



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN**

**CIENCIAS DE LA SALUD**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**

**DETECCIÓN DE GENES DEL LOCUS DE ADHESIÓN Y  
AUTOAGREGACIÓN (LAA) EN AISLADOS STEC LEE-NEGATIVOS,  
PROVENIENTES DE MATERIA FECAL DE GANADO BOVINO DEL AÑO  
2016**

**PATRICIA MABEL ACUÑA DUARTE**

Tesis presentada para obtener el Título de Magíster en Ciencias Biomédicas

**San Lorenzo – Paraguay**

**Mayo, 2021**



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN**

**CIENCIAS DE LA SALUD**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**

**DETECCIÓN DE GENES DEL LOCUS DE ADHESIÓN Y  
AUTOAGREGACIÓN (LAA) EN AISLADOS STEC LEE-NEGATIVOS,  
PROVENIENTES DE MATERIA FECAL DE GANADO BOVINO DEL AÑO**

**2016**

**PATRICIA MABEL ACUÑA DUARTE**

**Tutor: PROF. DRA. ROSA MARÍA GUILLÉN FRETES**

**Co-tutor: MSc. FÁTIMA RODRÍGUEZ ACOSTA**

Tesis presentada para obtener el Título de Magíster en Ciencias Biomédicas

**San Lorenzo – Paraguay**

**Mayo, 2021**

Acuña Duarte, Patricia Mabel

Detección de genes del locus de adhesión y autoagregación (LAA) en aislados STEC LEE-negativos, provenientes de materia fecal de ganado bovino del año 2016/ Patricia Mabel Acuña Duarte; Tutor Rosa María Guillén Fretes; Co-tutor Fátima Rodríguez Acosta.- - San Lorenzo: UNA, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Facultad de Ciencias Químicas, 2021.

xiv, 53; il.

Tesis (Magíster en Ciencias Biomédicas) – UNA, IICS, FCQ, 2021

1. Shiga-Toxigenic Escherichia coli 2. Hemolytic-Uremic Syndrome 3. Virulence factors 4. Cattle. I. Título

CDD (ed. 18<sup>a</sup>) 614  
Ac93d



“La Maestría en Ciencias Biomédicas, POSG17-59, es cofinanciada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología - CONACYT, con recursos del FEEI”.

Institución ejecutora del programa: Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud-Universidad Nacional de Asunción.

“La presente tesis ha sido elaborada con el apoyo del CONACYT. El contenido de la misma es responsabilidad exclusiva de los autores y en ningún caso se debe considerar que refleja la opinión del CONACYT”.



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN**  
**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN**  
**CIENCIAS DE LA SALUD**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



**LA PROF. DRA. ROSA MARÍA GUILLÉN FRETES**, DOCENTE INVESTIGADOR DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS DE LA SALUD DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN.

**INFORMA:** Que el presente documento, titulado “Detección de genes del Locus de Adhesión y Autoagregación (LAA) en aislados STEC LEE-negativos, provenientes de materia fecal de ganado bovino del año 2016”, constituye la Memoria del Trabajo de Tesis que presenta la estudiante Patricia Mabel Acuña Duarte para optar al Título de Magíster en Ciencias Biomédicas, y ha sido realizado bajo su dirección.

Considerando que la tesis reúne los requisitos necesarios para ser presentada ante el tribunal constituido a tal efecto y para que conste, se expide y firma el presente informe en la ciudad de San Lorenzo, a los \_\_\_ días del mes de Mayo de 2021.

---

**Tutora: Prof. Dra. Rosa María Guillén Fretes**



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN**  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN  
CIENCIAS DE LA SALUD  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



**LA MSc. FÁTIMA RODRÍGUEZ ACOSTA**, DOCENTE INVESTIGADOR DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS DE LA SALUD DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN.

**INFORMA:** Que el presente documento, titulado “Detección de genes del Locus de Adhesión y Autoagregación (LAA) en aislados STEC LEE-negativos, provenientes de materia fecal de ganado bovino del año 2016”, constituye la Memoria del Trabajo de Tesis que presenta el/la estudiante Patricia Mabel Acuña Duarte para optar al Título de Magíster en Ciencias Biomédicas, y ha sido realizado bajo su dirección.

Considerando que la tesis reúne los requisitos necesarios para ser presentada ante el tribunal constituido a tal efecto y para que conste, se expide y firma el presente informe en la ciudad de San Lorenzo, a los \_\_\_\_ días del mes de Mayo de 2021.

---

**Co-Tutora: Prof. MSc. Fátima Rodríguez Acosta**



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN**  
**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN**  
**CIENCIAS DE LA SALUD**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



LA **B.C. PAMELA ESTHER MONGELÓS DACUNTE, MSc**,  
COORDINADORA DEL PROGRAMA DE POSTGRADO, DEPENDIENTE DE  
LA UNIDAD DE DOCENCIA DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN  
CIENCIAS DE LA SALUD DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN  
Y DE LA DIRECCIÓN DE POSTGRADO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS  
QUÍMICAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN.

**INFORMA:** Que el presente documento, titulado “Detección de genes del Locus de Adhesión y Autoagregación (LAA) en aislados STEC LEE-negativos, provenientes de materia fecal de ganado bovino del año 2016”, constituye la Memoria del Trabajo de Tesis que presenta la estudiante **Patricia Mabel Acuña Duarte** para optar al Título de Magíster en Ciencias Biomédicas bajo la dirección la docente investigadora **PROF. DRA. ROSA MARÍA GUILLÉN FRETES** y la codirección de la **BC. MSc FÁTIMA RODRÍGUEZ ACOSTA**, considerando que el trabajo de tesis reúne los requisitos de formato necesarios para ser presentada ante el tribunal constituido a tal efecto y para que conste, se expide y firma el presente informe en San Lorenzo, a los \_\_\_\_ días del mes de \_\_\_\_\_ de 2021.

---

**B.C. Pamela Esther Mongelós Dacunte, MSc.**  
**Coordinadora de la Maestría en Ciencias Biomédicas**



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN**  
**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN**  
**CIENCIAS DE LA SALUD**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



**Detección de genes del Locus de Adhesión y Autoagregación (LAA) en aislados STEC LEE-negativos, provenientes de materia fecal de ganado bovino del año 2016”.**

Trabajo de tesis para optar el título de Magíster en Ciencias Biomédicas.

Patricia Mabel Acuña Duarte

Aprobado el \_\_\_\_\_ de 2021

Tribunal examinador:

Presidente: Prof. Dra. María Eugenia Flores Giubi, PhD.

Miembros:

Prof. Dra. María Cristina Romero Rodríguez, PhD.

Prof. Dra. Juana Medarda Ortellado de Canese, MSc.

Prof. Dr. José Félix Marcial Plans Perrotta, MSc.

---

Dra. Rosa Guillén Fretes, PhD  
Tutor

---

Prof. Lic. Laura Joy, MSc.  
Directora de Postgrado FCQ

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar a Dios, por guiarme y darme la fortaleza para culminar esta etapa y por la bendición de tener con salud a todas las personas que me apoyaron y fueron partícipes del proceso hasta llegar a la meta.

A mis tutoras, la Dra. Rosa Guillén y MSc. Fátima Rodríguez, por la paciencia, y dedicación que me brindaron durante el proceso. Representan un gran ejemplo como personas y profesionales. Sin ellas, este trabajo no hubiera sido posible.

A todo el equipo de trabajo de Microbiología del IICS, por brindarme ayuda en cada paso por el laboratorio y al Conacyt, por darme la oportunidad de cursar esta Maestría.

A mis compañeras Anyi, Meli y Christa, por brindarme su ayuda en cada actividad y por hacer que el estudio sea más divertido. Gracias por apoyarme, escucharme y buscar soluciones conmigo ante cualquier dificultad.

A la coordinadora de la Maestría, MSc. Pamela Mongelós por acompañarnos durante todo el proceso y por la buena voluntad de buscar soluciones ante inconvenientes de cualquiera de los alumnos.

A mis padres, Enrique y Daniela por el apoyo incondicional, por ser mi soporte y los primeros en incentivarme a continuar hasta el final y a no decaer ante las adversidades. Les amo.

A mis hermanos, por acompañarme y ayudarme en los momentos cruciales, por impulsarme en cada etapa atravesada y por el apoyo incondicional.

A mis viejos y nuevos amigos, por la comprensión y apoyo en momentos claves. Gracias por el acompañamiento.

**DETECCIÓN DE GENES DEL LOCUS DE ADHESIÓN Y  
AUTOAGREGACIÓN (LAA) EN AISLADOS STEC LEE-NEGATIVOS,  
PROVENIENTES DE MATERIA FECAL DE GANADO BOVINO DEL AÑO  
2016**

**Patricia Acuña\*, Fátima Rodríguez\*\*, Rosa Guillén\*\***

\*Estudiante de la Maestría en Ciencias Biomédicas, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud,  
Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Asunción

\*\*Departamento de Microbiología del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Universidad  
Nacional de Asunción

**RESUMEN**

El Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) se asocia al consumo de alimentos contaminados con STEC, afecta principalmente a niños menores de 5 años y adultos mayores. Aquellos aislados portadores del Locus de borrado de enterocitos (LEE) fueron exclusivamente asociados por mucho tiempo a los cuadros más severos, sin embargo, en los últimos años se ha observado el aumento de casos graves causados por STEC LEE-negativos. El Locus de Adhesión y Autoagregación (LAA) es una isla de patogenicidad que se ha descrito recientemente y se la ha asociado a casos esporádicos de SUH causados por aislados LEE-negativos confiriendo propiedades de colonización, adhesión y autoagregación. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la presencia de la isla LAA en aislamientos provenientes de materia fecal de bovinos de 11 establecimientos ganaderos, mediante la detección de los módulos I, II, III y el gen *ag43* mediante la técnica de PCR. El 6,5% (5/77) de los aislados presentó la isla LAA de forma completa con un predominio portación de *stx2* (80%) provenientes de bovinos de 2 Departamentos, mientras que el 33,8% (26/77) de los aislamientos presentó LAA de forma incompleta distribuidos en todos los establecimientos estudiados. La baja prevalencia de LAA en los aislados estudiados es un aspecto positivo desde el punto de la producción cárnica para el Paraguay, porque podría indicar la circulación de cepas menos virulentas. Con perspectiva a futuro sería importante la búsqueda de otras islas de patogenicidad para profundizar el análisis del nivel de virulencia de los aislados circulantes.

