismas condiciones descritas anteriormente. Transcurrido el segundo período de incubación, las células fueron lavadas 5 veces con PBS 1X y fijadas con metanol 70%. Una vez que estuvieron secas, se tiñeron durante 15 min con una solución de Giemsa (Merck, Darmstadt, Alemania) 1:10 en agua destilada. Los vidrios se montaron sobre portaobjetos y se observaron utilizando un microscopio óptico Nikon Eclipse E200 (Nikon Corp., Tokyo, Japón). Las imágenes fueron capturadas con el sistema Nikon Coolpix 4500, 4.0 MP 4X zoom (Nikon Corp., Tokyo, Japón).

3.8.2.- Ensayo cuantitativo

Los ensayos cuantitativos de adherencia bacteriana *in vitro* se realizaron como se describió anteriormente con algunas modificaciones. Las monocapas celulares semiconfluentes se lavaron inicialmente 3 veces con PBS 1X. Aproximadamente 10^5 células crecidas en placas de 24 pocillos (Falcon™ BD) fueron infectadas con ca. 10^7 bacterias (MOI 100) e incubadas por 3 h a 37°C, 5% CO₂, en presencia/ausencia de manosa al 0,5%. Pasado el período de incubación, las células fueron lavadas 2

veces con PBS 1X y se lisaron con 200 μ l de una solución 0,1% de tritón X-100/PBS durante 30 min o hasta observarse desprendimiento total de la monocapa celular. Seguido a la lisis, 20 μ l del homogenato se resuspendieron en 180 μ l de caldo LB y se cuantificaron mediante diluciones seriadas en base 10, las cuales fueron sembradas en placas de LB-agar con su respectivo antibiótico, utilizando la técnica de la gota descrita por Chen y col. (2003). El porcentaje de bacterias adherentes se calculó como el número de UFC/ml de bacterias recuperadas, dividido el número de UFC/ml inicial, multiplicado por 100 (promedio \pm desviación estándar). Los ensayos se repitieron 2 veces por cuadruplicado cada vez.

3.8.3.- Ensayo de competencia

Los ensayos de competencia *in vitro* se realizaron como se describió anteriormente (ver ensayo cuantitativo de adherencia). Las células Caco-2 (clon CRL2102) se infectaron con 5×10^6 bacterias silvestre y mutante, respectivamente (número total de bacterias/pocillo 10^7). El número de UFC/ml de las cepas silvestre y mutante fueron determinadas sembrando diluciones seriadas del homogenato en placas de LB-agar y LB-agar con el respectivo antibiótico para seleccionar la cepa mutante. El índice de competencia se calculó como el número de UFC/ml de bacterias mutantes recuperadas, dividido el número de UFC/ml de bacterias silvestres recuperadas; todo eso dividido el número de UFC/ml inicial de las bacterias mutantes, dividido el número de UFC/ml inicial de las bacterias silvestres.

3.9.- Invasión bacteriana *in vitro*

El ensayo cuantitativo de invasión bacteriana a células *in vitro* se realizó en las mismas condiciones descritas anteriormente para el ensayo cuantitativo de

adherencia pero por duplicado, ya que luego de las 3 h de incubación inicial un grupo de células se lisó y cuantificó para dar el número total de bacterias adherentes, mientras que para obtener el número de bacterias intracelulares, un segundo grupo de pocillos infectados fueron lavados 2 veces con PBS 1X y se incubaron con 100 µg/ml de Gm durante 2 h. Seguida esta incubación, las células se lavaron 2 veces con PBS 1X y se lisaron con 200 µl de una solución 0,1% de tritón X-100/PBS durante 30 min o hasta observarse desprendimiento total de la monocapa. Seguido a la lisis, 20 µl del homogenato se resuspendieron en 180 µl de caldo LB y se cuantificaron mediante diluciones seriadas en base 10. El total de bacterias intracelulares se expresó como el porcentaje del total de bacterias adherentes (promedio \pm desviación estándar). Los ensayos se realizaron 2 veces, por cuadruplicado cada vez.

3.10.- Análisis estadístico de los resultados de adherencia e invasión

Para el análisis estadístico, las diferencias significativas en los ensayos de adherencia e invasión fueron calculadas mediante la prueba estadística *t Student*, utilizando el programa *InStat* versión 3.05 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EE.UU.).

3.11.- Transformación de cepas bacterianas

3.11.1.- Aislamiento de ADN plasmídico

La extracción de ADN plasmídico se realizó utilizando el *kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega Corp, Madison, WI, EE.UU.), a partir de 10 ml de un cultivo bacteriano incubado durante 18 h. Se utilizaron los reactivos y

las condiciones descritas por el fabricante. Brevemente, se centrifugaron 10 ml del cultivo bacteriano. El sedimento celular se resuspendió en 250 µl de la solución de resuspensión celular [50 mM Tris-HCl (pH 7,5); 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNasa A]. Luego, se adicionaron 250 µl de la solución de lisis celular (0,2 M NaOH; 1% SDS) y se mezcló por inversión 4 veces. Se agregaron 10 µl de la solución de proteasa alcalina y se mezcló nuevamente por inversión 4 veces, se incubó 5 min a temperatura ambiente y se neutralizó con 350 µl de la solución de neutralización (4,09 M hidrocloreto de guanidinio; 0,759 M acetato de potasio; 2,12 M ácido acético glacial; pH 4,2) mezclándose nuevamente 4 veces por inversión. Seguido, se centrifugó por 10 min a velocidad máxima. El sobrenadante clarificado se transfirió a una columna y se centrifugó durante 1 min a máxima velocidad. Se realizaron 2 lavados, uno con 750 µl y el otro con 250 µl de la solución de lavado [60% etanol; 60 mM acetato de potasio; 8,3 mM Tris-HCl (pH 7,5); 0,04 mM EDTA] y el ADN se eluyó con 100 µl de agua libre de nucleasas. El ADN plasmídico se almacenó a -20°C hasta su uso.

3.11.2.- Preparación de bacterias electrocompetentes

Una colonia de la cepa 187/06(22) fue inoculada en 5 ml de caldo LB e incubada en agitación por 18 h a 37°C. El cultivo crecido durante toda la noche se diluyó 1:200 en 25 ml de caldo LB y se incubó en agitación a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica de 0,6 a 600 nm (DO_{600}). Una vez alcanzada la DO, el cultivo se enfrió en hielo durante 20 min y luego se centrifugó a 4°C y 4.000 rpm durante 6 min. El sedimento celular se resuspendió en 1 ml de agua destilada estéril fría. Se realizaron 2 lavados más con agua fría y 2 lavados con glicerol al 10% frío.

Una vez obtenidas las bacterias 187/06(22) transformadas con el plásmido pKM201, una colonia de la cepa 187/06(22) (pKM201) fue inoculada en 5 ml de caldo LB suplementado con 100 µg/ml Amp e incubada en agitación por 18 h a 30°C. El cultivo crecido durante toda la noche se diluyó 1:200 en 25 ml de caldo LB suplementado con 100 µg/ml Amp, y se incubó en agitación a 30°C hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0,6. Cuando el cultivo alcanzó aproximadamente 2×10^8 células, se enfrió en hielo durante 20 min y luego se centrifugó a 4°C y 4.000 rpm durante 6 min. El sedimento celular se resuspendió en 1 ml de agua destilada estéril fría. Se realizaron 2 lavados más con agua fría y 2 lavados con glicerol al 10% frío. Las bacterias electrocompetentes se utilizaron el mismo día en el que fueron preparadas.

3.11.3.- Electroporación

Para la transformación, se mezclaron 50 µl de bacterias electrocompetentes frescas, con 1, 2 ó 3 µl del producto de PCR (0,5-1 µg ADN) o ADN plasmídico (0,5 µg), en una cuveta de electroporación de 0,2 cm *Gene Pulser*[®]/*E. coli Pulser*[™] (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE.UU.). El equipo generador del pulso eléctrico *GenePulser* II (Bio-Rad Laboratories) fue calibrado en 25 µF capacitancia; 2,5 kV; y 200 Ω resistencia. Se aplicó un pulso, e inmediatamente se adicionó 1 ml de caldo SOC. Luego de la electroporación, la suspensión bacteriana fue recuperada a 37°C ó 30°C (según correspondiera la cepa) por 2 h y se sembraron alícuotas apropiadas en medio selectivo (LB-agar suplementado con el antibiótico apropiado). Las placas se incubaron durante 24-48 h.

3.12.- Construcción de una cepa mutante delecionada en *lpfA*₀₁₁₃

3.12.1.- Purificación de fragmentos de ADN

Los fragmentos de ADN se escindieron del gel de agarosa de bajo punto de fusión y se mezclaron con 3 volúmenes de *buffer* de solubilización L3 (isotiocianato de guanidinio). La agarosa se fundió a 50°C durante 15 min. El proceso de purificación se realizó por centrifugación, utilizando columnas de afinidad *PureLink™ Quick Gel Extraction Kit* (Invitrogen, Löhne, Alemania), los reactivos y las condiciones descritas por su fabricante.

3.12.2.- Construcción de la mutante *lpfA*

Para generar una mutante delecionada en *lpfA*₀₁₁₃ de la cepa 187/06(22), el gen *lpfA*₀₁₁₃ fue reemplazado con un gen de resistencia a Km utilizando el sistema de recombinación *lambda red* (Datsenko y Wanner, 2000). Se sintetizaron cebadores largos para introducir la mutación siendo: *lpfAKO-F* (5'-ATA AGT CGA TGA TTC ATG GTA AAG GAT ATA TTA TAT CAA TGT GTA GGC TGG AGC TGC TTC-3') y *lpfAKO-R* (5'-CTG GCC AAA GCC AAC TGA ATA AAA AGG CCC TTG ATA AAT TCA TAT GAA TAT CCT CCT TAG-3'). Cada cebador incluye 20 pb de secuencia homóloga al plásmido utilizado como ADN templado, pKD4, y 40 pb de secuencia homóloga a las regiones flanqueantes del gen *lpfA*₀₁₁₃. El gen de resistencia a Km se amplificó a partir del ADN plasmídico pKD4 por PCR, utilizando los cebadores descritos anteriormente. La mezcla de reacción se realizó en un volumen final de 50 µl, conteniendo 2 µl de ADN plasmídico como templado, 10 mM Tris-HCl (pH 8,8); 50 mM KCl; 0,8% Nonidet P40 (v/v); 0,75 mM MgCl₂; dNTP 0,1 mM cada uno (Invitrogen, Brasil); 0,05 µM de cada cebador; 1 U de *Taq* ADN polimerasa recombinante (Fermentas) y 0,1 U de Pfx ADN polimerasa (Invitrogen, Brasil). Las

condiciones de amplificación fueron 94°C por 5 min, seguido de 30 ciclos a 94°C por 1 min, 60°C por 1 min y 72°C por 2 min. La extensión final fue a 72°C por 10 min. El producto de PCR se corrió en un gel de agarosa al 2% y la banda de aproximadamente 1600 pb se escindió del gel y purificó como se describió anteriormente (ver purificación de fragmentos de ADN, sección 3.12.1). El producto de PCR purificado y previamente cuantificado utilizando el fluorómetro Qubit™ (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.), se electroporó en la cepa 187/06(22), la cual fue previamente transformada con el plásmido pKM201. Las colonias resistentes a Km fueron chequeadas por PCR para observar el reemplazo del gen *lpfA*_{O113} por el marcador de resistencia a este antibiótico. Las mutantes 187/06(22) Δ *lpfA*_{O113} fueron complementadas en trans gracias a la introducción del operón completo de *lpf*_{O113} a través del plásmido pWSK:*lpf*.

3.13.- Extracción de proteínas por calor

Las cepas bacterianas fueron crecidas en diferentes caldos: LB, LB sin hierro [dipiridil 200 μ M (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EE.UU.)], DMEM; DMEM sin hierro; y temperaturas (30°C y 37°C). Para la extracción de proteínas propiamente dicha, el cultivo bacteriano se estandarizó en una concentración de 4×10^9 ; se centrifugó a 3.000 xg por 10 min; se descartó el sobrenadante y el concentrado bacteriano se resuspendió en 160 μ l de PBS; el homogenato se calentó a 60°C durante 30 min y se centrifugó nuevamente a 3.000 xg por 10 min. Luego, el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo y se adicionaron 40 μ l de *buffer* de siembra 5X [60 mM Tris (pH 6,8); 2% SDS; 10% glicerol; 5% 2-mercaptoetanol; 0,01% azul de bromofenol]. Las proteínas se calentaron a 70°C durante 10 min

previo a ser colocadas en el gel para desnaturalizarlas y mantener reducidos los puentes disulfuro.

3.14.- Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante

Las proteínas extraídas por calor (15 μ l), fueron separadas en geles de poliacrilamida desnaturalizantes. El gel separador fue preparado con poliacrilamida al 10%, y el gel concentrador con poliacrilamida al 4%. La corrida electroforética se realizó a 150 v/cm durante 60 min (Bio-Rad Laboratories). Los geles fueron teñidos mediante tinción rápida con una solución de azul brillante de Coomassie (0,25% azul brillante de Coomassie; 40% metanol; 10% ácido acético glacial) durante 1 min a máxima potencia en microondas, y clarificados con una solución de desteñido (40% metanol, 10% ácido acético glacial) hasta observar el patrón electroforético de las proteínas. Se utilizó el marcador de peso molecular *Prestained Protein Marker, Broad Range* (New England BioLabs, MA, EE.UU.).

3.15.- Secuenciación proteica

Luego de realizar la corrida electroforética en gel de poliacrilamida desnaturalizante al 10%, 3 bandas de aproximadamente 17 kDa, 44 kDa y 60 kDa, fueron identificadas mediante espectrometría de masa utilizando un analizador 4800 MALDI TOF/TOF *Proteomics Analyzer* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.). Para ello, se limpiaron 3 tubos plásticos con metanol, se escindieron las bandas proteicas de interés del gel de poliacrilamida utilizando una hoja de afeitar estéril para cada banda y se colocaron en 200 μ l de agua estéril calidad biología molecular en cada uno de los tubos plásticos, para luego ser entregados al servicio de espectrometría de masa (*Mass Spectrometry Core Lab*, UTMB, Galveston, TX, EEUU).

4. RESULTADOS

4.1.- Caracterización fenotípica y genotípica de las cepas

Los serotipos, la fuente de aislamiento, los genotipos de la toxina Shiga y otros marcadores de virulencia de las cepas se muestran en la Tabla 3. Como criterio de inclusión elegido, todas las cepas fueron intimina-negativas y fermentaron el D-sorbitol (Anexo 1). Entre las cepas estudiadas, se identificaron 37 serotipos diferentes (O y H), que comprendieron 27 serogrupos O y 18 antígenos H. Sesenta y dos cepas fueron O no-tipificables (ONT) y 11 cepas O-rugoso (OR), 191 cepas fueron tipificables para el antígeno flagelar y 9 fueron no-móviles. Es importante señalar que 13 serotipos fueron comunes a cepas aisladas de ambos orígenes, sin embargo, algunos fueron especie específicos. Los serotipos comunes más prevalentes fueron: O113:H21 (12 cepas), O174:H21 (10 cepas), O130:H11 (9 cepas), O8:H19 (6 cepas), O15:H27 (4 cepas), O91:H21 (4 cepas) y O163:H19 (4 cepas).

Diferentes genotipos *stx* se observaron entre las cepas aisladas de ganado y las aisladas de humanos. Comparativamente, los genes *stx*₂, *stx*₁/*stx*₂ y *stx*₁ fueron detectados en el 64%; 26,8% y 9,2% de las cepas aisladas de ganado; y en el 83%; 10,6% y el 6,4% de las cepas de origen humano, respectivamente.

Por PFGE fue posible subtipificar 186 aislamientos (14 se lisaron), generando 143 patrones moleculares diferentes (Anexo 1), con un 63,90% de similitud, determinando así una gran variedad de cepas.

