



CUARTO CONGRESO INTERNACIONAL
CIENTÍFICO Y TECNOLÓGICO
DE LA PROVINCIA DE BUENOS AIRES

SÍNDROME URÉMICO HEMOLÍTICO: ECO-EPIDEMIOLOGÍA DEL ENEMIGO QUE AFECTA LA SEGURIDAD ALIMENTARIA

Centro de Investigación Veterinaria de Tandil
(CIVETAN)

SÍNDROME URÉMICO HEMOLÍTICO: ECO-EPIDEMIOLOGÍA DEL ENEMIGO QUE AFECTA LA SEGURIDAD ALIMENTARIA

P. Lucchesi, A. Etcheverría, A. Krüger, M. Sanso, A. Bustamante, D. Fernández, M. Sanz, R. Colello, E. Cáceres, J. Ruiz, J. Burgán, J. Cadona, J. González, L. Hernández, M. García, V. Vélez, G. Arroyo, N. L. Padola*

Centro de Investigación Veterinaria de Tandil (CIVETAN)
uecivetan@gmail.com

RESUMEN

Escherichia coli verocitotoxigénico (VTEC) es un patógeno emergente asociado a casos de diarrea, colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico (SUH), del cual Argentina presenta el registro más alto de casos a nivel mundial. No existe tratamiento específico para el SUH, por lo que son fundamentales las estrategias de control y prevención. Los estudios se han centralizado en cepas del serotipo O157:H7, pero las infecciones asociadas a VTEC no-O157 tienen creciente importancia y representan nuevos desafíos para el diagnóstico y el control de VTEC. En este trabajo se evaluó el rol de distintas especies animales, medio ambiente y alimentos en la epidemiología de VTEC, se caracterizó la variabilidad genética y la virulencia de las cepas, y se estudiaron medidas de control. Las metodologías comprenden técnicas microbiológicas y de biología molecular. Los resultados confirman la amplia distribución de las cepas VTEC, demuestran su gran diversidad genética y la presencia de factores de virulencia asociados con enfermedad en el hombre. Las cepas estudiadas mostraron alta capacidad para sobrevivir en el ambiente. La exhaustiva caracterización de las cepas resalta el alto riesgo para la salud pública que representan.

Palabras clave: síndrome urémico hemolítico, toxina Shiga, bovinos, alimentos, medio ambiente, control.

* Centro de Investigación Veterinaria de Tandil (CIVETAN), UNCPBA-CICPBA-CONICET, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNCPBA: paulaluc@vet.unicen.edu.ar, analiain@vet.unicen.edu.ar, akruiger@vet.unicen.edu.ar, msanso@vet.unicen.edu.ar, avbustaman@vet.unicen.edu.ar, dfer_inm@vet.unicen.edu.ar, msanz@vet.unicen.edu.ar, rocioc@vet.unicen.edu.ar, maemilia@vet.unicen.edu.ar, jruiz@vet.unicen.edu.ar, juliaburgan@gmail.com, jimena.cadona@gmail.com, julianag@vet.unicen.edu.ar, lubhtandil@hotmail.com, maurogb@vet.unicen.edu.ar, victoriavelez.92@gmail.com, gharroyo@vet.unicen.edu.ar, nlpadola@vet.unicen.edu.ar

INTRODUCCIÓN

Desde hace más de tres décadas, *Escherichia coli* verocitotoxigénico (VTEC) es considerado un patógeno emergente, principalmente transmitido por alimentos, asociado a casos esporádicos y brotes de diarrea, colitis hemorrágica (CH) y síndrome urémico hemolítico (SUH) (Rivas *et al.*, 2010). Nuestro país presenta el registro más alto de casos de SUH a nivel mundial, con aproximadamente 500 casos nuevos declarados anualmente y una incidencia de 17/100000 niños menores de 5 años de edad. Debido a la patogenicidad y morbilidad de VTEC para el hombre, especialmente para la población infantil, y conociendo la elevada incidencia del SUH en nuestro país, existe una gran demanda para el desarrollo de tratamientos y estrategias de prevención. Actualmente no existe un tratamiento específico para el SUH, ya que el tratamiento con antibióticos no está recomendado.

Desde el reconocimiento de VTEC como patógeno, frecuentemente se identificó a cepas del serotipo O157:H7 como responsables de enfermedad. Por lo cual, gran parte del conocimiento actual de VTEC está asociado a cepas de este serotipo. Sin embargo, el número de infecciones asociadas a VTEC non-O157 han comenzado a ganar predominancia creciente en los últimos años (Wang *et al.*, 2013) representando nuevos desafíos para el diagnóstico y el control de VTEC. La gran plasticidad genómica de VTEC determina diferencias en virulencia y provoca la emergencia de nuevas cepas, y aún no se ha logrado definir con precisión la combinación de genes de virulencia y los mecanismos que convierten a una cepa VTEC en una cepa patógena para el hombre.

Las cepas VTEC se caracterizan por su capacidad de producir unas toxinas, denominadas verocitotoxinas (VTs), que tienen la propiedad de destruir *in vitro* las células de la línea Vero (Konowalchuk *et al.*, 1977). Existen dos tipos de verocitotoxinas, VT1 y VT2, y dentro de cada uno de estos grupos existen subtipos y variantes genéticas que tendrían diferente grado de asociación al desarrollo de la enfermedad (Scheutz *et al.*, 2012). Las verocitotoxinas están codificadas en bacteriófagos temperados insertos en el cromosoma de VTEC (profagos), los cuales tienen importancia en la patogénesis de VTEC, así como en la transmisión horizontal de los genes VT dando surgimiento a nuevas cepas capaces de producir estas toxinas (Krüger y Lucchesi, 2015).

Si bien estas toxinas son las principales responsables del daño que se observa en el síndrome urémico hemolítico sobre riñón y diferentes órganos blanco, otros mecanismos de virulencia son necesarios para la colonización de VTEC, etapa necesaria para la patogénesis que le permite superar las defensas del huésped y establecerse en el intestino (Gyles, 2007). El mecanismo de adherencia al enterocito mejor caracterizado en VTEC está mediado por una proteína de membrana externa, denominada intimina, que está codificada en el gen *eae* del cromosoma bacteriano. Este mecanismo produce una lesión intestinal típica denominada *attaching and effacing* (A/E) (Jerse y Kaper, 1991) que involucra cambios estructurales en la célula epitelial del intestino grueso incluyendo la pérdida de las microvellosidades (Etcheverría & Padola, 2013). Las proteínas bacterianas necesarias para la formación de este tipo de lesión están codificadas en una isla de patogenicidad, denominada locus para el borrado del

enterocito (LEE) (Guth *et al.*, 2010). Existen estudios recientes sobre la regulación de distintos efectores de VTEC en conjunto con la expresión de genes del LEE, que evidencian que la expresión de los factores de virulencia ocurriría en forma coordinada con el metabolismo bacteriano y la fisiología intestinal (Mellies y Lorenzen, 2015).