**Palabras clave:** STEC, LEE-negativos, Locus de Adhesión y Autoagregación, ganado bovino.

## DETECTION OF GENES OF THE LOCUS OF ADHESION AND AUTOAGGREGATION (LAA) IN LEE-NEGATIVE STEC ISOLATES FROM FAECES SAMPLES OF BOVINE CATTLE IN 2016

Patricia Acuña\*, Fátima Rodríguez\*\*, Rosa Guillén\*\*

\*Student of the Master of Biomedical Sciences, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud,  
Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Asunción

\*\*Department of Microbiology, Institute de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Universidad Nacional  
de Asunción

### ABSTRACT

Hemolytic Uremic Syndrome (HUS) is associated with the consumption of food contaminated with STEC, it mainly affects children under 5 years of age and older adults. Those isolated carriers of the Locus of enterocyte effacement (LEE) were exclusively associated for a long time with the most severe cases; however, in recent years an increase in severe cases caused by LEE-negative STEC has been observed. The Locus of Adhesion and Autoaggregation (LAA) is a pathogenicity island that has been recently described and has been associated with sporadic cases of HUS caused by LEE-negative isolates, conferring colonization, adhesion and autoaggregation properties. The objective of this work was to study the presence of LAA in isolates from bovine fecal faeces from 11 livestock establishments, by detecting modules I, II, III and the *ag43* gene using the PCR technique. 6.5% (5/77) of the isolates studied presented the LAA island completely with a predominance of *stx2* (80%) from cattle from 2 Departments, while 33.8% (26/77) of the isolates presented the LAA island incompletely distributed in all the studied establishments. The low prevalence of LAA in the isolates studied is a positive aspect from the meat production point of view for Paraguay, because it could indicate the circulation of less virulent strains. Looking ahead, it would be important to search for other islands of pathogenicity to deepen the analysis of the level of virulence of circulating isolates.

**Keywords:** STEC, LEE-negative, Locus of Adhesion and autoaggregation, cattle.

## ÍNDICE

1.	MARCO TEÓRICO.....	1
	1.1 Aspectos Generales de <i>Escherichia coli</i> .....	1
	1.2 <i>E. coli</i> productora de toxina Shiga (STEC) .....	2
	1.3 Reservorio de las STEC .....	3
	1.4 Factores de virulencia .....	4
	1.5 Locus de Adhesión y Autoagregación (LAA) .....	7
	1.6 Situación en Paraguay .....	9
2.	OBJETIVOS .....	12
	2.1 Objetivo General .....	12
	2.2 Objetivos Específicos.....	12
3.	METODOLOGÍA .....	13
	3.1 Diseño del estudio y población .....	13
	3.2 Flujograma de actividades del presente trabajo .....	16
	3.3 Cultivo de aislados criopreservados.....	16
	3.4 Extracción de ADN .....	16
	3.4.1 Método de ebullición.....	16
	3.4.2 Método directo con colonias .....	17
	3.5 Detección de genes pertenecientes a la isla de patogenicidad LAA .....	17
	3.5.1 Amplificación de los módulos I, II y III.....	17
	3.5.2 Amplificación del gen <i>ag43</i> .....	18
	3.5.3 Amplificación del gen <i>hes</i> .....	19
	3.5.4 Amplificación del gen <i>iha</i> .....	20
	3.6 Cepas Control.....	22

3.7 Separación de fragmentos de ADN amplificados por electroforesis en gel de agarosa.....	22
3.8 Interpretación de los resultados .....	23
3.9 Consideraciones Éticas .....	23
3.10 Análisis y gestión de datos.....	24
4. RESULTADOS.....	25
4.1 Estandarización de la técnica de PCR para la detección de los módulos I, II, III y los genes <i>hes</i> , <i>iha</i> y <i>ag43</i> .....	25
4.2 Detección de los módulos I, II y III de la isla LAA y los genes <i>hes</i> , <i>iha</i> y <i>ag43</i> .....	29
5. DISCUSIÓN .....	34
6. CONCLUSIÓN.....	41
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42
8. ANEXOS .....	50
8.1 Anexo 1 .....	50
8.2 Anexo 2 .....	52
8.3 Anexo 3.....	53

**LISTA DE FIGURAS**

<b>Figura 1.</b> Vías de transmisión de STEC.....	4
<b>Figura 2.</b> Mecanismo de acción de Stx.....	5
<b>Figura 3.</b> Organización del Locus de Adhesión y Autoagregación.....	8
<b>Figura 4.</b> Ubicación geográfica de los 11 establecimientos ganaderos incluidos en el estudio marco.....	13
<b>Figura 5.</b> Criterios de elección de los aislados.....	15
<b>Figura 6.</b> Flujograma de trabajo de colonias criopreservadas.....	16
<b>Figura 7.</b> Esquema resumido de la isla de patogenicidad LAA.....	23
<b>Figura 8.</b> Amplificación de los módulos I, II y III por PCR en formato múltiple.....	26
<b>Figura 9.</b> Amplificación del gen <i>ag43</i> por PCR, marcador del módulo IV.....	27
<b>Figura 10.</b> Amplificación del gen <i>hes</i> por PCR.....	28
<b>Figura 11.</b> Amplificación del gen <i>iha</i> por PCR.....	28
<b>Figura 12.</b> Imagen representativa de las muestras analizadas.....	30
<b>Figura 13.</b> Distribución de la Isla LAA en aislados STEC.....	31

**LISTA DE TABLAS**

<b>Tabla 1.</b> Secuencia de primers y tamaño de amplicones esperados para cada reacción de PCR.....	21
<b>Tabla 2.</b> Perfil de virulencia y portación de las isla LAA en aislados STEC LEE-negativos .....	31

## 1. MARCO TEÓRICO

### 1.1 Aspectos Generales de *Escherichia coli*

*Escherichia coli* es una bacteria del tipo bacilo Gram negativo perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*. *E. coli* cuenta con flagelos peritricos, por tanto es una bacteria móvil, es capaz de crecer tanto en condiciones aerobias como anaerobias a 37°C (1).

Esta bacteria coloniza el tracto gastrointestinal de los animales de sangre caliente dentro de las primeras horas del nacimiento y coexisten con el huésped, beneficiándose mutuamente y sin causar ningún tipo de enfermedad, excepto cuando el huésped se encuentra inmunocomprometido o las barreras gastrointestinales son alteradas (2,3). Por otra parte, algunos clones de *E. coli* han adquirido factores de virulencia específicos, los cuales, le confieren una gran capacidad para adaptarse a nuevos ambientes y desencadenar un amplio espectro de enfermedades. Estos factores de virulencia, frecuentemente se encuentran codificados en elementos genéticos móviles, los cuales, pueden movilizarse entre diferentes cepas, generando varios perfiles de virulencia. Aquellas combinaciones de factores de virulencia que han resultado más exitosas y han persistido son las que han pasado a formar parte de los “patotipos” de *E. coli*, los cuales, son capaces de desencadenar enfermedades tanto en individuos inmunocomprometidos, como en individuos sanos (3,4).

Las infecciones por *E. coli* puede desencadenar síndromes clínicos de diversos tipos: las cepas intestinales son causantes de enfermedades diarreicas y las cepas extraintestinales pueden desencadenar infecciones del tracto urinario, así como sepsis y meningitis (2,3). Las cepas intestinales de *E. coli*, a su vez, pueden ser subclasificadas en grupos diferentes, los cuales, son caracterizados según los factores de virulencia involucrados en la infección, el cuadro clínico que desencadenan y el sitio de colonización de los mismos (5,6).

Los patotipos diarreogénicos de *E. coli* se clasifican típicamente en seis categorías: *E. coli* enterotoxigénica (ETEC, por sus siglas en inglés de enterotoxigenic *E. coli*), *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) o *E. coli* productora de Toxina Shiga (STEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* difusamente adherente (DAEC) y, recientemente se ha incluido un séptimo patotipo: *E. coli* invasiva-adherente (AIEC), al cual, se lo asocia con la enfermedad de Crohn (1–3).

### **1.2 *E. coli* productora de toxina Shiga (STEC)**

STEC representa uno de los patógenos causantes de Enfermedades transmitidas por Alimentos (ETA) más importantes en el mundo. Se estima que ocurren 76.000.000 de casos de ETA a nivel mundial, siendo STEC responsable de 1.500.000 de los casos, afectando principalmente a niños menores de 5 años y a adultos mayores de 60 años (7,8). La infección por STEC induce un amplio espectro de cuadros clínicos incluyendo una diarrea acuosa, Colitis Hemorrágica (CH) y el Síndrome Urémico Hemolítico (SUH), con complicaciones potencialmente letales (7).

STEC es responsable de una amplia variedad de cuadros clínicos, que pueden ser autolimitados o bien, desencadenar cuadros severos que pueden resultar fatales. Los primeros síntomas que pueden aparecer en la infección por STEC son diarrea acuosa y calambres abdominales. Aproximadamente un 90% de estos terminan desarrollando colitis hemorrágica (CH) y, a su vez, el 5% al 15% de los casos de CH progresan a SUH (9,10).

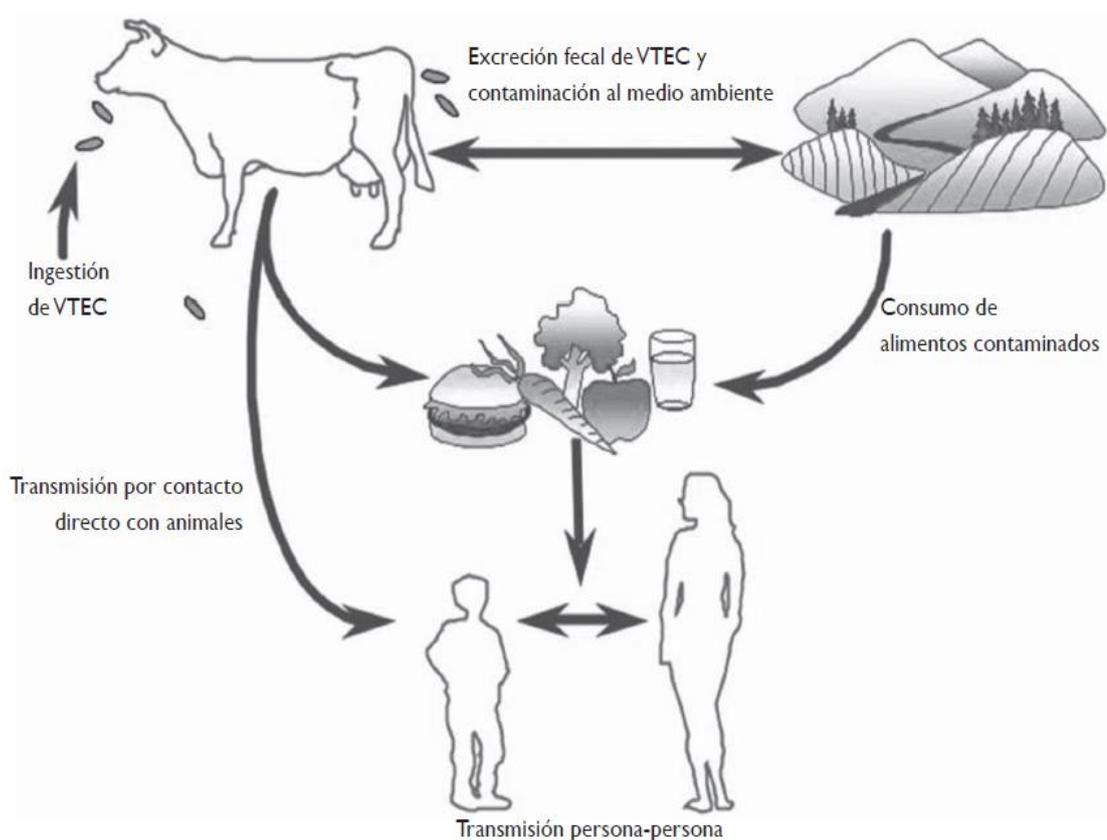
El SUH se caracteriza por la triada: anemia hemolítica, trombocitopenia e insuficiencia renal aguda. Las consecuencias a largo plazo en pacientes que han desarrollado SUH pueden ser a nivel del sistema renal, el tracto gastrointestinal, a nivel del sistema cardiovascular o el sistema nervioso central, siendo mortal en aproximadamente 5% de los casos (9,11).