Serotipo	Origen		Genotipo <i>stx</i> (Nº cepas)	Nº cepas positivas para los genes								
	Bovino	Humano		<i>saa</i>	<i>ehxA</i>	<i>lpfA</i> _{O113}	<i>iha</i>	<i>astA</i>	<i>subAB</i>	<i>cdt-V</i>	<i>fimA</i>	
O2:H25	1		<i>stx</i> _{2d} (1)			1	1	1				1
O5:HNM		1 ^a	<i>stx</i> _{1a} (1)	1	1	1	1					1
O7:HNM	2		<i>stx</i> _{1a} (2)			2		2				
O7:H21	3		<i>stx</i> _{1a} / <i>stx</i> _{2a} (1), <i>stx</i> _{2a} (1), <i>stx</i> _{2c} (vh-a) (1)	2	2	3	3		2	2		3
O8:H16	3	1 ^b	<i>stx</i> _{1a} / <i>stx</i> _{2a} (2), <i>stx</i> _{2a} (1), <i>stx</i> _{1a} / <i>stx</i> _{2d} (1)	4	4	4	4		1			4
O8:H19	3	3 ^b	<i>stx</i> _{2d} (4), <i>stx</i> _{1a} / <i>stx</i> _{2a} (1), <i>stx</i> _{2d2} (1)	3	6	6	2		1	1		6
O15:H27	2	2 ^{b,c}	<i>stx</i> _{2d2} (3), <i>stx</i> _{1c} / <i>stx</i> _{2d2} (1)			4	4					4
O20:H19		1 ^b	<i>stx</i> _{2d2} (1)			1	1					1
O22:H8	2		<i>stx</i> _{2d2} (2)			2	2					2
O22:H16	3		<i>stx</i> _{2d1} (1), <i>stx</i> _{2d1} / <i>stx</i> _{2d2} (1), <i>stx</i> _{2b-OX3a} (1)			3	3					3
O39:H49	1		<i>stx</i> _{2a} (1)	1	1	1	1		1			1
O46:H38	2		<i>stx</i> _{1a} / <i>stx</i> _{2a} (2)	2	2	2	2					2
O58:H40		1 ^c	<i>stx</i> _{1a} (1)			1						1
O59:H19		4 ^b	<i>stx</i> _{2a} (4)			4	4					4
O74:H12	1		<i>stx</i> _{1a} (1)			1		1				
O74:H28	1		<i>stx</i> _{2d2} (1)	1	1	1	1		1			1
O74:H42	1		<i>stx</i> _{1a} / <i>stx</i> _{2d} / <i>stx</i> _{2d2} (1)	1	1	1	1					1
O79:H19	2		<i>stx</i> _{1a} / <i>stx</i> _{2d2} (2)	2	2	2	2		2			2
O79:H28	1		<i>stx</i> _{2d2} (1)	1	1	1	1					1

Serotipo	Origen		Genotipo <i>stx</i> (Nº cepas)	Nº cepas positivas para los genes								
	Bovino	Humano		<i>saa</i>	<i>ehxA</i>	<i>lpfA_{O113}</i>	<i>iha</i>	<i>astA</i>	<i>subAB</i>	<i>cdt-V</i>	<i>fimA</i>	
O82:H8	1		<i>stx_{1a}/stx_{2a}</i> (1)	1	1	1	1					1
O91:H16	1		<i>stx_{2d}</i> (1)		1	1						1
O91:H21	1	3 ^{a,c}	<i>stx_{1a}/stx_{2d}/stx_{2d2}</i> (1), <i>stx_{2a}</i> (1), <i>stx_{2d2}</i> (1), <i>stx_{2d}/stx_{2d2}</i> (1)	4	4	4	4		4	4	4	4
O113:H21	9	3 ^{b,c}	<i>stx_{2a}</i> (4), <i>stx_{2d}</i> (3), <i>stx_{1a}/stx_{2d}/stx_{2d2}</i> (2), <i>stx_{1a}/stx_{2d2}</i> (1) <i>stx_{2d}/stx_{2d2}</i> (1), <i>stx_{2d2}</i> (1)	11	11	12	12	2	11	6	12	12
O116:H21	5		<i>stx_{2d}</i> (2), <i>stx_{1a}/stx_{2d}</i> (2), <i>stx_{1a}/stx_{2d}/stx_{2d2}</i> (1)	5	5	5	5		5	3	5	5
O124:H19	1		<i>stx_{1a}/stx_{2a}</i> (1)	1	1	1						1
O130:H11	7	2 ^{c,d}	<i>stx_{1a}/stx_{2d2}</i> (4), <i>stx_{1a}</i> (3) <i>stx_{1a}/stx_{2d}</i> (1), <i>stx_{1a}/stx_{2a}</i> (1)	8	8	9	8		8		9	9
O136:H12	7		<i>stx_{1a}</i> (7)			7		7				
O141:H49	3		<i>stx_{2d}</i> (2), <i>stx_{2a}</i> (1)	3	3	3	3		1		3	3
O143:HNM		1 ^b	<i>stx_{2d}</i> (1)			1	1					1
O163:H19	3	1 ^c	<i>stx_{2a}</i> (2), <i>stx_{2d}</i> (2)	4	4	4	4		4	4	4	4
O171:H2		2 ^c	<i>stx_{2c(vh-a)}</i> (1), <i>stx_{2d2}</i> (1)			2	2					2
O174:H8		1 ^d	<i>stx_{2b-OX3a}</i> (1)			1						1
O174:H21	1	9 ^{b,c,d}	<i>stx_{2d2}</i> (10)	1	1	10	10	4				10
O174:H28	1	2 ^b	<i>stx_{2d}</i> (2), <i>stx_{1a}/stx_{2d}</i> (1)	3	3	3	3		3	1	3	3
O174:HNM		1 ^c	<i>stx_{1c}/stx_{2b-O118}</i> (1)	1	1	1	1					1
O178:H19	18		<i>stx_{1a}/stx_{2a}</i> (7), <i>stx_{1a}/stx_{2d}</i> (4), <i>stx_{2c(vh-a)}</i> (4), <i>stx_{2d2}</i> (2), <i>stx_{2d}/stx_{2d2}</i> (1)	12	12	18	18		5	3	18	18
O179:H8	3		<i>stx_{2d}</i> (3)	3	3	3	3		3		3	3
ONT:H2	21		<i>stx_{2c(vh-a)}</i> (6), <i>stx_{2d2}</i> (5), <i>stx_{2d1}/stx_{2d2}</i> (5), <i>stx_{2d}/stx_{2d1}</i> (2), <i>stx_{1a}</i> (1), <i>stx_{2d1}</i> (1), 2NT (1)			21	21					21

Serotipo	Origen		Genotipo <i>stx</i> (Nº cepas)	Nº cepas positivas para los genes								
	Bovino	Humano		<i>saa</i>	<i>ehxA</i>	<i>lpfA_{O113}</i>	<i>iha</i>	<i>astA</i>	<i>subAB</i>	<i>cdt-V</i>	<i>fimA</i>	
ONT:H4		2 ^b	<i>stx_{2a}</i> (2)			1	2	1				
ONT:H7	8	1 ^c	<i>stx_{2d2}</i> (7), <i>stx_{2d1}</i> (1), <i>stx_{1a}/stx_{2a}</i> (1)	1	1	9	7		1			9
ONT:H14	1		<i>stx_{2d2}</i> (1)			1	1					1
ONT:H19	7	1 ^d	<i>stx_{2d}/stx_{2d2}</i> (5), <i>stx_{2a}</i> (1), <i>stx_{2d2}</i> (1), <i>stx_{2c(vh-b)}</i> (1)	8	8	8	7		8			8
ONT:H21	6		<i>stx_{1a}/stx_{2a}</i> (3), <i>stx_{2d}</i> (2), <i>stx_{2d2}</i> (1)	5	6	6	5					6
ONT:H25	1		<i>stx_{2a}</i> (1)	1	1	1	1		1	1		1
ONT:H28	2		<i>stx_{2d}</i> (2)		2	2		1				2
ONT:H46	6	1 ^d	<i>stx_{2d}</i> (5), <i>stx_{2d2}</i> (1), <i>stx_{2d}/stx_{2d2}</i> (1)	7	7	7	6		7	1		7
ONT:H49		1 ^a	<i>stx_{1a}/stx_{2d}</i> (1)	1	1	1	1		1			1
ONT:HNM	1	3 ^{b,c}	<i>stx_{2a}</i> (3), <i>stx_{1a}</i> (1)			4	3	1				3
OR:H2	10		<i>stx_{2c(vh-a)}</i> (5), <i>stx_{2d1}</i> (1), <i>stx_{2d2}</i> (1), <i>stx_{1a}/stx_{2a}</i> (1), <i>stx_{2d1}/stx_{2d2}</i> (1), 2NT (1)	1	1	10	9					10
OR:H19	1		<i>stx_{1a}/stx_{2a}</i> (1)	1	1	1	1					1
Total	153	47		100	107	199	172	20	70	26		187
(% cepas)	(76,5)	(23,5)		(50,0)	(53,5)	(99,5)	(86,0)	(10,0)	(35,0)	(13,0)		(93,5)

Tabla 3. Serotipos, origen, genotipo de toxina Shiga y otros marcadores de virulencia de las cepas *E. coli* estudiadas.

^aDS. ^bSUH. ^cD. ^dAsintomáticos. OR:O-rugoso, HNM:no móvil, NT:no tipificable.

Los genotipos de toxina Shiga se encuentran denominados de acuerdo al consenso de nomenclatura del VTEC 2009.

stx_{1a} (antiguamente denominada *stx_{1only}*); *stx_{2a}* (antiguamente denominada *stx_{2only}*); *stx_{2c(vh-a)}* (antiguamente denominada *stx_{2vh-a}*); *stx_{2c(vh-b)}* (antiguamente denominada *stx_{2vh-b}*); *stx_{2b-O118}* (antiguamente denominada *stx_{2d-ount}*); *stx_{2b-OX3a}* (antiguamente denominada *stx_{2d-OX3a}*); *stx_{2d}* (*stx_{2only}* activable); *stx_{2d1}* (*stx_{2vh-a}* activable); *stx_{2d2}* (*stx_{2vh-b}* activable).

4.2.- Marcadores de virulencia

La distribución de los genes que codifican para las adhesinas putativas y factores de virulencia adicionales, se muestra en la Figura 6. Los genes más comunes, entre todas las cepas estudiadas, fueron los codificados por *lpfA*_{O113} (199/200; 99,5%) y *fimA* (187/200; 93,5%). Cabe destacar que la única cepa *lpfA*_{O113}-negativa fue aislada de un caso de SUH perteneciente al serotipo ONT:H4. La región promotora del gen *fimA* estuvo presente en 142/153 (92,8%) cepas bovinas y en 45/47 (95,7%) cepas humanas; mientras que el gen *iha* estuvo presente en 130/153 (85%) y en 42/47 (89,4%), respectivamente (Figura 6). De las 187 cepas *fimA*-positivas, 175 (93,6%) expresaron la fimbria de tipo 1 por el ensayo de aglutinación con levaduras, mientras que 12 no la expresaron a pesar de los sucesivos pasajes en caldo LB para estimular la expresión. También hubo una asociación entre el fenotipo y los productos obtenidos mediante PCR-RFLP para determinar el estado de orientación de *fimA*, ya que las cepas que daban aglutinación positiva poseían el patrón de restricción característico de *fimA* encendido, dando bandas de 442 pb y 112 pb. Las cepas *fimA*-negativas, aisladas de ambos orígenes, pertenecieron a los serotipos O136:H12 (7 cepas), O7:HNM (2 cepas), O74:H12 (1 cepa), y tres cepas fueron no tipificables. Las cepas *iha*-negativas pertenecieron a los serotipos O136:H12 (7 cepas), O8:H19 (4 cepas), O7:HNM (2 cepas), O58:H40, O74:H12, O91:H16, O124:H19, O130:H11, O174:H8 (una cepa de cada uno), y nueve cepas fueron no tipificables. Curiosamente, todas las cepas *fimA*-negativas también fueron *iha*-negativas, a excepción de las dos cepas del serotipo ONT: H4 (Tabla 3).

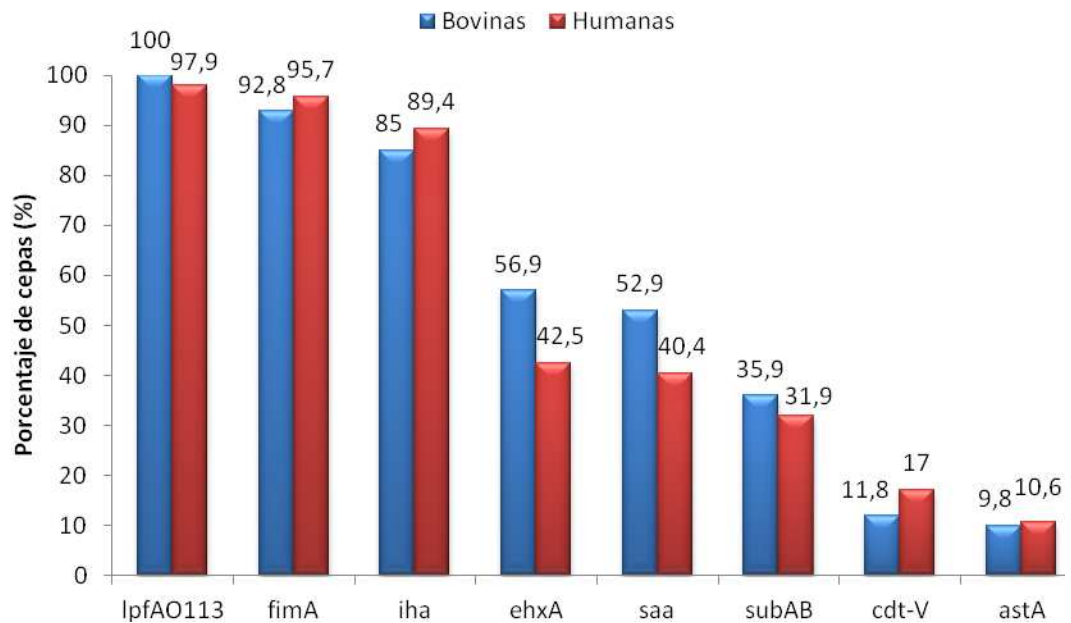


Figura 6. Distribución de los marcadores genéticos de virulencia en las cepas STEC de origen bovino y humano. Las cepas bovinas están respresentadas en color azul y las cepas humanas en color rojo.

El gen *ehxA* estuvo presente en 107 (53,5%) de las 200 cepas estudiadas, independientemente del origen. De las 107 cepas *ehxA*-positivas, 100 fueron también *saa*-positivas. El gen *ehxA* estuvo presente en 87/153 (56,9%) cepas de ganado y en 20/47 (42,5%) cepas STEC humanas. Además, el gen *saa* fue detectado en 81/153 (52,9%) y 19/47 (40,4%), respectivamente (Figura 6). Ninguna cepa *ehxA*-negativa fue positiva para el gen *saa*. Todas las cepas fueron *toxB* y *efa1*-negativas. Este hallazgo es coincidente con estudios previos que asocian con mayor frecuencia estos genes a cepas intimina-positivas (Toma y col., 2004; Cergole-Novella y col., 2007).

