



INFORME DE PASANTÍA DE GRADO
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA HUMANA

Facultad de Ciencias - Universidad de la República

**Caracterización fenotípica de cepas de
Escherichia coli productora de toxina
Shiga aisladas de bovinos neonatos
muertos y convivientes**

Br. Pricila Giménez Farabelli

Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable
Departamento de Microbiología

Orientadora de pasantía: Dra. Ana Umpiérrez
Orientadora de carrera: Dra. Adriana Delfraro

2025

Agradecimientos:

- A mi tutora de tesis Dra. Ana Umpiérrez un especial agradecimiento por darme la oportunidad de ser parte de esta línea de investigación en el IIBCE, acompañándome y enseñándome de forma constante y dedicada.
- Al Dr. Pablo Zunino por brindarme el espacio en el Dpto. de microbiología del IIBCE.
- A mis compañeros de laboratorio del IIBCE los cuales me ayudaron en varias ocasiones en este proyecto.
- A la Dra. Shirley Méndez por brindarme apoyo en cada momento desde que comencé a cursar la carrera en la sede de Montevideo.
- A mis padres, por ser el pilar de mi vida, apoyándome de forma incondicional en cada paso que di en mi formación universitaria.
- A mi hija, por darme el empujón que necesitaba para culminar este camino y ser el motor de mi vida.

Tabla de contenidos:

1- Resumen.....	4
2- Introducción.....	5
2.1 Enfermedades infecciosas en terneros.....	5
2.2 <i>Escherichia coli</i>	5
2.3 <i>E. coli</i> productora de toxina Shiga (STEC).....	6
2.4 STEC esporádicas y STEC persistentes.....	10
2.5 Situación epidemiológica regional.....	13
3- Objetivos.....	14
3.1 Objetivo General.....	14
3.2 Objetivos Específicos.....	14
3.3 Objetivos Académicos.....	14
4- Materiales y métodos.....	15
4.1 Cepas bacterianas.....	15
4.2 Detección de fimbrias Curli y celulosa.....	17
4.3 Formación de biofilm in vitro.....	17
4.4 Determinación del fenotipo hemolítico: alfa y beta hemólisis.....	18
5- Resultados.....	19
5.1 Detección de fimbrias Curli y celulosa.....	19
5.2 Producción de biofilm.....	20
5.3 Determinación del fenotipo hemolítico: alfa y beta hemólisis.....	22
6- Discusión.....	23
6.1 La temperatura de cultivo influyó en la expresión de fimbrias Curli y celulosa en STEC.....	23
6.2 La capacidad de formar biofilm a diferentes temperaturas, es muy diversa.....	24
6.3 Capacidad de STEC de expresar hemolisinas.....	26
7- Conclusiones y perspectivas.....	28
8- Bibliografía.....	30

1-Resumen:

Escherichia coli productora de toxina Shiga (STEC) es una bacteria que se encuentra en el intestino de animales de sangre caliente, puede colonizar de manera esporádica o persistente el intestino de bovinos, transmitiéndose entre terneros y a humanos de manera feco-oral, y contaminando alimentos o agua. Este microorganismo es capaz de producir enfermedades tanto en terneros como en humanos, considerándose de esta manera una zoonosis. Si bien puede causar diarrea leve a los animales, las infecciones en humanos pueden desarrollar cuadros complejos como colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico (SUH). Actualmente STEC causa 2,8 millones de infecciones humanas anuales, con más de 3800 casos de SUH y 230 muertes/año. En diversos estudios realizados se ha demostrado que las cepas capaces de infectar humanos tienen características específicas que las hacen resistentes en el ambiente, aumentando la posibilidad de contaminación alimentaria. El objetivo de este proyecto fue determinar características fenotípicas de STEC que les permitieran resistir en el intestino y/o en el ambiente, de cepas aisladas de muestras intestinales y extraintestinales de terneros neonatos muertos, terneros neonatos con diarrea, y uno sano que convivía con los anteriores. Los resultados obtenidos muestran que algunas cepas presentan características que favorecen su supervivencia en ambientes diferentes al hospedero. Se analizó la expresión de fimbrias Curli y celulosa (componentes importantes del biofilm), y se observó que la temperatura influye en la expresión de ambos. Se estudió la capacidad de producir biofilm en superficies abioticas, siendo diversa, y se pudo ver que, la producción de Curli y celulosa no estaría directamente relacionado a la producción de biofilm. Además, la capacidad de producir enterohemolisina (EhxA) fue mayoritaria a 30°C, lo que podría sugerir algún tipo de función en la supervivencia de STEC en el ambiente, mientras que alfa-hemolisina (HylA) lo fue a 37°C, por lo cual es necesario analizar su papel específico en la patología del SUH.

Palabras clave: STEC; resistencia ambiental; contaminación alimentaria.

2- Introducción:

2.1 Enfermedades infecciosas en terneros:

Las enfermedades infecciosas en los terneros representan un importante problema de salud para los animales, principalmente los criados en sistemas semi-intensivos e intensivos de producción. Se presentan en alta frecuencia, y como consecuencia tienen un impacto económico negativo en los sistemas ganaderos (Donovan et al., 1998; Caffarena et al., 2021). Algunas de las enfermedades infecciosas más comunes que pueden ocasionar la muerte de los terneros en producción son la diarrea neonatal en terneros (DNT), la neumonía y la sepsis (Fecteau et al., 2001; Lorenz et al., 2011; Caffarena et al., 2021). La DNT es reconocida mundialmente como uno de los mayores desafíos para las industrias cárnica y lechera (Lorenz et al., 2011). Es una enfermedad multifactorial cuyos agentes etiológicos más comúnmente asociados son *Escherichia coli*, Rota y Coronavirus, *Cryptosporidium* spp., *Clostridium* spp., y *Salmonella* spp. (Foster & Smith 2009; Kolenda et al., 2015; Caffarena et al., 2021). Un paso importante en la prevención de la DNT es identificar los factores de riesgo y los agentes infecciosos asociados, y establecer procedimientos para corregir factores que estén asociados al cuidado de los animales y a las condiciones del establecimiento donde se encuentran dichos terneros (Lorenz et al., 2011).

2.2 *Escherichia coli*:

E. coli es un bacilo Gram negativo anaerobio facultativo de la familia *Enterobacteriaceae* que forma parte de la microbiota normal en especies de sangre caliente, y es considerado el más abundante de la microbiota intestinal humana. En general, las cepas de *E. coli* coexisten con el hospedero sin causar ningún daño y rara vez causan enfermedad, salvo cuando éste se encuentra inmunocomprometido o la barrera gastrointestinal ha sido dañada (Kaper et al., 2004). Tanto en humanos como en bovinos coloniza el tracto gastrointestinal horas después del nacimiento a partir de la microbiota materna y ambiental, coexistiendo en condiciones de salud y beneficio mutuo (Mainil et al., 2014). Sin embargo, algunas variantes de *E. coli* han adquirido potencial patogénico, afectando tanto a seres humanos como animales sanos. Existen ciertos subtipos que han adquirido factores de virulencia específicos para la supervivencia en diversos nichos, produciendo así diferentes patologías en humanos, por ejemplo, enfermedad entérica/diarreica, infecciones del tracto urinario (ITU) y sepsis/meningitis. Las variantes o virotipos que producen diarrea se pueden clasificar de diferentes maneras como por ejemplo por el tipo de daño que causan al hospedador. Entre esos virotipos causantes de enfermedad entérica encontramos: *E. coli* enteropatogénica (EPEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli*

enteroagregativa (EAEC), *E. coli* productora de toxina Shiga (STEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), y *E. coli* de adherencia difusa (DAEC) (Jesser & Levy., 2024, Molina et al., 2024).

Gran parte de los factores de virulencia que encontramos en dichos virotipos se encuentran codificados en elementos genéticos móviles, resultantes de la transferencia horizontal de ADN entre procariotas. Estos elementos genéticos móviles pueden ser transposones, secuencias de inserción, bacteriófagos o plásmidos, los cuales pueden existir integrados al cromosoma bacteriano, o autorreplicándose dentro del huésped, otorgándole nuevos rasgos de adaptación. Las EPEC, y algunas STEC, comparten un grupo de genes en una isla de patogenicidad cromosómica llamada Locus de adherencia y borramiento de enterocitos (LEE, por su sigla en inglés *The Locus of Enterocyte Effacement*) (Croxen et al., 2013). Una isla de patogenicidad es un subconjunto de genes de virulencia que pueden encontrarse en bacterias patógenas y contribuyen en la virulencia y patogenicidad de quienes los portan (Vélez et al., 2023). LEE es responsable del fenotipo de adhesión y borramiento (A/E) en EPEC y STEC. Las lesiones A/E generadas en las microvellosidades de los enterocitos se producen por la acumulación de actina filamentosa en la unión bacteria/enterocito. El principal factor de virulencia responsable de este fenotipo es la intimina, una adhesina codificada por el gen *eae*, presente en la isla de patogenicidad LEE, la cual al interactuar con la célula del hospedero produce cambios en la dinámica funcional de la actina y otros procesos celulares, favoreciendo la interacción con la bacteria y la producción de la lesión (Croxen et al., 2013). Algunos autores proponen que, en función de la presencia o ausencia de LEE, las STEC se clasifican como STEC LEE-positivas o STEC LEE-negativas (Steyert et al., 2012; Vélez et al., 2023).

2.3 *E. coli* productora de toxina Shiga (STEC):

Las STEC pueden encontrarse en diversas especies de animales de granja y silvestres como cerdos, chancho jabalí, ciervos e incluso en aves, pero su principal reservorio son los bovinos, donde sobrevive sin causar enfermedad en el individuo sano (Alonso et al., 2016). La cantidad de STEC que coloniza el tracto gastrointestinal (TGI) de los bovinos es relativamente baja, representando menos del 0,01 % de la totalidad de *E. coli* en el rumen (Wells et al., 2014), mientras que, en el ciego y la materia fecal, representa entre el 0,1 y el 1% (Callaway et al., 2009). Sin embargo, una baja carga bacteriana, es suficiente para producir infección en humanos (Besser et al., 2001). Además de su persistencia en el tracto gastrointestinal de los animales, STEC tiene la capacidad de sobrevivir viable largos períodos de tiempo en varios ambientes, como el agua, suelo e incluso en raíces (Velez et al., 2023).

Las STEC se propagan por la vía fecal-oral, y tanto bovinos como seres humanos se encuentran expuestos en forma directa mediante el contacto con heces de animales colonizados, en forma

indirecta principalmente a través de agua y alimentos contaminados, o por el contacto persona-persona, animal-animal, animal-persona (Daly & Hint., 2016). También se ha comprobado la propagación a través de vectores como moscas domésticas (*Musca domestica*) (Figura 1) (Berry & Wells., 2010), otros insectos, roedores, y a través del contacto con animales domésticos como perros y gatos (Nielsen et al., 2004; Sapountzis et al., 2020). En este marco, y desde sus primeros reportes, se han presentado en la última década varios brotes en humanos que han sido adjudicados al consumo de alimentos contaminados, principalmente carne mal cocida y productos lácteos, vegetales de hoja y agua contaminados (Vélez et al., 2022).