### **1.3 Reservorio de las STEC**

STEC coloniza el tracto intestinal de muchas especies animales, sin embargo, los rumiantes representan el reservorio más importante de estos patógenos, los cuales, pueden ser transmitidos a los humanos a través de varias vías (**Figura 1**) (12). El consumo de alimentos contaminados y el contacto con el reservorio representan las principales vías de infección por STEC, siendo la carne y los productos lácteos contaminados, los principales alimentos responsables de grandes brotes registrados desde los años 1998 a 2016 (13,14). La infección por STEC también puede tener lugar por el consumo de aguas contaminadas y por el contacto de persona a persona (15).

El ganado bovino no desarrolla ninguna de las afecciones graves que se presentan en el humano debido a la infección por STEC. Los mismos son portadores asintomáticos del patógeno, por presentar una sensibilidad disminuida a las toxinas Shiga, lo cual, se debe a la expresión diferencial de Gb3 en diferentes tejidos. Estos receptores se encuentran ausentes en la vasculatura intestinal del bovino, por lo que la toxina no es endocitada y, por tanto, no es transportada a otros órganos que resultan ser sensibles a la toxina, traduciéndose esto en una colonización asintomática a nivel del intestino (15,16).

Estos patógenos son capaces de sobrevivir diversas condiciones del entorno, incluso en alimentos. Algunas cepas son capaces de soportar bajas temperaturas de entre 6,5 a 8°C, así como condiciones ácidas con pH de 2,5, lo cual, les permite sobrevivir en alimentos refrigerados y soportar las condiciones de pH bajos de ciertos alimentos y el paso a través del estómago (17,18). Es por esto, que se hace crucial las buenas prácticas de higiene en los procesos de faenamiento de los animales y la manipulación de los alimentos (15).

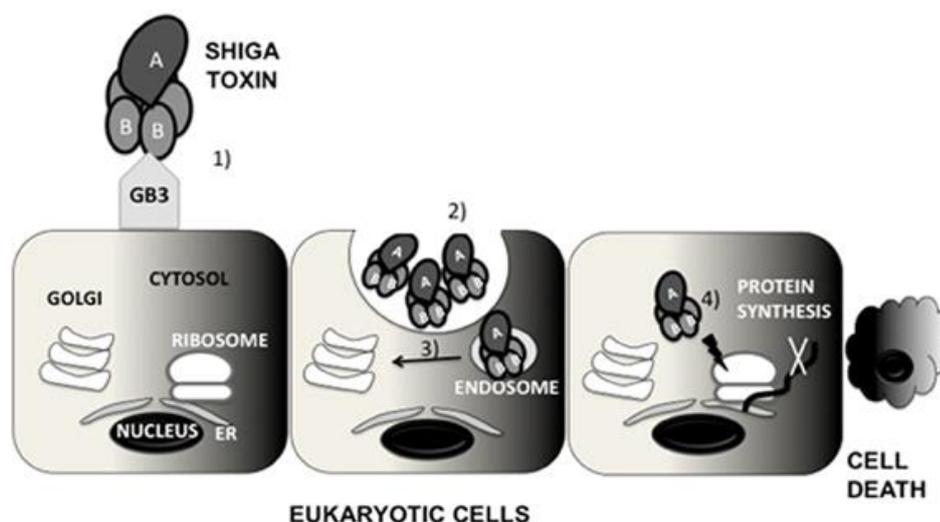


**Figura 1. Vías de transmisión de STEC.** La infección por STEC puede llegar al ser humano por el consumo de aguas y alimentos contaminados, así como por el contacto directo con animales portadores o, bien, por el contacto de persona a persona. Fuente: Etcheverría et al., 2013 (15).

#### **1.4 Factores de virulencia**

El principal factor de virulencia de STEC es la toxina Shiga (Stx), la cual, pertenece a la familia de las proteínas inactivantes del ribosoma, y presenta dos variantes de la misma: Stx1 y Stx2, codificadas por los genes *stx1* y *stx2*, respectivamente. Stx1 y Stx2 comparten un 55% de homología en sus estructuras aminoacídicas primarias y comparten el mismo receptor, denominado Gb3 (19–21). Las toxinas Shiga, tanto Stx1 como Stx2 poseen una estructura AB<sub>5</sub> la cual, comprende una subunidad catalítica A con actividad N-glicosidasa y 5 subunidades B idénticas que reconocen la célula blanco y se unen a ella (22,23).

Para ingresar a la célula blanco, el dominio B se une a un glicolípido de membrana denominado globotriaosilceramida (Gb3) e inicia la internalización vía endocitosis (**Figura 2**). Una vez ingresada, la toxina pasa del endosoma temprano al aparato de Golgi y, posteriormente, al retículo endoplásmico mediante transporte retrógrado (24). Durante este proceso, la subunidad A es escindida en dos fragmentos: A1 y A2. El fragmento A1 que representa la subunidad catalíticamente activa de la toxina, se libera al citosol donde remueve un residuo de adenina de la porción 28S del ARNr de la subunidad 60S del ribosoma, inhibiendo así, su unión al factor de elongación EIF2a, por lo cual, se interrumpe el proceso de síntesis proteica (19,25). La toxina induce una respuesta de estrés ribotóxico (RSR) debido a las alteraciones, lo cual, activa una variedad de efectores pro-inflamatorios y pro-apoptóticos que dan como respuesta la secreción de citocinas inflamatorias, una disfunción endotelial y apoptosis celular (24).



**Figura 2. Mecanismo de acción de Stx.** 1) Las subunidades B se unen al receptor Gb3 para el ingreso de Stx a la célula blanco. 2) Stx se internaliza por endocitosis. 3) Vía transporte retrógrado pasa del endosoma al aparato de Golgi y el retículo endoplásmico (RE). 4) Una vez en el RE, Stx interacciona con el ribosoma, interrumpiendo la síntesis proteica, causando estrés celular y muerte por apoptosis. Fuente: Pacheco et. al, 2012 (21).

Gb3 se expresa sólo en algunas células humanas. Entre estas, se encuentran las células epiteliales, endoteliales, mesangiales y glomerulares de los riñones, las células endoteliales de las microvasculaturas del intestino y del cerebro, así como en algunos grupos de linfocitos B. Es por esto, que los principales efectos de la infección por STEC se reflejan en estos órganos (23).

Se ha observado que Stx2 es más potente que Stx1 para los humanos y epidemiológicamente se ha observado que aquellos aislados que presentan Stx2 tienen una mayor probabilidad de desencadenar infecciones más severas que aquellos que portan Stx1 o la combinación Stx1/Stx2 (21,25).

Si bien, la toxina Shiga es el factor de virulencia principal, otros son necesarios para la adherencia de la bacteria al epitelio intestinal del huésped, por lo que la sola presencia de la toxina Shiga no es suficiente para el desarrollo del cuadro clínico (26). Se han descrito varios factores de virulencia asociados a la capacidad adherente de STEC al epitelio intestinal, como la intimina, codificada por el gen *eae* el cual se encuentra dentro del “Locus of Enterocyte Effacement” (LEE) y cuya presencia se asocia con la mayoría de los cuadros de SUH (20). La adhesina autoaglutinante de STEC, codificada por el gen *saa*, al igual que la intimina, participa en el paso de adherencia al epitelio y ha sido descrita en aislados STEC LEE-negativos (27). Otro factor de virulencia importante, representa la enterohemolisina codificada por el gen *ehxA*, la cual, posee actividad hemolítica y cuya presencia suele estar asociada a cuadros diarreicos y SUH (28).

El “Locus of Enterocyte Effacement” (LEE) o Locus de adhesión y borrado es una isla de patogenicidad que contiene al gen *eae*, codificante de la proteína intimina, cuya acción se caracteriza por la histopatología de “adhesión y borrado”, producida por el reordenamiento de las fibras de actina del citoesqueleto de los enterocitos, dando lugar a la formación de estructuras tipo pedestales y provocando el borrado de las microvellosidades del intestino (29). Este factor de virulencia se encuentra presente en las STEC O157:H7, el serotipo aislado con mayor frecuencia en muestras clínicas asociadas a casos de SUH en todo el mundo, al igual que en los serogrupos O26, O45, O103, O111, O121 y O145, denominados como “big six”, responsables del 80% de los casos de SUH causados por aquellas cepas no-O157

(14,30–32). LEE fue considerado por mucho tiempo como un marcador de riesgo para el desarrollo de SUH, debido a las cifras epidemiológicas registradas, sin embargo, se ha registrado un aumento de reportes de casos esporádicos y pequeños brotes de SUH desencadenado por la infección con serotipos como O113:H21, el serogrupo O91 (33–36). Este hecho, sugiere que existen mecanismos de virulencia alternativos, que contribuyen con la patogénesis de las LEE-negativas por lo que durante los últimos años, las investigaciones se han ampliado hacia la búsqueda de estos mecanismos utilizados por este grupo de STEC LEE-negativas para el desarrollo de las enfermedades.

Se han descrito otros genes de virulencia participantes en la adherencia, que son exclusivos de STEC LEE-negativas, como *saa*, así como también se han hallado otras islas de patogenicidad (PAI) que contienen genes que contribuyen a que el primer paso de adherencia pueda desencadenarse (27).

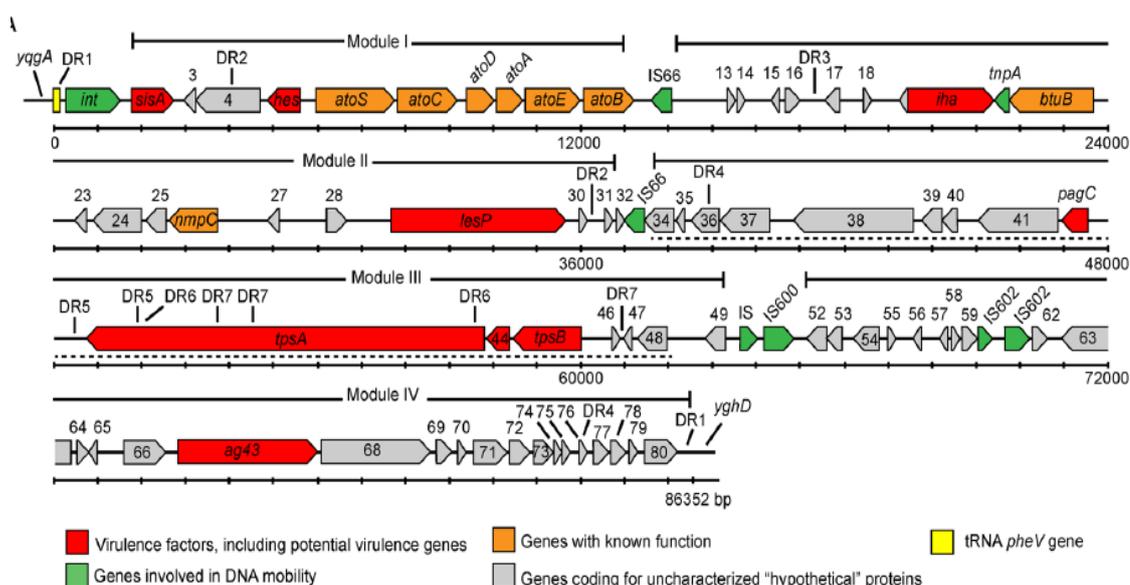
Algunas de las PAI que se han descrito en STEC LEE-negativas, son codificantes de genes que se ven implicados en la invasión y destrucción del epitelio intestinal como el “Locus of Proteólisis Activity” (LPA) o locus de actividad proteolítica, “Locus of Invasion and Contact-dependent Growth Inhibition” (LIC) o locus de invasión e inhibición del crecimiento dependiente del contacto (37,38). Por otra parte, se han descrito otras que contienen genes implicados en la colonización y adhesión de las STEC como el “Locus of Adhesion and Colonization” (LAC) o locus de adhesión y colonización, el “Locus of Adhesion and Autoagregación” (LAA) o locus de adhesión y autoagregación, “Subtilase-Encoding Pathogenicity Island” (SE-PAI) o Isla de Patogenicidad codificante de subtilasa que además codifica a una proteína con actividad sinérgica con las toxinas Shiga, entre otros (38–40).