La presencia de secuencias génicas relacionadas con *subAB*, *cdt-V* y *astA*, se confirmó en 70/200 (35%), 26/200 (13%) y 20/200 (10%) de las cepas, respectivamente. No se observó diferencia estadísticamente significativa en la

frecuencia de *subAB*, *cdt-V* y *astA*, entre las cepas aisladas de ganado bovino y las cepas humanas. El gen *subAB* estuvo presente en 55/153 (35,9%) cepas bovinas y en 15/47 (31,9%) cepas humanas; *cdt-V* en 18/153 (11,8%) y en 8/47 (17%); y *astA* en 15/153 (9,8 %) y en 5/47 (10,6%), respectivamente (Figura 6). Las cepas *subAB*-positivas pertenecieron a varios serotipos, pero los más frecuentes fueron O113:H21 (10 cepas), O130:H11 (6 cepas), O116:H21 (5 cepas), O178:H19 (5 cepas) y O91:H21 (4 cepas). Los serotipos más frecuentes de las cepas *cdt-V*-positivas fueron O113:H21 (6 cepas), O91:H21 (4 cepas) y O163:H19 (4 cepas). Todas las cepas *cdt-V*-positivas fueron *subAB*-positivas, pero no todas las cepas *subAB*-positivas fueron *cdt-V*-positivas. Las cepas *astA*-positivas pertenecieron a los serotipos O136:H12 (7 cepas), O174:H21 (4 cepas), O7:HNM (2 cepas), O113:H21 (2 cepas), O2:H25 (1 cepa), O74:H12 (1 cepa), y 3 cepas fueron no tipificables (Tabla 3).

4.2.1.- Variantes de *lpfA*

Una vez finalizada la caracterización genotípica de los marcadores de virulencia de las 200 cepas estudiadas, Torres y col. (2009) identificaron algunos polimorfismos en la secuencia nucleotídica de los genes *lpfA1* y *lpfA2*, lo que le permitió clasificar la subunidad principal en distintas variantes.

Utilizando la clasificación experimental descrita por Torres y col. (2009), se encontró que de todas las cepas *lpfA*_{O113}-positivas, la variante *lpfA2-1* fue la más prevalente. Como se muestra en el Anexo 1 la variante *lpfA2-1* estuvo presente en 198/199 cepas *lpfA*_{O113}-positivas (99,5%), mientras que la variante *lpfA2-3* estuvo presente en una cepa. La frecuencia de *lpfA1-2* fue del 46% (92/200) y aparentemente este gen se haya asociado a *lpfA2-1*, ya que siempre se los encontró

juntos. En ninguna de las cepas estudiadas se encontraron las variantes *lpfA1-1*, *lpfA1-3*, *lpfA1-4*, *lpfA1-5*, ni *lpfA2-2*.

La única cepa STEC *lpfA*-negativa identificada en este estudio fue aislada de un caso de SUH, perteneció al serotipo ONT:H4, y el único factor de adherencia detectado fue el gen *iha*.

No se pudo establecer ninguna asociación estadísticamente significativa entre la presencia de alguna variante particular de *lpfA* y la severidad de la enfermedad. Sin embargo, se observó que la mayoría de los serotipos mantienen la misma combinación de variantes de *lpf*, independientemente del origen de las cepas. Tales resultados se ven reflejados por ejemplo en el serogrupo O22, en el que se encuentran dos cepas del serotipo O22:H8 que portan las variantes *lpfA1-2* y *lpfA2-1*, mientras que las tres cepas del serotipo O22:H16 sólo poseen la variante *lpfA2-1*. Resultados similares pueden observarse en el serogrupo O174, donde todas las cepas O174:H21 poseen las variantes *lpfA1-2* y *lpfA2-1*, mientras que los otros serotipos de O174 (O174:H8, O174:H28 y O174:NM) sólo portan el gen *lpfA2-1* (Anexo 1).

4.3.- Comparación del perfil de virulencia de las cepas estudiadas

Se observaron distintos perfiles de virulencia entre las cepas STEC LEE-negativas analizadas, encontrándose diferencias entre las cepas bovinas y las cepas humanas (Tabla 4). Se identificaron once perfiles de virulencia diferentes entre las 153 cepas bovinas, siendo la combinación de *lpfA*_{O113}/*iha*/*fimA* la más frecuente (49/153, 32%), seguido por *lpfA*_{O113}/*iha*/*saal*/*ehxA*/*subAB*/*fimA* (32/153, 21%) y *lpfA*_{O113}/*iha*/*saal*/*ehxA*/*fimA* (29/153, 19%). Entre las 47 cepas STEC LEE-negativas de

origen humano, también fueron reconocidos 11 perfiles de virulencia diferentes. El perfil identificado con mayor frecuencia fue idéntico al más prevalente detectado entre las cepas bovinas *lpfA_{O113}/ iha/ fimA* (19/47; 40,4%). El segundo perfil más frecuente observado fue *lpfA_{O113}/ iha/ saa/ ehxA/ subAB/ cdt-V/ fimA*, encontrándose en ocho cepas de las 47 (17,2%).

Perfil de virulencia	Nº de cepas (%)		Valor <i>p</i>
	Humanas	Bovinas	
<i>lpfA_{O113}/ iha/ fimA</i>	19 (40,4)	49 (32)	NS
<i>lpfA_{O113}/ iha/ saa/ ehxA/ subA/ fimA</i>	6 (12,8)	32 (21)	NS
<i>lpfA_{O113}/ iha/ saa/ ehxA/ fimA</i>	3 (6,4)	29 (19)	<0.05
<i>lpfA_{O113}/ iha/ saa/ ehxA/ subA/ cdt-V/ fimA</i>	8 (17,2)	17 (11)	NS
<i>lpfA_{O113}/ astA</i>	0 (0)	11 (7,2)	<0.05
<i>lpfA_{O113}/ ehxA/ fimA</i>	1 (2,1)	5 (3,5)	NS
<i>lpfA_{O113}/ fimA</i>	2 (4,3)	4 (2,6)	NS
<i>lpfA_{O113}/ iha/ astA/ fimA</i>	4 (8,5)	2 (1,3)	<0.05
<i>lpfA_{O113}/ saa/ ehxA/ fimA</i>	1 (2,1)	2 (1,3)	NS
<i>lpfA_{O113}/ iha/ saa/ ehxA/ subA/ cdt-V/ astA/ fimA</i>	0 (0)	1 (0,6)	NS
<i>lpfA_{O113}/ ehxA/ astA/ fimA</i>	0 (0)	1 (0,6)	NS
<i>lpfA_{O113}/ iha/ astA</i>	1 (2,1)	0 (0)	NS
<i>lpfA_{O113}/ saa/ ehxA/ subA/ fimA</i>	1 (2,1)	0 (0)	NS
<i>iha</i>	1 (2,1)	0 (0)	NS
Total	47	153	

Tabla 4. Comparación de los perfiles de virulencia identificados en cepas STEC LEE-negativas aisladas de bovinos y casos de infección humana. NS, no significativo ($p > 0,05$).

La asociación entre el perfil de virulencia, la infección humana, y los serotipos de STEC se muestra en la Tabla 5. De los once perfiles identificados en las cepas

humanas, nueve se asociaron a SUH. El perfil más frecuente, *lpfA*_{O113}/*iha*/*fimA*, fue identificado en cepas de diferentes serotipos aislados de nueve casos de SUH, ocho casos de D y dos contactos asintomáticos. De los casos de SUH, dos pacientes fallecieron durante la fase aguda de la enfermedad y las cepas pertenecieron a los serotipos O143:HNM y ONT:HNM. Además, otros dos pacientes con SUH fallecieron y las cepas aisladas portaron los genes *lpfA*_{O113}/*iha*/*saa*/*ehxA*/*subAB*/*cdt-V*/*fimA* y pertenecieron a los serotipos O113:H21 y O174:H28.

Perfil	Infección humana (Nº de casos)	Serotipo (Nº de cepas)
<i>lpfA_{O113}/ iha/ fimA</i>	SUH (9) D (8) A (2)	O15:H27 (1), O20:H19 (1), O59:H19 (4), O143:NM (1)*, ONT:NM (2)* O15:H27 (1), O171:H2 (2), O174:H21 (3), ONT:H7 (1), ONT:NM (1) O174:H21 (2)
<i>lpfA_{O113}/ iha/ saal/ ehxA/ subA/ fimA</i>	SUH (1) D (2) DS (1) A (2)	O174:H28 (1) O113:H21 (1), O130:H11 (1) ONT:H49 (1) ONT:H46 (1), O130:H11 (1)
<i>lpfA_{O113}/ iha/ saal/ ehxA/ fimA</i>	SUH (1) D (1) A (1)	O8:H16 (1) O174:NM (1) O5:NM (1)
<i>lpfA_{O113}/ iha/ saal/ ehxA/ subA/ cdt-V/ fimA</i>	SUH (3) D (4) DS (1)	O113:H21(2)*, O174:H28 (1)* O91:H21 (2), O8:H19 (1), O163:H19 (1) O91:H21 (1)
<i>lpfA_{O113}/ ehxA/ fimA</i>	SUH (1)	O8:H19 (1)
<i>lpfA_{O113}/ fimA</i>	D (1), A (1)	O58:H40 (1), O174:H8 (1)
<i>lpfA_{O113}/ iha/ astA/ fimA</i>	SUH (1), D (1), A (2)	O174:H21 (4)
<i>lpfA_{O113}/ saal/ ehxA/ fimA</i>	SUH (1)	O8:H19 (1)
<i>lpfA_{O113}/ iha/ astA</i>	SUH (1)	ONT:H4 (1)
<i>lpfA_{O113}/ saal/ ehxA/ subA/ fimA</i>	A (1)	ONT:H19 (1)
<i>iha</i>	SUH (1)	ONT:H4 (1)

Tabla 5. Asociación entre perfil de virulencia, infección humana y serotipos de STEC. *Pacientes fallecidos.

4.4.- Adherencia bacteriana *in vitro*

Las cepas STEC que carecen de la isla de patogenicidad LEE son comunmente aisladas de reservorio animal, casos esporádicos de diarrea, y recientemente fueron asociadas a brotes de enfermedades transmitidas por alimentos. Sin embargo, poco se conoce sobre los mecanismos por los cuales este grupo de patógenos se adhiere y coloniza el intestino causando enfermedad.

4.4.1.- Ensayos cualitativos de adherencia *in vitro*

Una vez determinados los factores de virulencia de las 200 cepas estudiadas, se eligieron aquellas que presentaban perfiles de adhesinas únicos y se compararon los fenotipos de adherencia a través de ensayos *in vitro* con células HEp-2. Del total de cepas STEC LEE-negativas, sólo se encontraron cepas *lpfA*_{O113}-positivas (variante *lpfA2-1*) de origen bovino y una cepa *iha*-positiva de origen humano (SUH). A modo comparativo, también se seleccionó una cepa de origen humano (SUH) positiva para los genes *iha* y *lpfA*_{O113} (variante *lpfA2-3*). Las cepas *lpfA*_{O113}-positivas pertenecieron a los serotipos O136:H12, O7:H[12], y ONT:HNM; la cepa *iha*-positiva al serotipo ONT:H4; y la cepa combinada al serotipo O143:H[4] (Tabla 6).

Origen	Serotipo	stx	Factores de virulencia	
			Positivo	Negativo
Bovino	O136:H12	stx ₁	<i>lpfA2-1/astA</i>	<i>saa, efa1, toxB, subAB, cdt-V, fimA</i>
Bovino	O7:H[12]	stx ₁	<i>lpfA2-1/astA</i>	<i>saa, efa1, toxB, subAB, cdt-V, fimA</i>
Bovino	ONT:HNM	stx ₁	<i>lpfA2-1/astA</i>	<i>saa, efa1, toxB, subAB, cdt-V, fimA</i>
Humano	ONT:H4	stx ₁	<i>iha</i>	<i>saa, efa1, toxB, astA, lpfA1, lpfA2, subAB, cdt-V, fimA</i>
Humano	O143:H[4]	stx ₂	<i>iha/lpfA2-3</i>	<i>saa, efa1, toxB, astA, subAB, cdt-V</i>

Tabla 6. Cepas seleccionadas para el estudio de adherencia bacteriana *in vitro*. Los genes *lpfA*_{O113} se encuentran identificados con sus respectivas variantes.

Como puede observarse en la Figura 7, las cepas *lpfA*_{O113}-positivas O136:H12 y O7:H[12] mostraron un patrón de adherencia parcialmente localizado sobre la superficie celular denominado LAL por sus siglas en inglés *localized adherence like*, mientras que la cepa ONT:HNM mostró una adherencia difusa. La cepa *iha*-positiva mostró un patrón de adherencia típico de las cepas EAEC, pudiéndose observar la disposición en empalizada de las bacterias alrededor de las células. En cambio, la cepa combinada (O143:H[4]) mostró un patrón de adherencia difuso sobre la superficie celular.

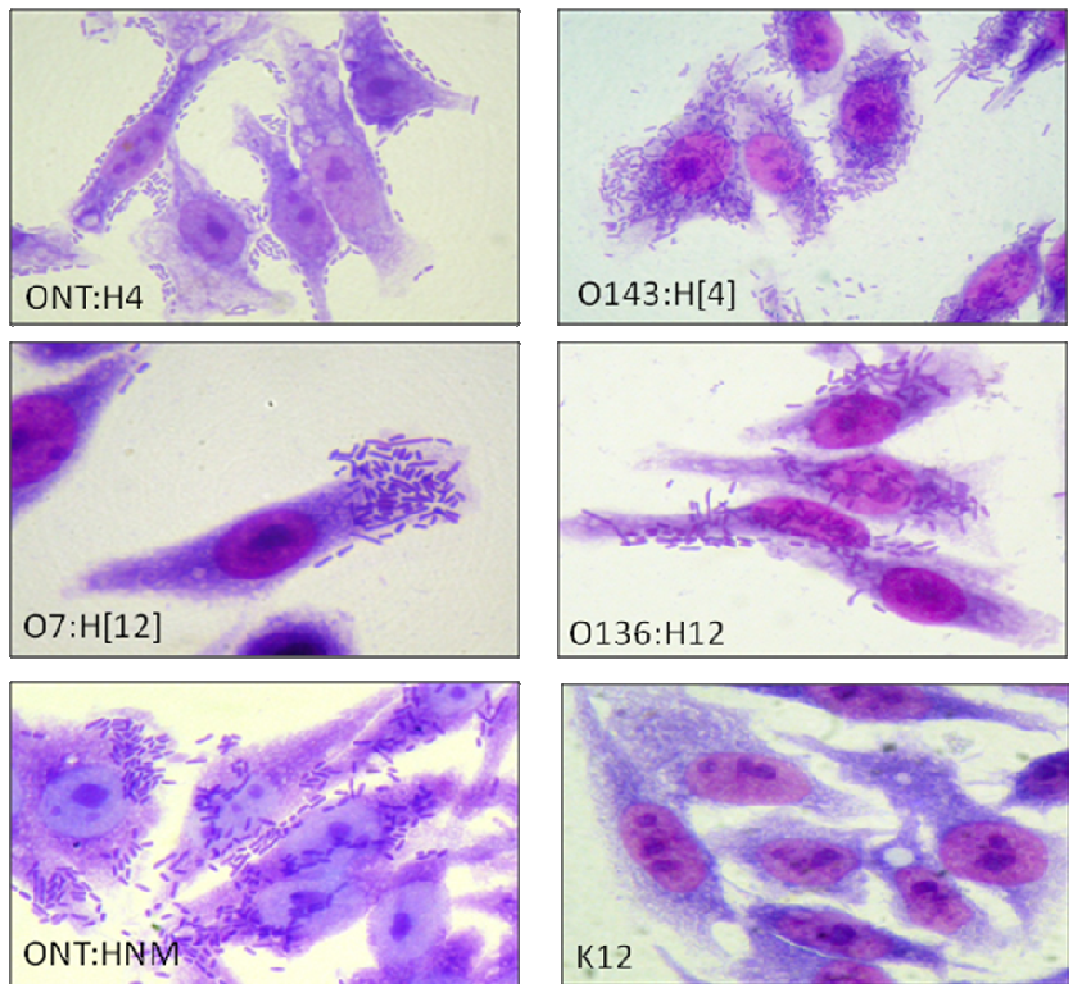


Figura 7. Ensayo cualitativo de adherencia bacteriana *in vitro* a células HEp-2. Las cepas O7:H[12], O136:H12, ONT:HNM son *lpfA*_{O113}-positivas (variante *lpfA2-1*); la cepa ONT:H4 es *iha*-positiva y la cepa O143:H[4] es *iha/lpfA*_{O113}-positiva (variante *lpfA2-3*). Se utilizó la cepa K12 como control negativo.