Durante muchos años, y debido a que gran parte de las cepas VTEC asociadas a enfermedad, incluyendo las O157, portan esta isla LEE, se ha considerado la presencia de LEE, en particular el gen *eae*, como factor de riesgo o marcador de cepas de mayor virulencia (Ethelberg *et al.*, 2004). Sin embargo, diferentes cepas VTEC que carecen de LEE (denominadas LEE-negativas) han sido aisladas en brotes y casos esporádicos de SUH, por ejemplo cepas de los serotipos O91:H21, O113:H21 y O174:H21 (Bielaszewska *et al.*, 2011; Girardeau *et al.*, 2009; Paton *et al.*, 1999). Por esto, actualmente se considera que la presencia de la región LEE no sería esencial para la patogénesis, o bien, sus funciones estarían reemplazadas por otros factores en cepas LEE-negativas.

El mecanismo de colonización no está bien dilucidado en las cepas LEE-negativas, y es probable que sea diferente entre ellas debido a que es un grupo genética y filogenéticamente diverso. Sin el locus LEE, las cepas VTEC LEE-negativas deben adherirse al epitelio intestinal por otros mecanismos. Se han descrito factores de virulencia únicos en cepas LEE-negativas, como la adhesina aglutinante de STEC (*Saa*) (Paton *et al.*, 2001), el autotransportador *Sab* (Herold *et al.*, 2009) y la citotoxina subtilasa (*SubAB*) (Paton *et al.*, 2004), todos codificados en el plásmido de virulencia pO113 (Steyert *et al.*, 2012), aunque hay algunas cepas que carecen de este plásmido.

VTEC tiene una ecología compleja y el bovino cumple un papel significativo en la exposición del hombre a este patógeno. En bovinos, la infección por VTEC no produce enfermedades graves como en el hombre y se piensa que estas bacterias se han adaptado a un estilo de vida "comensal" en animales adultos (Smith *et al.*, 2002). La detección frecuente de anticuerpos anti-VT en suero y calostro de bovinos demuestra que la persistencia de la infección por VTEC en estos animales no se debe a su incapacidad para responder a VTEC y sus productos. Probablemente, VTEC ha elaborado un mecanismo que limita activamente la inflamación intestinal, mantiene la homeostasis intestinal y, finalmente, permite la colonización persistente (Johnson *et al.*, 1996). Sin embargo, las investigaciones respecto a sitios de colonización y adherencia en bovinos son controversiales y están basadas principalmente en cepas O157:H7. Dada la variabilidad de VTEC, resulta importante el estudio de la adhesión a células epiteliales intestinales de cepas VTEC no-O157 y, particularmente, de las LEE-negativas, lo cual contribuiría significativamente a la identificación de los mecanismos por los cuales estos patógenos colonizan el intestino.

Algunos investigadores consideran que solo un subgrupo de las cepas VTEC presentes en reservorios es patógeno para el hombre. Los numerosos factores de virulencia frecuentemente están codificados en elementos genéticos móviles como plásmidos, trasposones, integrones, bacteriófagos e islas de patogenicidad. Esta diversidad y plasticidad permite innumerables combinaciones de factores de virulencia en diferentes cepas, lo cual presenta un desafío para el estudio de *E. coli* y dificulta la clasificación en patotipos claramente

delineados. Entre los elementos genéticos móviles, los integrones son responsables de la adquisición de genes de resistencia a antibióticos, lo que puede generar cepas multiresistentes que implican un alto riesgo para el hombre si ingresan a la cadena alimenticia (Di Conza y Gutkind, 2010).

Otra estrategia útil para la supervivencia de VTEC en el ambiente es la formación de *biofilms*, definidos como comunidades complejas de microorganismos que crecen embebidos en una matriz orgánica polimérica producida por las propias células y adherida a una superficie orgánica o inorgánica. Los *biofilms* formados por bacterias patógenas en ambientes como el doméstico, hospitalario o la industria alimentaria constituyen una fuente permanente de contaminación y contagio de enfermedades (Carpentier y Cerf, 1993).

Desafortunadamente, el diagnóstico y control de animales infectados dentro de un rodeo no es sencillo debido a que este patógeno no produce ningún efecto en la salud ni en la eficiencia de producción de los bovinos. Por otro lado, la eliminación de VTEC al medio es intermitente, lo que dificulta la identificación de los animales positivos. Por lo tanto, las estrategias para disminuir la carga de patógenos en los reservorios no debe focalizarse en un pequeño grupo de animales identificados como positivos, sino que debe poder aplicarse a grandes grupos de animales en el campo en las diferentes fases de producción, inmediatamente previo a la entrada al frigorífico y en plantas procesadoras de alimentos (Callaway *et al.*, 2004b). La presencia de animales portadores de VTEC no solo es importante por la posibilidad de contaminación de las carcasas en la faena y de la leche durante el ordeño, sino también por la contaminación del agua y del ambiente (Fernández y Padola, 2012; Polifroni *et al.*, 2009; Polifroni, 2012; Wallace, 1999). Por lo tanto, las estrategias para reducir la prevalencia de VTEC en rumiantes permitirán disminuir el ingreso de carne, vegetales, frutas, leche y agua contaminados a la cadena alimentaria y, en consecuencia, limitar la incidencia de infección en humanos (Stevens *et al.*, 2002).

Dada la emergencia y aumento de serotipos VTEC asociados con enfermedad severa en humanos (Miko *et al.*, 2014), se remarca la importancia de identificar los mecanismos por los que estas bacterias colonizan el intestino para, luego, desarrollar estrategias de intervención que disminuyan la colonización de los animales antes de la faena, para lograr mayor impacto en el mejoramiento de la seguridad de los alimentos.

Para reducir la enfermedad en el hombre, ya sea por el consumo de alimentos contaminados o por la exposición al medio ambiente contaminado, se pone cada vez más énfasis en el desarrollo de estrategias de intervención para ser utilizadas en el animal en pie antes de la llegada al frigorífico (Callaway *et al.*, 2004b). Debido a que la eliminación por materia fecal de VTEC está correlacionada con la contaminación de las carcasas, el rol que tiene el animal vivo en la producción de alimentos saludables y seguros es considerado crucial, tanto en la producción de alimentos como en la preservación de la calidad e integridad del medio ambiente (Callaway *et al.*, 2004a). Por lo tanto, las estrategias de intervención en el animal en el campo pueden reducir significativamente la exposición del hombre a estos microorganismos y, como consecuencia, disminuir las enfermedades y muertes relacionadas a este patógeno (Hynes y Wachsmuth, 2000).

Se han planteado numerosas estrategias de intervención-suplementación para controlar patógenos en el animal vivo: a) estrategias competitivas, b) estrategias antipatógenas directas y c) estrategias de manejo animal. Dentro de las estrategias competitivas, el uso de bacterias probióticas como microflora competitiva ha dado resultados promisorios en el control de VTEC *in vivo* (Callaway *et al.*, 2004b; Caprioli *et al.*, 2005).