Entre estas PAI, se ha observado una mayor prevalencia de LAA en las LEE-negativas, lo que sugiere que cumple un rol importante para este grupo de patógenos (38).

### **1.5 Locus de Adhesión y Autoagregación (LAA)**

El Locus de Adhesión y Autoagregación (LAA) es una isla de patogenicidad

con un tamaño de 86.256 pb, que se ha descrito recientemente y se las ha encontrado exclusivamente en el grupo de las STEC LEE-negativas. En esta isla, se encuentran codificados 80 genes que se organizan, a su vez, dentro de 4 módulos: Módulo I, Módulo II, Módulo III y Módulo IV (**Figura 3**). En el año 2017, fue descrito por Montero y colaboradores y han caracterizado algunos genes de virulencia que contribuyen a la patogenicidad de las STEC LEE-negativas (40). Entre los factores de virulencia identificados en esta isla, se ha caracterizado la proteína Hes, codificada por el gen *hes* que incrementa la adherencia a las células epiteliales, además, contribuye en la formación del biofilm, confiere a la bacteria la capacidad de autoagregación y se encuentra ubicado en el módulo I. Además de Hes, otras adhesinas fueron identificadas en LAA, como la codificada por el gen *iha* que se ubica dentro del módulo II y, por otra parte el gen *Ag43*, asociado a la autoagregación de la bacteria se ubica en el módulo IV (40–42).



**Figura 3. Organización del Locus de Adhesión y Autoagregación.** Los 80 genes de LAA se encuentran organizados dentro de los módulos I, II, III y IV. Los genes predichos y el sentido de su transcripción son ilustrados en forma de bloques de flechas. Algunos genes ya caracterizados se muestran en la figura, así como los genes considerados como potenciales factores de virulencia. **Fuente:** Montero et al., 2017 (40).

LAA puede encontrarse de manera completa en las STEC, es decir, con los cuatro módulos presentes así como también puede encontrarse con la estructura incompleta (40,43). Se ha visto que la presencia de la estructura completa es la que se asocia con la aparición de los cuadros clínicos graves como SUH y CH (40). Si bien, aún no se han caracterizado todos los genes de esta isla de patogenicidad, los genes mencionados proveen a la bacteria el fenotipo de colonización del epitelio intestinal y, por tanto, podrían contribuir al mejor entendimiento del mecanismo utilizado por las STEC LEE-negativas en la etapa de adhesión al epitelio para que la infección por STEC pueda tener lugar.

LAA ha sido detectada en aislados de muestras clínicas asociadas a casos de colitis hemorrágica y SUH, y que en mayor frecuencia pertenecen a los serogrupos O91, O113, O174, entre otros, que han sido reportados en casos esporádicos de infección severa por STEC (44–47).

En Argentina, país endémico del SUH, el 60% de los casos se encuentra asociado al serotipo O157:H7 y el 40% restante a serogrupos no-O157, siendo O174 el cuarto serogrupo no-O157 con mayor prevalencia detectado en aislamientos de muestras clínicas provenientes de casos de SUH, destacándose como una problemática del país ya que no existen protocolos de diagnóstico que cubran la detección de este serogrupo, al pertenecer al grupo de las LEE-negativas (36). Por otra parte, en otros países Europeos también se ha registrado el incremento de casos de SUH causada por serogrupos LEE-negativos como O91 y O113, los cuales, al igual que O174 han sido encontrados en el estudio de Montero y colaboradores que son portadores, en su mayoría, de la isla de patogenicidad LAA (40,46).

### **1.6 Situación en Paraguay**

En Paraguay, los reportes de SUH son poco frecuentes y así, se cuenta apenas un caso publicado en un niño de 5 años, asociado al serotipo O157:H7 en el año 2009 (48). Por otra parte, en un estudio realizado en el año 2001, en el que se ha incluido a individuos pediátricos con algún tipo de trastorno renal, se ha encontrado que apenas el 0,96% de los mismos había presentado SUH, revelando que esta patología no es muy frecuente en nuestro país, o bien, que existe un sub-registro de la

misma debido a la dificultad del diagnóstico etiológico (49). Estas frecuencias, son muy bajas a las comparadas con los países de la región, como Chile, donde la tasa de incidencia de SUH es de 3,4 casos por cada 100.000 niños menores de 15 años y un 10,2% de insuficiencia renal crónica desencadenada por la infección por STEC (50,51). Por otra parte Argentina constituye un país endémico de SUH, con la mayor tasa de incidencia anual de SUH en todo el mundo, siendo esta de 10 a 12 casos por cada 100.000 niños menores de 5 años (52). A su vez, el SUH representa la primera causa de insuficiencia renal aguda, la segunda causa de insuficiencia renal crónica y es responsable de la necesidad de transplante renal en el 20% de niños y adolescentes en Argentina (53).

Se han realizado en el país, estudios acerca de la frecuencia de portación de STEC en bovinos provenientes de diferentes establecimientos ganaderos del país, encontrándose un alto nivel de portación, con un promedio de 80% entre todos los establecimientos (54–56). Se realizó la búsqueda de los serogrupos O104, O157 y los denominados como “big six” (O26, O45, O103, O111, O121, O145), los cuales, representan a los serogrupos que con mayor frecuencia son reportados a nivel mundial como causantes de grandes brotes de infección así como un mayor número de casos de SUH, y no se ha encontrado presencia de los mismos en estos bovinos analizados. Por otra parte, se ha encontrado que circulan serogrupos como O91 y O130, los cuales, han incrementado su aparición en muestras provenientes de SUH en diferentes países (14,56,57). Así como también la detección de STEC en carne molida comercializada en carnicerías de la zona Metropolitana de Asunción en el 100% de los locales incluidos en dicho estudio es un dato alarmante que pone de manifiesto las malas prácticas de higiene a la hora del procesamiento de los alimentos (58).

En este contexto, la discordancia entre la baja incidencia de SUH en el país y la alta frecuencia de portación de STEC, tanto en bovinos como en alimentos comercializados, podría deberse a sub-registros de los casos o, bien, al predominio de STEC LEE-negativas que son las predominantes según publicaciones anteriores.

Ante esta situación, el siguiente cuestionamiento es acerca de si los aislamientos STEC LEE-negativos de Paraguay presentan otras islas de

patogenicidades. Es por esto, que el presente trabajo se enfoca en evaluar la presencia del Locus de Adhesión y Autoagregación (LAA) en materia fecal de ganado bovino, ya que es la principal fuente de contaminación de los alimentos y aguas y, teniendo en cuenta que el Paraguay es uno de los principales exportadores de carne bovina a nivel mundial (59).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo General

- Detectar genes del Locus de Adhesión y Autoagregación (*LAA*) en aislados STEC *LEE*-negativos, provenientes de materia fecal de ganado bovino del año 2016.

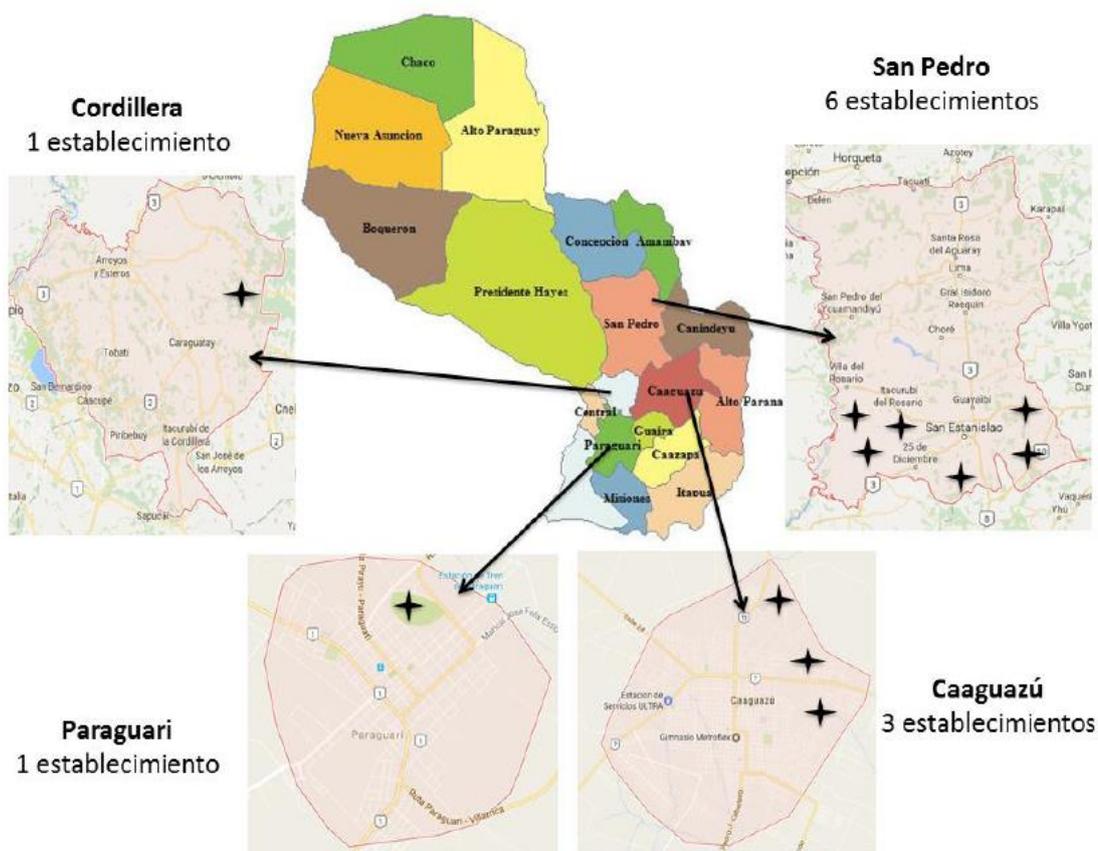
### 2.2 Objetivos Específicos

- Estandarizar reacciones de PCR para la detección de los genes *hes*, *iha*, *ag43* y los módulos I, II y III de la isla de patogenicidad *LAA*.
- Detectar la presencia de los genes de la isla de patogenicidad *LAA* en aislados STEC obtenidos de materia fecal de ganado bovino de los Dptos. de San Pedro, Caaguazú, Cordillera y Paraguarí.