4.5.- Secuenciación del gen *lpfA*_{O113}

Luego se secuenció el gen *lpfA*_{O113} de la cepa 187/06(22) (O136:H12), observándose 98% de similitud con el gen *lpfA*_{O113} de la cepa EH41 (O113:H21) descrita en el trabajo de Doughty y col. (2002) (Figura 8). Por lo tanto se utilizaron los mismos criterios y secuencias de los cebadores descritos en el trabajo mencionado anteriormente para construir la cepa mutada en *lpfA*. La mayoría de las diferencias nucleotídicas se produjeron al comienzo y finalización de la secuencia, pudiendo especular que se deben a errores en el proceso de secuenciación, ya que además coinciden con la secuencia de los cebadores.

```

*****
lpfAO113 EH41                231 ATGAAGCG-TAATATTATAGG 250
lpfAO113 187/06(22)         1  ATGAAGCGGTAATATTATAGG 21
*****

*****
CGGTGCATTCACCTCTGGCATCTCTAATGCTGGCCGGGCATGCACTGGCAG 300
CGGTGCATT---CTGGCATCTCTAATGCTGGCCGGGCATGCACTGGCAG 67
*****

*****
AAGATGGTGTTGTTCACTTCGTTCGGTGAAATTGTTCGACACTACTTGTGAA 350
AAGATGGTGTTGTTCACTTCGTTCGGTGAAATTGTTCGACACTACTTGTGAA 117
*****

*****
GTTACCTCCGATACAGCCGATCAAATTGTCCCCTGGGTAAAGTCAGTAA 400
GTTACCTCCGATACAGCCGATCAAATTGTCCCCTGGGTAAAGTCAGTAA 167
*****

*****
AAATGCATTTTCAGGTGTAGGTAGTCTGGCGTCGCCACAGAAGTTCAGTA 450
AAATGCATTTTCAGGTGTAGGTAGTCTGGCGTCGCCACAGAAGTTCAGTA 217
*****

*****
TTAAGCTCGAAAATTGCCCGGCAACGTACACTCAAGCAGCCGTTTCGTTTT 500
TTAAGCTTGAAAATTGCCCGGCAACGTACACTCAAGCAGCCGTTTCGTTTT 267
*****

*****
GATGGTACAGAAGCGCCTGGCGGCGACGGCGACCTGAAAGTGGGTACGCC 550
GATGGTACAGAAGCGCCTGGCGGCGACGGCGACCTGAAAGTGGGTACGCC 317
*****

*****
GCTTACAGCAGGCAACCCTGGTGATTTTACCGGTACAGGACAAGCGATTG 600
GCTTACAGCAGGCAACCCTGGTGATTTTACCGGTACAGGACAAGCGATTG 367

```

```

*****
CGGCAACCGGCGTTGGTATTCGTATTTTAAACCAGTCCGATAATTCGCAG 650
CGGCAACCGGCGTTGGTATTCGTATTTTAAACCAGTCCGATAATTCGCAG 417

*****
GTTAAACTTTATAACGACTCTGCTTATAACCGCTATCGATGCTGAAGGCAA 700
GTTAAACTTTATAACGACTCTGCTTATAACCGCTATCGATGCTGAAGGCAA 467

*****
GGCTGAAATGAAGTTTATTGCACGCTATGTGGCAACCAATGCGACCGTAA 750
GGCTGAAATGAAGTTTATTGCACGCTATGTGGCAACCAATGCGACCGTAA 517

*****.*****.*****.*****.*.*.*
CGGCTGGTACAGCGAACGCTGATTCAATTTACTTCGAAATTAACAAA 800
CGGCTGGTACGCGAACGCTGATTCAATTTACTATCGAAAAA 567

***
TAA 803
TAA 570

```

Figura 8. Alineamiento nucleotídico de *lpfA*_{O113} de la cepa EH41 (Nº acceso al banco de genes AY057066) y la cepa 187/06(22) secuenciada en el presente trabajo. El alineamiento se realizó con el programa ClustalX2 (versión 2.0.12), y el número de nucleótido se encuentra señalado a la derecha. Los *gaps* se indican con una línea, y los nucleótidos conservados con un asterisco. Los nucleótidos variables se encuentran resaltados y están marcados con un punto. Los cebadores utilizados para la secuenciación se encuentran subrayados.

4.5.1.- Construcción de la cepa mutada en *lpfA*_{O113}

Utilizando el sistema de recombinación *lambda red* y el protocolo descrito en Materiales y Métodos (ver sección 3.12) se construyó una cepa mutada para el gen *lpfA*_{O113}. Las cepas recombinantes capaces de crecer en LB-agar suplementado con 50 µg/ml de Km y sensibles a Amp, fueron corroboradas mediante PCR, utilizando los cebadores *lpfA*-F y *lpfA*-R, para observar la pérdida del gen *lpfA*_{O113}, ya que los cebadores utilizados para generar la mutante tenían 40 pb de secuencia homóloga a las regiones flanqueantes del gen *lpfA*_{O113}, obteniendo de esa manera una cepa delecionada en *lpfA*_{O113} (Figura 9).

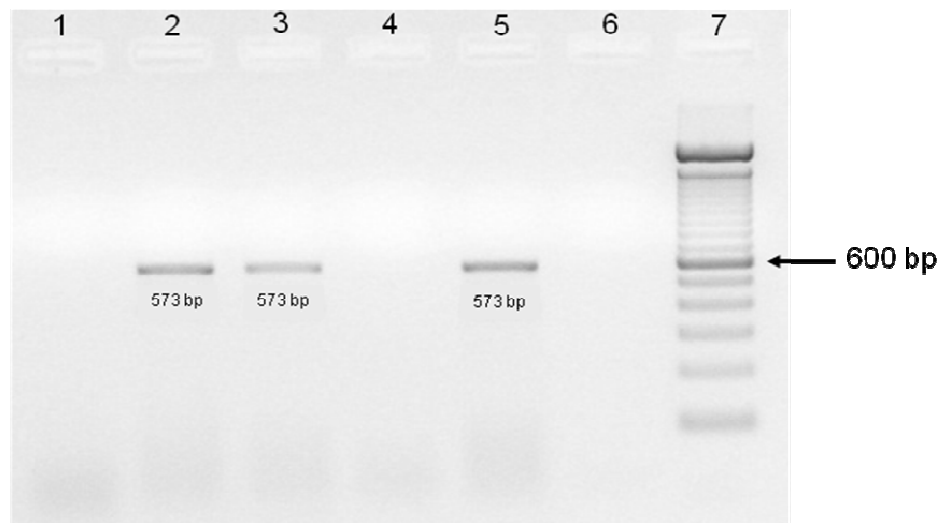


Figura 9. PCR de punto final para la detección del gen *lpfA*_{O113}. Calle 1: mezcla de reacción sin ADN templado (control de sistema). Calle 2: cepa 187/06(22) silvestre. Calle 3: cepa 187/06(22) Δ *lpfA*_{O113} (pWSK:*lpf*). Calle 4: cepa 187/06(22) Δ *lpfA*_{O113}. Calle 5: cepa EH41 (control positivo). Calle 6: cepa EH41 Δ *lpfA*_{O113}. Calle 7: Marcador de peso molecular 100 pb (*Cienmarker*).

4.6.- Contribución de Lpf a la adherencia de la cepa STEC O136:H12

A partir de los resultados anteriormente citados, se desafiaron las cepas 187/06(22) silvestre, 187/06(22) Δ *lpfA*_{O113} y 187/06(22) Δ *lpfA*_{O113} (pSWK:*lpf*) sobre distintas líneas celulares para observar si este gen estaba involucrado en la adherencia o invasión de las cepas *in vitro*.

Tal como puede observarse en la Figura 10, el agregado de manosa al medio inhibió la adherencia de las cepas a la línea celular T84. En estudios previos se observó que las cepas deletadas para el elemento invertible *fimA* son incapaces de expresar la fimbria de tipo 1 capaz de unir manosa y sus derivados. Sin embargo, las cepas estudiadas en el presente trabajo contienen un *locus lpf* que comparte cierta homología con la fimbria de tipo 1. Por lo tanto, estos resultados coinciden con

las observaciones realizadas por Farfan y col. (2011) quienes indicaron que la manosa disminuye el pegado de Lpf a las proteínas de matriz extracelular. Debido a este resultado, los ensayos de adherencia subsiguientes se realizaron en ausencia de manosa para no inhibir la actividad de Lpf.

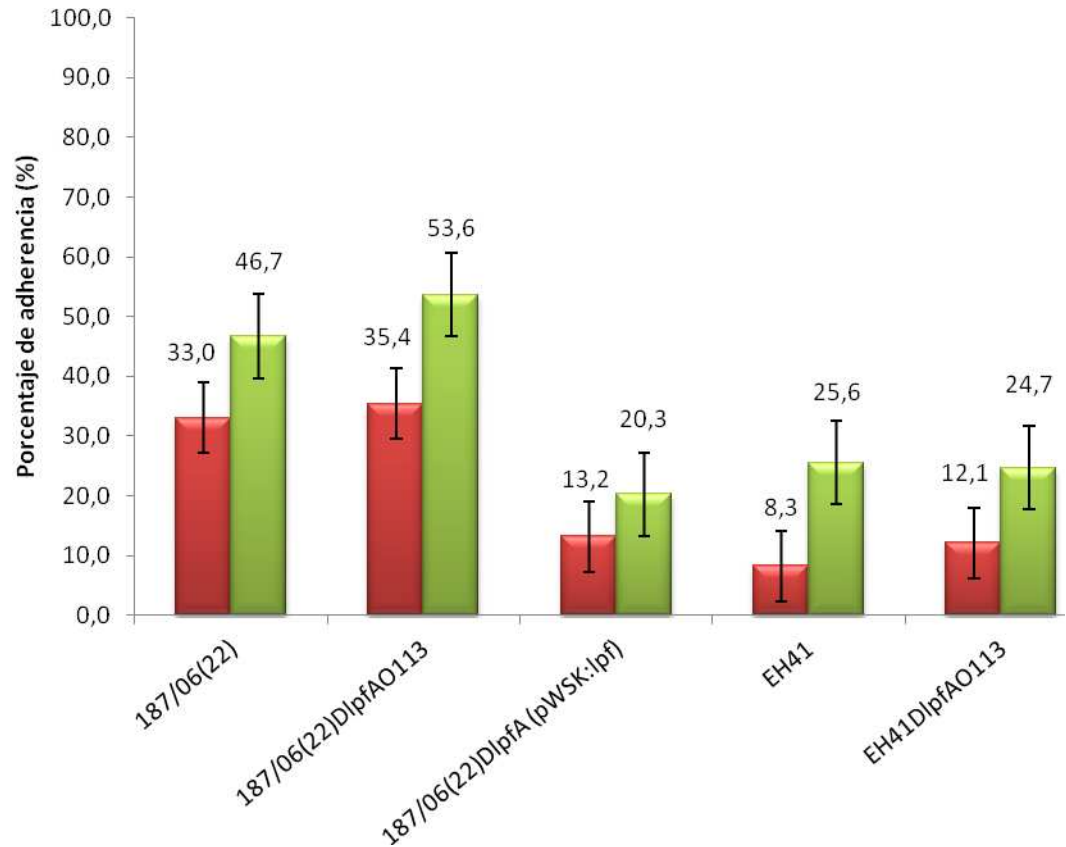


Figura 10. Ensayo de adherencia bacteriana *in vitro* a T84, en presencia (barras rojas) o ausencia (barras verdes) de manosa al 0,5%. Porcentaje de adherencia de las cepas 187/06(22) silvestre, mutante para *lpfA*₀₁₁₃ y complementada, utilizando como control positivo la cepa EH41.

Los ensayos de adherencia bacteriana *in vitro* reflejaron que la adherencia de las cepas es dependiente del tipo de línea celular utilizada, como puede observarse en la Figura 11. En la gráfica se ve reflejado que la cepa 187/06(22) y sus derivadas, presentan una elevada adherencia a la línea celular T84, lo que estaría sugiriendo

que además de adherirse, las bacterias se estarían multiplicando durante el período de incubación de 3 h, ya que el número de microorganismos recuperados fue superior al de infección. En base a esta observación, se realizó un ensayo de cinética de adherencia por parte de las bacterias a la línea celular T84 y un ensayo de invasión para confirmar si las bacterias eran internalizadas y se multiplicaban en el interior celular.

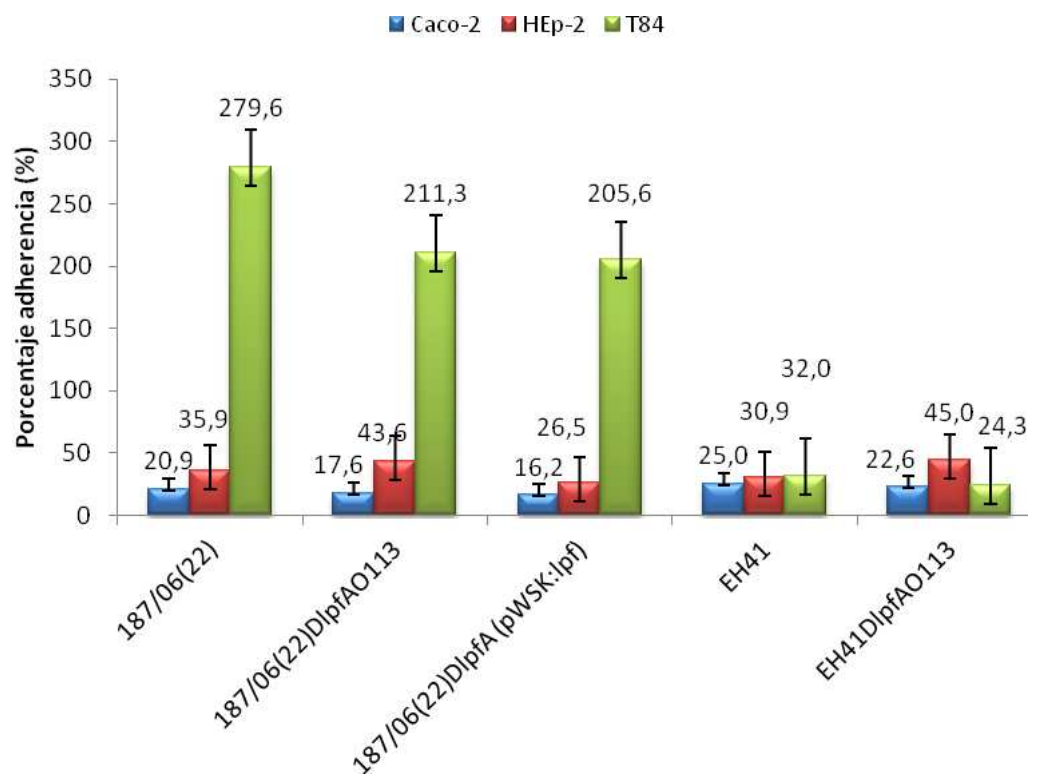


Figura 11. Gráfico comparativo de los ensayos de adherencia bacteriana *in vitro* a las líneas celulares Caco-2, HEp-2 y T84. El porcentaje de adherencia se expresó como el número de UFC/ml de bacterias recuperadas, dividido el número de UFC/ml inicial, todo multiplicado por 100 (promedio \pm desviación estándar).