Al igual que para otros microorganismos productores de enfermedades transmitidas por alimentos, la presencia de animales o productos crudos libres de VTEC no es posible en la práctica. Sin embargo, su incidencia puede ser minimizada aplicando medidas de higiene en todas las etapas de la cadena de producción de alimentos (Caprioli *et al.*, 2005). Se han estudiado diversas estrategias para el control microbiológico de alimentos, como sistemas de biopreservación mediante bacterias ácido lácticas (BAL) o sus metabolitos, tecnologías no térmicas o combinaciones de estas. Las BAL son consideradas seguras y se utilizan en muchos países en la producción de alimentos fermentados. Entre estas bacterias, el género *Lactobacillus* representa una alternativa para inactivar los patógenos de los alimentos mediante sus metabolitos activos con actividad inhibitoria y así brindar alimentos seguros a los consumidores (Daeschel, 1993; Ray y Daeschel, 1994).

Debido a que las terapias actuales de tratamiento no son eficientes para impedir el desarrollo de enfermedades graves a partir de infecciones gastrointestinales con VTEC en el hombre, la prevención de la infección primaria sigue siendo una importante estrategia para disminuir los casos de SUH. Por ello, el estudio de los diversos aspectos de estos patógenos permite un conocimiento amplio de la ecología de VTEC en los distintos reservorios para la elaboración de estrategias de control y prevención.

OBJETIVO

El objetivo principal de nuestro laboratorio ha sido evaluar el rol de distintas especies animales, el medio ambiente y alimentos cárnicos en la epidemiología de VTEC, así como la caracterización de la variabilidad genética y la virulencia de las cepas, y desarrollar estrategias de control de esta bacteria para disminuir los riesgos en la salud pública.

METODOLOGÍAS

Muestras realizadas: se obtuvieron muestras de animales de distintas especies productivas (3989 de bovinos, 859 de pollos, 299 de cerdos), del medio ambiente de establecimientos ganaderos y porcinos (459 y 71, respectivamente) y del medio ambiente de frigoríficos y bocas de expendio minoristas (40 y 471, respectivamente). Además, se analizó un total de 1533 muestras de alimentos correspondientes a hamburguesas, menudos y carcasas de pollo, hamburguesas y carne picada de origen bovino y carne de cerdo.

Tamizaje y aislamiento de cepas VTEC: se utilizó PCR para realizar un tamizaje de *vt* a partir de la zona confluyente de los cultivos bacterianos obtenidos a partir de las muestras de animales (bovinos, cerdos y aves), medio ambiente y alimentos.

Caracterización de los aislamientos: se desarrollaron e implementaron diversas técnicas microbiológicas y moleculares. Todos los aislamientos fueron evaluados por reacción de PCR múltiple para la presencia de *vt1*, *vt2*, *eae*, *saa*, *ehxA* (Paton y Paton, 2002). Las cepas se serotipificaron a través de las técnicas de aglutinación en placa mediante el empleo de antisueros O específicos y aglutinación en tubo para antígeno H. Se evaluó citotoxicidad a células Vero.

Se emplearon reacciones de PCR específicas para la detección de genes codificantes de otros factores de virulencia y supervivencia, como: *hes*, *ag43*, *iha*, *pagC*, *eatA*, *ehaA*, *ehaB*, *ehaC*, *ehaD*, *ehaJ*, *fimA*, *agn43*, *agn43* EDL933, *sab*, *lpf*, *katP*, *espP*, *subA*, *stcE*, *csgA*, *csgD*, *crl*, *intl1*, *intl2*, *intl3*. También se utilizaron reacciones de PCR y PCR-RFLP para la subtipificación de genes *vt* y *eae*.

Se emplearon métodos de genotipificación bacteriana para evaluar la relación epidemiológica entre aislamientos que incluyeron RAPD, análisis de múltiples locus VNTRs (repeticiones variables en tándem –*variable number of tandem repeats*–), MLVA (Bustamante *et al.*, 2010; González *et al.*, 2014; Krüger *et al.*, 2006).

Se estudió la producción de fagos codificantes de verocitotoxinas y su respuesta ante inductores por método de titulación en doble capa de agar (Lenzi *et al.*, 2016; Velandia *et al.*, 2012) y reacciones de *real time* PCR. Se secuenciaron genomas de fagos de interés por NGS.

Se estudió el efecto de cepas probióticas del laboratorio sobre cepas VTEC de diferentes orígenes (Etcheverría *et al.*, 2006).

RESULTADOS

Los estudios de Biología Molecular aplicados al análisis de reservorios de *Escherichia coli* verocitotoxigénico, uno de los patógenos de relevancia en salud pública en Argentina, contribuyeron a esclarecer en parte la cadena epidemiológica por las que estas cepas llegan al hombre. La posterior caracterización de las cepas aisladas permitió evaluar el riesgo que representan para la salud, relacionar los perfiles genéticos de cepas de diferentes orígenes y evaluar estrategias de supervivencia (resistencia a estrés ácido, formación de *biofilm* y resistencia a antibióticos).

La metodología utilizada por este grupo de investigación, que contempló la detección por PCR de *vt1-vt2* como tamizaje previo al aislamiento, demostró la necesidad de cambios profundos en los criterios de diagnóstico de VTEC, mediante la utilización de métodos que no ejerzan presión de selección hacia ningún serotipo en particular.

Bovinos: se determinó que los bovinos en pastoreo y en *feedlot* son reservorios de cepas de VTEC con potencialidad para producir SUH, con prevalencias variables entre 30 y 67 %. En bovinos de *feedlot* se identificaron por primera vez como VTEC a nivel mundial los serotipos O15:H21, O25:H19 y O175:H8. Se informó por primera vez a nivel mundial el aislamiento del serotipo O120:H19 a partir del bovino, que previamente había sido aislado de humanos por otros investigadores, y el aislamiento del serotipo O145:H-, por primera vez en Argentina. Este serotipo actualmente es el segundo en importancia en casos de SUH en nuestro país (Padola *et al.*, 2002; Padola *et al.*, 2004).

En cuanto a alimentos cárnicos, se aisló VTEC en más de un tercio de las muestras de carne picada y hamburguesas analizadas, y se encontraron varios serotipos que también habían sido aislados en bovinos (O20:H19, O91:H21, O113:H21, O116:H21, O117:H7, O171:H2, O174:H21). La mayoría de los aislamientos de bovinos y de alimentos cárnicos fueron vt_2+ , coincidiendo con resultados obtenidos en nuestro país por otros investigadores. Teniendo en cuenta la importancia del ambiente de las carnicerías, se determinó la presencia de VTEC O157:H7 y no-O157 en carne picada fresca, picadoras de carne, manipuladores, mesadas y utensilios en 66 comercios minoristas y se encontró una prevalencia de 36,36 %. Respecto de VTEC O157:H7 se detectó un 12,12 % en carne picada fresca, 7,57 % en picadora, 6,06 % en mesada y 3,03 % en cuchilla y manos del manipulador. Mientras que para las cepas VTEC no-O157:H7, se obtuvo un 15,15 % en carne picada fresca, 12,12 % en mesada, 10,6 % en picadora, 9,09 % en manos y 7,57 % en cuchilla (Etcheverría *et al.*, 2010; Sanz *et al.*, 1998).

