

Informe final publicable de proyecto

Aportes al conocimiento en la circulación de STEC: bases genómicas y determinantes fenotípicos de aislamientos de origen animal, humano, alimentario y ambiental

Código de proyecto ANII: FCE_3_2022_1_172463

Fecha de cierre de proyecto: 01/11/2025

UMPIÉRREZ MARTÍNEZ, Ana Gabriela (Responsable Técnico - Científico)

STOLETNIY BAYDA, Carla Lucía (Investigador)

VARELA PENSADO, Gustavo (Investigador)

ZUNINO ABIRAD, Pablo (Investigador)

BILBAO ORTEGA, Lucía (Investigador)

FIGUEROA, Yamila (Investigador)

SILVERA ESTEVES, Juan Victorio (Investigador)

SMIRCICH RUZO, Pablo (Investigador)

MINISTERIO DE EDUCACIÓN Y CULTURA. INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS "CLEMENTE ESTABLE" (Institución Proponente)
\\ UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE MEDICINA \\ FUNDACIÓN DE APOYO AL INSTITUTO CLEMENTE ESTABLE

Resumen del proyecto

Escherichia coli es un microorganismo ubicuo que se puede encontrar en ambientes diversos y formando parte de la microbiota intestinal de animales de sangre caliente. Además, algunas variantes son responsables de infecciones intestinales y extraintestinales. Las infecciones causadas por *E. coli* productora de toxina Shiga (STEC) tienen altas tasas de morbi-mortalidad y constituyen un problema de salud mundial. STEC es un patógeno zoonótico y su principal reservorio son los bovinos. La principal vía de transmisión de STEC es fecal-oral. En los rodeos su dispersión se favorece por condiciones inapropiadas de almacenamiento del alimento y escasa limpieza. Además, persiste en alimentos como carne poco cocida y en cursos de agua. Variantes patogénicas de STEC se han detectado en casos de Síndrome Urémico Hemolítico en niños y en terneros en Uruguay. En estos últimos, asociadas a clones altamente patogénicos y portando multirresistencia a antimicrobianos.

Para mejorar la comprensión y aportar a la prevención de las enfermedades que puede causar STEC, desarrollamos un proyecto de investigación desde el enfoque "Una salud", que integra la salud animal, humana y ambiental. Estudiamos las bases genéticas de STEC de diferentes fuentes: terneros, animales silvestres (jabalí y guazubirá), alimentos, agua de arroyo y casos clínicos humanos en Uruguay.

Se secuenciaron y anotaron más de 40 genomas de STEC. Determinamos una elevada diversidad de serogrupos, incluyendo variantes altamente patogénicas, que pese a tener diferente origen, presentan un genoma similar. También reportamos una característica específica de patogenicidad denominada isla de patogenicidad LAA. Se especula que su presencia puede estar relacionada con el éxito de STEC para sobrevivir en el suelo o en el agua. Los resultados sugieren la necesidad de incorporar la vigilancia ambiental como componente estratégico en el estudio de STEC, dado que los ecosistemas donde convergen fauna silvestre y actividades agropecuarias constituyen reservorios relevantes para su diseminación.

Ciencias Naturales y Exactas / Ciencias Biológicas / Biología Celular, Microbiología / Microbiología

Palabras clave: *Escherichia coli* productora de Toxina Shiga (STEC) / una sola salud / genoma flexible /

Antecedentes, problema de investigación, objetivos y justificación.

Características generales del genoma de *Escherichia coli*

Escherichia coli coloniza el tracto gastrointestinal de animales de sangre caliente luego del nacimiento, a partir de la microbiota materna y ambiental, coexistiendo en condiciones de salud y beneficio mutuo (1,2). Además, algunas variantes presentan atributos de virulencia que les permiten adaptarse y causar enfermedad a nivel intestinal (InPEC) y extraintestinal (ExPEC) (3,4).

E. coli puede sobrevivir en distintos nichos (ambiente intestinal, suelo, agua, alimentos y sedimentos) (5). Las cepas ExPEC causan infecciones extraintestinales (sepsis, meningitis, neumonía, infecciones urinarias) (6-8), pero también colonizan el intestino de forma asintomática (9) y funcionan como reservorio de genes (10). Por otro lado, las InPEC pueden causar enfermedad diarreica, como el virotipo *E. coli* productora de toxina Shiga (STEC) (11).

El genoma de *E. coli* es variable en tamaño y número de genes, oscilando entre 4,6 y 5,9 megabases (12). Acorde a su PAN-Genoma cada cepa porta hasta 5500 genes, de los cuales menos de 1000 conforman el genoma CORE (genes compartidos por todas las cepas, independientemente de sus propiedades de virulencia o del nicho que habiten), siendo aproximadamente 250 de éstos esenciales para el mantenimiento y multiplicación celular (13). El resto forma parte del genoma flexible e incluye genes adquiridos por transferencia horizontal (14).

La plasticidad genética permite múltiples combinaciones de genes que dan como resultado la diversificación fenotípica de *E. coli* y una adaptación selectiva de nicho, permitiéndole superar condiciones ambientales variables e infectar hospederos específicos. *E. coli* de hospederos humanos presentan más genes relacionados a vías del Quorum Sensing, y *E. coli* no asociadas a hospederos animales presentan mayor cantidad de genes relacionados a la recombinación y metabolismo del ADN, lo que refleja su necesidad de adquirir material genético para adaptarse (13). La transferencia horizontal de genes es una de las mayores responsables en la evolución bacteriana (15) asociada

inicialmente a genes de virulencia, y también es responsable de la evolución de las resistencias a los antimicrobianos (RAM) (16). Los plásmidos bacterianos también son responsables de generar cambios esenciales en las poblaciones microbianas como la diseminación de genes de virulencia, de RAM, del metabolismo de sustratos extraños, entre otros (17). *E. coli* presenta una gran variedad de plásmidos, algunos de los cuales definen virotipos, como por ejemplo pO157 (asociado a actividad hemolítica y adherencia a células epiteliales humanas) de STEC O157:H7(17). Además, plásmidos de virulencia híbridos asociados a virotipos STEC/ETEC se han descrito en STEC humanas y de alimentos, lo que representa una ventaja adaptativa y una amenaza emergente como patógeno transmitido por los alimentos (18). El viruloma de *E. coli* también incluye genes codificados en elementos móviles como los fagos temperados. Éstos contribuyen a la variabilidad genotípica y fenotípica, y en los casos de los genes de las toxinas Shiga (fagos Stx) de STEC, su integración al genoma determina la patogenicidad de ese virotipo (19).