### 3. METODOLOGÍA

#### 3.1 Diseño del estudio y población

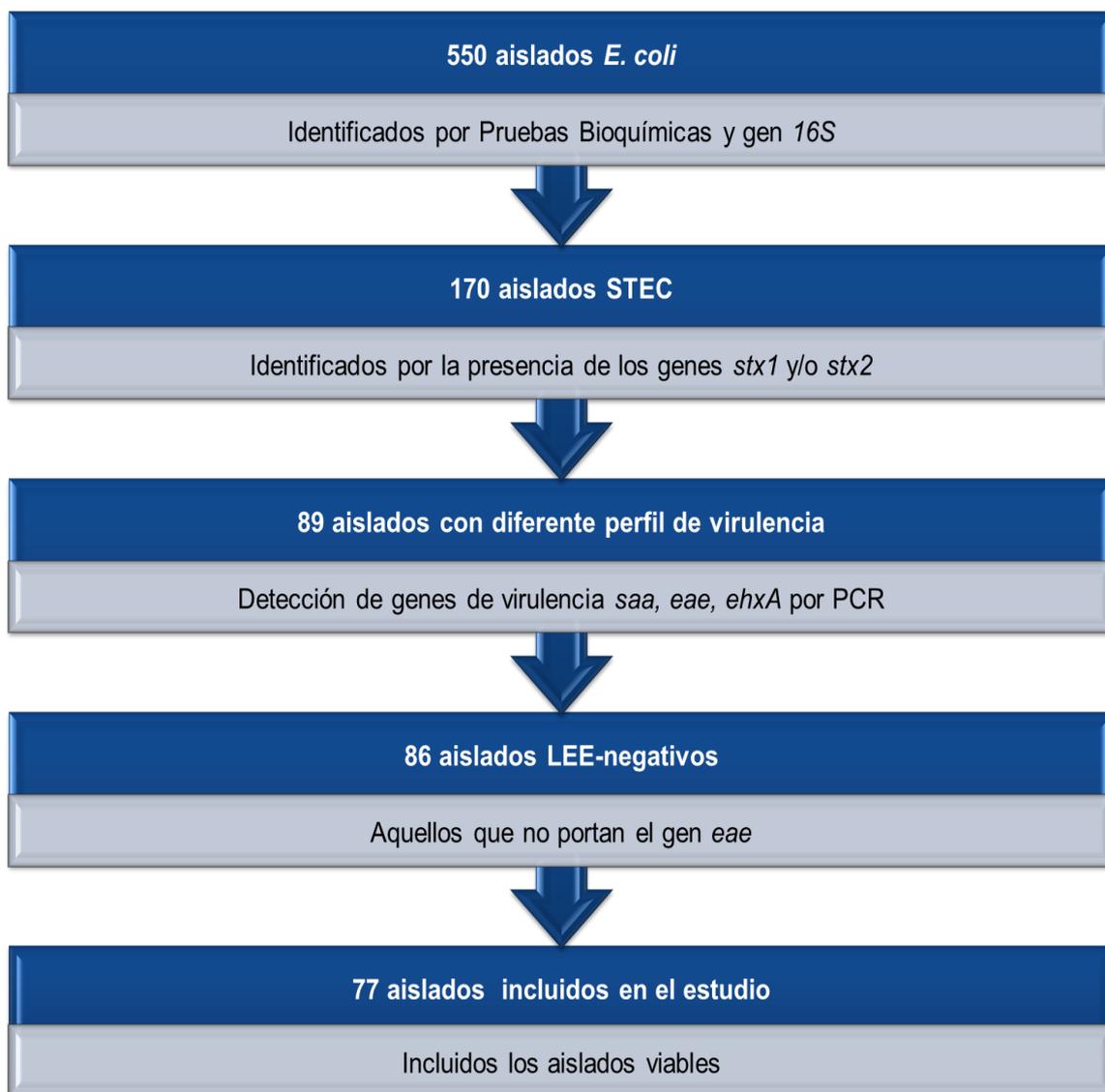
El presente estudio tuvo un diseño observacional descriptivo de corte transversal, para el cual, fueron incluidos 77 aislados STEC LEE-negativos que se encontraban criopreservados a  $-80^{\circ}\text{C}$  en medio BHI-glicerol al 15% en el Biobanco del Área de Bacteriología Molecular del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud (IICS) de la Universidad Nacional de Asunción (UNA). Estos aislados fueron obtenidos de muestras de materia fecal de ganado bovino, provenientes de 11 establecimientos ganaderos ubicados en los departamentos de San Pedro (6 establecimientos), Caaguazú (3 establecimientos), Cordillera (1 establecimiento) y Paraguarí (1 establecimiento), en el año 2016 (54). En la **Figura 4** se representa la ubicación de los 11 establecimientos incluidos en el estudio.



**Figura 4.** Ubicación geográfica de los 11 establecimientos ganaderos incluidos en el estudio marco. Figura proveniente de Rojas et al., 2017 (54).

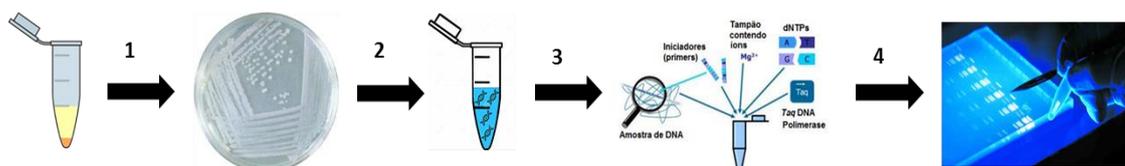
Los aislados fueron obtenidos en el año 2016 como parte de un proyecto denominado “Caracterización del perfil de virulencia de aislados de *Escherichia coli* productores de la toxina Shiga (STEC) de materia fecal de ganado bovino y carne molida en el año 2016” (54). El procedimiento llevado a cabo dentro del proyecto marco se detalla en el **Anexo 1**.

Las características y el número de aislados incluidos en el presente trabajo se representan esquemáticamente en la **Figura 5**. Brevemente, un total de 550 aislados de *E. coli* fueron obtenidos en el proyecto marco, de los cuales, 170 fueron identificados como STEC, ya que eran portadores de los genes *stx1* y/o *stx2*. De estas STEC, se seleccionaron colonias individuales con perfiles *stx1/stx2* diferentes por cada bovino, dando un total de 89 aislados, a los cuales se les realizó el *screening* de factores de virulencia accesorios (*saa*, *eae*, *ehxA*). 86 de estos aislados fueron identificados como LEE-negativos por la ausencia del gen *eae*, lo cual es criterio suficiente para clasificar a la STEC como LEE-negativa (60). 77 de estos aislados LEE-negativos se encontraban viables luego del proceso de criopreservación y, por tanto, estos fueron sujetos de estudio para la detección de los genes del Locus de Adhesión y Autoagregación (LAA). Estos 77 aislados incluidos en el presente trabajo, representa el estudio de 32 bovinos portadores de cepas STEC LEE-negativas provenientes de 11 establecimientos ganaderos ubicados en 4 Departamentos diferentes (San Pedro, Cordillera, Caaguazú, Paraguarí) (54).



**Figura 5. Criterios de elección de los aislados. STEC incluidos en el presente trabajo.**

### 3.2 Flujograma de actividades del presente trabajo



**Figura 6. Flujograma de trabajo de colonias criopreservadas.** 1) Cultivo de colonias individuales criopreservadas en agar LB a 37°C, 2) Extracción de ADN de colonias individuales, 3 y 4) PCR convencional y electroforesis en gel de agarosa para los módulos I, II y III de la isla LAA y genes *hes*, *iha*, *ag43*.

### 3.3 Cultivo de aislados criopreservados

Los aislamientos STEC *LEE*-negativos que se encontraban criopreservados en BHI-glicerol al 15%, fueron cultivados en agar Luria Bertani (LB) para la verificación de la viabilidad de los mismos por su crecimiento. Para la preparación del medio LB se utilizó 1% de Tripteína Bacteriológica (Britania, Argentina), 0,5% de Extracto de Levadura (Britania, Argentina), 1% de Cloruro de Sodio (Anedra, Argentina), ajustando el pH a 7 con Hidróxido de Sodio (Sigma-Aldrich, Suecia) para el posterior agregado de 2,5% de Agar Bacteriológico N° 1 (Lab M, Reino Unido).

Los aislamientos cultivados fueron incubados en estufa (Memmert, Alemania) a 37°C por 24 horas para su crecimiento y posterior extracción de ADN.

### 3.4 Extracción de ADN

En el presente trabajo se utilizaron dos metodologías de extracción de ADN, el método de ebullición y el método directo con colonias.

#### 3.4.1 Método de ebullición

Este método descrito por Ennis y colaboradores en el año 2012 fue empleado, realizando algunas modificaciones, para la amplificación de los genes *hes*

e *iha*, cuyos productos de amplificación esperados presentan un tamaño inferior a 1.000 pb (61).

Para la extracción del material genético se tomaron de 3 a 5 colonias crecidas en agar LB durante 24 horas. Estas colonias fueron resuspendidas en 300 µL de agua estéril y llevadas a un bloque térmico para su ebullición a 100°C (Fried-electric DBD-002N, Israel) durante 10 minutos y posterior centrifugación a 13.000 rpm a 25°C durante 5 min (Thermo Scientific Sorval Legend Micro 21R, USA). A continuación, el sobrenadante, el cual contiene el ADN, fue criopreservado a -20°C para su posterior uso en la detección de genes por PCR.

### **3.4.2 Método directo con colonias**

El método descrito por Jose y colaboradores en el año 2006 fue empleado para la amplificación del gen *ag43* y los módulos I, II y III, en cuyas reacciones de PCR se esperan productos de amplificación de tamaño superior a 1.000 pb (62). Esta metodología fue implementada tras la observación de productos de amplificación de tamaños inespecíficos al utilizar el método de extracción por ebullición, lo cual, ocurre debido a la fragmentación del material genético por su exposición a altas temperaturas durante un tiempo prolongado (63).

Para ello, se tomaron 2 a 3 colonias crecidas en agar LB durante 24 horas. Estas colonias fueron resuspendidas en 300 µL de agua estéril y se homogeneizaron en vórtex a 500 rpm por 10 segundos. La suspensión homogénea fue utilizada como templado para la detección de los genes en cuestión, teniendo en cuenta que las condiciones de reacción incluyen el paso de desnaturalización inicial a 94°C por 5 min y que Jose y colaboradores han demostrado que es suficiente el calentamiento a 94°C durante 2 minutos para romper la pared celular (62).

## **3.5 Detección de genes pertenecientes a la isla de patogenicidad LAA**

### **3.5.1 Amplificación de los módulos I, II y III**

Se realizó una reacción de PCR múltiple para la detección de los módulos I, II y III, utilizando como base las condiciones descritas por Montero et al., 2017, con

algunas modificaciones (40). Fue establecida una concentración de 1,5 mM de  $MgCl_2$  (no mencionada por Montero) ya que representa la concentración suficiente de la misma sin que se formen bandas secundarias en la fase de electroforesis. Por otra parte, se modificó la temperatura de extensión, ya que la temperatura de elongación óptima de la Taq polimerasa establecida por el fabricante es de 72°C (Invitrogen, USA) (64).