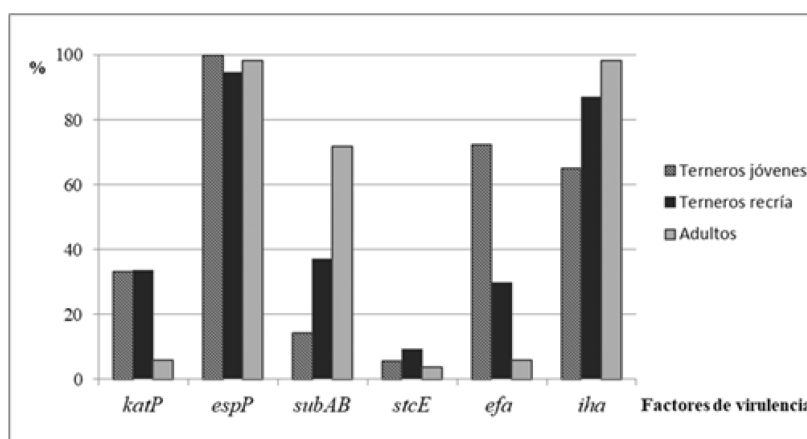
Luego de determinar el rol del bovino como reservorio y la transmisión de VTEC a través de alimentos derivados de este, se realizaron estudios sobre la resistencia al estrés ácido y térmico de cepas autóctonas VTEC aisladas de bovinos y alimentos cárnicos. La supervivencia de *E. coli* O157:H7 frente a condiciones de estrés ha sido estudiada por muchos investigadores pero, como en Argentina la incidencia de este serotipo es menor a la que ocurre en otros países, el objetivo principal fue estudiar aislamientos de otros serotipos, de los cuales el correspondiente a O91:H21 presentó la mayor resistencia (Molina *et al.*, 2003).

La caracterización detallada de aislamientos del cepario de nuestro laboratorio, provenientes de bovinos y alimentos derivados, mostró que las cepas VTEC presentes en el ganado bovino y alimentos derivados poseen características de virulencia asociadas al desarrollo de enfermedad en humanos en nuestro país. Además, la variabilidad observada en *eae*, *saa* y *vt*, así como en sus perfiles genéticos y en citotoxicidad a células Vero indica un abanico de capacidades patogénicas en la población de VTEC presente en el ganado bovino, y, por lo tanto, en el potencial para distribución en humanos. Nuestro grupo detectó el gen *saa* por primera vez en nuestro país y se diseñó una técnica para la subtipificación del gen *saa* que nos permitió identificar cinco variantes de *saa*, dos de las cuales no estaban descritas (Lucchesi *et al.*, 2006). En cuanto a las variantes de verocitotoxinas, aquellas asociadas al desarrollo de SUH fueron las predominantes (Krüger *et al.*, 2011). Además, se detectó por primera vez en Argentina la variante vt_{2g} , y se evaluó la capacidad de identificar esta variante con tres métodos convencionales empleados en la subtipificación de vt_2 (Krüger *et al.*, 2007).

En una selección de cepas VTEC aisladas de bovinos y alimentos, se evaluó la expresión del subtipo de verocitotoxina asociado con mayor frecuencia a SUH (*vt_{2a}*), y se detectaron cepas con una expresión incluso más elevada que la cepa de referencia *E. coli* O157:H7 EDL 933. Además, se estudió el fago codificante de este subtipo de toxina, presente en una de las cepas VTEC O145:H- de bovinos, y se demostró que este era inducible y capaz de movilizarse a otras cepas y que su secuencia genética es muy similar a la de fagos de cepas VTEC O157:H7 aisladas de pacientes (resultados no publicados).

Se demostró que la edad de los bovinos sería un factor que se relaciona con una distribución diferencial de ciertos factores de adherencia y colonización debido a que se detectaron diferencias significativas en las combinaciones de estos factores en cepas VTEC aisladas de bovinos de distintas edades (figura 1) (Cáceres *et al.*, 2017; Fernández *et al.*, 2009).

Figura 1. Distribución de factores de virulencia de cepas VTEC entre distintas categorías de bovinos



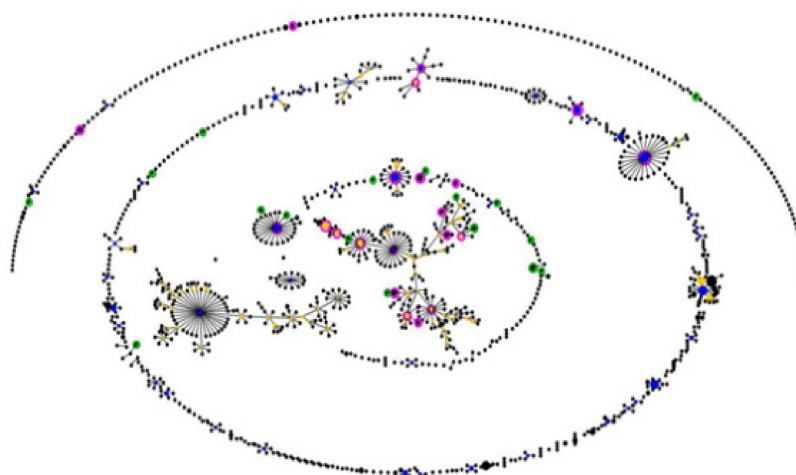
También, como parte de la caracterización de las VTEC nativas, nuestro grupo ha subtipificado cepas mediante diversas técnicas moleculares, tales como MLVA, MLST, caracterización de genes plasmídicos y de islas de patogenicidad (Cadona *et al.*, 2016; Krüger *et al.*, 2015; Sanso *et al.*, 2015; Velandia *et al.*, 2011). Los resultados obtenidos mediante el MLVA_{O157} y MLVA_G muestran la alta diversidad genética de los aislamientos VTEC analizados, con cinco o más perfiles genéticos identificados en los serotipos O20:H19, O117:H7, O157:H7, O171:H2, O174:H21 y O178:H19 (Bustamante *et al.*, 2010; Franci *et al.*, 2011; González *et al.*, 2014; Reyes-Rodríguez *et al.*, 2015). Por el contrario, el serotipo O130:H11 mostró un perfil único en todas las cepas analizadas, lo cual indicaría la emergencia reciente de este serotipo, o por el contrario, que los VNTR utilizados no son lo suficientemente variables (Fernández *et al.*, 2013).

Se confirmó la circulación casi exclusiva del linaje altamente virulento, el clado 8, en las cepas O157:H7 de origen bovino que circulan en la región pampeana de Argentina (González *et al.*, 2017).