E. coli productora de toxina Shiga (STEC)

STEC es un patógeno zoonótico que se propaga por la ruta fecal-oral, y tanto el ganado como los humanos están expuestos directamente a él por contacto con heces de animales colonizados, e indirectamente a través de alimentos y agua contaminados). Su principal reservorio es el intestino y rumen de los bovinos. Las infecciones en humanos generalmente se deben al consumo de carne poco cocida, vegetales, lácteos y agua contaminados. Se han reportado también infecciones por contacto directo con animales y con el ambiente donde se encuentran los rumiantes y al contacto persona-persona (20-22). En los rodeos, la dispersión de STEC se favorece por condiciones inapropiadas de almacenamiento del alimento, escasa limpieza de los ambientes, e inadecuado diseño de comederos y bebederos, en los que persiste viable hasta 4 meses (23). Además, las escorrentías debidas a precipitaciones pueden llevar el agua contaminada hasta ríos, lagos y pozos de agua potable que podrían utilizarse para consumo humano, riego o recreación, facilitando así su dispersión (24). STEC puede adherirse a raíces, superficies foliares y compartimientos internos de las plantas (25-28). De forma similar, se reproduce y sobrevive largos períodos de tiempo en diversas fuentes alimentarias. La carne usualmente se contamina durante el sacrificio de animales colonizados y en el procesamiento en plantas frigoríficas, mientras que la leche cruda por el contacto animales-ambiente (29).

Se estima que más de 2,8 millones de personas sufren enfermedades causadas por STEC anualmente, con 3890 casos Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) y colitis hemorrágica (CH), con altas tasas de morbilidad y mortalidad (30). En América Latina, estas infecciones son endémicas y representan casi el 2% de los casos de diarrea aguda y el 20%-30% de la diarrea con sangre (31-32). En Uruguay, si bien las infecciones por STEC no son de registro obligatorio para el Ministerio de Salud Pública, se estima que la incidencia de SUH es 4 o 5 niños cada 100000 menores de 5 años (33).

Los brotes de STEC están ligados a la presencia y combinación de factores de virulencia. Su principal factor de virulencia son las toxinas Shiga 1 y 2, codificadas en el genoma de profagos lambdoides integrados en el cromosoma bacteriano. Dichas toxinas poseen variantes que se asocian a un desarrollo más o menos agresivo de la enfermedad (34). Otros factores de virulencia relevantes son hemolisinas, adhesinas, fimbrias y proteínas de membrana externa (24). Su isla de patogenicidad LEE (Locus for Enterocyte Effacement) codifica el sistema de secreción tipo 3, es responsable del fenotipo de adhesión y borramiento de las vellosidades intestinales en el hospedero (1) y se encuentra asociada a brotes graves de STEC. Otras islas: SE (Subtilase-Encoding) y LAA (Locus of Adhesion and Autoaggregation) también se reportan en brotes graves en humanos y se han detectado en aislamientos humanos, animales, ambientales y en alimentos en Chile y Argentina (35-39). El serotipo STEC O157:H7 es el más frecuentemente asociado a brotes en los seres humanos (34), aunque la incidencia de los serotipos "big six" (O26, O45, O103, O111, O121 y O145), O113 y los serotipos híbridos como el O104:H4, detectados en enfermedad grave y brotes de SUH, se encuentra en ascenso (34,38).

En investigaciones previas en el Depto. de Microbiología se detectó STEC en casos de diarrea y en terneros sanos (39-41), y una asociación entre STEC multirresistentes en el intestino de terneros y su mortalidad (42). Asimismo, este grupo particular de patógenos zoonóticos, se han detectado además en casos clínicos de niños con diarrea en nuestro país (43) y en alimentos (O157:H7 en matriz cárnica) (44).

Con la iniciativa "Una salud" se busca materializar la vigilancia, así como establecer estrategias efectivas para disminuir el aumento de las enfermedades infecciosas como las causadas por STEC y a su vez controlar el aumento de la Resistencia a los Antimicrobianos (RAM) (<http://www.oie.int/en/for-the-media/onehealth/>). La RAM es un

problema de creciente impacto tanto en salud humana y animal como económico. Si bien el tratamiento con antibióticos no es recomendado para tratar infecciones por STEC, se registran aislamientos resistentes a distintos antibióticos e incluso multirresistentes asociadas a terneros muertos (34,42).

Hipótesis

Variantes genéticas de STEC que están presentes en los bovinos de Uruguay circulan en el ambiente, contaminan los alimentos y causan enfermedad en los seres humanos. Las propiedades genómicas presentes en los genomas flexibles de STEC son las que le permiten a este microorganismo adaptarse a diferentes nichos, lo que se puede reflejar en fenotipos diferenciales. Por el contrario, el flujo horizontal de genes de resistencia trasciende a las variantes de STEC, lo que se vería reflejado en determinantes de resistencia antimicrobiana independientes del origen de aislamiento.

Objetivo

Este proyecto tuvo como objetivo general determinar cuáles son las diferencias genómicas y fenotípicas entre STEC aisladas en Uruguay a partir de diferentes orígenes: aislamientos de la clínica humana (causantes de SUH en niños), aislados de origen animal (terneros sanos, de terneros con diarrea y de muestras de necropsias de terneros septicémicos), de aislamientos de origen ambiental (ecosistemas acuáticos como arroyos y playas) y de alimentos (como carne y hamburguesas).

Objetivos específicos

1. Secuenciar y ensamblar los genomas de hasta 50 STEC aisladas de muestras de heces y necropsias de terneros, de casos clínicos de niños, de alimentos y ambientales.
2. Caracterizar las propiedades de virulencia (toxinas, serotipo, islas de patogenicidad, plásmidos de virulencia, profagos, filogrupos, etc) de los aislamientos de STEC mediante análisis *in silico* de sus secuencias.
3. Determinar el resistoma de los aislamientos de STEC
4. Determinar el PAN y CORE genoma y el secuenciotipo de los aislamientos de STEC, y las relaciones filogenéticas de todos los aislamientos de la colección.
5. Evaluar la resistencia al ácido, la producción de biofilms y la expresión de las fimbrias tipo 1 y Curli *in vitro* de los aislamientos de STEC
6. Estudiar la actividad metabólica de los aislamientos de STEC en placas de cultivo comerciales del sistema OmniLog, con medios con distintas composiciones de nutrientes y determinar la cinética de crecimiento en medio mínimo M9 con distintas fuentes de C.
7. Identificar en los genomas genes de vías metabólicas asociadas a los distintos nutrientes evaluados, a la formación de biofilms y a la expresión de fimbrias *in vitro*.
8. Asociar los hallazgos del CORE-Genoma y genoma flexible de las STEC con el origen del aislamiento y los fenotipos observados.
9. Determinar si cepas de STEC de diferente origen (animal, humano, alimento y aisladas de agua de arroyo) tienen la misma potencialidad de ser virulentas *in vitro*.