El ensayo de cinética de adherencia a T84 se realizó siguiendo el protocolo descrito en la sección ensayo cuantitativo de adherencia (ver Materiales y Métodos, sección 3.8.2), utilizando los tiempos de infección: 30 min, 1, 2, y 4 h. En la Figura 12 se presentan los resultados obtenidos del experimento, donde queda demostrada

una cinética de adherencia rápida a esta línea celular, ya que a los 30 min puede observarse una alta tasa de recuperación bacteriana y a las 4 h prácticamente el porcentaje de adherencia duplica al número de infección. Estos resultados ratifican la alta afinidad de la cepa 187/06(22) y sus derivadas a la línea celular de carcinoma de colon.

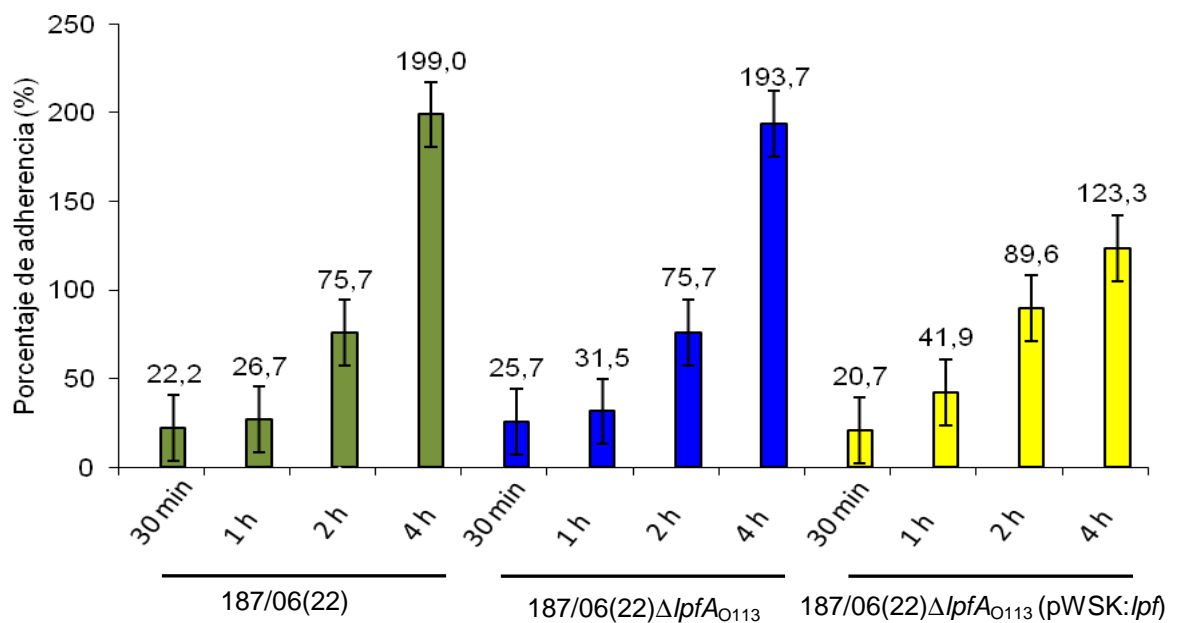


Figura 12. Cinética de adherencia de las cepas 187/06(22) (barras verdes), 187/06(22)ΔlpfA₀₁₁₃ (barras azules) y 187/06(22)ΔlpfA₀₁₁₃ (pWSK:lpf) (barras amarillas), a la línea celular T84, siendo los períodos de infección 30 min, 1, 2, y 4 h. Este experimento fue realizado una sola vez por cuadruplicado.

Paso siguiente, se procedió a realizar los ensayos de invasión *in vitro*. Los experimentos reflejaron que la cepa 187/06(22) y sus derivadas no son invasivas si se las compara con el control positivo de invasión que es la cepa EH41 (Figura 13), de este resultado se desprende la hipótesis que la línea celular T84 posee algún receptor específico para las cepas estudiadas que hace que sean hiper-adherentes.

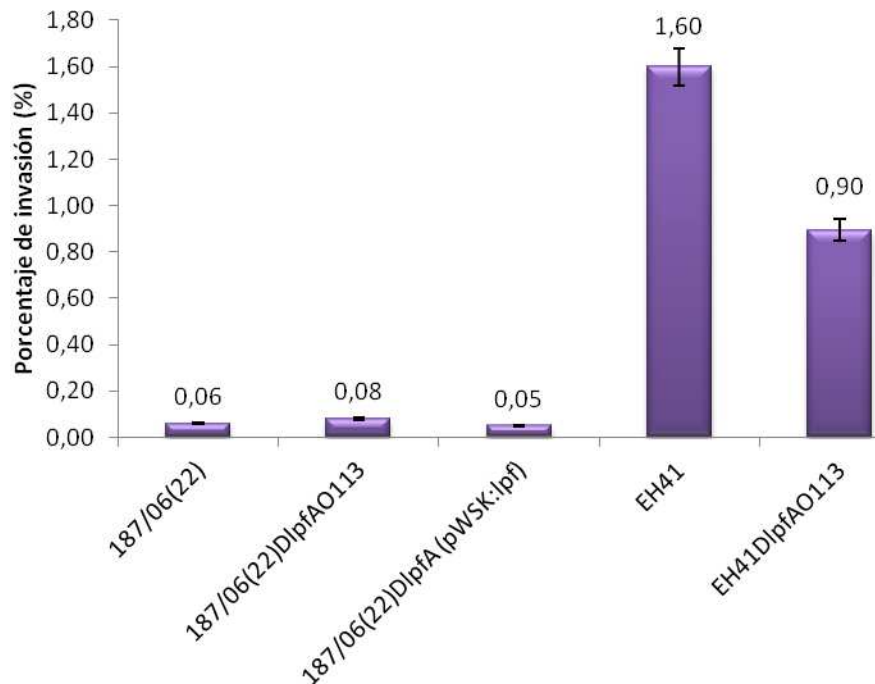


Figura 13. Ensayo de invasión *in vitro* a T84. El experimento se realizó por duplicado y cuadruplicado cada vez. La cepa EH41 se utilizó como control positivo de invasión.

Otro resultado que se ve reflejado en la Figura 11 es que no existe una diferencia significativa en la reducción de la adherencia por parte de la cepa mutante en *lpfA*_{O113} si se la compara con la silvestre en las líneas celulares Caco-2 y HEp-2 ($p=0,42$; $p=0,10$). Sin embargo, existe una diferencia significativa ($p<0,0002$) en la línea celular T84. En los ensayos de competencia, la media del índice de competencia ($3,27 \pm 1,35$) fue significativamente mayor a 1 ($p=0,043$), indicando que la cepa mutante se adhiere más que la silvestre. Este descubrimiento inesperado sugiere que la cepa al carecer de Lpf como factor de adherencia estaría expresando un factor adicional que le proveería una ventaja en los ensayos de adherencia *in vitro*. En un estudio recientemente publicado por Lloyd y col. (2012), se describió una situación similar a la mencionada anteriormente, donde una cepa O157:H7 doble mutante *lpfA1/2* (ya que *E. coli* O157:H7 tiene dos operones de Lpf), presentó un

aumento en la adherencia a líneas celulares *in vitro*. Mediante ensayos de microscopía electrónica de transmisión, se demostró la presencia de estructuras tipo curli, que fueron confirmadas a través ensayos de expresión fenotípica de curli, *Western Blot*, y PCR en tiempo real para medir la expresión de *csgA*.

Siguiendo este razonamiento, se determinó la presencia del gen *csgA* en las cepas 187/06(22), 187/06(22) Δ *lpfA*_{O113} y 187/06(22) Δ *lpfA*_{O113} (pWSK:*lpf*), mediante PCR (Figura 14).

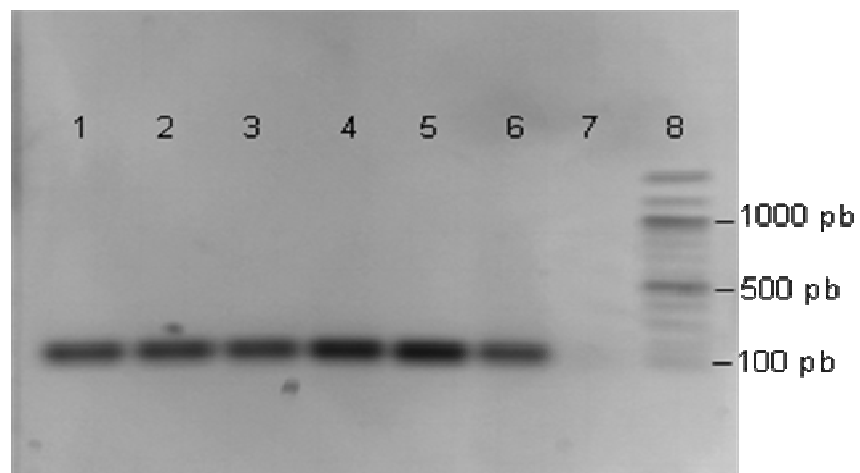


Figura 14. PCR de punto final para el gen *csgA*. Calle 1: cepa 187/06(22). Calle 2: 187/06(22) Δ *lpfA*_{O113}. Calle 3: 187/06(22) Δ *lpfA*_{O113} (pWSK:*lpf*). Calle 4: EH41. Calle 5: EH41 Δ *lpfA*_{O113}. Calle 6: 86-24 (O157:H7, control positivo). Calle 7: mezcla de reacción sin ADN templado (control de sistema). Calle 8: Marcador de peso molecular 100 pb (*Cienmarker*).

Al observar que el gen se encontraba presente, se realizó el ensayo de expresión fenotípica de curli (ver Materiales y Métodos, sección 3.6), donde a diferencia del caso explicado anteriormente la cepa 187/06(22) silvestre y sus derivadas, no expresaron dicha fimbria. Como puede observarse en la Figura 15 (columna 2), la cepa O157:H7 doble mutante para *lpfA*_{1/2} cuando es sembrada en las placas indicadoras de rojo Congo, desarrolla una coloración rojiza consistente

con la unión del colorante por curli. Del mismo modo, puede observarse que las cepas que no expresan dicha fimbria presentan una coloración más pálida, casi blanquecina, o no producen la coloración rojiza sólida (columnas 1, 3, 4-6).

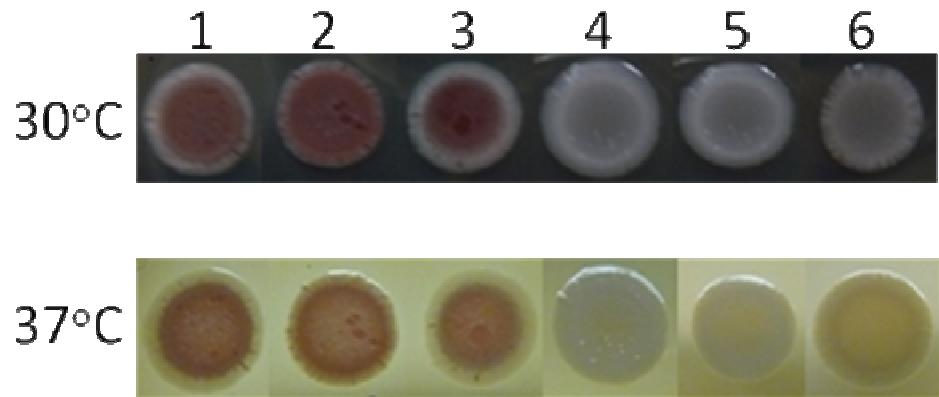


Figura 15. Ensayo de expresión de curli. Se crecieron las cepas 1) EHEC 86-24 (O157:H7), 2) AGT210 (86-24Δ*lpfA1/2*), 3) SJL102 (AGT210Δ*csgA*), 4) 187/08(22), 5) 187/08(22)Δ*lpfA*₀₁₁₃, 6) 187/08(22)Δ*lpfA*₀₁₁₃ (pWSK:*lpf*), por 18 h. Se sembraron (6 μl) en placas de LB-agar sin NaCl conteniendo 40 μg/ml de rojo Congo y 20 μg/ml de azul brillante de Coomassie y se incubaron por 24 h a 30°C ó 37°C. La cepa AGT210 (Δ*lpfA1/2*) fue utilizada como control positivo. La diferencia de color del fondo las fotos a 30°C ó 37°C se debe a artefactos de la toma de la foto.

En un intento por querer determinar la presencia de alguna otra adhesina no identificada anteriormente, se incubó la cepa 187/06(22) en diferentes medios de cultivo (LB, LB + dipiridil, DMEM, DMEM + dipiridil) a 30°C ó 37°C. Se realizó una extracción de proteínas por calor (ver Materiales y Métodos, sección 3.13.1), se corrieron en un gel de poliacrilamida desnaturizante al 10% y se enviaron a secuenciar tres bandas de aproximadamente 17 kDa, 44 kDa y 60 kDa con aparente expresión inducida. El análisis de los resultados de espectrometría de masa no reflejó la secuencia de ninguna adhesina, sino que se obtuvieron secuencias similares a una proteína periplásmica de *Shigella flexneri* (17 kDa), una proteína de unión a fosfato (44 kDa) y una glutamato decarboxilasa de *E. coli* uropatógena.

5. DISCUSION

El conocimiento preciso de los factores que rigen la adherencia de STEC en los huéspedes animales, y el eventual desarrollo de una grave enfermedad en los seres humanos es imprescindible para lograr una intervención eficaz tendiente a evitar la colonización de este grupo bacteriano. Por otra parte, la definición de la combinación de genes de virulencia y los mecanismos que hacen que una cepa STEC sea potencialmente patogénica es fundamental para mejorar la eficacia tanto del diagnóstico de las infecciones en seres humanos como en la vigilancia de los reservorios animales y la evaluación de riesgos para la Salud Pública.

En los últimos diez años, el conocimiento sobre la epidemiología de las infecciones causadas por STEC avanzó notablemente. A nivel mundial, entre los años 2000 y 2005, los casos de enfermedad humana causados por STEC no-O157 aumentaron un 60,5%, mientras que en el mismo período los casos causados por STEC O157 aumentaron sólo un 13% (Coombes y col., 2008). En vista del número creciente de informes sobre infecciones causadas por STEC no-O157 y puntualmente del brote en Alemania causado por una cepa STEC LEE-negativa, se pone en evidencia la falta de información de este heterogéneo grupo bacteriano y por ende la necesidad de investigar las bases moleculares para la virulencia, por lo que la prevalencia de adhesinas y otros marcadores de virulencia, junto a posibles mecanismos de patogenia en este tipo de cepas deben ser estudiados.

5.1.- Prevalencia de factores de virulencia de cepas STEC LEE-negativas

En este trabajo, se determinó la prevalencia de seis genes (incluidas sus variantes) que codifican para adhesinas o probables adhesinas, y tres genes que codifican

para toxinas adicionales a las Stx, en un total de 200 cepas STEC LEE-negativas de 37 serotipos aisladas en Argentina a partir de ganado bovino y seres humanos con infección gastrointestinal.

En este estudio, la prevalencia de los genes *lpfA*_{O113} e *iha* fue de 99,5% y 86%, respectivamente. Resultados similares fueron descritos por Cergole-Novella y col. (2007), quienes encontraron *lpfA*_{O113} (89,2%) e *iha* (87,6%) como las adhesinas más frecuentes. Toma y col. (2004) encontraron *iha* como la más prevalente (91%), seguido por *lpfA*_{O113} (73%); mientras que Tatarczak y col. (2005) describieron a *toxB* (70,3%) como la más prevalente. Las principales diferencias entre los estudios podrían deberse al subgrupo de cepas estudiadas, ya que en los trabajos mencionados anteriormente se estudiaron en su mayoría cepas STEC LEE-positivas; en cambio, el presente trabajo se focalizó en el estudio del grupo de las STEC LEE-negativas. Por lo tanto, las diferencias en la frecuencia de las adhesinas identificadas podrían depender de las cepas caracterizadas en cada estudio.