Se han identificado alrededor de 380 serotipos diferentes de STEC en humanos y animales, pero solo un pequeño grupo produce enfermedad en humanos. El serotipo O157:H7 es uno de los principales responsables de brotes por contaminación alimentaria con STEC (Nguyen et al., 2014).

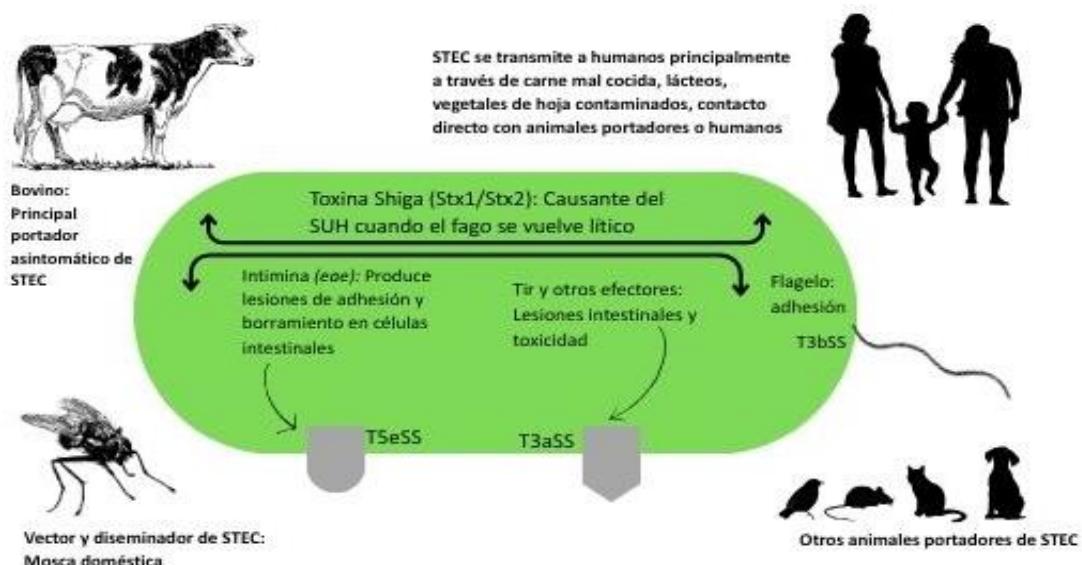


Figura 1. Transmisión a humanos y factores de virulencia de STEC. En el centro se observa una célula STEC con la descripción de sus principales factores de virulencia. Arriba a la izquierda: principal reservorio de STEC (bovino), arriba a la derecha: humano, indicando vías de transmisión ya sea por contaminación alimentaria o contacto con animales portadores y personas infectadas. Abajo: otros vectores de STEC. Modificado de Sapountzis et al., 2020.

STEC fue descripta por primera vez en la década de los '70, al observar que ciertas cepas aisladas de pacientes con enteritis producían lesiones irreversibles en células Vero (línea celular derivada de células de riñón de mono verde africano (*Cercopithecus aethiopicus*)) (Konowalchuk et al., 1977). Debido a esto, las toxinas producidas por STEC inicialmente fueron llamadas Verotoxinas (VT), aunque actualmente se denominan toxinas Shiga "Stx" (Paton & Paton., 1998). Los genes que las codifican se

encuentran en profagos lambdoideos heterogéneos (fagos Stx) que se transfieren de forma horizontal entre bacterias, lo que posiblemente lleve a la diseminación de la capacidad de producir esta toxina entre las *E. coli* (Bai et al., 2018). Consideradas el principal factor de virulencia de STEC, las Stx se clasifican en 2 variantes: Stx1 y Stx2. A su vez, se han descrito subtipos de cada toxina, siendo el grupo de las Stx2 más heterogéneo y prevalente en brotes graves que las Stx1 (Kaper et al., 2004). Las Stx son proteínas de aproximadamente 70 kDa, formadas por dos subunidades principales: A y B (Figura 2) (Melton-Celsa., 2014).



Figura 2. Diagrama de cinta de la estructura cristalina de Stx1. La subunidad B se muestra en naranja (pentámero), y A2 en azul. La mayor parte de A1 se muestra en verde, excepto la región que interactúa con el ribosoma, que se muestra en violeta. Tomada de Melton-Celsa., 2014.

El mecanismo de acción de la toxina comienza cuando la subunidad B se une a su receptor específico, la globotriaosilceramida-3 (Gb3) en la célula eucariota formando un pentámero, para luego ser fagocitada (Figura 3). Una vez dentro de la célula, a través del aparato de Golgi y el retículo endoplásmico rugoso, la toxina es liberada al citosol donde la subunidad A es clivada en A1 y A2. Éstas inhiben la síntesis proteica mediante la actividad ARN N-glucosidasa, que produce la remoción de un residuo de adenina que afecta al ARNr 28S de las células eucariotas, interrumpiendo de esta forma la síntesis proteica y concluyendo en la apoptosis celular (Nguyen & Sperandio, 2012).

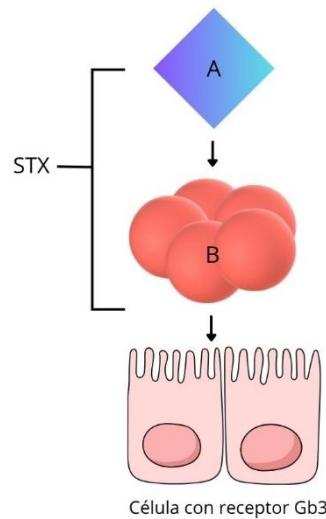


Figura 3. Stx formada por dos subunidades A y B que se unirán al receptor Gb3 ubicado en la célula epitelial. Adaptado de Farfán et al., 2016.

Los tejidos con capacidad de expresar Gb3 varían según el huésped (Karmali et al., 1983), y la capacidad citotóxica de Stx al unirse a Gb3 puede estar presente o no, según la estructura del receptor y su contexto de membrana. En bovinos, la expresión de Gb3 se da en intestino delgado y grueso, donde una vez que la toxina ingresa a la célula, en vez de tomar la ruta retrograda hacia el retículo endoplásmico, reside en los lisosomas, donde generalmente es neutralizada. Por esta razón no causa la misma patología que en humanos (Hoey, 2003). Una vez que STEC logra llegar e ingresar a las células del intestino de los humanos puede producirse el borramiento de los enterocitos si la cepa porta la isla de patogenicidad LEE (STEC LEE-positiva). Las lesiones A/E generadas en las microvellosidades de los enterocitos se producen por la acumulación de actina filamentosa en la unión bacteria/enterocito. Esta lesión resulta en diarrea sanguinolenta, colitis hemorrágica, necrosis y perforación intestinal (Kaper et al., 2004). De esta manera, a través de dicha herida Stx ingresa al torrente sanguíneo, viajando por el mismo hasta llegar a los riñones, encontrándose con su receptor específico Gb3, donde desencadenara mediante el ingreso a la célula, la interrupción de la síntesis proteica y apoptosis (Kaper et al., 2004). Esta interrupción genera daño a nivel glomerular, y desencadena una insuficiencia renal aguda, trombocitopenia y anemia hemolítica microangiopática, características típicas del Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) (Karmali et al., 1983). Una vez comenzada la diarrea, la patología puede evolucionar a SUH en aproximadamente dos semanas. También se ha visto secuelas a nivel neurológico y cardíaco (Figura 4) (Yun et al., 2023). La acción de esta toxina ha sido demostrada en modelos animales como ratón (Judge et al., 2004) y cerdo (McKee et al., 1995).

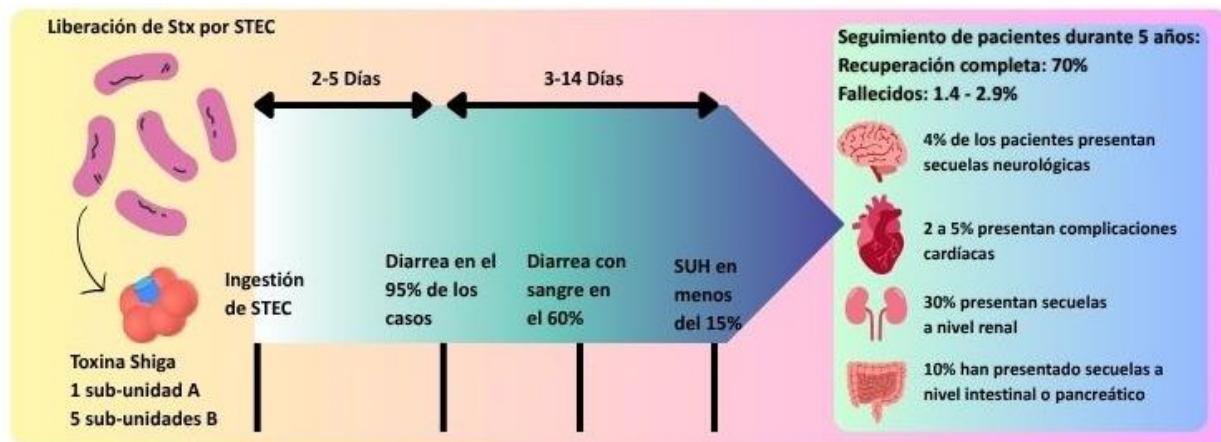


Figura 4. Desarrollo cronológico de la patología producida por STEC/EHEC. Una vez comenzada la diarrea, el SUH puede aparecer dentro de las dos semanas posteriores. En pacientes menores a 5 años también pueden quedar secuelas neurológicas y renales, y complicaciones cardíacas. Adaptado de Yun et al., 2023.