Metodología/Diseño del estudio

Conformación del equipo de trabajo

Para llevar adelante esta propuesta se conformó un grupo de trabajo multidisciplinario e interinstitucional, integrado por investigadores consolidados y estudiantes de los Departamentos de Microbiología y de Genómica del IIBCE, y del Departamento de Bacteriología y Virología del Instituto de Higiene. Estos últimos, responsables del cepario de STEC de casos humanos y de carnes. Además, se contó con la colaboración del experto en STEC, Dr. Roberto Vidal, responsable del Laboratorio de E. coli patógenas del Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, y de la Dra. Claudia Piccini, responsable del Laboratorio de Ecología Microbiana Acuática del IIBCE, experta en el estudio de bacterias patógenas en sistemas acuáticos. Asimismo, se contó con el asesoramiento del Dr. Stefano Morabito, director del Laboratorio de Referencia de la Unión Europea para E. coli, con quien establecimos una colaboración en el transcurso del proyecto.

Generación de colección de STEC

Se consolidó una colección de STEC de distintos orígenes. En el marco de un proyecto de salud ecosistémica (2021–2023) se aislaron 14 STEC ambientales (agua del arroyo y fecas de animales silvestres) (45). Adicionalmente, se incorporaron 14 aislamientos de STEC del Instituto de Higiene (7 cárnicos y 7 humanos). Finalmente, se seleccionaron 20 aislamientos de bovinos del Departamento de Microbiología (IIBCE). La selección de los aislamientos en las colecciones del IIBCE y del IH fue en base a la fecha de colecta, y en el caso de contarse, en base combinaciones de propiedades previamente determinadas: genes de virulencia, serogrupos, fenotipo RAM, filogrupo.

Determinación de las distintas poblaciones

Los aislamientos de STEC se estudiaron explorando atributos de resistencia, formación de biofilm, expresión de toxinas y sobrevivencia a condiciones extremas.

Formación de biofilms

Se estudió la capacidad de los aislamientos para adherirse a superficies abióticas mediante la técnica semi-cuantitativa de tinción con Cristal Violeta (46), la cual se realiza de rutina en nuestro Depto.(47). Se evaluaron 2 temperaturas (20°C y 37°C), que simulan condiciones diferenciales del medio interno animal y el ambiente.

Tolerancia al ácido

Se determinó la capacidad de STEC de tolerar el ácido in vitro. Los aislamientos se cultivaron en caldo Luria Bertani con distintos niveles de acidificación (pH7, 5 y 2) y se realizaron recuentos bacterianos(x cuádruplicado) con un tiempo de exposición de 2h (48). Con los resultados de recuentos se establecieron categorías de sensibilidad, resistencia y no viable, a donde se asignaron las cepas.

Detección de hemolisinas

Se sembrarán cultivos frescos de STEC en placas de agar sangre. El fenotipo hemolítico se observó como zonas claras en las placas, lo que permitió identificar cepas con producción de hemolisinas, diferenciando perfiles compatibles con α -hemolisina y hemolisinas tardías.

Fenotipo de resistencia a antibióticos

La resistencia a los antibióticos se determinó utilizando el método de difusión en disco de Kirby-Bauer, de acuerdo con las directrices del CLSI (2025) (49). Los antibióticos analizados fueron ampicilina (AMP), ciprofloxacina (CIP), ácido nalidíxico (NA), trimetoprim-sulfametoxazol (STX), enrofloxacin (ENR), gentamicina (GN), tetraciclina (TE), cefuroxima (CXM), amikacina (AK), fosfomicina (FOT), amoxicilina-ácido clavulánico (AMC), cefepima (FEP), ceftiaxona (CRO), cefoxitina (FOX), ceftazidima (CAZ) e imipenem (IMI). Para el caso de la colistina (COL) se utilizó el método de pre-difusión en placa empleado en ANLIS-MALBRAN.

Determinación de fenotipos metabólicos

Se utilizaron placas de microarray Omnilog® (Biolog) para detectar la actividad metabólica y la capacidad de utilizar diferentes sustratos (3 réplicas biológicas/aislamiento). Se midió el metabolismo de 190 carbonos diferentes, 95 fuentes de nitrógeno, 59 de fósforo y 35 de azufre (placas comerciales PM1, PM2A, PM3B, PM4A) y se midió la respiración mediante la reducción del violeta de tetrazolio en Varioskan (Thermo), de acuerdo a lo recomendado por el fabricante. La actividad metabólica y los análisis estadísticos se realizarán en el programa R y los paquetes previamente descritos para tal fin (50).

Expresión de las toxinas Shiga in vitro

Si bien no constituía un objetivo original, se incorporó el siguiente al trabajo: determinar si cepas de STEC de diferente origen (animal, humano, alimento y aisladas de agua de arroyo) tienen la misma potencialidad de ser virulentas in vitro.

Para ello se implementó y optimizó la técnica para evaluar la expresión de los genes *stx1* y *stx2* con la técnica de qPCR en cultivos bacterianos en caldo TSB y en agua (51). Se seleccionaron 5 cepas de diferente origen: 4H y MBG10 (caso clínico humano y animal respectivamente), CBVS84 y CAVS123 (agua de arroyo) y BZ0742 (carne picada).

Las cepas se cultivarán en medio nutriente TSB (Oxoid) y en agua de arroyo esterilizada. El agua será colectada en el arroyo Los Chanchos, Lavalleja. La misma será filtrada para eliminar bacterias usando filtros de membrana de 0,22 μ m y posteriormente esterilizada en autoclave para eliminar posibles fagos que pasen por el filtro.

Viabilidad y crecimiento bacteriano ante variaciones nutricionales

Cada cultivo será incubado en los medios correspondientes a partir de suspensiones ajustadas a una concentración de 0,5 McFarland, por un período de 24 horas, a 37°C. Se tomarán alícuotas a tiempo final, las cuales serán diluídas serialmente y se les realizarán recuentos en placa por siembra en superficie (por duplicado); con el fin de confirmar la viabilidad y crecimiento de las cepas.