Para conocer qué clones de VTEC, especialmente de los serotipos no-O157:H7, están circulando en Argentina, se analizaron por MLST aislamientos de distintas fuentes y se

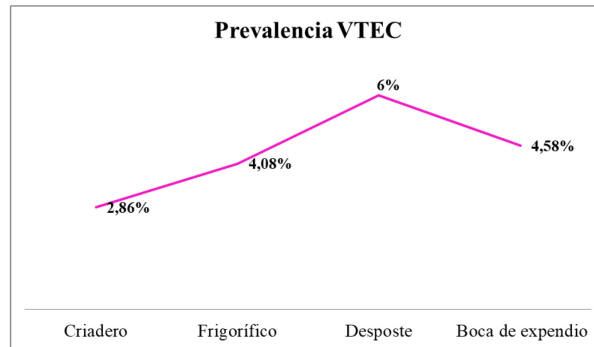
compararon con cepas de diferentes orígenes geográficos, con el fin de evaluar su potencial riesgo para la salud. Los resultados mostraron un alto grado de heterogeneidad filogenética entre las cepas argentinas y señalaron que varios aislamientos de ganado y alimento pertenecían a los mismos clones que comúnmente se asocian con casos clínicos humanos en distintas regiones del mundo (figura 2) (Cadona *et al.*, 2016).

Figura 2. Diagrama de eBURST mediante el cual se muestra el agrupamiento de cepas VTEC en complejos clonales analizados mediante la técnica de MLST



Cerdos: del total de todas las muestras tomadas en criaderos de cerdos, 2,86 % resultaron positivas a VTEC. La distribución de muestras positivas a cada categoría fue: lechón en terminación 6 (5,88 %), lechón recría 2 (4,3 %), madre gestación 1 (2,38 %), lechón lactancia 1 (1,51 %). Se determinó que los cerdos son reservorios de VTEC y que existe un aumento de estos patógenos con el manipuleo de los alimentos (figura 3). Se observó variación de los genes *vt* en las diferentes etapas de la cadena productiva. La mayoría de las cepas aisladas portaron los genes *vt2* y *vt1/vt2*, mientras en boca de expendio el gen con mayor prevalencia fue *vt2*, y en algunos aislamientos combinados con el gen *eae*. Algunos de los serotipos VTEC encontrados en frigoríficos y desposte son serotipos enterohemorrágicos portando perfiles de virulencia relacionados con enfermedad en el hombre (Colello *et al.*, 2016).

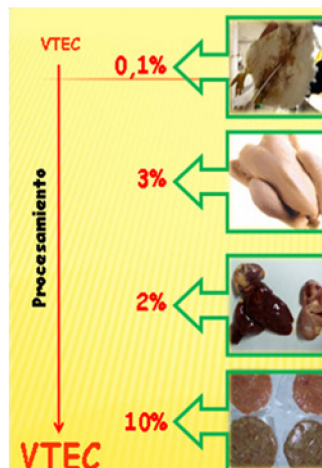
Figura 3. Prevalencia de VTEC a lo largo de la cadena productiva porcina



Respecto a la presencia de integrones codificantes de genes de resistencia a antibióticos, se detectó que el 14 % de las cepas poseían genes codificantes de integrasas. Una proporción considerable de estas cepas mostró resistencia al menos a dos clases de antibióticos diferentes (Colello *et al.*, 2015; Colello *et al.*, 2016).

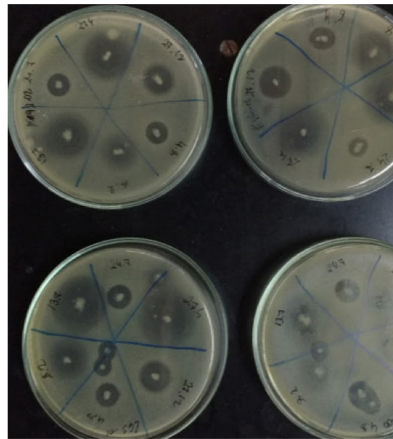
Pollos: se realizó el aislamiento no selectivo y la caracterización de cepas VTEC provenientes de productos de pollo atendiendo a la presencia de *vt1*, *vt2*, *eae*, *saa* y *ehxA*, subtipos de *vt* y serotipos. La mayoría de los aislamientos portaba *vt2* y subtipos de *vt* asociados con enfermedades graves en humanos (Alonso *et al.*, 2016). Se detectaron diferentes serotipos, entre ellos O22:H8, O113:H21, O130:H11, O171:H2 y O178:H19, también identificados como VTEC aislados de pacientes con diarrea, colitis hemorrágica y SUH, y de ganado bovino. Teniendo en cuenta los perfiles de virulencia y los serotipos identificados, nuestros resultados indican que los productos de pollo crudos, especialmente las hamburguesas que se venden en las carnicerías, pueden ser vehículos de cepas VTEC de alto riesgo. Se observó un incremento en la prevalencia de VTEC a lo largo del procesamiento, demostrando que la contaminación aumenta con la manipulación de los alimentos y puede ser producto de la contaminación cruzada con carne bovina (figura 4) (Alonso *et al.*, 2012).

Figura 4. Prevalencias de VTEC a lo largo del procesamiento del pollo y sus alimentos derivados



Control de VTEC: debido al riesgo de contaminación que representan los reservorios para el ambiente y para los productos derivados, se aislaron *Escherichia coli* probióticas a partir de colon bovino que demostraron actividad inhibitoria hacia VTEC O157 y no-O157 en ensayos *ex vivo* e *in vivo*. Estas bacterias son productoras de bacteriocinas que han sido identificadas por PCR. De muestras obtenidas de cerdos en su etapa productiva, se aislaron en total 78 cepas bacterianas, de las cuales 27 (34,61 %) tuvieron características fenotípicas y genotípicas correspondientes al género *Lactobacillus* spp.; el 85,18 % de ellas presentó capacidad inhibitoria frente a, por lo menos, una de las cepas patógenas evaluadas (figura 5). Estos resultados indican que los microorganismos aislados representan una potencial alternativa para inactivar a los patógenos presentes en los alimentos y así brindar alimentos más seguros a los consumidores (Ruiz *et al.*, 2017).

Figura 5. Halos de inhibición producidos por el efecto de probióticos sobre cepas VTEC



CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos confirman la amplia distribución de VTEC en reservorios animales, medio ambiente y alimentos.

La caracterización genotípica de las cepas revela una gran diversidad genética y la presencia de variadas combinaciones de factores de virulencia, asociados con enfermedad en el hombre.

Las cepas estudiadas mostraron una alta capacidad para sobrevivir en el ambiente, a través de la resistencia a estrés ácido y la formación de *biofilm*.

La exhaustiva caracterización realizada de las cepas autóctonas resalta el alto riesgo para la salud pública que estas representan, tanto a través de la contaminación de los alimentos como del contacto directo con el medioambiente o los animales.