2.4 STEC esporádicas y STEC persistentes:

Recientemente las propiedades de colonización en el intestino bovino, la capacidad de utilizar diferentes metabolitos, así como los niveles de excreción en heces, y la capacidad de resistencia en el ambiente, se han utilizado para agrupar a las cepas de STEC en lo que se conoce como STECper (persistentes) y STECesp (esporádicas). Esta clasificación agrupa como STECper a cepas con serotipos distintos de los que comúnmente están relacionados a infecciones humanas, mientras que las STECesp se asocian mayormente a casos graves en los seres humanos (Barth et al., 2020). Se ha reportado que las cepas STECper pueden aislarse en las heces repetidamente a lo largo de un período de meses, mientras que las STECesp se detectan una única vez, o en pocas instancias en el tiempo. En este sentido, las diferencias en las capacidades de colonización y persistencia de STEC pueden ser explicadas por diferencias ecológicas del nicho donde se encuentran, ya sea una región particular en el hospedador como en el ambiente. Se ha visto que las STECper tienen un perfil especialista, adaptado al nicho en el hospedero; mientras que las STECesp son más generalistas, lo que podría deberse a que tienen un pasaje más rápido por el tracto gastrointestinal bovino y a que deben tener estrategias para sobrevivir más tiempo en el ambiente. Por ejemplo, se determinó que las STECper pierden el ciclo del glioxitato para la síntesis de los carbohidratos que se pueden encontrar en las plantas, mientras que se mantiene en el grupo de las esporádicas. La tolerancia al ácido y al crecimiento en bajas temperaturas también se demuestra diferencial (Barth et al., 2020). Las STECesp presentan una mayor tolerancia a pH bajos, como los que se podría encontrar en el pasaje por el estómago de los humanos en un proceso de infección, así como una mayor producción de biofilm a bajas temperaturas, lo que le conferiría una mayor resistencia fuera del tracto gastrointestinal animal, en el ambiente (Vogeler et al., 2016).

Formación de biofilm, propiedades de adhesión, y hemólisis de STEC:

Los biofilm o biopelículas son poblaciones dinámicas bacterianas que viven adheridas a superficies bióticas o abióticas. Estas comunidades están consolidadas entre si debido a la presencia de agua, polisacáridos extracelulares, ADN extracelular, y proteínas (Flemming & Wingender, 2010). Pueden distinguirse 5 etapas en la formación de los biofilm: 1- unión superficial reversible (unida mediante fuerzas de atracción y repulsión entre las bicapas celulares eléctricas y la superficie), 2- unión irreversible (dada mediante interacciones covalentes entre proteínas de membrana y superficie), 3- formación de microcolonias, 4- maduración, y 5- desprendimiento y dispersión (Schlapp et al., 2011). Las bacterias que logran adherirse de forma irreversible forman microcolonias que sufren cambios genotípicos, produciendo mayor cantidad de exopolisacáridos, y regulación negativa de flagelos. Así, estas microcolonias pueden madurar hasta convertirse en células gruesas incrustadas en la matriz de exopolisacáridos, que finalmente al dispersarse colonizarán nuevas superficies (Castagnini et al., 2024). Los biofilm de STEC en diversas superficies ha sido demostrada, especialmente en lugares donde se procesan alimentos como la carne o productos derivados. Cepas aisladas de diferentes orígenes ya sea de superficies abióticas, alimentos o muestras biológicas (de origen animal o humano), han demostrado tener fuerte capacidad de producir biofilm. El crecimiento de estas comunidades bacterianas es influenciado tanto por la temperatura como por el tiempo transcurrido, sin embargo, diversos estudios demuestran que su capacidad de crecimiento es rápida, por lo que su formación es una peligrosa amenaza para la salud (Ma et al., 2019). Los biofilm constituyen una barrera contra agentes externos, y por lo tanto su producción es una estrategia bacteriana efectiva para sobrevivir en el ambiente. Dentro del biofilm, la bacteria adquiere la capacidad de protegerse ante escenarios adversos como son la falta de nutrientes y presencia de desinfectantes, además de que el propio biofilm le provee de nutrientes. Por esta razón existe gran dificultad de control de la contaminación bacteriana en la industria alimentaria (Vogeleer et al., 2016). Las STEC productoras de biofilm se asocian con la producción de diversas adhesinas, como las fimbrias tipo 1, fimbria curli, fimbrias-P y fimbria F9. Además de las adhesinas, los exopolisacáridos cumplen una función importante para la maduración del biofilm, los cuales son poli- *N* -acetilglucosamina (PGA), celulosa y ácido colánico (Vogeleer et al., 2016). Curli y celulosa forman proyecciones en la superficie de la célula, otorgándole a la biopelícula mayor resistencia mecánica gracias a sus propiedades físicas y de arquitectura. Por la misma razón, estas matrices son más rígidas, viscosas y de menor solubilidad. Curli, además, es importante al momento de la interacción con superficies hostiles y bajas temperaturas, permitiendo la adaptación de STEC a diferentes ambientes (Park & Chen., 2015). Esta adhesina también está implicada en la adherencia de la bacteria al huésped, colaborando con el inicio del proceso infeccioso (Vogeleer et al., 2016).

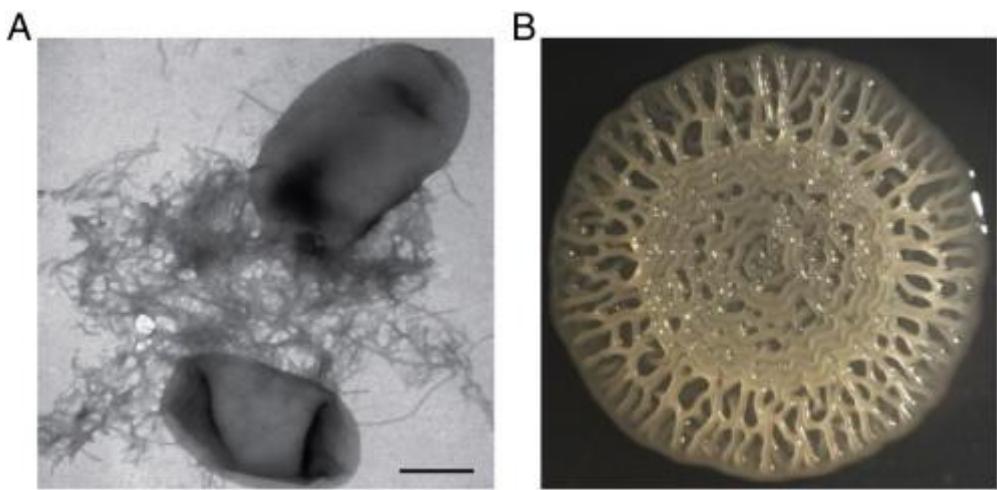


Figura 5. A. Cepa BW25113 de *E. coli* K12 cultivada en agar Rojo Congo con bajo contenido de sal a 26°C. Se observan 2 células y abundancia de fimbrias Curli mediante microscopía electrónica de transmisión (escala de 500 nm). B. Se observa el crecimiento de la cepa uropatógena de *E. coli* UTI89 la cual desarrolla una morfología de colonia rugosa compleja que depende de Curli. (Tomado de Evans et al., 2014).

Otro factor de virulencia de STEC son las hemolisinas, proteínas capaces de destruir las células del hospedero y desencadenar la respuesta inflamatoria, contribuyendo a la patogenia de la enfermedad (Bielaszewska et al., 2014). Se han identificado cuatro tipos de hemolisinas hasta el momento: alfa-hemolisina (codificada por el gen *hlyA*), enterohemolisina transportada por plásmidos y fagos (codificadas por los genes *ehxA* y *e-hlyA* respectivamente) y hemolisina silenciosa (codificada por el gen *sheA*) (Welch, 1991). La enterohemolisina EhxA se asocia con enfermedad diarreica y SUH (Hua et al., 2021), produce lisis de eritrocitos, liberando el grupo hemo que es utilizado por la bacteria como nutriente para su propio crecimiento (Hannaoui & Villalobos., 2009). El gen que la codifica se encuentra en un plásmido de virulencia enterohemorrágico (Lorenz et al., 2013 Hua et al., 2021). Por otro lado, HlyA que se encuentra codificada en una isla de patogenicidad, es producida mayoritariamente en cepas de *E. coli* que producen enfermedad en el tracto urinario (Lorenz et al., 2013). La hemolisina HlyA causa necrosis en los tejidos y facilita la colonización del huésped, afecta diversos tipos celulares por ejemplo glóbulos rojos (GR), fibroblastos, granulocitos, linfocitos y macrófagos (Cavalieri et al., 1982; Cané et al., 2023).

La observación de la hemólisis se puede realizar a través del cultivo de las cepas en medios con agar sangre. La enterohemolisina sólo es detectada en medio con agar sangre de oveja lavada, mientras que la alfa hemolisina puede leerse en medios agar sangre convencional. Dado que la detección de este factor es relativamente sencilla, y está directamente relacionado a la toxina Shiga, se ha utilizado como marcador epidemiológico para la detección de este virotipo (Lorenz et al., 2013).

2.5 Situación epidemiológica regional:

Actualmente STEC causa 2,8 millones de infecciones humanas anuales, con más de 3800 casos de SUH y 230 muertes/año (Galarce et al., 2020). Argentina es el país con mayor incidencia de SUH en niños menores de 5 años a nivel mundial, con 300/400 casos anuales. Por otro lado, en Uruguay y en Brasil la incidencia de SUH es menor. Se estima que en nuestro país ocurren entre 4 o 5 casos cada 100.000 niños (Blanco et al., 2004), detectándose entre 10 y 15 casos nuevos por año aproximadamente (Varela et al., 2008). Los casos de SUH son de denuncia obligatoria ante el MSP en nuestro país (Decreto Nº 41/012), sin embargo, no hay un registro adecuado de los mismos y por ende se estima que existe una sub-detección de casos.

En el Depto. de Microbiología del IIBCE se trabaja en varios aspectos relacionados con la patogenia y resistencia a antibióticos de *E. coli* y la DNT. A partir de estos trabajos se han reportado variantes de STEC no O157:H7 en terneros sanos, enfermos con DNT y también, algo a destacar, asociados a mortalidad de terneros. Estas cepas además presentan un potencial zoonótico que podría poner en riesgo la salud de operarios y población en general (Umpiérrez et al., 2017; 2021; 2022; Fernández et al., 2023). A su vez más recientemente se recuperaron STEC en agua de arroyo y en fecas de animales silvestres circundantes en la zona de Villa Serrana, Lavalleja, aislándose por primera vez en Uruguay STEC del serotipo O157:H7 en una muestra de materia fecal de chancho jabalí (Figueroa et al., 2024).

3- Objetivos:

3.1 Objetivo General:

El objetivo general de este trabajo fue estudiar la expresión de fimbrias, el fenotipo hemolítico y la capacidad de formar biofilm *in vitro* de *Escherichia coli* productora de toxina Shiga que fueron aisladas de muestras intestinales y extraintestinales de terneros neonatos muertos y de terneros neonatos que convivían con los anteriores.

3.2 Objetivos Específicos:

- Determinar la expresión de fimbrias Curli y celulosa *in vitro* en una colección de 22 aislamientos de STEC.
- Evaluar la producción de biofilm de los aislamientos de STEC utilizando la técnica semicuantitativa con Cristal Violeta.
- Determinar fenotipo hemolítico (alfa y beta hemólisis) de los aislamientos.