Análisis de la expresión de genes de virulencia

Con el fin de evaluar la expresión de los genes codificantes de la toxina Shiga, todas las cepas serán cultivadas en los 2 medios antes especificados a 37°C, usando réplicas como controles positivos, a las cuales se les agregará Ciprofloxacina a una concentración equivalente a la mitad de su CIM. A las 24 horas de cultivo, se extraerán alícuotas para proceder con los siguientes 3 pasos: la extracción de ARN con el kit comercial PureLink® RNA Mini Kit; el tratamiento con DNAsa con el kit TURBO DNA-free Kit; la retrotranscripción con el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit. El fin de estos 3 ensayos consecutivos es obtener una porción representativa del ARNm presente en la célula, en forma de ADN copia (ADNc). El mismo será cuantificado en nanodrop y se le aplicará la técnica de qPCR con primers específicos, siguiendo protocolos previamente establecidos en el laboratorio y avalados por estudios previos en los que se cuantificó la presencia de STEC [24]. En cada corrida de qPCR se generarán curvas de calibración para cuantificar los genes de interés, utilizando la cepa de referencia ATCC STEC O26:H11. Con los resultados obtenidos se compararán los niveles de expresión de ARNm de las toxinas entre cepas de distinto origen y entre los medios de cultivo utilizados.

Secuenciación y análisis genómico de cepas STEC

Se secuenciaron 37 aislamientos en servicios de secuenciación masiva en el exterior del país: 17 bovinos, 1 humano (caso de síndrome urémico hemolítico), 7 de agua de arroyo, 5 de chanco jabalí, 2 de guazubirá y 5 de carne cruda para consumo humano.

El análisis bioinformático se realizó utilizando protocolos estandarizados del EU Reference Laboratory for E. coli (EURL-VTEC, Istituto Superiore di Sanità, Italia) (52). Dichos protocolos fueron aplicados durante una pasantía que Yamila Figueroa realizó en el EURL-VTEC bajo la supervisión del Dr. Stefano Morabito. Se evaluó la calidad de las lecturas con FastQC (53), se realizó trimming (FastQ Positional and Quality Trimming) (54), verificación de pureza con Kmerfinder (55), ensamblaje con SPAdes y calidad con QUAST (56,57). Los genomas se caracterizaron mediante Virulotyper, SeroTypeFinder, Shiga-toxin typer y ABRicate-ResFinder (58,59). Para la comparación filogenómica, se construyó el pangenoma con Roary (60) y se extrajeron variantes de nucleótidos (SNPs) para inferencia filogenética con IQ-TREE (61), visualizada en FigTree (62). Además, se aplicó tipificación basada en el genoma central (cgMLST) con ChewBBACA (63), considerando como válidos los perfiles con >80% de los loci identificados. Las distancias genéticas se calcularon con ChewTree y los dendrogramas con FigTree.

Determinación de islas de patogenicidad

Se estudió la presencia de la isla Locus of Adhesion and Autoaggregation (LAA) (64). Para esta instancia, se utilizó como referencia el genoma completo de E. coli O91:H21 (JAEKGL000000000), que contiene la isla LAA (3.867.470–3.954.019pb). Los genomas se ordenaron en relación con esta referencia mediante algoritmo MCM y posterior alineación con Mauve Progressive (65). A partir de este alineamiento se identificó la isla LAA, sus módulos y su contexto genómico. Para la representación gráfica se utilizó Easyfig (66), visualizando las similitudes y variaciones entre aislamientos portadores y no portadores de LAA.

Resultados, análisis y discusión

El proyecto se desarrolló sin mayores contratiempos, lográndose los objetivos planteados originalmente e incorporando otros. A continuación, se mencionan y desglosan los mayores resultados obtenidos.

Aislamiento y caracterización bioquímica de STEC

En total, se procesaron 43 STEC, incluyendo 14 STEC ambientales aisladas en este proyecto (agua de arroyo y fecas de chanco jabalí y guazubirá). A continuación, se realizaron pruebas fenotípicas (ver Tabla 1).

Los ensayos fenotípicos se realizaron a 2 temperaturas, 20°C y 37°C. La selección de las temperaturas se relacionó

con buscar diferencias en la capacidad de STEC de sobrevivir y estar activas en el ambiente e intestino de animales de sangre caliente.

Producción de hemolisinas

Todas las cepas expresaron hemolisinas tardías, a las 24h de incubación, pero no se detectó la expresión de α -hemolisinas (hemolisina temprana) a las 6h de incubación a ninguna de las temperaturas evaluadas. Las STEC de alimentos y humanos presentaron una marcada diferencia en la hemólisis cuando se las incubó a diferente temperatura, produciendo más a 37°C que a 20°C ($p < 0.05$). Por otro lado, las STEC de bovinos y de ambiente (agua de río y animales silvestres) no presentaron una diferencia en la hemólisis entre las temperaturas seleccionadas (Fig. 1).

Producción de biofilm

Se evaluó la producción de biofilm con la técnica semicuantitativa con Cristal Violeta donde se categorizaron las cepas en no formadoras (0), formadoras débiles (1), formadoras moderadas (2) y formadoras fuertes (3). Las STEC de alimentos fueron las únicas que no produjeron biofilm a 20°C. El resto de las cepas fueron débiles y moderadas formadoras de biofilm (Fig. 2). Las STEC de agua y animales (bovinos y animales silvestres) no cambiaron la producción de biofilm cuando aumentó la temperatura (puntos verdes y turquesa), mientras que las STEC de alimentos y de casos clínicos presentaron una marcada diferencia en la producción de biofilms cuando se incubaron a diferente temperatura ($p < 0.05$, puntos rojos y violetas) (Fig. 2).

Supervivencia en pH ácidos

Se estudió la supervivencia de STEC a tres pH diferentes (pH2, 5 y 7). A partir de los recuentos a las 2h de incubación se categorizaron las cepas en sensibles (no aumentó el número de ufc/mL), resistentes (aumentó el número de ufc/mL) y no viables. A pH5 y pH7 no se observaron alteraciones en el crecimiento de las cepas. Por otro lado, a pH2 se observó una mayor resistencia de las cepas de STEC aisladas de bovinos, seguidas por las cepas de ambiente: agua de río y animales silvestres (Fig. 3). Las cepas de STEC de alimentos y de humanos presentaron una menor resistencia al pH2.

Análisis genómico de las STEC

Luego de los análisis fenotípicos se puso a punto la extracción de ADN genómico de 37 aislamientos de STEC con el kit Monarch® Genomic DNA Purification kit. La primera tanda de cepas ($n=3$) se envió a secuenciar al servicio de MacroGen en Corea (1 STEC de feca de animal nativo, 1 STEC de alimento cárnico y 1 STEC de bovino). La segunda tanda se envió a secuenciar al servicio MicrobesNG en la Universidad de Birmingham, Reino Unido. La secuenciación en ambas instituciones se realizó con el equipo Illumina Novaseq6000 (lecturas cortas, 250pb). Además, se incorporaron 6 genomas de STEC humanos y de carne previamente secuenciados por investigadores de la Unidad de Bacteriología y Virología del Instituto de Higiene, Fac. de Medicina, los cuales se procesaron junto con los anteriores. El análisis bioinformático se realizó utilizando protocolos estandarizados del EU Reference Laboratory for E. coli (EURL-VTEC, Istituto Superiore di Sanità, Italia), aplicados durante una pasantía que realizó Yamila Figueroa en el EURL-VTEC en 2024, bajo la supervisión del Dr. Stefano Morabito (ver materiales y métodos).