BIBLIOGRAFÍA

- ALONSO, M. Z.; LUCCHESI, P.; RODRÍGUEZ, E. M.; PARMA, A. E. y PADOLA, N. L. (2012). "Enteropathogenic (EPEC) and Shigatoxigenic Escherichia coli (STEC) in Broiler Chickens and Derived Products at Different Retail Stores. *Food Control*, vol. 23, n.º 2, pp. 351-355.
- ALONSO, M. Z.; SANZ, M. E.; IRINO, K.; KRÜGER, A, LUCCHESI, P. y PADOLA, N. L. (2016). "Isolation of Atypical Enteropathogenic Escherichia coli from Chicken and Chicken-Derived Products". *British Poultry Science*, vol. 57, n.º 2, pp. 161-164.
- BIELASZEWSKA, M.; MELLMANN, A.; ZHANG, W.; KÖCK, R.; FRUTH, A.; BAUWENS, A.; ... y KARCH, H. (2011). "Characterisation of the Escherichia coli Strain Associated with an Outbreak of Haemolytic Uraemic Syndrome in Germany, 2011: a Microbiological Study". *The Lancet Infectious Diseases*, vol. 11, n.º 9, pp. 671-676.
- BUSTAMANTE, A. V.; SANZO, A. M.; LUCCHESI, P. M. y PARMA, A. E. (2010). "Genetic Diversity of O157: H7 and non-O157 Verocytotoxigenic Escherichia coli from Argentina Inferred from Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis (MLVA)". *International Journal of Medical Microbiology*, vol. 300, n.º 4, pp. 212-217.
- CÁCERES, M. E.; ETCHEVERRÍA, A. I.; FERNÁNDEZ, D.; RODRÍGUEZ, E. M. y PADOLA, N. L. (2017). "Variation in the Distribution of Putative Virulence and Colonization Factors in Shiga Toxin-Producing Escherichia coli Isolated from Different Categories of Cattle". *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, vol. 7.
- CADONA, J. S.; BUSTAMANTE, A. V.; GONZÁLEZ, J. y SANZO, A. M. (2016). "Genetic Relatedness and Novel Sequence Types of non-O157 Shiga Toxin-Producing Escherichia coli Strains Isolated in Argentina. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, vol. 6.
- CALLAWAY, T.; ANDERSON, R.; EDRINGTON, T.; GENOVESE, K.; BISCHOFF, K.; POOLE, T.; ... NISBET, D. (2004a). "What are We Doing about O157: H7 in Cattle?". *Journal of Animal Science*, vol. 82, pp. E93-E99.
- CALLAWAY, T. R.; ANDERSON, R. C.; EDRINGTON, T. S.; GENOVESE, P. J.; HARVEY, R. B.; POOLE, T. L. y NISBET, D. J. (2004b). "Recent Pre-Harvest Supplementation Strategies to Reduce Carriage and Shedding of Zoonotic Enteric Bacterial Pathogens in Food Animals". *Animal Health Research Reviews*, vol. 5, n.º 1, pp. 35-47.
- CAPRIOLI, A.; MORABITO, S.; BRUGÈRE, H.; OSWALD, E. (2005). "Enterohaemorrhagic Escherichia coli: Emerging Issues on Virulence and Modes of Transmission". *Veterinary Research*, vol. 36, n.º 3, pp. 289-311.
- CARPENTIER, B. y CERF, O. (1993). "Biofilms and their Consequences, with Particular Reference to Hygiene in the Food Industry". *Journal of Applied Bacteriology*, vol. 75, n.º 6, pp. 499-511.

- COLELLO, R.; CÁCERES, M. E., RUIZ, M. J.; SANZ, M.; ETCHEVERRÍA, A. I. y PADOLA, N. L. (2016). "From Farm to Table: Follow-Up of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Throughout the Pork Production Chain in Argentina". *Frontiers in Microbiology*, vol. 7.
- COLELLO, R.; ETCHEVERRÍA, A. I.; DI CONZA, J. A.; GUTKIND, G. O. y PADOLA, N. L. (2015). "Antibiotic Resistance and Integrins in Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STEC)". *Brazilian Journal of Microbiology*, vol. 46, n.º 1, pp 1-5.
- DAESCHEL, M. A. (1993). "Applications and Interactions of Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria in Foods and Beverages". En HOOVER D. G. y STEENSON L. R. (eds.) *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria*(pp. 63-91). EE. UU.: Academic Press.
- DI CONZA, J. A. y GUTKIND, G. O. (2010). "Integrines: los coleccionistas de genes". *Revista Argentina de Microbiología*, vol. 42, n.º 1, pp. 63-78.
- ETCHEVERRÍA, A. (2015). "Strategies to Avoid Shiga Toxin Effects". *Virulence*, vol, 6, n.º 2, pp103-104. doi: 10.4161/21505594.2014.983405
- ETCHEVERRÍA, A. I.; ARROYO, G. H.; PERDIGON, G y PARMA, A. E. (2006). "Escherichia coli with anti-O157: H7 Activity Isolated from Bovine Colon". *Journal of Applied Microbiology*, vol. 100, n.º 2, pp. 384-389.
- ETCHEVERRÍA, A. I.; PADOLA, N. L.; SANZ, M. E.; POLIFRONI, R.; KRÜGER, A.; PASSUCCI, J. PARMA, A. E. (2010). "Occurrence of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*(STEC) on Carcasses and Retail Beef Cuts in the Marketing Chain of Beef in Argentina". *Meat Science*, vol. 86, n.º 2, pp. 418-421.
- ETCHEVERRÍA, A. I. y PADOLA, N. L. (2013). "Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*: Factors Involved in Virulence and Cattle Colonization". *Virulence*, vol. 4, n.º 5, p 366.
- ETHELBERG, S.; OLSEN, K. E.; SCHEUTZ, F.; JENSEN, C.; SCHIELLERUP, P.; ENBERG, J.; ... y MØLBAK, K. (2004). "Virulence Factors for Hemolytic Uremic Syndrome, Denmark". *Emerging Infectious Diseases*, vol. 10, pp. 842–847.
- FERNÁNDEZ, D.; KRÜGER, A.; POLIFRONI, R.; BUSTAMANTE, A. V.; SANZO, A. M.; ETCHEVERRÍA, A. I. PADOLA, N. L. (2013). "Characterization of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O130: H11 and O178: H19 Isolated from Dairy Cows". *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, vol. 3.
- FERNÁNDEZ, D. y PADOLA, N. L. (2012). "Escherichia coli verocitotóxico: varias cuestiones... y los tambos también". *Revista Argentina de Microbiología*, vol. 44, n.º 4, pp. 312-323.
- FERNÁNDEZ, D.; RODRÍGUEZ, E. M.; ARROYO, G. H.; PADOLA, N. L. y PARMA, A. E. (2009). "Seasonal Variation of Shiga Toxin-Encoding Genes (stx) and Detection of *E. coli* O157 in Dairy Cattle from Argentina". *Journal of Applied Microbiology*, vol. 106, n.º 4, pp. 1260-1267.