En un trabajo publicado por Torres y col. (2009) se identificaron varios polimorfismos dentro del gen *lpfA*, que fueron utilizados para clasificar en variantes a la principal subunidad de esta fimbria. En este estudio se investigó la presencia de las variantes de *lpfA* tanto en las cepas aisladas de bovinos como en aquellas aisladas de infecciones humanas, encontrándose una prevalencia de *lpfA1* y *lpfA2* del 46% y 99,5%, respectivamente. Del total de cepas estudiadas sólo una fue *lpfA*-negativa. La mayoría de las cepas portó la variante *lpfA2-1* (99%). Sin embargo, el 53% fue sólo *lpfA2-1*, mientras que el 46% fue positivo para la combinación de genes *lpfA1-2* y *lpfA2-1*.

Es interesante destacar que la variante más común identificada en las cepas de origen bovino fue *lpfA2-1* (57,5%). En cambio, en las cepas de origen humano la combinación de las variantes *lpfA1-2* y *lpfA2-1* fue la más prevalente (57,4%). Estos hallazgos sugieren que la variante *lpfA2-1* podría estar vinculada más a aquellos aislamientos que colonizan al ganado bovino, mientras que las cepas portadoras de la combinación *lpfA1-2* y *lpfA2-1* podrían llegar a tener la habilidad de colonizar el intestino humano y eventualmente ocasionar enfermedad. Es evidente que se requieren experimentos adicionales para confirmar la expresión de Lpf de estas cepas y establecer la asociación de determinadas variantes con enfermedad humana. Como primera aproximación los ensayos cualitativos de adherencia a células HEp-2 revelaron un patrón de adherencia diferente entre cepas con la variante *lpfA2-3*, que presentó un fenotipo parecido al de las cepas DAEC; y cepas *lpfA2-1* que presentaron un tipo de adherencia localizado sobre las células.

De acuerdo con los resultados publicados por Torres y col. (2009) ninguna de las cepas estudiadas presentó las variantes *lpfA1-3* o *lpfA2-2* solas o combinadas. Por lo tanto, el presente estudio apoya la observación que estas variantes se encuentran específicamente en cepas O157:H7 y O55:H7 (su ancestro). Hasta el presente, sólo se vinculó la asociación entre *lpfA* e intimina, indicando que diferentes alelos de intimina están relacionados con variantes de *lpfA* específicas (Torres y col., 2009), lo que condujo al desarrollo de una PCR múltiple que incluye los cebadores de variantes de *lpfA* específicas permitiendo la detección de serotipos específicos de STEC y EPEC (Botkin y col., 2012). Sin embargo, el trabajo de Torres y col. (2009) no incluye cepas STEC LEE-negativas, una diferencia notable con el presente estudio, porque a pesar que algunos de sus hallazgos son corroborados, nosotros

encontramos evidencias de la distribución de variantes de *lpfA* en otras cepas STEC que también son patógenas para el hombre.

Ninguna de las cepas STEC LEE-negativas estudiadas portaron el gen *efa1* ni *toxB*, corroborando la estrecha asociación entre estos genes y cepas intiminopositivas (Toma y col., 2004; Tatarczak y col., 2005). Este es el primer trabajo en el que se estudió ampliamente el gen *fimA* y se lo encontró en el 93,5% de las cepas STEC LEE-negativas. Los hallazgos concuerdan con la presencia de esta adhesina en la mayoría de las cepas de *E. coli* comensales, lo que sugiere que la presencia de estas fimbrias podría contribuir en los primeros pasos de la adherencia a las células epiteliales.

Varios autores describieron la producción de otras toxinas, como CDT-V y SubAB, y propusieron su posible rol en la patogénesis de las infecciones causadas por STEC (Bielaszewska y col., 2005; Talbot y col., 2005). En este trabajo se demostró que el gen *cdt-V* estuvo presente en el 12% y el 17% de las cepas animales y humanas; y *subAB* en el 36% y 32%, respectivamente. La frecuencia de detección de *cdt-V* fue mayor en las cepas humanas que en las de ganado bovino. Aunque Cergole-Novella y col. (2007) observaron que los genes de estas nuevas toxinas estaban presentes sólo en cepas LEE-negativas aisladas de bovinos, es importante mencionar que en el presente estudio, *cdt-V* y *subAB* se encontraron en cepas STEC aisladas de casos graves de enfermedad humana. Por lo tanto, la relevancia clínica aparente no debe ser ignorada, ya que especialmente se identificaron en serotipos de STEC, como O113:H21, O91:H21, O130:H11 y O163:H19, relacionados con casos de SUH en todo el mundo (<http://www.lugo.usc.es/ecoli/SEROTIPOSHUM.htm>). Asimismo, nuevos serogrupos

portadores del gen *subAB* fueron identificados por primera vez en este estudio como O7, O39, O74, O116 y O130. Por otra parte, la presencia simultánea de *cdt-V* y *subAB* fue identificada en un vasto grupo de serotipos como O7:H21, O8:H19, O91:H21, O116:H21, O163:H19, O174:H28, O178:H19, ONT:H25 y ONT:H46, algunos de los cuales causan enfermedad en humanos. La secuencia del gen *astA* se encontró presente en el 9,8% y el 10,6% de las cepas animales y humanas, respectivamente. Es importante señalar que existió una asociación entre el genotipo *stx* específico de las cepas humanas *astA*-positivas, ya que todas fueron *stx*_{2d2}, excepto una que fue *stx*_{2a}. Sin embargo, las cepas de ganado fueron principalmente *stx*_{1a}.

El perfil de virulencia observado con mayor frecuencia entre las cepas estudiadas coincidentemente fue *lpfA*_{O113}/*iha*/*fimA*, el cual estuvo presente en diez serotipos y en cepas no tipificables. Si bien el SUH presenta una etiología multifactorial, involucrando complejas interacciones de variables dependientes de la bacteria y del hospedador, en este trabajo se demostró que las cepas aisladas de 15 de los 19 casos de SUH estudiados portaron los genes *lpfA*_{O113}/*iha*/*fimA*. Se pudo observar una gran diversidad de serotipos y perfiles de virulencia entre las cepas STEC LEE-negativas de origen bovino y humano, sin embargo, ocho de los 11 perfiles coincidieron en ambos grupos. Estas pruebas refuerzan la teoría que el ganado es el principal reservorio natural de STEC y el principal origen de las infecciones en el ser humano.

5.2.- Capacidad de adherencia de cepas STEC LEE-negativas

Se intentaron dilucidar los posibles mecanismos de adherencia de las cepas STEC LEE-negativas a células epiteliales. Se seleccionó un grupo de aislamientos con patrones únicos de adherencia establecidos a través de ensayos de adherencia *in vitro*. Para caracterizar mejor el rol del operón *lpf*_{O113} en la adherencia, se construyó una cepa mutante en la subunidad principal (LpfA) de la fimbria.

En estudios previos se demostró que la expresión del operón *lpf*_{O113} en una cepa de *E. coli* no fimbriada presentaba una adherencia elevada a células CHO-K1. Además, se demostró que la mutación del gen *lpfA*_{O113} (principal subunidad fimbrial de Lpf) en una cepa STEC O113:H21 (EH41), resultó en una reducción de la adherencia a células en cultivo *in vitro* y cuando la cepa delecionada era complementada en *trans* con *lpf*_{O113}, reestablecía la adherencia a niveles similares a la cepa silvestre (Doughty y col., 2002). Sin embargo, en estudios posteriores se determinó que la cepa EH41 era capaz de invadir células colónicas humanas de forma rápida (Luck y col., 2005), aunque ese fenotipo no se asoció a Lpf, sino que se relacionó a *FliC*_{H21} y fue dependiente de la temperatura y del tipo flagelar, ya que en una cepa *fliC*_{H21} mutante se observó una capacidad reducida de invasión a células HCT-8 y sólo se reestableció parcialmente cuando fue complementada con su respectivo flagelo y no con otro aleatorio (Luck y col., 2006).

Otros estudios también demostraron que tanto los operones *lpf1* como *lpf2* de *E. coli* O157:H7 participan en la adherencia bacteriana en cultivo *in vitro*, ya que cepas mutantes en los genes *lpfA1* y *lpfA2* mostraron una reducción en la capacidad de adherencia a células epiteliales (Torres y col., 2002; Torres y col., 2004). En cambio, en el presente trabajo se demostró que la adherencia de las bacterias es

dependiente de la línea celular utilizada y no se pudo establecer una relación directa entre adherencia y la presencia de *lpf*, ya que en una cepa O136:H12 deletcionada en *lpfA*_{O113} no se observaron diferencias significativas respecto de la adherencia al compararla con la silvestre.

A diferencia de las observaciones de Luck y col. (2005), en este estudio tampoco se vió que las cepas LEE-negativas fueran invasivas. Por lo tanto, la hipótesis que las cepas STEC LEE-negativas podrían emplear un mecanismo de invasión celular del huésped para colonizar el epitelio intestinal como medio de patogenia alternativo de forma de compensar la ausencia de LEE y la incapacidad de formar lesión A/E, sería válida solamente para algunas cepas STEC LEE-negativas. Asimismo, teniendo en cuenta la información proporcionada por la secuencia de la cepa del brote de Alemania, que demostró que la cepa tenía una base genética de EAEC pero portaba la codificación mediada por fagos para Stx2, y las observaciones de Luck y col. (2005), se podría especular que algunas bacterias del amplio grupo de las cepas STEC LEE-negativas podrían tener la base genética de cualquiera de las categorías de *E. coli* patogénicas, pero que por algún evento evolutivo adquirieron los fagos que codifican para las toxinas Shiga. Un indicio de esta especulación que se ve reflejada en el trabajo podrían ser las cepas STEC LEE-negativas *astA*-positivas, ya que este tipo de toxinas es característico de las cepas EAEC.

Cabe destacar que se observó solamente una diferencia estadísticamente significativa en la reducción de la adherencia a la línea celular T84 por parte de la cepa mutante, pero no se reestablecieron los valores de adherencia de la cepa silvestre cuando la mutante fue complementada con el plásmido que tenía clonado el

operón completo de *lpfA*_{O113}. Además, en esta línea celular las cepas O136:H12 y sus derivadas (mutante para *lpfA*_{O113} y complementada) presentaron una adherencia elevada, sugiriendo que esta línea en particular posee alguna capacidad inherente que hace que las bacterias se adhieran más que a otras líneas celulares como Caco-2 o HEP-2. Estos resultados sugieren la existencia de algún tipo de receptor específico para alguna adhesina no identificada en las cepas en estudio, ya que a pesar de obtener una reducción significativa en la adherencia por parte de la cepa mutante en *lpfA*_{O113}, las cepas continúan uniéndose elevadamente a esta línea celular.

Los ensayos de competencia en células Caco-2 en cambio, revelaron que la cepa 187/08(22) Δ *lpfA*_{O113} fue más adherente que la cepa silvestre. Coincidentemente, un estudio reciente publicado por Lloyd y col. (2012), estableció que una cepa O157:H7 doble mutante para *lpf* (Δ *lpfA*1/2) fue más adherente en cultivo celular *in vitro* que su respectiva silvestre. Los investigadores encontraron que al mutar ambos operones de *lpf*, la cepa comenzaba a expresar mayores niveles de curli, permitiéndole adherirse aún más a la línea celular *in vitro*. En el presente estudio se encontró que las cepas estudiadas portaban el gen que codifica para la principal subunidad fimbrial de curli (*csgA*), pero a diferencia de lo descubierto por Lloyd y col. (2012) esta fimbria no se expresaba fenotípicamente, aún en la cepa mutante para *lpfA*. Estos resultados sugieren que podría llegar a existir otra fimbria no identificada en este estudio (el presente estudio se centralizó en el estudio de adhesinas principalmente descritas en cepas de origen humano, pero no se investigaron aquellas específicas de reservorio animal como F9 o F17, entre otras), que se estaría expresando bajo una situación de estrés, como podría ser en este

caso la mutación de *lpf*. A pesar de no poder identificar otra adhesina, estas observaciones indican que los mecanismos regulatorios de la expresión de Lpf y otra adhesina alternativa son interdependientes. Otra hipótesis podría ser que dentro de la secuencia de *lpfA2* se encuentre un sitio de unión específico para algún regulador transcripcional de otra fimbria y por ello cuando se muta una cepa en *lpf2* se observa mayor adherencia *in vitro*.

Otro tema a tener en cuenta es la regulación del operón *lpf2* en cepas STEC LEE-negativas, ya que sólo se describió en profundidad la regulación del operón *lpf1* de cepas O157:H7. En el caso del operón *lpf1*, se determinó que se regula en respuesta a la fase de crecimiento del microorganismo, de la temperatura y del pH (Torres y col., 2007a). Asimismo, se demostró que el mecanismo de silenciamiento/anti-silenciamiento está regulado por las proteínas H-NS y Ler (Torres y col., 2007b), y en un estudio recientemente publicado se describieron los sitios específicos de unión de dichas proteínas (Rojas-López y col., 2011).

En cambio, se conoce muy poco sobre los mecanismos de regulación del operón *lpf2*. Mediante ensayos de fusión transcripcional se observó que este operón se induce *in vitro* en la fase de crecimiento tardía del microorganismo a 37°C. Además, la expresión de *lpf2* se vió estimulada en medio mínimo restringido en la concentración de hierro, sugiriendo que la expresión de este operón podría estar regulado por la proteína Fur (Torres y col., 2007a). En otro trabajo se describió que la expresión de *lpf2* se encuentra influenciada por la fuente de carbono y la ausencia de hierro en el medio (Lymberopoulos y col., 2006). Sin embargo, se requieren más estudios que corroboren la función de Fur como reguladora de *lpf2*.

Las cepas STEC LEE-negativas al carecer de esta isla de patogenicidad, tampoco poseen la proteína Ler, por lo tanto en este grupo bacteriano la expresión de Lpf no puede estar regulada por esta proteína, y a pesar que se realizaron algunos intentos por dilucidar el mecanismo de regulación de *lpf2* (datos no mostrados), poco se conoce sobre su expresión.

La principal subunidad fimbrial LpfA_{O113} pertenece a la familia de las fimbrias de tipo 1, como tal posee residuos de cisteína conservados que forman puentes disulfuro con otras proteínas, también poseen un dominio de unión a chaperona característico por un residuo invariable de glicina y residuos aromáticos separados por una serie alternada de residuos hidrofóbicos (Doughthy y col., 2002). Por su alta homología con las fimbrias de tipo 1 también podría hipotetizarse que la expresión de *lpfA* estuviera regulada por una fase de encendido y apagado como *fimA*, pero se requieren estudios adicionales para dilucidar el complejo mecanismo de expresión y patogénesis del operón *lpf2*.

6. CONCLUSIONES

6.1.- Se realizó por primera vez un estudio en el que se determinó la presencia de los genes que codifican para seis adhesinas putativas y tres toxinas, además de las Stx, en una colección de 200 cepas aisladas en Argentinas de reservorio animal y de infecciones intestinales humanas causadas por STEC LEE-negativas.

6.2.- Se demostró que las cepas STEC LEE-negativas bovinas poseen genes que codifican para adhesinas putativas y las toxinas presentes en las cepas STEC LEE-negativas aisladas de casos de enfermedad en humanos.

6.3.- A pesar de la diversidad de los perfiles de virulencia observados entre las cepas estudiadas, se identificó una asociación característica entre perfiles de virulencia, serotipos y fuente de aislamiento.

6.4.- Se confirmó que las cepas STEC LEE-negativas no son un grupo clonal de patógenos, ya que se observaron diferencias en los perfiles de virulencia, incluso en cepas del mismo serotipo. Si bien algunos determinantes no pueden considerarse factores esenciales de virulencia para las infecciones humanas, podrían facilitar la supervivencia y la persistencia de las cepas en diferentes ambientes.