1. Caracterización de las STEC

Se determinó el secuenciotipo (ST) y serogrupo de las STEC (Fig. 4). En lo que refiere a los serotipos, se observó una gran diversidad, incluyendo O111, O103, O19, O91, O119, O174, O163 y O157 (confirmando resultados por PCR en aislamientos clínicos), entre otros. Los STs más detectados fueron ST11 y ST21 (principalmente detectado en casos de SUH, y coincidentemente determinado en las STEC de carne O157:H7 y en el aislamiento de chanco jabalí O157:H7 (aislamiento F113) (Fig. 4).

2. Marcadores de virulencia en los genomas de STEC

Se determinó el perfil de virulencia de los aislamientos, el perfil de genes de resistencia y la presencia de plásmidos. Entre los genes de virulencia, los más representados fueron los de citotoxinas, como la enterohemolisina hylA (Fig. 4), y entre las toxinas Shiga, la variante stx1a. Se confirmó además la co-ocurrencia de las 2 toxinas Shiga stx1 y stx2 en algunos aislamientos. Por otro lado, se confirmó la presencia del gen eae que codifica a la intimina, adhesina clave en el fenotipo de adhesión y borramiento de las STEC LEE-positivas, y la ausencia de este gen en todas las STEC de agua de arroyo y de animales silvestres, excepto en un aislamiento de chanco jabalí que se clasificó como O157:H7 (aislamiento F113). En lo que refiere a la resistencia a antibióticos, se determinó que en general los aislamientos de STEC no presentaba gran cantidad de genes de resistencia a antibióticos, aunque sí se determinó un alto número de genes de resistencias, incluyendo a betalactámicos, aminoglucósidos y sulfonamidas, en

los aislamientos de STEC de mortalidad de bovinos y de caso clínico humano (O111:H8) (resultado coincidente con RAM fenotípica). Por otro lado, el gen de resistencia a macrólidos (*mdf(A)*) fue el único que se detectó en casi la totalidad de los aislamientos ($n=39/43$) (Fig. 4). En lo que refiere a plásmidos, se detectaron varios, pero sin un patrón claro, siendo las STEC de mortalidad de terneros y de fecas de animales silvestres las que presentaron más genes asociados a plásmidos (Fig. 4).

El listado de todos los genes de virulencia determinados en los genomas se puede ver en la siguiente tabla anexa: https://docs.google.com/spreadsheets/d/1yHAuaZWVbpmW6x_oyeIqXgURhiZHAdEVttfTPwbVofI/edit?gid=0#gid=0

3. Relaciones filogenéticas de las STEC

El análisis de tipificación genómica basada en el genoma central (cgMLST) permitió construir un árbol que integra la totalidad de los aislamientos. Se identificaron dos clústeres principales: uno correspondiente a STEC O111, que agrupa aislamientos de terneros con diarrea neonatal y mortalidad, así como de casos clínicos humanos; y otro correspondiente a STEC O157:H7, en el que se incluyen aislamientos de alimentos cárnicos, de casos humanos y de fecas de animales silvestres. La conformación de estos clústeres evidencia la circulación de linajes genéticamente relacionados en diferentes nichos y refuerza la importancia de los animales y el ambiente como reservorios y fuentes de transmisión hacia el ser humano (Fig. 5).

4. Caracterización de una nueva isla de patogenicidad en STEC LEE-negativas

Se analizaron las STEC LEE-negativas y se detectó por primera vez en el país la isla de patogenicidad LAA de forma completa (4 módulos) e incompleta (2 y 3 módulos) en STEC de agua y de fecas. Los aislamientos 15F2 de feca y CBVS85 de agua presentaron una isla LAA completa (cuatro módulos) mientras que los aislamientos CAVS18 de agua y 11F1 de feca con isla LAA parcial (dos y tres módulos respectivamente) (Fig. 6).

Además de los 14 aislamientos ambientales caracterizados en esta etapa (incluida la cepa F113, correspondiente a O157:H7, LEE-positivo), se utilizaron 92 genomas de STEC LEE-negativos publicados en la bibliografía para construir un árbol filogenético de máxima verosimilitud (con raíz de punto medio) basado en SNPs del core-genoma (aproximación 1) y en la diferencia de alelos (aproximación 2). En cuanto a las relaciones filogenéticas de estas STEC, los análisis basados en SNPs del core-genoma revelaron una población diversa de cepas ambientales, que portan numerosos genes los cuales probablemente le confieran ventajas adaptativas y evolutivas. Se detectaron 2 clados bien diferenciados que agrupan todas las STEC O174 y a las O163 con STEC LEE negativas de la región, respectivamente (Fig. 7).

La obtención de STEC de agua de arroyo y animales silvestres, su caracterización genómica y la descripción de la isla LAA forman parte del primer manuscrito de este proyecto. El mismo fue recientemente aprobado para publicarse en la revista internacional arbitrada *Microbiology Spectrum* de la ASM (STEC surveillance in the natural environment of Uruguay: genomic surveillance and environmental circulation in the framework of One Health, code: Spectrum03153-25R1).

5. Anotación funcional y capacidad metabólica de STEC de diferente origen

A partir de los genomas se realizó la anotación funcional de los genomas de STEC mediante GhostKOALA (KEGG). Dicho análisis mostró que, independientemente de su origen (clínico, ambiental, alimentario o animal), los aislamientos presentaron perfiles metabólicos y funcionales altamente conservados. La normalización de los conteos de genes en cada categoría de KEGG evidenció escasas variaciones entre genomas, lo que sugiere que, pese a las diferencias de nicho ecológico, el repertorio funcional básico de STEC se mantiene estable (Fig. 8).