- FRANCI, T.;SANSO, A. M.;BUSTAMANTE, A. V.;LUCCHESI, P.yPARMA, A. E. (2011). "Genetic Characterization of non-O157 Verocytotoxigenic Escherichia coli Isolated from Raw Beef Products Using Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis". *Foodborne Pathogens and Disease*, vol. 8, n.º 9, pp. 1019-1023.
- GIRARDEAU, J. P.; BERTIN, Y. y MARTIN, C. (2009). "Genomic Analysis of the PAI ICL3 Locus in Pathogenic LEE-Negative Shiga Toxin-Producing Escherichia coli and Citrobacter Rodentium". *Microbiology*, vol. 155, n.º 4, pp. 1016-1027.
- GONZÁLEZ, J.; SANSO, A. M.; LUCCHESI, P.M. y BUSTAMANTE, A.V.(2014). "Comparison of 2 Proposed MLVA Protocols for Subtyping non-O157: H7 Verotoxigenic Escherichia coli". *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, vol. 78, n.º 4, pp. 328-332.
- GONZÁLEZ, J.; SANSO, A. M.; CADONA, J. S. y BUSTAMANTE, A. V. (2017). "Virulence Traits and Different nle Profiles in Cattle and Human Verotoxin-Producing Escherichia coli O157: H7 Strains from Argentina". *Microbial Pathogenesis*, vol. 102, pp. 102-108.
- GUTH, B.;PRADO, V.;RIVAS, M. yTORRES, A. G. (2010). "Shiga toxin-producing Escherichia coli". En TORRES, A. (ed.). *Pathogenic Escherichia coli in Latin America*(pp. 65-83).
- GYLES, C. L. (2007). "Shiga toxin-producing An overview". *Journal of Animal Science*, vol. 85, pp. E45-E62.
- HEROLD, S.; JAMES C.; PATON, J. C.; ADRIENNE, W. y PATON, A. E. W. (2009). "Sab, a Novel Autotransporter of Locus of Enterocyte Effacement-Negative Shiga-Toxigenic Escherichia coli O113: H21, Contributes to Adherence and Biofilm Formation". *Infection and Immunity*, vol. 77, n.º 8, pp. 3234-3243.
- HYNES, N. A. y WACHSMUTH, I. K. (2000). "Escherichia coli O157: H7 risk assessment in ground beef: a public health tool".*Proceedings of the 4th International Symposium on Shiga Toxin-producing Escherichia coli Infections*, Kyoto, Japón, vol. 4, p. 46.
- JERSE, A. E.y KAPER, J. B. (1991). "The eae Gene of Enteropathogenic Escherichia coli Encodes a 94-Kilodalton Membrane Protein, the Expression of which is Influenced by the EAF Plasmid". *Infection and Immunity*, vol. 59, n.º 12, pp. 4302-4309.
- JOHNSON, R. P.; CRAY, W. C.; JOHNSON, S. T. (1996). "Serum Antibody Responses of Cattle Following Experimental Infection with Escherichia coli O157: H7". *Infection and Immunity*, vol. 64, n.º 5, pp. 1879-1883.
- KONOWALCHUK, J.; SPEIRS, J. I. y STAVRIC, S. (1977). "Vero Response to a Cytotoxin of Escherichia coli". *Infection and Immunity*, vol. 18, n.º 3, pp. 775-779.
- KRÜGER, A.; LUCCHESI, P. M.; SANSO, A. M.; ETCHEVERRIA, A. I.; BUSTAMANTE, A. V.; BURGAN, J. ROSSEN, J. W. (2015). "Genetic Characterization of Shiga Toxin-Producing Escherichia coli O26:H11 Strains Isolated from Animal, Food, and Clinical Samples". *Frontiers in Cellular and Infectio Microbiology*, vol. 5, n.º 74.

- KRÜGER, A. y LUCCHESI, P. (2015). "Shiga Toxins and stx Phages: Highly Diverse Entities". *Microbiology*, vol. 161, n.º 3, pp.451-462.
- KRÜGER, A. ;LUCCHESI, P. y PARMA, A. E. (2007). "Evaluation of vt2-Subtyping Methods for Identifying vt2g in Verotoxigenic Escherichia coli". *Journal of Medical Microbiology*,vol. 56, n.º 11, pp.1474-1478.
- KRÜGER, A. ; LUCCHESI, P. y PARMA, A. E. (2011). "Verotoxins in Bovine and Meat Verotoxin-Producing Escherichia coli Isolates: Type, Number of Variants, and Relationship to Cytotoxicity". *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 77, n.º 1, pp. 73-79.
- KRÜGER, A.;PADOLA, N. L.;PARMA, A. E. yLUCCHESI, P. (2006). "Intraserotype Diversity among Argentinian Verocytotoxigenic Escherichia coli Detected by Random Amplified Polymorphic DNA Analysis". *Journal of Medical Microbiology*, vol. 55, n.º 5, pp.545-549.
- LENZI, L. J.; LUCCHESI, P.; MEDICO, L.; BURGÁN, J. y KRÜGER, A. (2016). "Effect of the Food Additives Sodium Citrate and Disodium Phosphate on Shiga Toxin-Producing Escherichia coli and Production of stx-Phages and Shiga Toxin". *Frontiers in Microbiology*, vol. 7.
- LUCCHESI, P.; KRÜGER, A. yPARMA, A. E. (2006). "Distribution of saa Gene Variants in Verocytotoxigenic Escherichia coli Isolated from Cattle and Food". *Research in Microbiology*, vol. 157, n.º 3, pp. 263-266.
- MELLIES, J. y LORENZEN, E. (2014). "Enterohemorrhagic Escherichia coli virulence gene regulation *Enterohemorrhagic Escherichia coli and Other Shiga Toxin-Producing E. coli* (pp. 199-209): American Society of Microbiology.
- MIKO, A.; RIVAS, M.; BENTANCOR, A.; DELANNOY, S.; FACH, P. y BEUTIN, L. (2014). "Emerging Types of Shiga Toxin-Producing E. coli (STEC) O178 Present in Cattle, Deer, and Humans from Argentina and Germany".*Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, vol. 4, p. 78.
- MOLINA, P. M.;PARMA, A. E. ySANZ, M. E. (2003). "Survival in Acidic and Alcoholic Medium of Shiga Toxin-Producing Escherichia coli O157: H7 and non-O157: H7 Isolated in Argentina". *BMC Microbiology*, vol. 3, n.º 1, p. 17.
- PADOLA, N. L.; SANZ, M. E.; BLANCO, J. E.; BLANCO, M.; BLANCO, J.; ETCHEVERRIA, A. I. ... y PARMA, A. E. (2004). "Serotypes and Virulence Genes of Bovine Shigatoxigenic Escherichia coli (STEC) Isolated from a Feedlot in Argentina". *Veterinary Microbiology*, vol. 100, n.º 1, pp. 3-9.
- PADOLA, N. L.; SANZ, M. E.; LUCCHESI, P. M.; BLANCO, J. E.; BLANCO, M.; BLANCO, J ... y PARMA, A. E. (2002). "First Isolation of the Enterohaemorrhagic Escherichia coli O145: H-from Cattle in Feedlot in Argentina". *BMC Microbiology*, vol. 2, n.º 1, p. 6.