Las condiciones de reacción para la detección de los módulos son descritas a continuación: buffer 1x (Invitrogen, USA), dNTPs 0,4 mM (Invitrogen, USA), oligonucleótidos para los módulos I, II y III 0,3  $\mu$ M de cada uno de ellos (Macrogen, Corea),  $MgCl_2$  1,5 mM (Invitrogen, USA), 1 Unidad de Taq Polimerasa por reacción (Invitrogen, USA), 1,5  $\mu$ L de ADN molde, en un volumen total de reacción de 15  $\mu$ L.

Las condiciones de ciclado fueron: desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos, 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, anillamiento a 62,5°C por 40 segundos y extensión a 72°C por 2 minutos 30 segundos, y una extensión final a 72 °C por 10 minutos. Se empleó el termociclador Applied Biosystems-SimpliAmp Thermal Cycler (Singapur).

La secuencia de los oligonucleótidos y el tamaño de los productos de amplificación esperados se detallan en la **Tabla 1**.

### **3.5.2 Amplificación del gen *ag43***

Se realizó la detección del gen *ag43* como marcador de la presencia del módulo IV, ya que no es posible el diseño de primers específicos para dicho módulo, debido a que los genes que componen al mismo, se encuentran ampliamente distribuidos en *E. coli*. Para su detección, se realizó una reacción de PCR simple utilizando como base las condiciones descritas por Montero et al., 2014, con algunas modificaciones (65) Fue establecida una concentración de 1,5 mM de  $MgCl_2$  ya que representa la concentración suficiente de la misma sin que se formen bandas secundarias en la fase de electroforesis (64). Por otra parte, se calculó la  $T_m$  de los oligonucleótidos con el software ThermoFisher Scientific  $T_m$  calculator y se

estableció la temperatura de anillamiento a 5° por debajo de la T<sub>m</sub> de los oligonucleótidos.

Las condiciones de reacción para la detección de *ag43* son descritas a continuación: buffer 1x (Invitrogen, USA), dNTPs 0,2 mM (Invitrogen, USA), oligonucleótidos 0,3 μM (Macrogen, Corea), MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM (Invitrogen, USA), 1 Unidad de Taq Polimerasa por reacción (Invitrogen, USA), 1,5 μL de ADN molde, en un volumen total de reacción de 15 μL.

Las condiciones de ciclado fueron: desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos, 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, anillamiento a 60°C por 40 segundos y extensión a 72°C por 1 minuto 20 segundos, y una extensión final a 72 °C por 10 minutos. Se empleó el termociclador Applied Biosystems-SimpliAmp Thermal Cycler (Singapur).

La secuencia de los oligonucleótidos y el tamaño del producto de amplificación esperado se detallan en la **Tabla 1**.

### **3.5.3 Amplificación del gen *hes***

Se realizó una reacción de PCR simple para la detección del gen *hes*, utilizando como base las condiciones descritas por Montero et al., 2017 (40).

Fue establecida una concentración de 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> ya que representa la concentración suficiente de la misma sin que se formen bandas secundarias en la fase de electroforesis. Por otra parte, se calculó la T<sub>m</sub> de los oligonucleótidos con el software ThermoFisher Scientific T<sub>m</sub> calculator y se estableció la temperatura de anillamiento a 5° por debajo de la T<sub>m</sub> de los cebadores, la concentración de los mismos fue establecida en 0,1 μM de tal manera que no se formen uniones inespecíficas y la concentración de dNTPs fue establecida en 0,2 mM ya que representa la concentración óptima para que la reacción no sea inhibida ni se formen productos secundarios. En cuanto al tiempo de elongación, considerando que el tamaño de producto esperado es de 350 pb y que la extensión es de aproximadamente 1kb por minuto, se estableció un tiempo de elongación de 30 segundos (64).

Las condiciones de reacción para la detección de *hes* incluyeron: buffer 1x (Invitrogen, USA), dNTPs 0,2 mM (Invitrogen, USA), oligonucleótidos 0,1  $\mu$ M (Macrogen, Corea),  $MgCl_2$  1,5 mM (Invitrogen, USA), 1 Unidad de Taq Polimerasa por reacción (Invitrogen, USA), 1,5  $\mu$ L de ADN molde, en un volumen total de reacción de 15  $\mu$ L.

Las condiciones de ciclado fueron: desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos, 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, anillamiento a 58°C por 30 segundos y extensión a 72°C por 30 segundos, y una extensión final a 72 °C por 5 minutos. Se empleó el termociclador Applied Biosystems-SimpliAmp Thermal Cycler (Singapur).

La secuencia de los oligonucleótidos y el tamaño del producto de amplificación esperado se detallan en la **Tabla 1**.

#### **3.5.4 Amplificación del gen *iha***

Se realizó una reacción de PCR simple para la detección del gen *iha*, utilizando como base las condiciones descritas por Abe et al., 2008 (66).

Fue establecida una concentración de 1,5 mM de  $MgCl_2$  ya que representa la concentración suficiente de la misma sin que se formen bandas secundarias en la fase de electroforesis. Por otra parte, se calculó la  $T_m$  de los oligonucleótidos con el software ThermoFisher Scientific  $T_m$  calculator y se estableció la temperatura de anillamiento a 5° por debajo de la  $T_m$  de los cebadores, la concentración de los mismos fue establecida en 0,1  $\mu$ M de tal manera que no se formen uniones inespecíficas y la concentración de dNTPs fue establecida en 0,2 mM ya que representa la concentración óptima para que la reacción no sea inhibida ni se formen productos secundarios. En cuanto al tiempo de elongación, considerando que el tamaño de producto esperado es de 925 pb y que la extensión es de aproximadamente 1kb por minuto, se estableció un tiempo de elongación de 1 minuto (64).

Las condiciones de reacción para la detección de *iha* son descritas a continuación: buffer 1x (Invitrogen, USA), dNTPs 0,2 mM (Invitrogen, USA), oligonucleótidos 0,1  $\mu$ M (Macrogen, Corea),  $MgCl_2$  1,5 mM (Invitrogen, USA), 1

Unidad de Taq Polimerasa por reacción (Invitrogen, USA), 1,5  $\mu$ L de ADN molde, en un volumen total de reacción de 15  $\mu$ L.

Las condiciones de ciclado fueron: desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos, 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, anillamiento a 58°C por 40 segundos y extensión a 72°C por 1 minuto, y una extensión final a 72 °C por 5 minutos. Se empleó el termociclador Applied Biosystems-SimpliAmp Thermal Cyclor (Singapur).

La secuencia de los oligonucleótidos y el tamaño del producto de amplificación esperado se detallan en la **Tabla 1**.

**Tabla 1. Secuencia de oligonucleótidos y tamaño de amplicones esperados para cada reacción de PCR**

<b>Gen</b>	<b>Oligonucleótido</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Tamaño</b>	<b>Autor</b>
<b>módulo I</b>	LAA1_for	AACCGGGAGCCATATTCAGC	2207 pb	Montero et al., 2017 (40).
	LAA1_rev	ACGCGGTAAGTCGATGTAGAG		
<b>módulo II</b>	LAA2_for	CTGCAAAAGACATTGCCACAACA	1689 pb	Montero et al., 2017 (40).
	LAA2_rev	TGCGACAACAGGGTCAGTGA		
<b>módulo III</b>	ms-3_for	GCGTGTAGCAGCTCATGCAG	880 pb	Montero et al., 2017 (40).
	ms-3_rev	GACAACACTGACCGGATAATC		
<b>ag43</b>	agn43_for	GGGGGACTTCAGCACGATAA	1839 pb	Montero et al., 2014 (65).
	agn43_rev	CCGGCGGGCAATGGGTACA		
<b>hes</b>	hes_det1	CAACCAGCGTCTTATCGAT	350 pb	Montero et al., 2017 (40).
	hes_det2	CGGTTGTTTTCTGGTGAAC		
<b>iha</b>	iha F	CAAATGGCTCTCTCCGTCAATGC	925 pb	Abe et al., 2008 (66)
	iha R	CAGGTCGGGGTTACCAAGT		

### **3.6 Cepas Control**

Los aislados utilizados como control positivo estaban previamente caracterizados como portadores de los genes *hes*, *iha*, *ag43* y de los módulos I, II y III de la isla *LAA*. Estos aislados control fueron donados gentilmente por la Dra. Nora Lía Padola del Laboratorio de Inmunología y Biotecnología del Centro de Investigación Veterinaria de Tandil de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires (UNCPBA).

### **3.7 Separación de fragmentos de ADN amplificados por electroforesis en gel de agarosa**

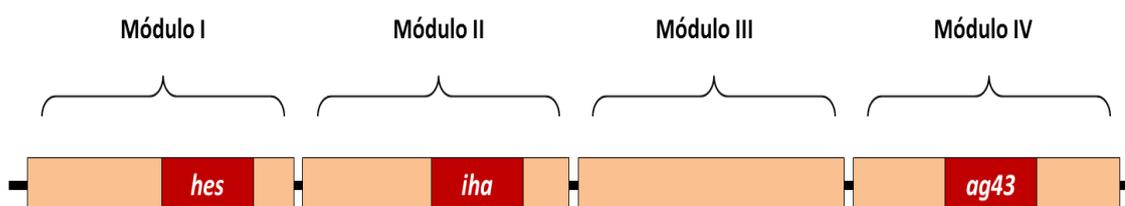
La visualización de los fragmentos amplificados por PCR de los módulos I, II, III y el gen *ag43* se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido con el agente intercalante SYBR safe (Invitrogen Thermo Fisher Scientific, USA) al 0,01% del volumen de gel utilizado. Se sembró 5 µL del producto amplificado mezclado con buffer de carga a una concentración final de 1x y se realizó la corrida en cuba electroforética con buffer TAE (Tris-Acetato-EDTA) al 1x, con una fuente de poder de 110 V durante 30 minutos, aproximadamente.

Se utilizó como marcador de peso molecular el ADN Lambda digerido con la enzima de restricción BstEII (Bioron, Alemania), que tiene fragmentos de 702 pb hasta 8454 pb, para estimar el tamaño de los productos amplificados. Los productos fueron visualizados utilizando un transiluminador UV con cámara digital (Mrc Laboratory Equipment Manufacturer GDS-01, Alemania) y analizados en formato digital.

Para los genes *hes* e *iha*, se utilizó gel de agarosa al 2% para una mejor separación de fragmentos y mejor resolución del marcador de peso molecular. Se realizó la tinción con el agente intercalante SYBR safe (Invitrogen Thermo Fisher Scientific, USA) al 0,01% del volumen de gel utilizado. Se sembró 5 µL del producto amplificado y se adicionó loading buffer a una concentración final de 1x. La corrida se realizó en cuba electroforética con buffer TAE (Tris-Acetato-EDTA) al 1x, con una fuente de poder de 110 V durante 30 minutos aproximadamente.

Se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pb (Bioron, Alemania) para estimar el tamaño de los productos amplificados. Los productos fueron visualizados utilizando un transiluminador UV con cámara digital (Mrc Laboratory Equipment Manufacturer GDS-01, Alemania) y analizados en formato digital.