3.3 Objetivos Académicos:

Adquirir destrezas para el trabajo en un laboratorio de microbiología:

- Manejo de técnica aséptica.
- Desinfección y esterilización de materiales.
- Preparación de medios de cultivo.
- Siembra y cultivo de microorganismos.
- Desarrollo de técnicas *in vitro* particulares, referentes a los objetivos de la presente tesina.
- Capacidad de análisis e interpretación de los resultados obtenidos en base a búsquedas bibliográficas.

4- Materiales y métodos:

4.1 Cepas bacterianas:

En este trabajo se utilizaron 22 aislamientos de STEC obtenidos de necropsias realizadas a terneros neonatos de menos de 35 días de edad, muertos por DNT (origen: intestino, pulmón, linfonódulo mesentérico, cerebro e hígado), de heces de terneros vivos con diarrea y una muestra de heces de un ternero vivo y sano que convivía con uno de los terneros muertos por DNT. Todos los aislamientos fueron colectados en tambos de Colonia y San José y fueron caracterizados entre 2014 y 2021 (Umpiérrez et al., 2021; Fernández et al., 2023) (Tabla 1). Todos ellos se encuentran almacenados en freezer a -80°C, en el cepario del Depto. de Microbiología del IIBCE.

Las cepas seleccionadas se cultivaron rutinariamente en placas de Petri con Triptosa Soya Agar (TSA) a 37°C durante 18-24 horas. Cuando se requirió un cultivo líquido se utilizó el caldo Triptosa Soya (TSB). En todo momento se trabajó en cámara de flujo laminar, aplicando la técnica aséptica.

Tabla 1. Aislamientos de STEC utilizados en este trabajo. Se indica el animal, su sintomatología, origen de la muestra (órganos o materia fecal) y año de cada aislamiento. También perfil de virulencia, virotipo, subtipo de toxina Stx, serogrupo, y perfil de resistencia antimicrobiana. Datos tomados de Umpiérrez et al., 2021; 2022, Fernández et al., 2023).

Animal	Estado	Aislamiento	Origen	Año	Perfil de virulencia	Virotipo	Stx	Serogrupo	Perfil de resistencia
1	Muerto	18.16	MF	2015	<i>eae/stx1/ehxA/cnf1/iucD</i>	STEC/NTEC	a y c	n/d	AMP/GEN/STR
		21.16	MF	2015	<i>eae/stx1/ehxA</i>	STEC	a y c	n/d	AMP/GEN/TOB/STR
		16.16	MF	2015	<i>eae/stx1/cnf1/iucD</i>	STEC/NTEC	a y c	n/d	AMP/GEN/STR
2	Muerto	MBF5.5	Intestino	2017	<i>eae/stx1/ehxA/iucD</i>	STEC	a y c	n/d	AMP/NAL/ENR/CIP/STR
		MBG5.2	Intestino	2017	<i>eae/stx1/ehxA/iucD</i>	STEC	a y c	n/d	AMP/AMC/CMX/NAL/ENR/CIP/STR
3	Muerto	MBG7.1	Pulmón	2017	<i>eae/stx1/ehxA/iucD</i>	STEC	a y c	n/d	AMP/NAL/ENR/CIP
		MBG10	LNM	2017	<i>eae/stx1/ehxA/iucD</i>	STEC	a y c	n/d	AMP/CXM/NAL/ENR/CIP/STR
4	Muerto	MBH11.2	MF	2017	<i>eae/stx1/ehxA/iucD</i>	STEC	a y c	O111	AMP/AMC/CXM/NAL/ENR/CIP/STR
		MBO 0.1	MF	2017	<i>eae/stx1/ehxA/iucD</i>	STEC	a y c	O111	AMP/CRO/NAL/CIP/STR
		MBO 0.3	MF	2017	<i>eae/stx1/ehxA/iucD/afa8E</i>	STEC	a y c	O111	AMP/AMC/NAL/ENR/CIP/GEN/TOB/STR/STX
		MBO 3.1	Cerebro	2017	<i>eae/stx1/ehxA/iucD</i>	STEC	a y c	O111	AMP/NAL/CIP/STR
5	Muerto	MBO 3.4	Cerebro	2017	<i>eae/stx1/ehxA/iucD/afa8E</i>	STEC	a y c	O111	AMP/NAL/ENR/CIP/GEN/TOB/STR
		MBO 3.6	Cerebro	2017	<i>eae/stx1/iucD/afa8E</i>	STEC	a y c	O111	AMP/NAL/ENR/CIP/GEN/TOB/STR
		MBO 6.2	Hígado	2017	<i>eae/stx1/ehxA/iucD</i>	STEC	a y c	O111	AMP/NAL/CIP/STR
		MBO 7.1	Pulmón	2017	<i>eae/stx1/ehxA/iucD</i>	STEC	n/d	O111	AMP/NAL/CIP/STR
		MBO 7.3	Pulmón	2017	<i>Stx1/ehxA/iucD</i>	STEC	a y c	O111	AMP/NAL/ENR/CIP/STR/STX
6	Muerto	MBP 11.1	MF	2017	<i>eae/stx1/ehxA</i>	STEC	a y c	O111	AMP/NAL/ENR/CIP/STR/STX
7	Sano*	MBPb 5.1	MF	2017	<i>eae/stx1/ehxA</i>	STEC	a y c	O111	AMP/NAL/ENR/CIP/STR/STX
8	DNT	74.1	MF	2014	<i>eae/stx1</i>	STEC	a	O111	Sensible
9	DNT	AG 2.1	MF	2016	<i>eae/stx2</i>	STEC	a	n/d	FOT
		BJ1.3	MF	2017	<i>eae/stx1/stx2</i>	STEC	a/ /e	O103	Sensible
10	DNT	BJ1.5	MF	2017	<i>eae/stx1/stx2</i>	STEC	a y c / /e	O103	AMP

*Convivía con animal 6. MF: Materia fecal. NTEC: *E. coli* necrotoxigénica. AMP: ampicilina. CXM: cefuroxima. CAZ: ceftazidima. CRO: ceftriaxona. NAL: ácido nalidíxico. CIP: ciprofloxacina. ENR: enrofloxacina. GEN: gentamicina. AK: amikacina. STR: estreptomicina. STX: trimetoprim-sulfametoazol. FOT: fosfomicina-trometamol. TOB: tobramicina.

4.2 Detección de fimbrias Curli y celulosa:

Para estudiar la expresión de las fimbrias Curli y celulosa *in vitro*, los aislamientos de STEC se cultivaron en caldo LbnoS (0,9% Triptona, 0,4% extracto de levadura) durante 24 h a 37°C. Transcurrido el tiempo de incubación se sembró 5 µL de cada cultivo fresco en placas de agar LbnoS y LbnoS conteniendo 40µg/mL de colorante rojo Congo. Cada aislamiento se sembró por triplicado y se incubó durante 48 h a 20°C y 30°C, y durante 24 h a 37°C (Barth et al., 2020).

Transcurrido el tiempo de incubación se analizaron macroscópicamente las colonias para observar su consistencia, color y patrones de crecimiento. Las cepas que expresan Curli son capaces de unirse al colorante rojo Congo y se tiñen de marrón, las cepas que producen celulosa son rosadas y las cepas que producen ambas fimbrias exhiben el fenotipo Rdar (del inglés rojo, secas y rugosas) (Barth et al., 2020). Según los patrones de crecimiento las cepas que expresan celulosa + Curli crecen en forma de red, las que expresan Curli crecen en forma de anillos, y las negativas para ambas, son blancas y lisas (Cáceres et al., 2019). Para la caracterización, las cepas se agruparon según el fenotipo en: Rdar (positivas para Curli y celulosa): Rojo, secas y rugosas; Bdar (positivas para Curli): marrones y lisas; Pdar (positivas para celulosa): rosadas y lisas; Saw (negativa para Curli y celulosa): blancas y lisas (Sabalza., 2014).

4.3 Formación de biofilm *in vitro*:

Para estudiar la capacidad de los aislamientos de STEC de adherirse a superficies abioticas se utilizó la técnica semicuantitativa de tinción con Cristal Violeta (CV) descrita por O'Toole (O'Toole et al., 2000) con algunas modificaciones (Scavone et al., 2016). Para comenzar el ensayo, cada aislamiento de STEC se sembró en 8 mL de medio TSB y se incubó a 37°C durante 24 h de forma estática. Transcurrido el tiempo de incubación se midió la concentración con espectrofotómetro a 600 nm y se ajustó la misma a 0,9 nm. Una vez ajustadas las concentraciones, una dilución 1/10 de cada cultivo se sembró por cuadruplicado en placas de microtitulación (20 µL cultivo + 180 µL de caldo TSB). En cada placa se incluyeron 4 pocillos “Blanco” sin sembrar, conteniendo 200 µL de caldo TSB. Este esquema de siembra se repitió en 3 placas, y cada una se incubó a 20°C, 30°C, y 37°C durante 48 h, de forma estática.

Transcurridas las 48 h el medio de cultivo fue removido, teniendo la precaución de no levantar el biofilm. Cada pocillo fue lavado 3 veces con PBS (200 µL) y las bacterias que quedaron adheridas al pocillo fueron teñidas con 200 µL de solución de Cristal Violeta 0,1% durante 15 minutos. El exceso de colorante fue retirado con lavados de PBS hasta que no saliera más color.

A continuación, el Cristal Violeta fue solubilizado agregando a cada pocillo etanol 95%, (2 minutos en agitación suave para ayudar al desprendimiento del biofilm) y se midió la absorbancia a 590 nm en espectrofotómetro Varioskan del IIBCE. Para la interpretación de resultados utilizamos lo propuesto por Ángel Villegas y colaboradores (2013): No productor de biofilm DO (densidad óptica) \leq DO control (DOc). Débil productor de biofilm (DOc) $<$ DO \leq (2xDOc). Moderado productor de biofilm (2xDOc) $<$ DO \leq (4xDOc). Fuerte productor de biofilm (4xDOc) $<$ DO.

4.4 Determinación del fenotipo hemolítico: alfa y beta hemólisis:

Las cepas de STEC se sembraron en placas de medio de cultivo TSA durante 24 h a 37°C para luego cultivarlas en caldo TSB durante 24 h a 37°C. A partir de los cultivos en caldo se sembró una ansada (con perforación del medio de cultivo) en placas de agar sangre (AS).

Para preparar las placas de AS se centrifugaron 10 mL de sangre ovina estéril a 2500 rpm durante 10 min a 10°C (en 2 tubos conteniendo 5 mL cada uno) y se descartó el sobrenadante. Seguidamente se lavaron los pellets conteniendo los eritrocitos agregando igual volumen de PBS estéril y agitando suavemente para evitar lisar los mismos. Este paso se repitió 3 veces. Los eritrocitos lavados se suspendieron en 5 mL de PBS estéril y se agregaron a un matraz con agar TSA fundido y termostatizado para repartir en placas de Petri.