6.5.- A pesar del gran esfuerzo por querer determinar alguno de los mecanismos en las primeras etapas de la patogenia de las cepas STEC LEE-negativas, en el presente trabajo se demostró que en las condiciones ensayadas, Lpf2 no es la

adhesina principal participando de los mecanismos de pegado o interacción a células epiteliales *in vitro*.

6.6.- Se requieren estudios adicionales para determinar el papel exacto de cada factor en la patogénesis de las cepas STEC LEE-negativas.

6.7.- Es de vital importancia para la Salud Pública y los laboratorios clínicos reconocer las cepas STEC LEE-negativas como causa de infección en humanos e incluirlos en el sistema de vigilancia.

7. PERSPECTIVAS A FUTURO

- 7.1.- Encontrar las posibles adhesinas que están participando en la adherencia de la cepa O136:H12 *in vitro*.

- 7.2.- Identificar los principales mecanismos de regulación de la expresión del operón *lpf2* en cepas STEC LEE-negativas.

- 7.2.- Determinar la contribución de Lpf2 *in vivo*.

8. BIBLIOGRAFIA

1. Abaas S, Franklin A, Kühn I, Ørskov F, Ørskov I. Cytotoxin activity on Vero cells among *Escherichia coli* strains associated with diarrhea in cats. *Am J Vet Res.* 1989;50:1294-1296.
2. Abraham JM, Freitag CS, Clements JR, Eisenstein BI. An invertible element of DNA controls phase variation of type 1 fimbriae of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1985;82:5724-5727.
3. Abu-Median AB, Van Diemen PM, Dziva F, Vlisidou I, Wallis TS, Stevens MP. Functional analysis of lymphostatin homologues in enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett.* 2006;258:43-49.
4. Bardiau M, Labruzzo S, Mainil JG. Putative adhesins of enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* of serogroup O26 isolated from humans and cattle. *J Clin Microbiol.* 2009;47:2090-2096.
5. Barnhart MM, Chapman MR. Curli biogenesis and function. *Annu Rev Microbiol.* 2006;60:131-147.
6. 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;32:3013-7.
7. Bäumlér AJ, Heffron F. Identification and sequence analysis of *lpfABCDE*, a putative fimbrial operon of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol.* 1995;177:2087-2097.
8. Bell BP, Griffin PM, Lozano P, Christie DL, Kobayashi JM, Tarr PI. Predictors of hemolytic-uremic syndrome in children during a large outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections. *Pediatrics.* 1997;100:E12.
9. Bentancor A, Rumi MV, Gentilini MV, Sardoy C, Irino K, Agostini A, Cataldi A. Shiga toxin-producing and attaching and effacing *Escherichia coli* in cats and dogs in a high hemolytic uremic syndrome incidence region in Argentina. *FEMS Microbiol Lett.* 2007;267:251-256.

10. Best A, La Ragione RM, Sayers AR, Woodward MJ. Role for flagella but not intimin in the persistent infection of the gastrointestinal tissues of specific-pathogen-free chickens by shiga toxin-negative *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun*. 2005;73:1836-1846.
11. 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.
12. Bielaszewska M, Fell M, Greune L, Prager R, Fruth A, Tschape 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;72:1812-1816.
13. Bielaszewska M, Sinha B, Kuczius T, Karch H. Cytolethal distending toxin from Shiga-toxin *Escherichia coli* O157 causes irreversible G2/M arrest, inhibition of polifarantin, and death of human endothelial cells. *Infect Immun*. 2005;73:552-562.
14. Bielaszewska M, Mellmann A, Zhang W, Köck R, Fruth A, Bauwens A, Peters G, Karch H. Characterisation of the *Escherichia coli* strain associated with an outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, 2011: a microbiological study. *Lancet Infect Dis*. 2011;11:671-676.
15. Botkin DJ, Galli L, Sankarapani V, Soler M, Rivas M, Torres AG. Development of a multiplex PCR assay for detection of pathogenic *Escherichia coli* strains. *Front Cell Inf Microbio*. 2012;2:8. doi: 10.3389/fcimb.2012.00008. En prensa.
16. Bürk C, Dietrich R, Açar G, Moravek M, Bülte M, Märtlbauer E. Identification and Characterization of a new variant of Shiga toxin 1 in *Escherichia coli* O157:H7 of bovine origin. *J Clin Microbiol*. 2003;41:2106–2112.
17. Buteau C, Proulx F, Chaibou M, Raymond D, Clermont MJ, Mariscalco MM, Lebel MH, Seidman E. Leukocytosis in children with *Escherichia coli* O157:H7 enteritis developing the hemolytic-uremic syndrome. *J Pediatr Infect Dis*. 2000;19:642-647.

18. 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.
19. Carter AO, Borczyk AA, Carlson JA, Harvey B, Hockin JC, Karmali MA, Krishnan C, Korn DA, Lior H. A severe outbreak of *Escherichia coli* O157:H7-associated hemorrhagic colitis in a nursing home. *N Engl J Med.* 1987;317:1496-1500.
20. Castillo A, Eguiarte LE, Souza V. A genomic population genetics analysis of the pathogenic enterocyte effacement island in *Escherichia coli*: The search for the unit of selection. *PNAS.* 2005;102:1542-1547.
21. Cergole-Novella MC, Nishimura LS, Dos Santos LF, Irino K, Vaz TM, Bergamini AM, Guth BEC. Distribution of virulence profiles related to new toxins and putative adhesins in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from diverse sources in Brazil. *FEMS Microbiol Lett.* 2007;274:329-334.
22. Chapman PA, Siddons CA, Wright DJ. Cattle as a possible source of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 infections in man. *Epidemiol Infect.* 1993;111:439-447.
23. Chen CY, Nace GW, Irwin PL. A 6 x 6 drop plate method for simultaneous colony counting and MPN enumeration of *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli*. *J Microbiol Methods.* 2003;55:475-479.
24. Chinen I, Epszteyn S, Melamed CL, Aguerre L, Martínez Espinosa E, Motter MM, Baschkier A, Manfredi E, Miliwebsky E, Rivas M. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 in beef and chicken burgers, and chicken carcasses in Buenos Aires, Argentina. *Int J Food Microbiol.* 2009;132:167-171.
25. Cimolai N, Basalyga S, Mah DG, Morrison BJ, Carter JE. A continuing assessment of risk factors for the development of *Escherichia coli* O157:H7-associated hemolytic uremic syndrome. *Clin Nephrol.* 1994;42:85-89.
26. Comité de Nefrología. Incidencia del Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) en la República Argentina. *Arch Arg Pediatr.* 1995;93:407-11.

27. Collinson SK, Doig P, Doran JL, Clouthier SC, Trust T, Kay WW. Thin aggregative fimbriae mediate binding of *Salmonella enteritidis* to fibronectin. *J Bacteriol.* 1993;175:12-18.
28. Collinson SK, Clouthier SC, Doran JL, Banser PA, Kay WW. *Salmonella enteritidis* *agfBAC* operon encoding thin, aggregative fimbriae. *J Bacteriol.* 1996;178:662-667.
29. Coombes BK, Wickham ME, Mascarenhas M, Gruenheid S, Finlay B, Karmali MA. Molecular analysis as an aid to assess the Public Health risk of Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains. *Appl Environ Microbiol.* 2008;74:2153-2160.
30. Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000;97:6640-6645.
31. Deacon V, Dziva F, van Diemen PM, Frankel G, Stevens MP. Efa-1/LifA mediates intestinal colonization of calves by enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O26:H- in a manner independent of glycosyltransferase and cysteine protease motifs or effects on type III secretion. *Microbiology.* 2010;156:2527-2536.
32. Dean-Nystrom EA, Bosworth BT, Cray WC Jr, Moon HW. Pathogenicity of *Escherichia coli* O157:H7 in the intestines of neonatal calves. *Infect Immun.* 1997;65:1842-1848.
33. Doughty S, Sloan J, Bennet-Wood V, Robertson M, Robins-Browen 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.
34. Dytoc MT, Ismaili A, Philpott DJ, Soni R, Brunton JL, Sherman PM. Distinct binding properties of *eaeA*-negative verocytotoxin-producing *Escherichia coli* of serotype O113:H21. *Infect Immun.* 1994;62:3494-3505.
35. Erdem AL, Avelino F, Xicohtencatl-Cortes J, Girón JA. Host protein binding and adhesive properties of H6 and H7 flagella of attaching and effacing *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 2007;189:7426-7435.

36. Edwards RA, Puente JL. Fimbrial expression in enteric bacteria: a critical step in intestinal pathogenesis. *Trends Microbiol.* 1998;6:282-287.
37. Escherich, T. Die Darmbakterien des Neugeborenen und Säuglings. *Fortschritte der Medizin.* 1885;3:547–554.
38. Ewing WH, Edwards PR. Edwards and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae. En: Ewing WH (Ed). New York: Elsevier; 1986.
39. Farfan MJ, Cantero L, Vidal R, Botkin DJ, Torres AG. The long polar fimbriae of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 binds to extracellular matrix proteins. *Infect Immun.* 2011;79:3744-3750.
40. Fitzhenry R, Dahan S, Torres AG, Chong Y, Heuschkel R, Murch S, Thomson M, Kaper JB, Frankel G, Phillips AD. Long polar fimbriae and tissue tropism in *Escherichia coli* O157:H7. *Int J Med Microbiol.* 2006;296:547-552.
41. Friedrich AW, Bielaszewska M, Zhang W, 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.
42. Frydendahl K. Prevalence of serogroups and virulence genes in *Escherichia coli* associated with postweaning diarrhea and edema disease in pigs and a comparison of diagnostic approaches. *Vet Microbiol.* 2002;85:169-182.
43. Galli L, Miliwebsky E, Irino K, Leotta GA, Rivas M. Virulence profile comparison between LEE-negative Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from cattle and humans. *Vet Microbiol.* 2010a;143:307-313.
44. Galli L, Torres AG, Rivas M. Identification of the long polar fimbriae gene variants in the locus of enterocyte effacement-negative Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from humans and cattle in Argentina. *FEMS Microbiol Lett.* 2010b;308:123-129.

45. Gally DL, Leathart J, Blomfield IC. Interaction of FimB and FimE with the *fim* switch that controls the phase variation of type 1 fimbriae in *Escherichia coli* K-12. *Mol Microbiol.* 1996;21:725-738.
46. Gómez D, Miliwebsky E, Fernandez Pascua C, Baschkier A, Manfredi E, Zotta M, Nario F, Piquín A, Sanz M, Etcheverría A, Padola N, Parma A, Rimas M. Aislamiento y caracterización de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga en hamburguesas supercongeladas y quesos de pasta blanda. *Rev Arg Microbiol.* 2002;34:66-71.
47. Goldberg MB, Boyko SA, Butterton JR, Stoebner JA, Payne SM, Calderwood SB. Characterization of a *Vibrio cholerae* virulence factor homologous to the family of TonB-dependent proteins. *Mol Microbiol.* 1992;6:2407–2418.
48. Griffin PM, Bell BP, Cieslak PR, Tuttle J, Barret TJ, Doyle MP, y col. Large outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 in the Western United States: the big picture. En: Recent advances in verocytotoxin-producing *Escherichia coli* infections. Karmali MA, Goglio AG (eds). Elsevier Amsterdam, Lausanne, New York, Oxford Shannon, Tokyo; 1994. p. 7-12.
49. Guth BEC, Prado V, Rivas M. Capítulo 5: Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. En: Pathogenic *Escherichia coli* in Latin America. Torres AGT (eds). Bentam Science Publishers. April 2011, p. 65-83.
50. Gyles CL. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: An overview. *J Anim Sci.* 2007;85:E45-E62.
51. Hall TA. Bioedit: a user friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser.* 1999;41:95-98.
52. Hamilton CM, Aldea M, Washburn BK, Babitzke P, Kushner SR. New method for generating deletions and gene replacements in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 1989;171:4617-4622.
53. Hammermueller J, Kruth S, Prescott J, Gyles C. Detection of toxin genes in *Escherichia coli* isolated from normal dogs and dogs with diarrhea. *Can J Vet Res.* 1995;59:265-270.

54. Hovde CJ, Austin PR, Cloud KA, Williams CJ, Hunt CW. Effect of cattle diet on *Escherichia coli* O157:H7 acid resistance. *Appl Environ Microbiol.* 1999;65:3233-3235.
55. Iida KI, Mizunoe Y, Wai SN, Yoshida SI. Type 1 fimbriation and its phase switching in diarrheagenic *Escherichia coli* strains. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2001;8:489-495.
56. Janka A, Bielaszewska M, Dobrindt U, Greune L, Schmidt MA, Karch H. Cytolethal distending toxin gene cluster in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H- and O157:H7: Characterization and evolutionary considerations. *Infect Immun.* 2003;71:3634-3638.
57. Jenkins C, Chart H, Smith HR, Hartland EL, Batchelor M, Delahay RM, Dougan G, Frankel G. Antibody response of patients infected with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* to protein antigens encoded on the LEE locus. *J Med Microbiol.* 2000;49:97-101.
58. 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.
59. Johnson JR, Jelacic S, Schoening LM, Clabots C, Shaikh N, Mobley HL, Tarr PI. The IrgA homologue adhesin Iha is an *Escherichia coli* virulence factor in murine urinary tract infection. *Infect Immun.* 2005;73:965-971.
60. Jonas K, Tomenius H, Kader A, Normark S, Romling U, Belova LM, Melefors O. Roles of curli, cellulose and BapA in *Salmonella* biofilm morphology studied by atomic force microscopy. *BMC Microbiol.* 2007;7:70.
61. Jones CH, Pinkner JS, Roth R, Heuser J, Nicholes AV, Abraham SN, Hultgren SJ. FimH adhesin of type 1 pili is assembled into a fibrillar tip structure in the *Enterobacteriaceae*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995;92:2081-2085.
62. Jordan DM, Cornick N, Torres AG, Dean-Nystrom EA, Kaper JB, Moon HM. Long polar fimbriae contribute to colonization by *Escherichia coli* O157:H7 in vivo. *Infect Immun.* 2004;72:6168-6171.

63. Jure MA, Condorí S, Leotta GA, Chinen I, Miliwebsky E, Allori C, Aulet O, De Castillo MC. Detección, aislamiento y caracterización de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga a partir de carne molida fresca proveniente de carnicerías de Concepción, provincia de Tucumán. *Rev Argent Microbiol.* 2010;42:284-287.
64. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol.* 2004;2:123-140.
65. Kaplan BS, Cleary TG, Obrig TG. Recent advances in understanding the pathogenesis of the hemolytic uremic syndromes. *Pediatr Nephrol.* 1990;4:276-281.
66. 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:H-. *J Clin Microbiol.* 1993;31:1200-1205.
67. Karch H, Bielaszewska M. Sorbitol-fermenting Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H(-) strains: epidemiology, phenotypic and molecular characteristics, and microbiological diagnosis. *J Clin Microbiol.* 2001;39:2043-2049.
68. Karmali MA, Steele BT, Petric M, Lim C. Sporadic cases of haemolytic-uraemic syndrome associated with fecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. *Lancet.* 1983;1:619-620.
69. 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.
70. Klapproth JM, Scaletsky IC, McNamara BP, Lai LC, Malstrom C, James SP, Donnenberg MS. A large toxin from pathogenic *Escherichia coli* strains that inhibits lymphocyte activation. *Infect Immun.* 2000;68:2148-2155.
71. Knowalchuk J, Speir JI, Stavric S. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 1977;18:775-779.