A continuación, se seleccionaron 4 STEC de diferente origen. Una STEC de un caso clínico humano (cepa 4H, O26:H11), otra de agua de arroyo (cepa BI, O174:H21), una de carne picada (cepa BZ0742, O157:H7) y una de un caso clínico animal (cepa MBG10, ternero-muerto, O119:H11). Se evaluó su metabolismo a 25°C y 37°C en 4 placas Biolog (PM1, PM2A, PM3 y PM4A) para evaluar el metabolismo de carbohidratos, aminoácidos y nucleótidos, y cofactores y vitaminas, durante 48h. Las lecturas de absorbancia se midieron a 590 y 750nm, cada 15 minutos y luego se procesaron en R para determinar el uso de cada uno de los sustratos ($n=379$ sustratos). Con los valores de absorbancia se calculó el área debajo de la curva y se estableció un punto de corte de 11. Todos los sustratos con valores superiores a 11 se consideraron "utilizados" y el resto no. Con estos puntos de corte se estableció la actividad metabólica de las cepas a diferentes temperaturas. Los resultados se compararon con las anotaciones genómicas funcionales KEGG (GhostKOALA).

El uso de sustratos aumentó con la temperatura en todas las cepas. No se encontró asociación entre la anotación de

categorías funcionales y la cantidad de sustratos utilizados, aunque sí una tendencia negativa en el metabolismo de aminoácidos y nucleótidos (Fig. 9).

A 37°C, las cepas O157:H7 (carne) y O119:H11 (ternero-muerto) utilizaron más sustratos que el resto. La cepa O157:H7 fue la más activa, destacándose por la mayor utilización de sustratos únicos a 25°C. Por otro lado, las cepas O26:H11 (humana) y O174:H21 (agua) fueron las menos activas (Fig. 9).

Estos resultados reflejarían una actividad diferencial influenciada por la temperatura, y relacionada con vías metabólicas presentes en cepas muy virulentas como la O157:H7.

6. Expresión de las toxinas Shiga in vitro

En todas las cepas y medios ensayados se observó crecimiento bacteriano pasadas las 24 horas de incubación, por lo que se puede afirmar que todas las cepas son viables en ambos medios (Fig. 10). En segundo lugar, en todas las cepas se obtuvo un crecimiento significativamente mayor en los cultivos de TSB, resultado esperable debido a la mayor cantidad de nutrientes en este medio, se puede observar la presencia de uno e incluso dos órdenes por encima del crecimiento en agua de arroyo en algunas cepas como 4H, CAVS123 y MBG10 (Fig. 10).

A continuación, se puso a punto el método de co-extracción de ADN/ARN, resultando el kit PurePrep Pathogens (MOLGEN)) (servicio Lab. de Bioseguridad, IIBCE) y el protocolo de tratamiento con DNAsa, retrotranscripción y qPCR para los genes stx (ver ANEXO en el adjunto con resultados). Se incorporaron cultivos con antibiótico ciprofloxacina a la mitad y ¼ de la concentración de la CIM como controles positivos, visto que la incorporación de antibiótico puede ser un fuerte inductor de la expresión de los genes blanco. En este ensayo se obtuvo la expresión deseada de los cultivos tratados con CIM/2 en cada uno de los puntos de control, corroborando la hipótesis de que la mitad de la concentración inhibitoria mínima de ciertos antibióticos potencian la expresión de la toxina Shiga.

Finalmente se realizaron los ensayos de qPCR absoluta. Se generó una curva estándar y se analizó la expresión de las toxinas Shiga en medio si antibiótico y con antibiótico. Se determinó que todas las cepas eran capaces de expresar las toxinas, independientemente del medio de crecimiento (Fig. 11).

Conclusiones y recomendaciones

En el presente proyecto pudimos evidenciar una alta diversidad de STEC circulando en distintos ambientes y animales. Se profundizó en los atributos de virulencia, resistencia y tolerancia a estados de estrés y se relacionaron estos hallazgos con el fenotipo y su sobrevivencia en condiciones variables: bajo pH, presencia de antibióticos en el medio, baja y alta temperatura de cultivo, diferentes sustratos para activar su metabolismo. Se detectó una variante altamente virulenta de STEC en fecas de animales silvestres, una STEC del serotipo O157:H7 en chanco jabalí. Este suceso se destacó como sorpresivo y preocupante, visto que la caza de jabalí está incentivada en nuestro país (es una plaga), aunque no existen controles sobre la carne para el consumo humano. Cabe recordar que este serotipo es el más asociado a brotes graves de SUH a nivel mundial. Paralelamente se describió por primera vez en nuestro país una isla de patogenicidad, LAA, en aislamientos de agua y de animales silvestres.

Los resultados desprendidos de este proyecto evidencian la necesidad de incorporar la vigilancia ambiental como componente estratégico en el estudio de STEC, dado que los ecosistemas donde convergen fauna silvestre y actividades agropecuarias constituyen reservorios relevantes para su mantenimiento y disseminación. La detección de aislamientos con potencial virulento en estos contextos sugiere que el ambiente no solo actúa como vehículo de persistencia, sino también como un escenario propicio para la diversificación genética del patógeno. En este marco, la integración de enfoques genómicos, transcriptómicos y ecológicos se posiciona como una herramienta esencial para comprender los riesgos de transmisión y orientar futuras acciones de vigilancia y control.

Los resultados de este proyecto se presentaron en diversos congresos nacionales y regionales, además, un primer artículo fue aceptado para su publicación en la revista arbitrada internacional Microbiology Spectrum de la ASM (Spectrum03153-25R1).

Paralelamente, los resultados se divulgaron al público general en instancias como IIBCE Abierto y en la Semana de la Ciencia y la Tecnología; y se publicó una nota de prensa en la web institucional del IIBCE, la cual se replicó en redes sociales institucionales: <https://www.gub.uy/ministerio-educacion-cultura/comunicacion/noticias/investigacion-sobre-escherichia-coli-productora-toxina-shiga-stec-su-impacto>.

Trabajos presentados en congresos:

1. Figueroa Y, Stoletniy C, Martínez de la Escalera G, Montero D, Coitiño H, Croci C, Bertoglio F, Lepillanca F, Zunino P, Vidal R, Piccini C, Umpiérrez A. Circulación de STEC en agua de arroyo y fauna silvestre en Uruguay. 2025. ISME-Lat. Mérida, México. Oral.
2. Umpiérrez A, Figueroa Y, Stolestly C, Silvera J, Caetano AL, Varela G, Zunino P, Piccini C. Efecto de la temperatura en la utilización de sustratos: STEC ambientales vs STEC clínicas. 2025. ISME-Lat. Mérida, México. Poster.
3. Figueroa, Y; Stoletniy, C; Martínez de la Escalera, G; Coitiño, H; Croci, C; Bertoglio, F; Lepillanca, F; Montagne, E; Zunino, P; Smircich, P; Piccini C, Umpiérrez. Circulación de Escherichia coli productora de toxina Shiga en muestras ambientales (VILLA SERRANA, URUGUAY). XVI Congreso Argentino de Microbiología (CAM). 2024. Argentina. Poster.
4. Figueroa Y, Stoletniy C, Gimenez P, Vazquez S, Caetano A, Varela G, Iriarte A, Zunino P, Piccini C, Umpierrez A. Estudio genómico comparativo de STEC en la naturaleza y en hospederos animales y humanos. II Simposio argentino sobre Escherichia coli productor de Toxina Shiga (STEC/VTEC) responsable del Síndrome Urémico Hemolítico (SUH). 2024. Facultad de Ciencias Veterinarias UNCPBA. Simposio. Argentina. Expositor oral.
5. Stoletniy C, Figueroa Y, Giménez P, Zunino P, Piccini C, Umpiérrez A. Determinación de las características fenotípicas de STEC asociadas a hospederos y circulantes en el ambiente en Uruguay. Uruguay. XV Congreso Nacional de Microbiología - V encuentro nacional de jóvenes investigadores en microbiología. Sociedad Uruguaya de Microbiología. Montevideo, Uruguay. Poster.
6. Figueroa, Yamila; Martinez de la Escalera, Gabriela; Coitiño, Hugo; Bertoglio, Florencia; Stoletniy, Carla; Croci, Carolina; Lepillanca, Facundo; Bajsa, Natalia; Zunino, Pablo; Piccini, Claudia; Umpiérrez, Ana. Estudio de la resistencia a los antibióticos en enterobacterias de compost de residuo avícola, arroyo y fecas de animales silvestres en Uruguay. 3er Congreso Latinoamericano de Ecología Microbiana (ISME-Lat). 2023. Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Buenos Aires, Argentina. Poster.
7. Figueroa, Yamila; Martínez de la Escalera, Gabriela; Coitiño, Hugo; Croci, Carolina; Bertoglio, Florencia; Lepillanca, Facundo; Piccini, Claudia; Umpiérrez, Ana. Aplicación de la técnica lamp para la detección de genes de virulencia de STEC en muestras ambientales de agua y fauna nativa. III Congreso Nacional de Biociencias. Sociedad Uruguaya de Biociencias. 2022. Montevideo, Uruguay. Poster.

Productos derivados del proyecto

Tipo de producto	Título	Autores	Identificadores	URI en repositorio de Silo	Estado
Resumen de conferencia publicado	Circulación de STEC en agua de arroyo y fauna silvestre en Uruguay	Figueroa, Yamila Stoletniy, Carla Martínez de la Escalera, Gabriela Montero, David Coitiño, Hugo Crocí, Carolina Bertoglio, Florencia Lepillanca, Facundo Zunino, Pablo Vidal, Roberto Mauricio Piccini, Claudia Umpiérrez, Ana		https://hdl.handle.net/20.500.12381/5329	Finalizado
Resumen de conferencia publicado	Determinación de las características fenotípicas de STEC asociadas a hospederos y circulantes en el ambiente en Uruguay	Stolentiy, Carla Figuera, Yamila Giménez, Pricila Zunino, Pablo Piccini, Claudia Umpiérrez, Ana		https://hdl.handle.net/20.500.12381/5332	Finalizado
Artículo científico	STEC in the	Figueroa,		https://hdl.handle.net/20.500.12381/5328	Finalizado

Tipo de producto	Título	Autores	Identificadores	URI en repositorio de Silo	Estado
	natural environment of Uruguay: genomic surveillance and environmental circulation in the framework of One Health	Yamila Stoletniy, Carla Michelacci, Valeria Montero, David Silvera, Juan Martínez de la Escalera, Gabriela Bertoglio, Florencia Croci, Carolina Lepillanca, Facundo Coitiño, Hugo Zunino, Pablo Vidal, Roberto Mauricio Morabito, Stefano Piccini, Claudia Umpiérrez, Ana			
Resumen de conferencia publicado	Estudio de la resistencia a los antibióticos en enterobacterias de compost de residuo avícola, arroyo y fecas de animales silvestres en Uruguay	Figueroa, Yamila Martínez de la Escalera, Gabriela Coitiño, Hugo Bertoglio, Florencia Stoletniy, Carla Croci, Carolina		https://hdl.handle.net/20.500.12381/5331	Finalizado

Tipo de producto	Título	Autores	Identificadores	URI en repositorio de Silo	Estado
		Lepillanca, Facundo Bajsa, Natalia Zunino, Pablo Piccini, Claudia Umpiérrez, Ana			
Resumen de conferencia publicado	Efecto de la temperatura en la utilización de sustratos: STEC ambientales vs STEC clínicas	Umpiérrez, Ana Figuera, Yamila Stolentli, Carla Silvera, Juan Caetano, Ana Laura Varela, Gustavo Zunino, Pablo Claudia, Piccini		https://hdl.handle.net/20.500.12381/5330	Finalizado
Presentación en evento	Circulación de STEC no-0157 y 0157:H7 en Uruguay: prevalencia en terneros de lechería y su presencia en el ambiente	Umpiérrez Ana		https://hdl.handle.net/20.500.12381/5334	Finalizado
Tesis de grado/monografías	Caracterización fenotípica de cepas de Escherichia coli productora de toxina Shiga	Pricila Giménez		https://hdl.handle.net/20.500.12381/5336	Finalizado

Tipo de producto	Título	Autores	Identificadores	URI en repositorio de Silo	Estado
	aisladas de bovinos neonatos muertos y convivientes				
Resumen de conferencia publicado	Estudio genómico comparativo de STEC en la naturaleza y en hospederos animales y humanos en Uruguay	Figueroa, Yamila Stoletniy, Carla Giménez, Pricila Sylvia, Vázquez Caetano, Ana Laura Varela, Gustavo Iriarte, Andrés Zunino, Pablo Piccini, Claudia Umpiérrez, Ana		https://hdl.handle.net/20.500.12381/5337	Finalizado
Resumen de conferencia publicado	Aplicación de la técnica LAMP para la detección de genes de virulencia de STEC en muestras ambientales de agua y fecas de fauna nativa	Figueroa, Yamila Martínez de la Escalera, Gabriela Coitiño, Hugo Crocí, Carolina Bertoglio, Florenia Lepillanca, Facundo Zunino, Pablo Piccini, Claudia Umpiérrez,		https://hdl.handle.net/20.500.12381/5335	Finalizado

Tipo de producto	Título	Autores	Identificadores	URI en repositorio de Silo	Estado
		Ana			
Póster	CIRCULACIÓN DE Escherichia coli PRODUCTORA DE TOXINA SHIGA EN MUESTRAS AMBIENTALES (VILLA SERRANA, URUGUAY)	Figueroa, Yamila Stoletniy, Carla Martínez de la Escalera, Gabriela Coitiño, Hugo Crocí, Carolina Bertoglio, Florencia Lepillanca, Facundo Montagne, Elis Zunino, Pablo Piccini, Claudia Umpiérrez, Ana		https://hdl.handle.net/20.500.12381/5338	Finalizado