Para observar la beta hemolisis resultante de la expresión de HylA, se realizó una primera lectura a las 3 h post-siembra. La segunda lectura se efectuó a las 18 h para observar alfa hemolisis resultante de la expresión de la enterohemolisina EhxA (Lorenz et al., 2013).

Análisis estadísticos:

Para comparar los niveles de expresión de las hemolisinas EhxA y HylA a las distintas temperaturas ensayadas se utilizó el test estadístico no paramétrico de Mann-Whitney con el programa PAST 4.03 (Hammer., 2023). Se consideró significativo un valor de $p < 0,05$.

5- Resultados:

5.1 Detección de fimbrias Curli y celulosa:

En el ensayo de expresión de fimbrias en agar LbnoS se observó la producción de Curli (Bdar), celulosa (Pdar) y ambas en simultáneo (Rdar) a las 3 temperaturas ensayadas. A 20°C, 91% (20/22) de las STEC expresaron algún tipo de fimbria, 45,5% (10/22) la forma Pdar y 41% (9/22) la forma Bdar. Sólo el 4,5% (1/22) de STEC fue de fenotipo Rdar a 20°C. Este perfil se invirtió en los ensayos a temperaturas más elevadas. A 30°C, el 77,7% (17/22) de las STEC fueron de fenotipo mixto Rdar, mientras que 18,2% (4/22) y 4,5% (1/22) presentaron fenotipo Bdar y Pdar respectivamente. A 37°C el fenotipo mixto siguió siendo el más representado, con 54,5% (12/22) de las STEC, seguido por el fenotipo Bdar en 45,5% (10/22) de las STEC. Solo el 9,1% (2/22) de las cepas analizadas (16.16 y MBO6.2) no expresaron fimbrias Curli ni celulosa a 20°C (ver Figura 5). Los resultados fueron registrados fotográficamente (Figura 6).

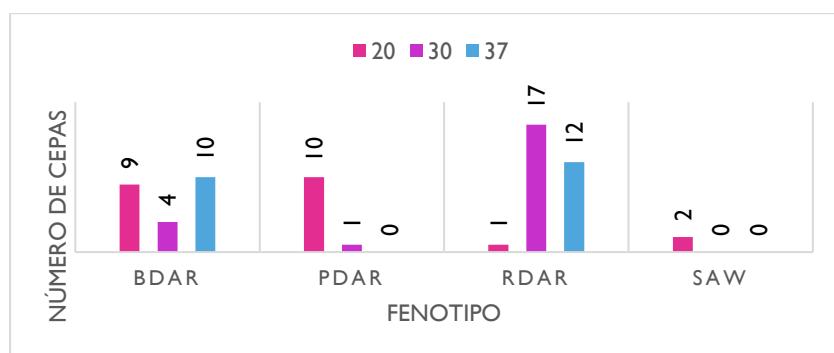


Figura 5. Resultados de fenotipos Bdar, Pdar, Rdar, y Saw a 20°C, 30°C, 37°C incubadas entre 24 a 48 h.

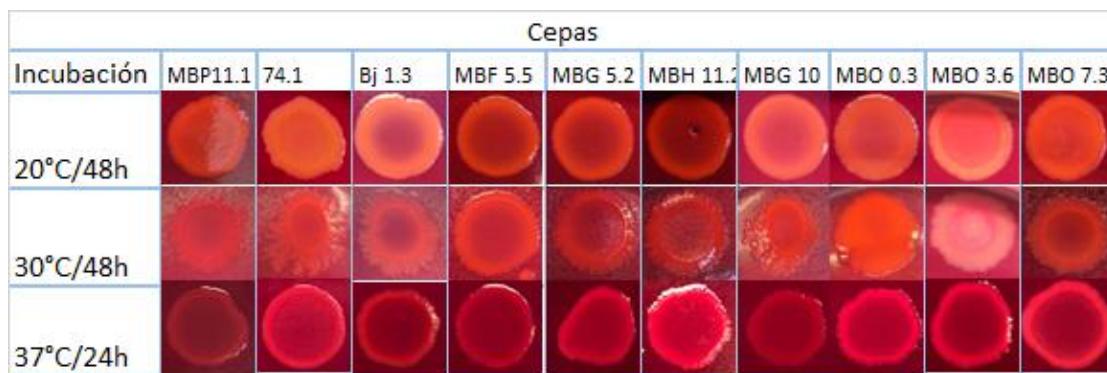
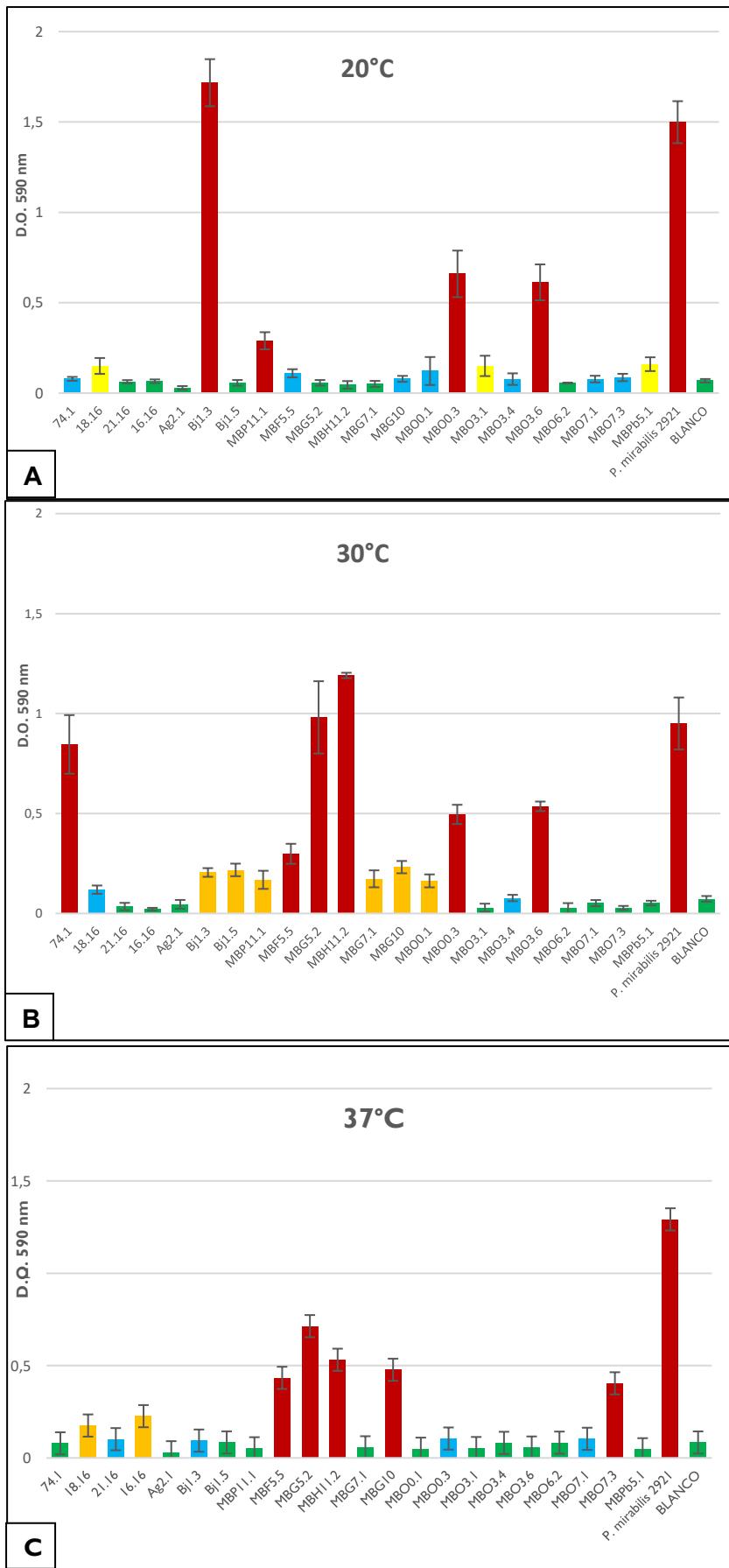


Figura 6. Expresión de Curli y celulosa en agar LbnoS RC a diferentes temperaturas (20°C, 30°C y 37°C). Lectura y captura fotográfica a 24 y 48 h. Se muestra una selección de las cepas.

5.2 Producción de biofilm:

Se observó variabilidad en la capacidad de formar biofilm entre cepas. El 77% de las cepas (17/22) formaron biofilm de algún grado (fuerte o moderado). Algunas cepas fueron fuertes formadoras a más de una temperatura: MBF5.5, MBG5.2, y MBH11.2 fueron fuertes formadoras de biofilm a 30°C y 37°C mientras que MBO0.3 y MBO3,6 a 20°C y 30°C. Otras cepas sólo produjeron fuerte biofilm a una única temperatura: la cepa 74.1 formó fuerte biofilm a 30°C mientras que la cepa MBO7.33 a 37°C. Por otra parte, las siguientes cepas formaron biofilm en cantidad moderada: la cepa 16.16 a 37°C, las cepas Bj1.5, MBG7.1 y MBO0.1 a 30°C, y MBO3.1, MBPb5.1 y 18.16 a 20°C y a 37°C. Asimismo, las cepas MBP11.1 y Bj1.3 formaron biofilm de forma moderada a 30°C, pero además fuerte a 20°C, mientras que la cepa MBG10 fue fuerte formadora a 37°C y moderada a 30°C. El 23% de las cepas (4/22) no formaron biofilm o lo hicieron de forma débil (AG2.1, 21.16, MBO3.4, MBO6.2, y MBO7.1) (Ver figura 7).



5.3 Determinación del fenotipo hemolítico: alfa y beta hemólisis:

La expresión de hemolisina HylA la cual produce beta hemólisis, es nula a 20°C para todos los aislamientos. A 30°C 9.1% (2/22) fueron positivos para HylA. Mientras que a 37°C se ve un aumento, donde muchas cepas expresan esta hemolisina llegando al 59.1% (13/22). EhxA, que produce alfa hemólisis, es expresada a las tres temperaturas, en mayor cantidad a 30°C: 45.5% (10/22), y en el 18.2% (4/22) de las cepas tanto a 20°C como a 37°C (Tabla 2).

Tabla 2. Fenotipo hemolítico (alfa y beta hemolysis) de cepas de STEC a 20, 30, y 37°C.