- PATON, A. W. y PATON, J. C. (2002). "Direct Detection and Characterization of Shiga Toxigenic *Escherichia coli* by Multiplex PCR for stx 1, stx 2, eae, ehxA, and saa". *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 40, n.º 1, pp. 271-274.
- PATON, A. W.; SRIMANOTE, P.; TALBOT, U. M.; WANG, H.; PATON J. C. (2004). "A New Family of Potent AB5 Cytotoxins Produced by Shiga Toxigenic *Escherichia coli*". *The Journal of Experimental Medicine*, vol. 200, n.º 1, pp. 35-46.
- PATON, A. W.; SRIMANOTE, P.; WOODROW, M. C. y PATON, J. C. (2001). "Characterization of Saa, a Novel Autoagglutinating Adhesin Produced by Locus of Enterocyte Effacement-Negative Shiga-Toxigenic *Escherichia coli* Strains That Are Virulent for Humans". *Infection and Immunity*, vol. 69, n.º 11, pp. 6999-7009.
- PATON, A. W.; WOODROW, M. C.; DOYLE, R. M.; LANSER, J. A.; PATON, J. C. (1999). "Molecular Characterization of a Shiga Toxigenic *Escherichia coli* O113: H21 Strain Lacking eae Responsible for a Cluster of Cases of Hemolytic-Uremic Syndrome". *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 37, n.º 10, pp. 3357-3361.
- POLIFRONI, R. (2012). *Caracterización fenotípica de Escherichia coli verotoxigénica (VTEC) y su persistencia en el medio ambiente del tambo*. UNCPBA.
- POLIFRONI, R.; ETCHEVERRÍA, A. I.; PADOLA, N. L. y PARMA, A. E. (2009). "Escherichia coli verocitotoxigénico (VTEC): características de virulencia y persistencia en el medio ambiente". *In Vet*, vol. 11, n.º 1, pp. 65-70.
- RAY, B. y DAESCHEL, M. A. (1994). "Bacteriocins of Starter Culture Bacteria". En DILLON, V. M. y BOARD, R. G. (eds.). *Natural Antimicrobial Systems and Food Preservation* (p. 133-165). Wallingford, United Kingdom: CAB International.
- REYES-RODRÍGUEZ, N. E.; SORIANO-VARGAS, E.; BARBA-LEÓN, J.; NAVARRO, A.; TALAVERA-ROJAS, M.; SANZO, A. M. y BUSTAMANTE, A. V. (2015). "Genetic Characterization of *Escherichia coli* Isolated from Cattle Carcasses and Feces in Mexico State". *Journal of Food Protection*, vol. 78, n.º 4, pp. 796-801.
- RIVAS, M.; PADOLA, N. L.; LUCCHESI, P. M. y MASANA, M. (2010). "Diarrheagenic *Escherichia coli* in Argentina". En TORRES, A. *Pathogenic Escherichia coli in Latin America* (pp. 142-161), EE. UU.: Bentham Books.
- RUIZ, M. J.; COLELLO, R.; PADOLA, N. L. y ETCHEVERRÍA, A. I. (2017). "Efecto inhibitorio de *Lactobacillus* spp. sobre bacterias implicadas en enfermedades transmitidas por alimentos". *Revista Argentina de Microbiología*, vol. 49, n.º 2, 174-177.
- SANZO, A. M.; BUSTAMANTE, A. V.; FRANCI, T.; GONZÁLEZ, J.; CADONA, J. S. y LUCCHESI, P. (2015). "Serotype Distribution of Plasmid-Encoded Virulence Profiles, and Identification of espP and subAB Alleles in Verotoxigenic *Escherichia coli*". *British Microbiology Research Journal*, vol. 5, n.º 5, p. 396.

- SANZ, M. E.; VIÑAS, R. M. y PARMA, A. E. (1998). "Prevalence of Bovine Verotoxin-Producing *Escherichia coli* in Argentina". *European Journal of Epidemiology*, vol.14, n.º 4, pp.399-403.
- SCHEUTZ, F.; TEEL, L. D.; BEUTIN, L.; PIERARD, D.; BUVENS, G., KARCH, H. O'BRIEN, A. D. (2012). Multicenter Evaluation of a Sequence-Based Protocol for Subtyping Shiga Toxins and Standardizing Stx Nomenclature". *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 50, n.º 9, pp. 2951-2963.
- SMITH, D.; NAYLOR, S. W. y GALLY, D. L. (2002). "Consequences of EHEC Colonisation in Humans and Cattle". *International journal of medical microbiology*, vol. 292, n.º 3-4, pp. 169-183.
- STEVENS, M. P.; VANDIEMEN, P. M.; FRANKEL, G.; PHILLIPS, A. D. y WALLIS, T. S. (2002). "Efa1 Influences Colonization of the Bovine Intestine by Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Serotypes O5 and O111". *Infection and Immunity*, vol. 70, n.º 9, pp. 5158-5166.
- STEYERT, S. R.; SAHL, J. W.; FRASER, C. M. TEEL, L. D.; SCHEUTZ, F. y RASKO, D. A. (2012). "Comparative Genomics and stx Phage Characterization of LEE-Negative Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*". *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, vol.2, p. 133.
- VELANDIA, C.; KRÜGER, A.; PARMA, Y. R.; PARMA, A. E. y LUCCHESI, P. (2012). "Differences in Shiga Toxin and Phage Production among stx2g-Positive STEC Strains". *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, vol. 2.
- VELANDIA, C.; SANZO, A. M.; KRÜGER, A.; SUAREZ, L. V.; LUCCHESI, P. y PARMA, A. E. (2011). "Occurrence of Subtilase Cytotoxin and Relation with Other Virulence Factors in Verocytotoxigenic *Escherichia coli* Isolated from Food and Cattle in Argentina". *Brazilian Journal of Microbiology*, vol. 42, n.º2, pp. 711-715.
- WALLACE, J. S. (1999). "The Ecological Cycle of *Escherichia coli* O157:H7". En STEWART, C. S. y FLINT, H. J. (eds.). *Escherichia coli O157:H7 in Farm Animals* (pp. 195-223). Wallingford, Oxon: CAB International.
- WANG, F.; YANG, Q.; KASE, J. A.; MENG, J.; CLOTILDE, L. M.; LIN, A. y GE, B. (2013). "Current Trends in Detecting non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in Food". *Foodborne Pathogens and Disease*, vol. 10, n.º 8, pp. 665-677.