Referencias bibliográficas

1. Kaper, JB. et al. Int J Med Microbiol. 2005;295:355–356.
2. Mainil, JG. et al. Molecular and Cellular Microbiology. 2014; pp19-44.
3. Tenaillon, O. et al. Nat Rev Microbiol. 2010;8:207-217.
4. Robins-Browne, RM. et al. Front Cell Infect Microbiol. 2016;6:1-9.
5. Leimbach, A. et al. Curr Top Microbiol Immunol. 2013;358:3-32.
6. Russo, TA. et al. J Infect Dis. 2000;181:1753-1754.
7. Russo, TA. et al. EcoSal Plus. 2004;1:(1).
8. Pettersen, VK. et al. Mol Cell Proteomics. 2016;15:2890-2907.
9. Köhler, CD. et al. Int J Med Microbiol. 2011;301:642-647.
10. Manges, AR. et al. Clin Microbiol Rev. 2019;32:1-25.
11. Croxen, MA. et al. Clin Microbiol Rev. 2013;26:822–880.
12. Robins-Browne, RM. et al. Front Cell Infect Microbiol. 2016:1-9.
13. Yang, ZK. et al. Bioinformatics. 2019;1987–1991.
14. Leimbach, A. et al. Curr Top Microbiol Immunol. 2013; 358:3-32.
15. Berg, OG. et al. Mol Biol Evol. 2002;19:2265–2276.

16. Fondi, M. et al. *Appl Environ Microbiol.* 2010;12:3228-3242.
17. Johnson, T.J. et al. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2009;73:750-74.
18. Leonard, S.R. et al. *Appl Environ Microbiol.* 2016;82(14):4309-4319.
19. Martínez-Castillo, A., Muniesa, M. *Front Cell Infect Microbiol.* 2014.
20. Erickson, M.C. et al. *J Food Protect.* 2007;2426-2449.
21. Torres, A.G. et al. *Bentham Sci Publish.* 2010.
22. Kintz, E. et al. *Int J Hyg Environ Health.* 2017;220:5767.
23. Persad, A.K. et al. *Microbiol Spectr.* 2014.
24. Croxen, M.A. et al. *Clin Microbiol Rev.* 2013;26:822-880.
25. Fairbrother, J.M. et al. *Rev Scientif Tech l'OIE.* 2006;555-569.
26. Gagliardi, J.V. et al. *Appl Environ Microbiol.* 2000;66:877-883.
27. Saldaña, Z. et al. *Front Microbiol.* 2011;2:119.
28. Duffy, G. et al. *Microbiol Spectr.* 2014;2.
29. Lira, W.M. et al. *J Appl Microbiol.* 2004;97:861-866.
30. Majowicz, S.E. et al. *Foodborne Pathog Dis.* 2014;11:447-455.
31. Torres, A. et al. *Microorganisms.* 2018;100.
32. Rivas, M. et al. *Microbiol Spectr.* 2014;2.
33. Varela, G. et al. *Ver Argent Microbiol.* 2008;40:93-100.
34. Gyles, C.L. et al. *J Animal Sci.* 2007;E45-E62.
35. Montero, D.A. et al. *Sci Reports.* 2017.
36. Colello, R. et al. *Microb Pathogen.* 2018;259-263.
37. Michelacci, V. et al. *Clin Microbiol Infect.* 2013;19:E149-56.
38. Kampmeier, S. et al. *Curr Top Microbio Immunol.* 2018;416:117-148.
39. Umpiérrez A. , et al. *Microbes Environ.* 2017.
40. Umpiérrez A. et al. *Rev Argent Microb.* 2020.
41. Umpiérrez A. et al. *Austral J Vet Sci.* 2022.
42. Fernández M. . et al. *Microorganisms.* 2023.
43. Gadea et al. *Rev Argent Microbiol.* 2012, 44(2):94-6.2012.
44. Mussio et al. *Simposio argentino sobre STEC y SUH.* 2022.
45. Martínez de la Escalera G. *Project: The Rufford Foundation.* 2023-2024.
46. Ashton, P.M. et al. *Peer J.* 2015;3:e739.
47. Barth, S.A. et al. *Toxins(Basel).* 2020;12:414.
48. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, P A .
<https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m100/>
49. Seemann, T. et al. *Bioinformatics.* 2014;30:2068-2069.
50. Ramstad, S. N. et al. Effects of antimicrobials on Shiga toxin production in high-virulent Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Microb Pathog* 152, 104636 (2021).
51. Galaxy. <https://aries.iss.it/root/login?redirect=%2F>.
52. Babraham Bioinformatics - FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data.
<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>.
53. Thangadurai, D. & Sangeetha, J. *Genomics and Proteomics: Principles, Technologies, and Applications.* (CRC Press, 2015).
54. Hasman, H. et al. Rapid whole-genome sequencing for detection and characterization of microorganisms directly from clinical samples. *J Clin Microbiol* 52, 139-146 (2014).
55. Bankevich, A. et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol* 19, 455-477 (2012).
56. Gurevich, A., Saveliev, V., Vyahhi, N. & Tesler, G. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics* 29, 1072-1075 (2013).
57. Joensen, K. G., Tetzschner, A. M. M., Iguchi, A., Aarestrup, F. M. & Scheut, F. Rapid and easy in silico serotyping of *Escherichia coli* isolates by use of whole-genome sequencing data. *J. Clin. Microbiol.* 53, 2410-2426 (2015).

58. GitHub - tseemann/abricate: :mag_right: Mass screening of contigs for antimicrobial and virulence genes. GitHub <https://github.com/tseemann/abricate>.
59. Seemann, T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* 30, 2068–2069 (2014).
60. IQ-TREE. <https://iqtree.github.io/>.
61. FigTree. <https://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>.
62. GitHub - B-UMMI/chewBBACA: BSR-Based Allele Calling Algorithm. GitHub <https://github.com/B-UMMI/chewBBACA>.
63. Montero, D. A. et al. Locus of Adhesion and Autoaggregation (LAA), a pathogenicity island present in emerging Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* strains. *Sci Rep* 7, 7011 (2017).
64. the Darling lab. <https://darlinglab.org/mauve/user-guide/progressivemaue.html>.
65. Easyfig - home. <https://mjsull.github.io/Easyfig/>.

Licenciamiento

Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. (CC BY-NC-ND)