CEPAS	20°C		30°C		37°C	
	EhxA	HylA	EhxA	HylA	EhxA	HylA
1 74.1			+			+
2 18.16	+			+		++
3 21.16	+		+			++
4 16.16			+			+
5 Ag 2.1			+		+	
6 BJ 1.3	+		+			+
7 BJ 1.5	+		+	+		+
8 MBP 11.1			+			+
9 MBF 5.5			+			+
10 MBG 5.2			+			+
11 MBH 11.2						+
12 MBG 7.1						
13 MBG 10						+
14 MBO 0.1						
15 MBO 0.3						+
16 MBO 3.1						
17 MBO 3.4						
18 MBO 3.6						
19 MBO 6.2					+	
20 MBO 7.1					+	
21 MBO 7.3					+	
22 MBPb 5.1			+			+

+ (Hemólisis); ++ (Hemólisis fuerte).

En el caso de la hemolisina EhxA se observó una tendencia, marginal, a que se exprese más a 30°C que a 20°C o 37°C ($p=0.057$ en cada caso). Por otro lado, la hemolisina HylA se expresó significativamente más a 37°C que a 20°C ($p=2.32E-05$) y que a 30°C ($p=0.58E-03$).

6 – Discusión:

E. coli productora de toxina Shiga es un bacilo Gram negativo anaerobio facultativo de la familia *Enterobacteriaceae*. STEC es un virotipo enterohemorrágico (Lai et al., 2013), caracterizado por producir lesiones a nivel de las células intestinales humanas, pudiendo llegar a ocasionar daño a nivel glomerular desencadenando una insuficiencia renal aguda, trombocitopenia y anemia hemolítica microangiopática, características del SUH (Karmali et al., 1983).

Se han utilizado algunas características fenotípicas para agrupar a las STEC en dos grupos: STECper (persistentes) y STECesp (esporádicas). Esta clasificación agrupa como STECper a cepas con serotipos distintos de los que comúnmente están relacionados a infecciones humanas, mientras que las STECesp se asociarían mayormente a casos graves en los seres humanos (Barth et al., 2020).

En este trabajo se estudió la expresión de fimbrias Curli y celulosa, la capacidad de formar biofilm *in vitro* y el fenotipo hemolítico de 22 cepas de STEC, a diferentes temperaturas, que fueron aisladas de muestras intestinales y extraintestinales de terneros neonatos muertos, terneros neonatos con DNT, y un ternero sano.

6.1 La temperatura de cultivo influyó en la expresión de fimbrias Curli y celulosa en STEC.

Se pudo observar que la temperatura influyó en estos aislados para la expresión tanto de Curli como de celulosa. El fenotipo Rdar se vió mayoritariamente a 30°C, y a 37°C, mientras que a 20°C sólo se manifestó en 1 cepa.

Casi todas las cepas fueron capaces de expresar fimbria Curli en al menos una de las condiciones de temperatura, concordando con los resultados de Vogelee y colaboradores (2016). En sus resultados, el 61,5% de las cepas fueron capaces de unirse al colorante a 30°C, y 92,3% a 37°C, esto se asemeja de forma parcial con los resultados obtenidos en nuestro estudio, ya que la unión a RC se dio en 77,7% para fenotipo mixto Rdar, mientras que 18,2% para Bdar, dando un total de 95,9% a 30°C, mientras que a 37°C 54,5% de las STEC expresaron el fenotipo Rdar y 45,5% el Bdar, dando la totalidad del 100% de las cepas. Vogelee y colaboradores (2016) no discriminan en su ensayo según la morfología de las colonias, y toman sus resultados como positivos tanto para Curli y celulosa. Para confirmar la producción de polisacáridos (incluyendo la celulosa), utilizan un ensayo con Canconflúor, los cuales no son comparables con nuestro estudio por ser un método diferente.

En la tesis de Cáceres y colaboradores (2019), se estudió la expresión de fimbria Curli en diferentes etapas de formación de biofilm. Se estudió el fenotipo de 16 cepas (STEC y aEPEC) a 28°C y a temperatura ambiente ($\approx 20^\circ\text{C}$). En la mayoría de ellas las cepas se unieron al colorante, dando una totalidad del 75%. En este caso se observa una diferencia importante con respecto a los resultados obtenidos en nuestros ensayos, ya que a 20°C sólo 4,5% de las cepas expresó el fenotipo Rdar, y 40,9% cepas el Bdar, dando un total de 45,4% de bacterias que expresaron Curli y lograron unirse al colorante. Podemos suponer que esta diferencia se debe a que los cultivos fueron cambiados de 28°C a temperatura ambiente de 20°C aproximadamente, ya que a partir de ese momento cambiaron su fenotipo. Quizás el cambio de temperatura dentro de un mismo cultivo sólido actuó como un factor importante de estrés para la célula y desató un mecanismo de defensa.

Por otra parte, en el artículo publicado por Barth y colaboradores (2020), se analizaron 28 cepas de STEC y sus experimentos dieron como resultado que el fenotipo Rdar predomina a 20 o 28 °C. Coinciendo de forma parcial con nuestros resultados.

Por lo expuesto, podemos observar que la fimbria Curli por si sola o en conjunto con la celulosa se expresa tanto a temperatura ambiente como a la temperatura del hospedero. Coinciendo con los tres trabajos expuestos anteriormente. Pero existe una diferencia en la expresión de celulosa. Cabe suponer que, nuestros ensayos podrían complementarse con la adición de un ensayo con canconflúor para la detección de celulosa, y, además, podría utilizarse el cambio de temperatura de un mismo cultivo de LBnS + RC. Otro detalle para considerar es que no utilizamos el colorante azul brillante de Coomassie, como si lo hicieron tanto Cáceres y colaboradores (2019) como Barth y colaboradores (2020), lo que pudo generar algún tipo de contraste en la interpretación de los resultados. Sin embargo, lo expuesto en esta tesis estaría en concordancia con la teoría de la importancia tanto de la fimbria Curli, como de la celulosa en la adaptación de STEC a diversos nichos.

6.2 La capacidad de formar biofilm a diferentes temperaturas, es muy diversa.

La formación de biofilm provee a las bacterias de un mecanismo de protección ante escenarios adversos como son la falta de nutrientes y presencia de desinfectantes. Por esta razón existe gran dificultad de control de la contaminación bacteriana en la industria alimentaria (Vogelee et al., 2016). Además, se ha visto que el biofilm también se da como un agregado celular dentro del huésped sin necesidad de una superficie abiótica, por lo que es importante identificar las bacterias que tienen esta capacidad, para comprender su función en la patología (Sauer et al., 2022).

En nuestros resultados pudimos observar que las cepas se comportaron de forma diversa en cada temperatura de incubación. Algunas cepas fueron fuertes formadoras de biofilm solo a una temperatura, otras lo hicieron en dos temperaturas distintas y otras no formaron biofilm en ninguna de las situaciones.

Los resultados obtenidos en esta tesis coinciden parcialmente con los alcanzados por Vogebeer y colaboradores (2016) quienes sugieren que la formación de biofilm podría contribuir a la resistencia de STEC en el medio ambiente.

Cáceres y colaboradores (2019) propone que la temperatura es una variable importante para el crecimiento del biofilm en diferentes superficies, viéndose favorecido por temperaturas cercanas a la del hospedero. Estos resultados no están totalmente en línea con los nuestros, ya que nuestras cepas tuvieron una capacidad formadora de biofilm variable, y no sólo a 37°C.

En los experimentos realizados por Barth y colaboradores (2020), analizan la formación de biofilm agrupando las cepas en esporádicas y persistentes. Así, puede verse que las cepas esporádicas formaron biofilm a temperaturas más cercanas a las ambientales, y las persistentes, a 37°C. A su vez, analizaron la expresión de Curli y celulosa, solo en las cepas formadoras de biofilm, donde pudo observarse que, algunas de ellas, expresaron estos fenotipos, concordando con nuestros resultados. En nuestro trabajo no se pudo establecer una relación entre la producción de biofilm y la expresión de Curli o celulosa, ya que 5 cepas que sí habían expresado la fimbria o el polisacárido en alguna de las temperaturas cuando crecieron en agar RC, no formaron biofilm. Mientras que a 20°C sólo 1 cepa fuerte formadora de biofilm y 3 moderadas habían expresado Curli, y 3 de las cepas fuertes no habían expresado ni la fimbria ni el polisacárido. A 30°C, 3 cepas fuertes y 4 moderadas expresaron tanto Curli como celulosa, mientras que 1 fuerte y 2 moderadas expresaron solo Curli. A 37°C 4 cepas fuertes y las 2 moderadas expresaron solo Curli, y solo MBG10 (fuerte) expresó ambos. La mayoría de las cepas que produjeron biofilm a 30°C, además de producir Curli, también tuvieron la capacidad de producir celulosa en el ensayo de RC. Podríamos suponer que esto se debe a que las temperaturas ambientales medianamente altas, como las que se dan en nuestro país en las estaciones de primavera y otoño, inducen a la bacteria a expresar este fenotipo, mejorando así la capacidad de supervivencia en estos ambientes.

Curli también estuvo presente en todas las cepas que formaron biofilm tanto de forma fuerte como moderada a 37°C y en la mayoría a 20°C. Esto puede indicar que cumple un papel importante tanto en la supervivencia en el ambiente, como en la interacción hospedero-patógeno. Sin embargo, no logramos asegurar que sea esencial, ya que 3 fuertes formadoras de biofilm, no lo expresaron a 20°C.

Teniendo en cuenta lo mencionado anteriormente, podríamos decir que las cepas que produjeron biofilm a 20°C y 30°C podrían estar mejor adaptadas a sobrevivir fuera del hospedero, como lo hacen las cepas esporádicas. Las cepas Bj1.3 (aislada de un ternero con DNT), MBP11.1, MBO0.3, y MBO3.6 (aisladas de MF u órganos de animales muertos) fueron capaces de producirlo tanto a 20°C como a 30°C, ya sea de forma fuerte o moderada, se puede considerar agruparlas en posibles STECesp. A su vez, se observó que las cepas que formaron biofilm a 37°C, produjeron sólo Curli en el ensayo de RC, por lo tanto, estas cepas, estarían mejor adaptadas al ambiente dentro del hospedero, y se puede suponer que utilizarían la fimbria Curli para favorecer la adhesión de STEC a los tejidos. Curiosamente, la cepa aislada del ternero sano apenas presentó una capacidad moderada de producir biofilm sólo a 20°C. Nuestros resultados podrían indicar que la presencia de Curli y celulosa, no siempre es un requisito para la formación de biofilm. Además, ya que se expresan también en cepas que no producen biofilm, podemos suponer que cumplen otras funciones más allá de la estructural. A su vez, debemos considerar que el biofilm generalmente está formado por comunidades bacterianas, dónde pueden existir diferentes cepas de una especie, o incluso especies diferentes, por lo tanto, la variabilidad en la formación de biofilm y su composición, podrían bien, ser una adaptación de las STEC para sobrevivir en conjunto, tanto en el ambiente como en el hospedero, esto explicaría porque algunas cepas, no expresaron ni Curli ni celulosa, pero si tienen capacidad de formar biofilm con otros componentes.