72. Knutton S, Lloy DR, McNeish AS. Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to human intestinal enterocytes and cultured human intestinal mucosa. *Infect Immun*. 1987;55:69-77.
73. Kokai-Kun JF, Melton-Celsa AR, O'Brien AD. Elastase in intestinal mucus enhances the cytotoxicity of Shiga toxin type 2d. *J Biol Chem*. 2000;275:3713–3721.
74. Large TM, Walk ST, Whittam TS. Variation in acid resistance among Shiga toxin-producing clones of pathogenic *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*. 2005;71:2493-2500.
75. Leotta GA, Chinen I, Epszteyn S, Miliwebsky E, Melamed IC, Motter M, Ferrer M, Marey E, Rivas M. Validation of a multiplex PCR for detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Rev Arg Microbiol*. 2005;37:1-10.
76. Leotta GA, Deza N, Origlia J, Toma C, Chinen I, Miliwebsky E, Iyoda S, Sosa-Estani S, Rivas M. Detection and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in captive non-domestic mammals. *Vet Microbiol*. 2006;118:151-157.
77. Leung PHM, Peiris JSM, Ng WWS, Robins-Browne RM, Bettelheim KA, Yam WC. A newly discovered verotoxin variant, VT2g, produced by bovine verocytotoxigenic *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*. 2003;69:7549-7553.
78. Lloyd SJ, Ritchie JM, Rojas López M, Blumentritt CA, Popov VL, Greenwich JL, Waldor MK, Torres AG. A double long polar fimbriae mutant of *Escherichia coli* O157:H7 expresses curli and exhibits reduced *in vivo* colonization. *Infect and Immun*. 2012. doi: 10.1128/IAI.05945-11. [Epub ahead of print].
79. López EL, Díaz M, Grinstein S, Devoto S, Mendilaharsu F, Murray BE, Ashkenazi S, Rubeglio E, Woloj M, Vasquez M, Turco M, Pickering LK, Cleary TG. Hemolytic Uremic Syndrome and diarrhea in Argentine children; the role of Shiga-like toxins. *J Infect Dis*. 1989;160:469-475.
80. López 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.

81. Luck SN, Bennett-Wood V, Poon R, Robins-Browne RM, Hartland EL. Invasion of epithelial cells by locus of enterocyte effacement-negative enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun*. 2005;73:3063-3071.
82. Luck SN, Badea L, Bennett-Wood V, Robins-Browne R, Hartland EL. Contribution of FliC to epithelial cell invasion by enterohemorrhagic *Escherichia coli* O113:H21. *Infect Immun*. 2006;74:6999-7004.
83. Lymberopoulos MH, Houle S, Daigle F, Léveillé S, Brée A, Moulin-Schouleur M, Johnson JR, Dozois CM. Characterization of Stg fimbriae from an avian pathogenic *Escherichia coli* O78:K80 strain and assessment of their contribution to colonization of the chicken respiratory tract. *J Bacteriol*. 2006;188:6449-6459.
84. Mahajan A, Currie CG, Mackie S, Tree J, McAteer S, McKendrick I, McNeilly TN, Roe A, La Ragione RM, Woodward MJ, Gally DL, Smith DG. An investigation of the expression and adhesin function of H7 flagella in the interaction of *Escherichia coli* O157:H7 with bovine intestinal epithelium. *Cell Microbiol*. 2009;11:121-137.
85. 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.
86. 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.
87. McClain MS, Blomfield IC, Eisenstein BI. Roles of *fimB* and *fimE* in site-specific DNA inversion associated with phase variation of type 1 fimbriae in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 1991;173:5308-5314.
88. Meichtri L, Miliwebsky E, Gioffré A, Chinen I, Baschkier A, Chillemi G, Guth BE, Masana MO, 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.

89. Melton-Celsa AR, Darnell SC, O'Brien AD. Activation of Shiga-like toxins by mouse and human intestinal mucus correlates with virulence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O91:H21 isolates in orally infected, streptomycin-treated mice. *Infect Immun.* 1996;64:1569-1576.

90. Mercado EC. Control de *Escherichia coli* enterohemorrágico (EHEC) en el ganado bovino. *Medicina (B Aires)* 2006;66:33-36.

91. Miliwebsky E, Deza N, Chinen I, Martínez Espinosa E, Gómez D, Pedroni E, Caprile L, Bashckier A, Manfredi E, Leotta GA, Rivas M. Prolonged fecal shedding of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* among children attending day-care centers in Argentina. *Rev Argent Microbiol.* 2007;39:90-92.

92. Newton HJ, Sloan J, Bennett-Wood V, Adams LM, Robins-Browne RM, Hartland EL. Contribution of long polar fimbriae to the virulence of rabbit-specific enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 2004;72:1230-1239.

93. Nicholls L, Grant TH, Robins-Browne RM. Identification of a novel genetic locus that is required for in vitro adhesion of a clinical isolate of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* to epithelial cells. *Mol Microbiol.* 2000;35:275-288.

94. 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.

95. O'Brien AD, Newland JW, Miller SF, Holmes RK, Smith HW, Formal SB. Shiga-like toxin-converting phages from *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis or infantile diarrhea. *Science.* 1984;226:694-696.

96. O'Brien AD, Holmes RK. Shiga and Shiga-like toxins. *Microbiol Rev.* 1987;51:206-220.

97. Oliveira MG, Brito JRF, Carvalho RR, Guth BEC, Gomes TAT, Vieira MAM, Kato MAMF, Ramos II, Vaz TMI, Irino K. Water buffaloes (*Bubalus bubalis*) identified as an important

- reservoir of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Brazil. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73:5945-5948.
98. Ørskov F, Ørskov I. Serotyping of *Escherichia coli*. En: *Methods in Microbiology*. Bergan T (ed). London: Academic Press; 1984. p. 43-112.
99. Ørskov F, Ørskov I, Villar JA. Cattle as reservoir of verotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. *Lancet* 1987;2:276.
100. 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.
101. Parma AE, Sanz ME, Blanco JE, Blanco J, Blanco M, Padola NL, Etcheverría AI. Virulence genotypes and serotypes of verotoxigenic *Escherichia coli* isolated from cattle and foods in Argentina. *Eur J Epidemiol.* 2000;16:757-62.
102. Paton AW, Woodrow MC, Doyle RM, Lanser JA, Paton JC. Molecular characterization of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* O113:H21 strain lacking *eae* responsible for a cluster of cases of hemolytic-uremic syndrome. *J Clin Microbiol.* 1999;37:3357-3361.
103. Paton AW, Srimanote P, Woodrow MC, Paton JC. Characterization of Saa, a novel autoagglutinating adhesin produced by locus of enterocyte effacement-negative Shiga-toxigenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans. *Infect Immun.* 2001;69:6999-7009.
104. Paton AW, Srimanote P, Talbor UM, Wang H, Paton JC. A new family of potent AB5 cytotoxins produced by Shiga toxigenic *Escherichia coli*. *J Exp Med.* 2004;200:35-46.
105. Paton JC, Paton AW. Shiga toxin 'goes retro' in human primary kidney cells. *Kidney Int.* 2006;70:2049-2051.
106. Pièrard D, Muyldermans G, Moriau L, Stevens D, Lauwers S. Identification of new verocytotoxin type 2 variant B-subunit genes in human and animal *Escherichia coli* isolates. *J Clin Microbiol.* 1998;36:3317-3322.

107. Ray PE, Liu XH. Pathogenesis of Shiga toxin-induced hemolytic uremic syndrome. *Pediatr Nephrol*. 2001;16:823-839.
108. Riley LW, Remis RS, 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.
109. Ritchie, J. M., C. M. Thorpe, A. B. Rogers, and M. K. Waldor. Critical roles for *stx2*, *eae*, and *tir* in enterohemorrhagic *Escherichia coli*-induced diarrhea and intestinal inflammation in infant rabbits. *Infect Immun*. 2003;71:7129-7139.
110. 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.
111. Rivas M, Chinen I, Miliwebsky E, Galli L, Repetto HA, Masana M. Capítulo 8: Epidemiology of Argentinean STEC. En: *Bacterial Population Genetics: A Tribute to Thomas S. Whittam*. Walk S, Feng P (eds.). ASM Press. Abril 2011, p. 109-132.
112. Rogers TJ, Paton JC, Wang H, Talbot UM, Paton AW. Reduced virulence of an *fliC* mutant of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* O113:H21. *Infect Immun*. 2006;74:1962-1966.
113. Römling U, Bian Z, Hammar M, Sierralta WD, Normark S. Curli fibers are highly conserved between *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* with respect to operon structure and regulation. *J Bacteriol*. 1998;180:722-731.
114. Rojas-López M, Arenas-Hernández MM, Medrano-López A, Martínez de la Peña CF, Puente JL, Martínez-Laguna Y, Torres AG. Regulatory control of the *Escherichia coli* O157:H7 *lpf1* operon by H-NS and Ler. *J Bacteriol*. 2011;193:1622-1632.
115. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Ed 2. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989. pp. A.1-A.2.

116. Savarino SJ, Fasano A, Robertson DC, Levine MM. Enteroaggregative *Escherichia coli* elaborate a heat-stable enterotoxin demonstrable in an in vivo rabbit intestinal model. *J Clin Invest.* 1999;87:1450-1455.
117. Schering J, Andreoli SP, Zimmerhackl LB. Treatment and outcome of Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome (HUS). *Pediatr Nephrol.* 2008;23:1749:1760.
118. Schmidt H, Beutin L, Karch H. Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL933. *Infect Immun.* 1995;63:1055-1061.
119. Schmidt H, Scheef J, Morabito S, Caprioli A, Wieler LH, Karch H. A new Shiga toxin 2 variant (Stx2f) from *Escherichia coli* isolated from pigeons. *Appl Environ Microbiol.* 2000;66:1205-1208.
120. Schmitt CK, McKee ML, O'Brien AD. Two copies of Shiga-like toxin II-related genes common in enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains are responsible for the antigenic heterogeneity of the O157:H- strain E32511. *Infect Immun.* 1991;59:1065-1073.
121. 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.
122. Stevens MP, Roe AJ, Vlisidou I, Van Diemen PM, La Ragione RM, Best A, Woodward MJ, Gally DL, Wallis TS. Mutation of *toxB* and a truncated version of the *efa-1* gene in *Escherichia coli* O157:H7 influences the expression and secretion of locus of enterocyte effacement-encoded proteins but not intestinal colonization in calves or sheep. *Infect Immun.* 2004;72:5402-5411.
123. Talbot UM, Paton JC, Paton AW. Protective Immunization of Mice with an Active-Site Mutant of Subtilase Cytotoxin of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 2005;73:4432-4436.
124. Tamm A, Tarkkanen AM, Korhonen TK, Kuusela P, Toivanen P, Skurnik M. Hydrophobic domains affect the collagen-binding specificity and surface polymerization as

well as the virulence potential of the YadA protein of *Yersinia enterocolitica*. Mol Microbiol. 1993;10:995-1011.

125. 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. 2000;68:1400-1407.

126. Tarr P, Gordon C, Chandler W. Shiga-toxin producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome. Lancet. 2005;365:1073-1086.

127. Tatarczak M, Wieczorek K, Possē B, Osek J. Identification of putative adhesin genes in shigatoxigenic *Escherichia coli* isolated from different sources. Vet Microbiol. 2005;110:77-85.

128. Tatsuno I, Horie M, Abe H, Miki T, Makino K, Shinagawa H, Taguchi H, Kamiya S, Hayashi T, Sasakawa C. *toxB* gene on pO157 of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 is required for full epithelial cell adherence phenotype. Infect Immun. 2001;69:6660-6669.

129. Tatsuno I, Mundy R, Frankel G, Chong Y, Phillips AD, Torres AG, Kaper JB. The *lpf* gene cluster for long polar fimbriae is not involved in adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* or virulence of *Citrobacter rodentium*. Infect Immun. 2006;74:265-272.

130. Tesh VL, Burris JA, Owens JW, Gordon VM, Wadolkowski EA, O'Brien AD, Samuel JE. Comparison of the relative toxicities of Shiga-like toxins type I and type II for mice. Infect Immun. 1993;61:3392-3402.

131. Toma C, Espinosa EM, Song T, Miliwebsky E, Chinen I, Iyoda S, Iwanaga M, Rivas M. Distribution of Putative Adhesins in Different Seropathotypes of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. J Clin Microbiol. 2004;42:4937-4946.

132. Toma C, Higa N, Iyoda S, Rivas M, Iwanaga M. The long polar fimbriae genes identified in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* are present in other diarrheagenic *E. coli* and in the standard *E. coli* collection of reference (ECOR) strains. Res Microbiol. 2006;157:153-161.

133. Toma C, Nakasone N, Miliwebsky E, Higa N, Rivas M, Suzuki T. Differential adherence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* harboring *saa* to epithelial cells. *Int J Med Microbiol.* 2008;298:571-578.
134. Torres AG, Giron JA, Perna NT, Burland V, Blattner FR, Avelino-Flores F, Kaper JB. Identification and characterization of *lpfABCC'DE*, a fimbrial operon of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun.* 2002;70:5416-5427.
135. Torres AG, Kanack KJ, Tutt CB, Popov V, Kaper JB. Characterization of second long polar (LP) fimbriae of *Escherichia coli* O157:H7 and distribution of LP in other pathogenic *E. coli* strains. *FEMS Microbiol Lett.* 2004; 238:333-344.
136. Torres AG, Milflores-Flores L, Garcia-Gallegos JG, Patel SD, Best A, La Ragione RM, Martinez-Laguna Y, Woodward MJ. Environmental regulation and colonization attributes of the long polar fimbriae of *Escherichia coli* O157:H7. *Int J Med Microbiol.* 2007a;297:177-185.
137. Torres AG, López-Sánchez GN, Milflores-Flores L, Patel SD, Rojas-López M, Martínez de la Peña CF, Arenas-Hernández MM, Martínez-Laguna Y. Ler and H-NS, regulators controlling expression of the long polar fimbriae of *Escherichia coli* O157:H7. *J Bacteriol.* 2007b;189:5916-5928.
138. Torres AG, Blanco M, Valenzuela P, Slater TM, Patel SD, Dahbi G, López C, Fernández Barriga X, Blanco JE, Gomes TAT, Vidal R, Blanco J. The long polar fimbriae genes of pathogenic *Escherichia coli* strains as reliable markers to identify virulent isolates. *J Clin Microbiol.* 2009;47:2442-2451.
139. 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.
140. Veilleux S, Dubreuil JD. Presence of *Escherichia coli* carrying the EAST1 toxin gene in farm animals. *Vet Res.* 2006;37:3-13.

141. 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;348:831-832.
142. Weinstein DL, Jackson MP, Samuel JE, Holmes RK, O'Brien AD. Cloning and sequencing of a Shiga-like toxin type II variant from *Escherichia coli* strain responsible for edema disease of swine. *J Bacteriol*. 1988;170:4223-4230.
143. Wells JG, Shipman LD, Greene KD, Sowers EG, Green JH, Cameron DN, Downes FP, Martin ML, Griffin PM, Ostroff SM, Potter ME, Tauxe RV, Wachsmuth IK. Isolation of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and other Shiga-like-toxin-producing *E. coli* from dairy cattle. *J Clin Microbiol*. 1991;29:985-989.
144. Williams ND, Torres AG, Lloyd SJ. Evolution and epidemiology of diarrheagenic *Escherichia coli*. En: *Pathogenic Escherichia coli in Latin America*. Torres AG (Ed). Bentham Books. Abril 2011. pp. 8-24.
145. Wong CS, Jelacic S, Habeeb RL, Watkins SL, Tarr PI. The risk of the hemolytic-uremic syndrome after antibiotic treatment of *Escherichia coli* O157: H7 infections. *N Engl J Med*. 2000;342:1930-1936.
146. Yamamoto T, Echeverria P. Detection of the enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 gene sequences in enterotoxigenic *E. coli* strains pathogenic for humans. *Infect Immun*. 1996;64:1441-1445.
147. 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.
148. Zweifel C, Schumacher S, Beutin L, Blanco J, Stephan R. Virulence profile of Shiga toxin 2e-producing *Escherichia coli* isolated from healthy pig at slaughter. *Vet Microbiol*. 2006;117:328-332.