### **3.8 Interpretación de los resultados**



**Figura 7. Esquema resumido de la isla de patogenicidad LAA**

La isla de patogenicidad LAA tiene un tamaño aproximado de 86.000 pb. Se conforma por 80 genes que se encuentran distribuidos entre 4 módulos: módulo I, módulo II, módulo III y módulo IV. Los módulos I, II y IV presentan genes de virulencia marcadores de los mismos, los genes *hes*, *iha* y *ag43*, respectivamente (**Figura 7**) (40,43). Se tuvo en cuenta el criterio de Montero y colaboradores, el cual se basa en la combinación de los módulos y los genes para clasificar a las STEC como LAA-completa, LAA-incompleta o LAA-negativa (40).

Los aislados STEC fueron considerados como LAA-completos cuando los módulos I, II, III, IV y los genes codificados por los mismos eran detectados. Por otra parte, la ausencia de un módulo o más, permite la clasificación de LAA-incompleta.

Las aislados STEC fueron considerados como LAA-negativos cuando menos de cuatro módulos eran detectados.

### **3.9 Consideraciones Éticas**

El presente estudio fue realizado utilizando muestras criopreservadas en el Biobanco de Bacteriología Molecular del IICS, por lo que no fue necesaria la toma de muestra adicional a ningún animal. Las muestras criopreservadas son parte de un

trabajo marco realizado en el año 2017, que se denominó “Caracterización del perfil de virulencia de aislados de *Escherichia coli* productores de la toxina Shiga (STEC) de materia fecal de ganado bovino y carne molida en el año 2016”. Dicho trabajo cuenta con la aprobación de los Comités Científicos y de Ética del IICS con el código P51/2015 (**Anexo 2**), al igual que el presente trabajo, cuyo código de aprobación por Comités es P09/2019 (**Anexo 3**).

Los residuos generados en el presente trabajo fueron descartados cumpliendo los protocolos vigentes para el manejo de residuos patológicos en cumplimiento a lo dispuesto por la Ley 3361.

El presente trabajo tuvo como objetivos aspectos netamente epidemiológicos y los resultados del mismo no tienen efecto alguno sobre la salud de los bovinos, ya que estos son portadores asintomáticos del patotipo STEC.

La autoría de los investigadores del proyecto marco se respetará estrictamente y será mantenida en cualquier trabajo que pueda publicarse a partir del mismo.

### **3.10 Análisis y gestión de datos**

Fueron diseñadas planillas electrónicas para la carga de datos en Microsoft Excel 2010. Se utilizó la estadística descriptiva para referir la frecuencia de portación de la isla *LAA* y los factores de virulencia estudiados. Los resultados se presentan en tablas.

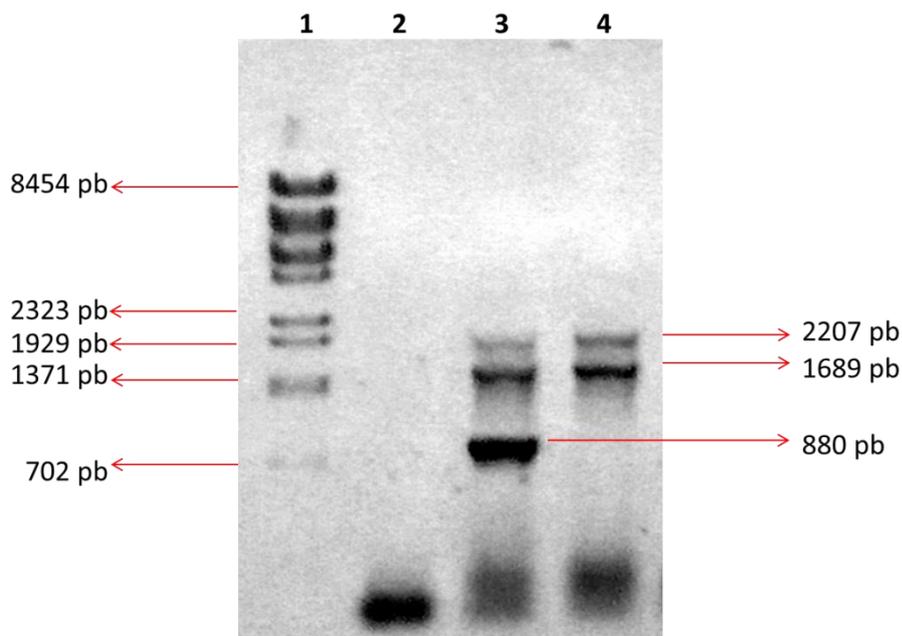
## 4. RESULTADOS

### **4.1 Estandarización de la técnica de PCR para la detección de los módulos I, II, III y los genes *hes*, *iha* y *ag43***

Se utilizó la técnica de PCR en formato múltiple para la detección de los módulos I, II y III de la isla LAA. La técnica fue estandarizada utilizando controles positivos portadores de estos módulos y partiendo de las condiciones descritas por Montero y colaboradores. Se estableció la concentración de MgCl<sub>2</sub> ya que la misma no fue descrita por Montero y se estableció una temperatura de 72°C para la elongación, sugerida como óptima por el fabricante.

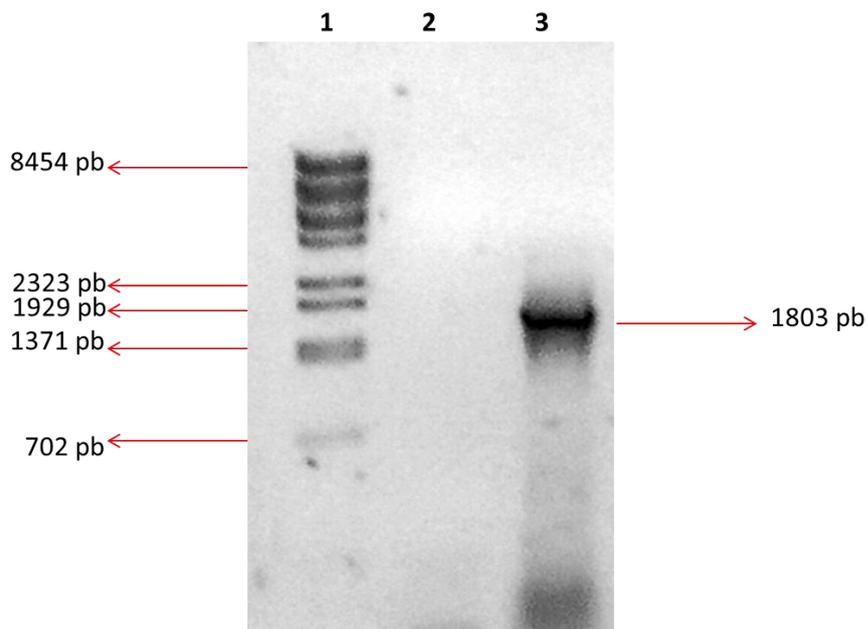
Aplicando las condiciones mencionadas y utilizando como templado el ADN extraído por el método de ebullición, se obtuvo la amplificación de los productos esperados, sin embargo, además de la observación del amplicon de tamaño esperado, también se obtuvieron otros fragmentos de amplificación de menor tamaño. Se realizó, entonces, modificaciones en el método de extracción y se utilizó el método directo de colonias para evitar el posible efecto de la fragmentación del material genético por su exposición a altas temperaturas. Esta modalidad permite exponer al material genético a temperaturas altas por un menor tiempo.

Como resultado, se obtuvo una óptima amplificación de los módulos I, II y III realizando las modificaciones mencionadas. Los fragmentos de menor tamaño observados anteriormente ya no se encontraban presentes y se logró la amplificación de los módulos I, II y III de manera exitosa, sin observación de bandas secundarias y con la amplificación de fragmentos de tamaños esperados (**Figura 8**).



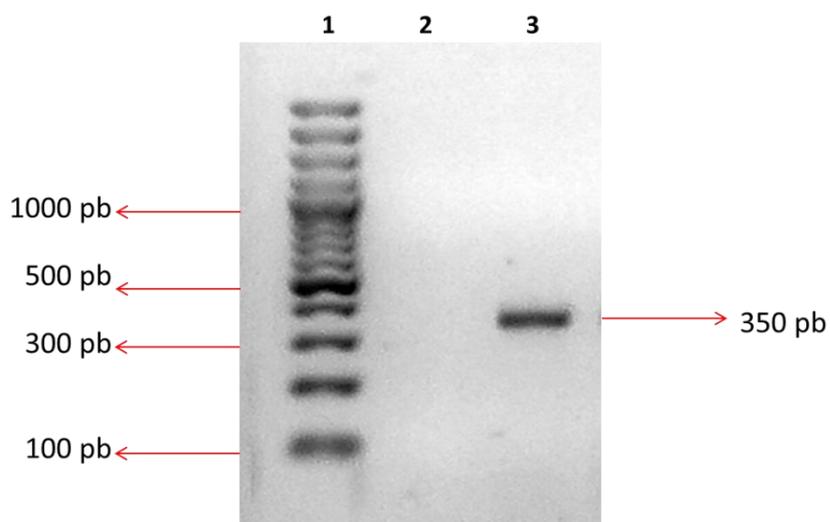
**Figura 8. Amplificación de los módulos I, II y III por PCR en formato múltiple.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con SYBR safe. **Carril 1:** ADN lambda-*BstEII* con fragmentos de 702 pb a 8454 pb. **Carril 2:** control negativo. **Carril 3:** control positivo del módulo I (2207 pb), módulo II (1689 pb), módulo III (880 pb). **Carril 4:** control positivo del módulo I y módulo II.

Para la detección del módulo IV y, por tanto, determinar si LAA se encontraba de forma completa, el gen *ag43* fue amplificado de forma individual, ya que es un marcador específico de dicho módulo. Se realizaron reacciones individuales, utilizando como templado aquellas muestras de ADN extraídas por el método directo de colonias, ya que al utilizar ADN extraídos por el método de ebullición se observaron bandas inespecíficas de tamaño variable. De esta manera, se logró estandarizar la PCR, obteniendo exitosamente en la primera prueba, los productos de amplificación con el tamaño esperado y sin presencia de bandas secundarias, aplicando las condiciones establecidas por los autores y estableciendo las condiciones faltantes, las cuales, fueron descritas en la sección de materiales y métodos (**Figura 9**).