6.3 Capacidad de STEC de expresar hemolisinas.

Las hemolisinas son proteínas capaces de destruir las células del hospedero y desencadenar la respuesta inflamatoria, contribuyendo a la patogenia de la enfermedad (Bielaszewska et al., 2014, Hua et al., 2021). La enterohemolisina EhxA se asocia con enfermedad diarreica y SUH, produce lisis de eritrocitos, liberando el grupo hemo que es utilizado por la bacteria como nutriente para su propio crecimiento (Hannaoui et al., 2009). La hemolisina HylA causa necrosis en los tejidos y facilita la colonización del huésped, afecta diversos tipos celulares por ejemplo glóbulos rojos (GR), fibroblastos, granulocitos, linfocitos y macrófagos (Cavalieri et al., 1982, Cané et al., 2023).

En la Tabla 1 se encuentran los perfiles de virulencia para las 22 cepas estudiadas, el 68.2% (15/22) presentan el gen *ehxA* codificante para la enterohemolisina, la cual produce alfa hemólisis. El 63,6% (14/22) de las cepas lograron expresar este fenotipo en alguna de las 3 temperaturas, sin embargo, solo el 18,2% (4/22) pudieron expresarla a 37°C (temperatura del hospedero). Según el análisis estadístico realizado, EhxA se expresa más a 30°C que a 20°C o 37°C. Esto puede deberse a las condiciones de cultivo, o a la regulación génica de STEC. Los resultados obtenidos *in vitro*, no siempre reflejan la actividad de la bacteria *in vivo*. Es necesario complementar el análisis de dicha hemolisina con experimentos que impliquen su actividad en seres vivos. Como se mencionó anteriormente, la

enterohemolisina es considerada un factor importante en la patología del SUH, por lo tanto, podemos decir que las cepas que efectivamente lograron expresar dicha hemolisina a 37°C son potencialmente peligrosas para el ser humano. De estas cepas, sólo una tuvo la capacidad de formar biofilm a 37°C, y produjo Curli en esta temperatura. Esta cepa (MBO 7.3), fue aislada del pulmón de un animal muerto. Es evidente que esta cepa pudo ser una de las causas etiológicas del fallecimiento del animal.

La actividad de HylA fue detectada en 59,1% (13/22) de las STEC a 37°C, obteniéndose una diferencia significativa con respecto a la expresión a 20°C y 30°C. Esto podría señalar una adaptación de las STEC para producir esta hemolisina a la temperatura del hospedero, favoreciendo la patología. Además, hubo 2 cepas que también la expresaron a 30°C. Como mencionamos anteriormente, esta hemolisina cumple un papel importante en las infecciones del tracto urinario, pero afecta también otro conjunto de células, por lo tanto, no podemos descartar que también tenga importancia en la patología del SUH. Es necesario profundizar en la investigación de HylA para conocer si tiene alguna función específica en dicha patología, además de la lisis de ciertos tipos celulares.

En el trabajo de Lorenz y colaboradores (2013) se analizaron 435 cepas de STEC a 37°C, y la alfa hemólisis se observó en el 69,2% (301/435) de las cepas de STEC. En nuestro ensayo sólo 2,8% (4/22) fueron alfa hemolíticas, difiriendo notablemente con esos resultados.

De igual manera, los resultados obtenidos por Miko y colaboradores (2014) tampoco coinciden con los nuestros, ya que todas las cepas que poseían el gen *ehxA* produjeron enterohemolisina y ninguna cepa produjo HylA. Ellos utilizaron métodos similares de cultivo, donde se analizaron 74 cepas de STEC. Sin embargo, las cepas fueron de orígenes muy diversos, lo que podría explicar la notable diferencia con nuestros resultados.

Los estudios mencionados anteriormente no analizan la expresión de hemolisinas en otras temperaturas además de 37°C. Los resultados obtenidos aquí reflejan la capacidad de las hemolisinas de producirse en temperaturas más bajas. Es interesante suponer que podrían tener funciones adaptativas en el medio fuera del hospedero, que contribuyan a su supervivencia, sin embargo, se requieren más estudios sobre el tema.

7– Conclusiones y perspectivas:

En el presente trabajo determinamos que la expresión de Curli y celulosa no siempre está asociada a la producción de biofilm, y puede expresarse a varias temperaturas siendo favorecido el fenotipo Rdar por temperaturas medianamente altas (30°C). Es necesario complementar estos ensayos con otros métodos de confirmación, como por ejemplo el de Canconflúor.

En cuanto a la formación de biofilm, pudimos observar que la temperatura es una condición significativa a la hora de su producción *in vitro*, y que el crecimiento bacteriano puede verse condicionado por dicho factor.

Por otro lado, la presencia del gen codificante para EhxA no siempre asegura su expresión, esto puede deberse a las condiciones específicas del ambiente o a la regulación génica de la bacteria. A su vez, demostramos que esta hemolisina se expresa más a 30°C que a 37°C. Mientras que la hemolisina HylA podría cumplir un papel importante en la patología del SUH, ya que fue expresada mayoritariamente a 37°C (temperatura del hospedero).

Finalmente, dado que las hemolisinas EhxA e HylA también pueden ser expresadas a bajas temperaturas, es necesario realizar estudios complementarios para poder comprender el papel que cumplen dichas proteínas en la adaptación de STEC a diferentes nichos.

8 - Bibliografía

- Angel Villegas, N., Baronetti, J., Albesa, I., Polifroni, R., Parma, A., Etcheverría, A., ... & Paraje, M. (2013). Relevance of biofilms in the pathogenesis of shiga-toxin-producing *Escherichia coli* infection. *The scientific world journal*, 2013(1), 607258.
- Alonso, M. Z., Krüger, A., Sanz, M. E., Padola, N. L., & Lucchesi, P. (2016). Serotipos, perfiles de virulencia y subtipos de *Stx* en *Escherichia coli* productor de toxina Shiga aislados de productos de pollo. *Revista argentina de microbiología*, 48(4), 325-328.
- Bai, X., Fu, S., Zhang, J., Fan, R., Xu, Y., Sun, H., ... & Xiong, Y. (2018). Identification and pathogenomic analysis of an *Escherichia coli* strain producing a novel Shiga toxin 2 subtype. *Scientific Reports*, 8(1), 6756.
- Barth, S. A., Weber, M., Schaufler, K., Berens, C., Geue, L., & Menge, C. (2020). Metabolic traits of bovine Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains with different colonization properties. *Toxins*, 12(6), 414.
- Berry, E. D., & Wells, J. E. (2010). *Escherichia coli* O157: H7: recent advances in research on occurrence, transmission, and control in cattle and the production environment. *Advances in food and nutrition research*, 60, 67-117.
- Bielaszewska, M., Aldick, T., Bauwens, A. y Karch, H. (2014). Hemolisina de *Escherichia coli* enterohemorrágica: estructura, transporte, actividad biológica y supuesto papel en la virulencia. *Revista Internacional de Microbiología Médica*, 304 (5-6), 521-529.
- Besser, T. E., Richards, B. L., Rice, D. H., & Hancock, D. D. (2001). *Escherichia coli* O157 [ratio] H7 infection of calves: infectious dose and direct contact transmission. *Epidemiology & Infection*, 127(3), 555-560.
- Blanco, M., Padola, N. L., Krüger, A., Sanz, M. E., Blanco, J. E., González, E. A., ... & Blanco, J. (2004). Virulence genes and intimin types of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle and beef products in Argentina. *International Microbiology*, 7(4), 269-276.
- Cáceres, M. E., Etcheverría, A. I., & Padola, N. L. (2019). Effects of the culture medium and the methodology applied on the biofilm formation of 2 diarrheagenic *Escherichia coli* strains.
- Caffarena, R. (2021.). *Causas de diarrea neonatal y mortalidad de terneros en tambos de Uruguay, caracterización de especies y subtipos zoonóticos de Cryptosporidium y estimación de pérdidas*

económicas nacionales por mortalidad de terneras lecheras. Tesis de doctorado. Universidad de la República (Uruguay). Facultad de Veterinaria.

Callaway, T. R., Carr, M. A., Edrington, T. S., Anderson, R. C., & Nisbet, D. J. (2009). Diet, *Escherichia coli* O157: H7, and cattle: a review after 10 years. *Current issues in molecular biology*, 11(2), 67-80.

Cané, L. (2023). *Avances en la interacción de alfa hemolisina de E. coli con glóbulos rojos humanos: potencial uso del dominio N-terminal en la construcción de inmunotoxinas* (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de La Plata).

Castagnini, D., Palma, K., Jara-Wilde, J., Navarro, N., González, M. J., Toledo, J., ... & Härtel, S. (2024). *Proteus mirabilis* biofilm expansion microscopy yields over 4-fold magnification for super-resolution of biofilm structure and subcellular DNA organization. *Journal of Microbiological Methods*, 220, 106927.

Cavalieri, S. J., Bohach, G. A., & Snyder, I. S. (1984). *Escherichia coli* alpha-hemolysin: characteristics and probable role in pathogenicity. *Microbiological reviews*, 48(4), 326-343.

Coppola, N., Freire, B., Umíerrez, A., Cordeiro, N. F., Ávila, P., Trenchi, G., ... & Vignoli, R. (2020). Transferable resistance to highest priority critically important antibiotics for human health in *Escherichia coli* strains obtained from livestock feces in Uruguay. *Frontiers in veterinary science*, 7, 588919.

Croxen, M. A., Law, R. J., Scholz, R., Keeney, K. M., Włodarska, M., & Finlay, B. B. (2013). Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical microbiology reviews*, 26(4), 822-880.

Daly, R. F., & Hill, N. T. (2016). Characterizing the role of animal exposures in cryptosporidiosis and shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections: South Dakota, 2012. *Zoonoses and public health*, 63(6), 467-476.

Donovan, G. A., Dohoo, I. R., Montgomery, D. M., & Bennett, F. L. (1998). Calf and disease factors affecting growth in female Holstein calves in Florida, USA. *Preventive veterinary medicine*, 33(1-4), 1-10.

Evans, M. L., & Chapman, M. R. (2014). Curli biogenesis: order out of disorder. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1843(8), 1551-1558.

Farfán-García, A. E., Ariza-Rojas, S. C., Vargas-Cárdenas, F. A., & Vargas-Remolina, L. V. (2016). Virulence mechanisms of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Revista Chilena de Infectología: Órgano Oficial de la Sociedad Chilena de Infectología*, 33(4), 438-450.

Fecteau, G., Fairbrother, J. M., Higgins, R., Van Metre, D. C., Paré, J., Smith, B. P., ... & Jang, S. (2001). Virulence factors in *Escherichia coli* isolated from the blood of bacteremic neonatal calves. *Veterinary Microbiology*, 78(3), 241-249.

Fernández, M., Casaux, M. L., Fraga, M., Vignoli, R., Bado, I., Zunino, P., & Umpiérrez, A. (2023). Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) associated with calf mortality in Uruguay. *Microorganisms*, 11(7), 1704.

Figueroa Y., Stoletniy C., **Giménez P.**, Vázquez S., Caetano A., Varela G., Iriarte A., Zunino P., Piccini C., Umpiérrez A., (2024). Estudio genómico comparativo de STEC en la naturaleza y en hospederos animales y humanos en Uruguay. Simposio Nacional sobre *Escherichia coli* productor de toxina Shiga (STEC/VTEC) responsable del Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) (16 y 17 de mayo de 2024), Buenos Aires, Argentina (Presentación oral).

Flemming, H. C., & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature reviews. Microbiology*, 8(9), 623–633.

Foster, D. M., & Smith, G. W. (2009). Pathophysiology of diarrhea in calves. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 25(1), 13-36.

Galarce, N., Sánchez, F., Fuenzalida, V., Ramos, R., Escobar, B., Lapierre, L., Paredes-Osset, E., Arriagada, G., Alegría-Morán, R., Lincopán, N., Fuentes-Castillo, D., Vera-Leiva, A., González-Rocha, G., Bello-Toledo, H., & Borie, C. (2020). Phenotypic and Genotypic Antimicrobial Resistance in Non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolated From Cattle and Swine in Chile. *Frontiers in veterinary science*, 7, 367.

Hannaoui Rodríguez, E. J., & Villalobos, L. B. (2009). *Escherichia coli* shigatoxigena: Patogénesis, diagnóstico y tratamiento. *Revista de la sociedad Venezolana de Microbiología*, 29(1), 13-20.

Hammer O. (2023). PAST (versión 4.03) (Software de análisis estadístico). <https://nhm.uio.no/english/research/infrastructure/past/>

Hoey, D. E., Sharp, L., Currie, C., Lingwood, C. A., Gally, D. L., & Smith, D. G. (2003). Verotoxin 1 binding to intestinal crypt epithelial cells results in localization to lysosomes and abrogation of toxicity. *Cellular microbiology*, 5(2), 85-97.

Hua, Y., Zhang, J., Jernberg, C., Chromek, M., Hansson, S., Frykman, A., ... y Bai, X. (2021). Caracterización molecular del gen de la enterohemolisina (ehxA) en aislados clínicos de *Escherichia coli* productores de toxina Shiga. *Toxinas*, 13 (1), 71.

Jesser, K. J., & Levy, K. (2020). Updates on defining and detecting diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes. *Current opinion in infectious diseases*, 33(5), 372-380.

Judge, N. A., Mason, H. S., & O'Brien, A. D. (2004). Plant cell-based intimin vaccine given orally to mice primed with intimin reduces time of *Escherichia coli* O157: H7 shedding in feces. *Infection and Immunity*, 72(1), 168-175.

Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature reviews microbiology*, 2(2), 123-140.

Karmali, M. A., Petric, M., Lim, C., Fleming, P. C., Arbus, G. S., & Lior, H. (1985). The association between idiopathic hemolytic uremic syndrome and infection by verotoxin-producing *Escherichia coli*. *Journal of Infectious Diseases*, 151(5), 775-782.

Kolenda, R., Burdukiewicz, M., & Schierack, P. (2015). A systematic review and meta-analysis of the epidemiology of pathogenic *Escherichia coli* of calves and the role of calves as reservoirs for human pathogenic *E. coli*. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 5, 23.

Konowalchuk, J., Speirs, J. I., & Stavric, S. (1977). Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infection and immunity*, 18(3), 775-779.

Lai, Y., Rosenshine, I., Leong, J. M., & Frankel, G. (2013). Intimate host attachment: enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Cellular microbiology*, 15(11), 1796-1808.

Lorenz, I., Fagan, J., & More, S. J. (2011). Calf health from birth to weaning. II. Management of diarrhoea in pre-weaned calves. *Irish veterinary journal*, 64, 1-6.

Lorenz, S. C., Son, I., Maounounen-Laasri, A., Lin, A., Fischer, M., & Kase, J. A. (2013). Prevalence of hemolysin genes and comparison of ehxA subtype patterns in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and non-STEC strains from clinical, food, and animal sources. *Applied and environmental microbiology*, 79(20), 6301-6311.

Mainil, J., Fairbrother, J., & Morabito, S. (2014). *Escherichia coli* in domestic mammals and birds.

Ma, Z., Bumunang, E. W., Stanford, K., Bie, X., Niu, Y. D., & McAllister, T. A. (2019). Biofilm formation by shiga toxin-producing *Escherichia coli* on stainless steel coupons as affected by temperature and incubation time. *Microorganisms*, 7(4), 95.

McKee, M. L., Melton-Celsa, A. R., Moxley, R. A., Francis, D. H., & O'Brien, A. D. (1995). Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 requires intimin to colonize the gnotobiotic pig intestine and to adhere to HEp-2 cells. *Infection and Immunity*, 63(9), 3739-3744.

Melton-Celsa, A. R. (2014). Shiga toxin (Stx) classification, structure, and function. *Microbiology spectrum*, 2(4), 10-1128.

Miko, A., Rivas, M., Bentancor, A., Delannoy, S., Fach, P., & 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*, 4, 78.

Molina, N. B., Oderiz, S., López, M. A., Basualdo, J. Á., & Sparo, M. D. (2024). Caracterización molecular de *Escherichia coli* diarreogénica proveniente de población pediátrica ambulatoria con diarrea, atendida en dos hospitales de Buenos Aires, Argentina. *Revista argentina de microbiología*, 56(1), 8-15.

Nguyen, Y., & Sperandio, V. (2012). Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) pathogenesis. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 2, 90.

Nielsen, E. M., Skov, M. N., Madsen, J. J., Lodal, J., Jespersen, J. B., & Baggesen, D. L. (2004). Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* in wild birds and rodents in close proximity to farms. *Applied and environmental microbiology*, 70(11), 6944-6947.

Organización mundial de sanidad animal (s.f.) *Una sola salud*. Recuperado de <https://www.woah.org/es/que-hacemos/iniciativas-mundiales/una-sola-salud/>.

O'Toole, G., Kaplan, H.B. y Kolter, R. (2000). Formación de biopelículas como desarrollo microbiano. *Revisiones anuales en microbiología*, 54 (1), 49-79.

Park, Y. J., & Chen, J. (2015). Control of the biofilms formed by curli-and cellulose-expressing Shiga toxin-producing *Escherichia coli* using treatments with organic acids and commercial sanitizers. *Journal of Food Protection*, 78(5), 990-995.

Paton, J. C., & Paton, A. W. (1998). Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clinical microbiology reviews*, 11(3), 450-479.

Sabalza Baztán, A. (2014). Obtención de un alelo de celulosa sintetasa capaz de producir celulosa en ausencia del activador alostérico c-di-GMP.

Sapountzis, P., Segura, A., Desvaux, M., & Forano, E. (2020). An overview of the elusive passenger in the gastrointestinal tract of cattle: The Shiga toxin producing *Escherichia coli*. *Microorganisms*, 8(6), 877.

Scavone, P., Iribarnegaray, V., Caetano, A. L., Schlapp, G., Härtel, S., & Zunino, P. (2016). Fimbriae have distinguishable roles in *Proteus mirabilis* biofilm formation. *FEMS Pathogens and Disease*, 74(5), ftw033.

Schlapp, G., Scavone, P., Zunino, P., & Härtel, S. (2011). Development of 3D architecture of uropathogenic *Proteus mirabilis* batch culture biofilms—A quantitative confocal microscopy approach. *Journal of microbiological methods*, 87(2), 234-240.

Sauer, K., Stoodley, P., Goeres, D. M., Hall-Stoodley, L., Burmølle, M., Stewart, P. S., & Bjarnsholt, T. (2022). The biofilm life cycle: expanding the conceptual model of biofilm formation. *Nature Reviews Microbiology*, 20(10), 608-620.

Steyert, S. R., Sahl, J. W., Fraser, C. M., Teel, L. D., Scheutz, F., & Rasko, D. A. (2012). Comparative genomics and stx phage characterization of LEE-negative Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Frontiers in cellular and infection microbiology*,

Umpiérrez, A., Ernst, D., Fernández, M., Oliver, M., Casaux, M. L., Caffarena, R. D., & Zunino, P. (2021). Virulence genes of *Escherichia coli* in diarrheic and healthy calves. *Revista Argentina de Microbiología*, 53(1), 34-38.

Umpiérrez, A., Bado, I., Oliver, M., Acquistapace, S., Etcheverría, A., Padola, N. L., ... & Zunino, P. (2017). Zoonotic potential and antibiotic resistance of *Escherichia coli* in neonatal calves in Uruguay. *Microbes and environments*, 32(3), 275-282.

Umpiérrez, A., Ernst, D., Cardozo, A., Torres, A., Fernández, M., Fraga, M., ... & Zunino, P. (2022). Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* with potential harmful profiles to humans are isolated from the faeces of calves in Uruguay. *Austral journal of veterinary sciences*, 54(2), 45-53.

Varela, G., Chinen, I., Gadea, P., Miliwebsky, E., Mota, M. I., González, S., ... & Schelotto, F. (2008). Detección y caracterización de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga a partir de casos clínicos y de alimentos en Uruguay. *Revista argentina de microbiología*, 40(2), 93-100.

Vélez, M. V., Colello, R., Etcheverría, A. I., & Padola, N. L. (2022). Shiga toxin producing *Escherichia coli*: the challenge of adherence to survive. *Revista Argentina de Microbiología*, S0325-7541.

Velez, M. V., Colello, R., Etcheverría, A. I., & Padola, N. L. (2023). *Escherichia coli* productora de toxina Shiga: el desafío de adherirse para sobrevivir. *Revista argentina de microbiología*, 55(1), 100-107.

Vogeleer, P., Tremblay, Y. D., Jubelin, G., Jacques, M., & Harel, J. (2016). Biofilm-forming abilities of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates associated with human infections. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(5), 1448-1458.

Welch, R. A. (1991). Pore-forming cytolsins of Gram-negative bacteria. *Molecular microbiology*, 5(3), 521-528.

Wells, J. E., Kim, M., Bono, J. L., Kuehn, L. A., & Benson, A. K. (2014). Meat science and muscle biology symposium: *Escherichia coli* O157: H7, diet, and fecal microbiome in beef cattle. *Journal of animal science*, 92(4), 1345-1355.

Yun, Y. S., Park, D. Y., Oh, I. H., Shin, W. R., Ahn, G., Ahn, J. Y., & Kim, Y. H. (2023). Pathogenic Factors and Recent Study on the Rapid Detection of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STEC). *Molecular Biotechnology*, 1-11.