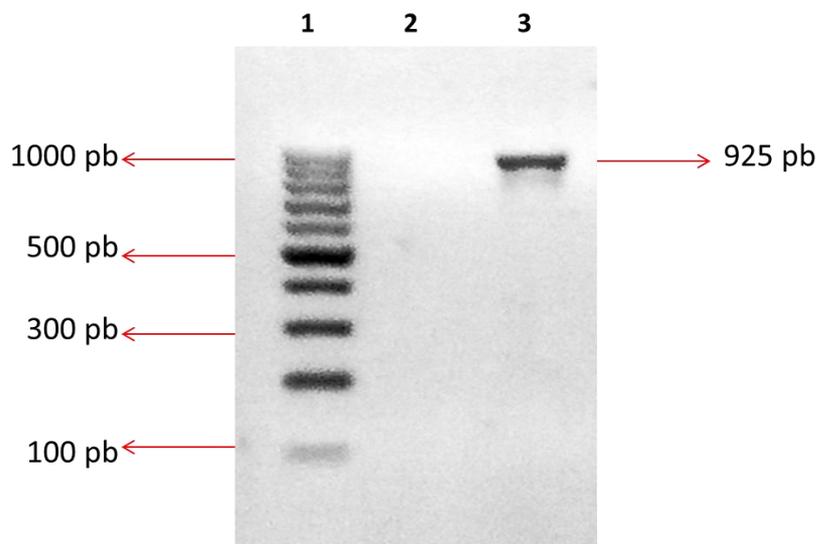


**Figura 9. Amplificación del gen *ag43* por PCR, marcador del módulo IV.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con SYBR safe. **Carril 1:** ADN lambda-*BstEII* con fragmentos de 702 pb a 8454 pb. **Carril 2:** control negativo. **Carril 3:** control positivo (1803 pb).

Para la detección de *hes*, e *iha* se realizaron reacciones de PCR simples. Se evaluaron las concentraciones de dNTPs,  $MgCl_2$  y oligonucleótidos a ser utilizados, ya que los mismos no fueron descritos en el trabajo utilizado como referencia, así como tampoco se describió la temperatura de anillamiento óptima y los tiempos de reacción óptimos para cada etapa de la PCR, los cuales tuvieron que ser establecidos. Se logró estandarizar las reacciones exitosamente en la primera reacción realizada, obteniéndose la amplificación de los fragmentos esperados sin bandas secundarias, empleándose las condiciones descritas anteriormente en la sección de materiales y métodos (**Figuras 10 y 11**).



**Figura 10. Amplificación del gen *hes* por PCR.** Electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con SYBR safe. **Carril 1:** Marcador de peso molecular de 100 pb. **Carril 2:** control negativo. **Carril 3:** control positivo (350 pb).

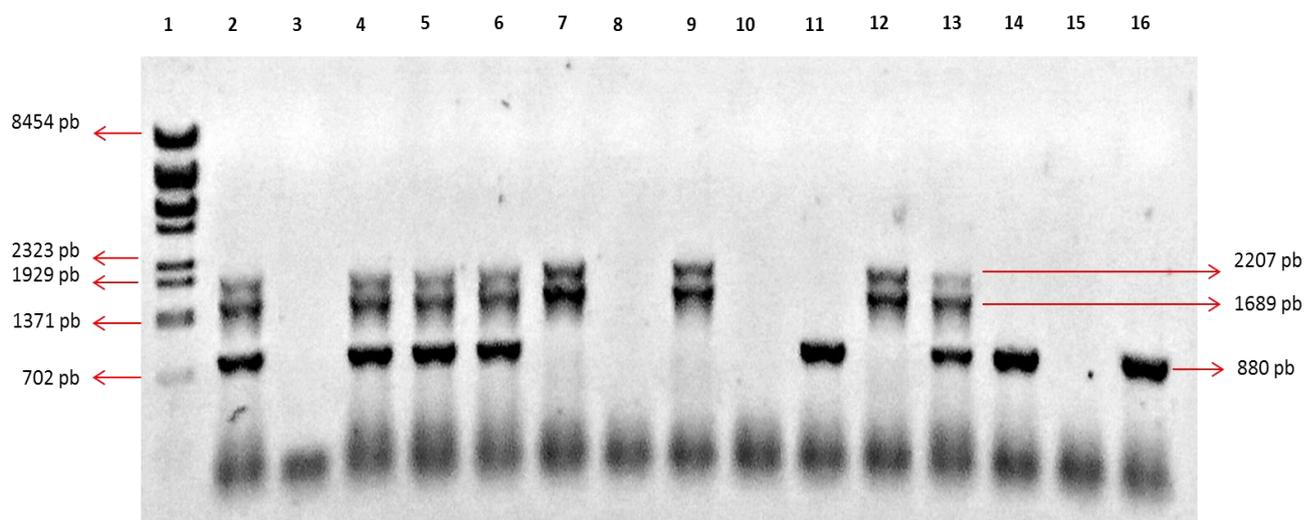


**Figura 11. Amplificación del gen *iha* por PCR.** Electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con SYBR safe. **Carril 1:** Marcador de peso molecular de 100 pb. **Carril 2:** control negativo. **Carril 3:** control positivo (925 pb).

#### **4.2 Detección de los módulos I, II y III de la isla LAA y los genes *hes*, *iha* y *ag43***

Se realizó la búsqueda de la isla LAA en los 77 aislados en estudio, utilizando la técnica de PCR en formato múltiple para la detección de los módulos I, II y III (**Figura 12**); mientras los genes *hes*, *iha* y *ag43* fueron detectados mediante la técnica de PCR en formato simple.

Fueron considerados “LAA completos” aquellos aislados a los cuales se les haya detectado la isla de patogenicidad en su forma completa, es decir, aquellos aislados portadores de los cuatro módulos: módulo I (y el gen *hes*), módulo II (y el gen *iha*), módulo III y el gen *ag43* (utilizado como marcador del módulo IV). Aquellos aislados portadores de tres módulos o menos, fueron considerados “LAA incompletos”, y la ausencia de módulos fue considerada como “LAA-negativos”.



**Figura 12. Imagen representativa de las muestras analizadas.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con SYBR safe. **Carril 1:** ADN lambda-BstEII con fragmentos de 702 pb a 8454 pb. **Carril 2:** control positivo del módulo I (2207 pb), módulo II (1689 pb), módulo III (880 pb). **Carril 3:** control negativo. **Carriles 4, 5, 6 y 13:** aislados positivos para los módulos I, II y III. **Carriles 7, 9 y 12:** aislados positivos para los módulos I y II. **Carriles 8, 10 y 15:** aislados no portadores de los módulos I, II y III. **Carriles 11, 14 y 16:** aislados portadores del módulo III.

La portación de aislados STEC LAA-completos se vio distribuida en el 6,1% (2/33) de los bovinos en estudio, provenientes de establecimientos ganaderos de los Departamentos de San Pedro y Caaguazú, mientras que en bovinos de Cordillera y Paraguari no se detectó la presencia STEC LAA-completa. Se detectó la presencia de al menos un módulo de la isla LAA en aislados STEC del 45,4% (15/33) de los bovinos en estudio provenientes de los cuatro Departamentos incluidos, mientras que en 48,5% (16/33) de los bovinos era portador de aislados STEC sin ningún módulo de la isla LAA.

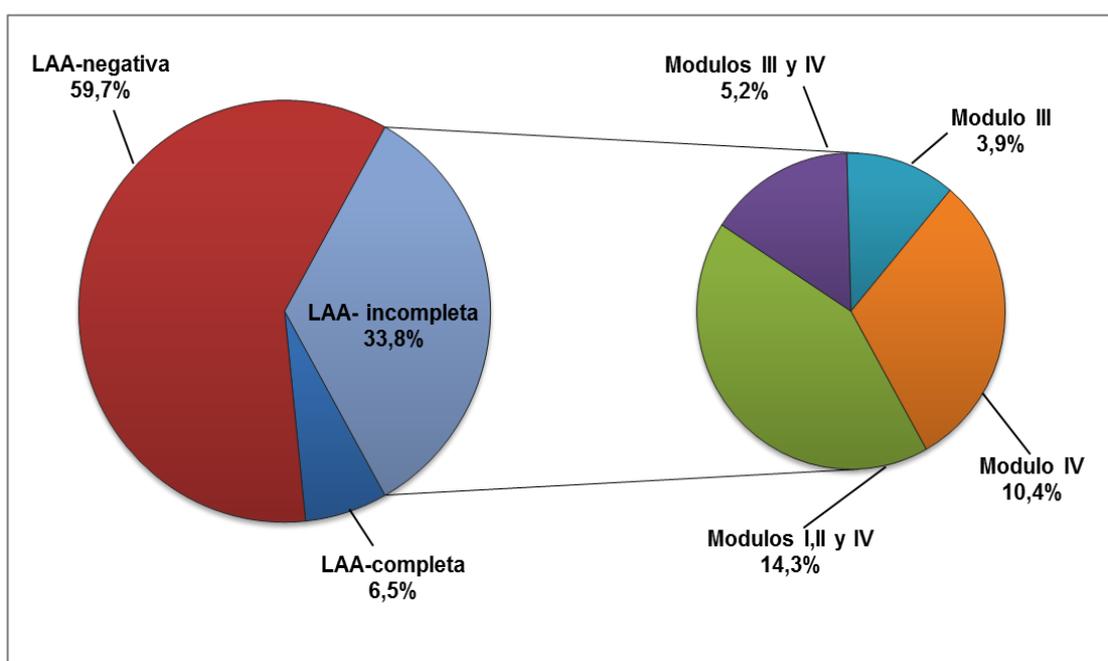
En cuanto a los aislamientos, la isla LAA completa se detectó en el 6,5% (5/77) de los aislados STEC LEE-negativos (**Figura 13**). El 80% (4/5) de estos aislados provenía de un establecimiento ganadero del Departamento de San Pedro y los mismos eran portadores de *stx2*, mientras que el 20% (1/5) de los aislados LAA-positivos restantes, eran provenientes de un establecimiento ganadero del

Departamento de Caaguazú y eran portadores de *stx1/stx2*. No se detectó ningún aislado LAA positivo portador de *stx1* de forma individual.

Por otra parte, el 33,8% (26/77) de los aislados presentó la isla LAA de forma incompleta con combinaciones de dos o tres módulos, así como la presencia de un solo módulo (**Figura 13**). La portación de los módulos I, II y IV se detectó en el 14,3% (11/77) de los aislados, la combinación de los módulos III y IV fue detectada en un 5,2% (4/77), el módulo III fue detectado en el 3,9% (3/77) de los aislados y el gen *ag43*, marcador del módulo IV se detectó en un 10,4% (8/77).

Por otra parte, el 59,7% (46/77) de los aislados restantes resultó ser negativo para LAA, es decir, no presentó portación de ningún módulo de la isla (**Figura 13**). Estos aislados no portadores de la Isla LAA se distribuyen en un 52% (24/46) en establecimientos del Departamento de San Pedro, el 26% (12/46) proviene de bovinos del Dpto. de Caaguazú, el 11% (5/46) son de Paraguari y el 11% (5/46) restante provienen de bovinos de establecimientos de Cordillera.

Los perfiles de virulencia de los aislados en estudio y la presencia o ausencia de la isla LAA, se detallan en la **Tabla 2**.



**Figura 13.** Distribución de la Isla LAA en aislados STEC.

**Tabla 2. Perfil de virulencia y portación de las isla LAA en aislados STEC LEE-negativos**

<b>Factores de virulencia</b>	<b>Frecuencia absoluta</b>	<b>Frecuencia porcentual</b>	<b>LAA (C/I/N)</b>
<i>stx2/ag43/hes/iha</i>	4	5,2%	C
<i>stx1/stx2/ag43/hes/iha</i>	1	1,3%	C
<i>stx1/stx2/ag43/hes/iha</i>	9	11,7%	I (I, II, IV)
<i>stx2/ag43</i>	4	5,2%	I (IV)
<i>stx2/iha/ag43</i>	3	3,9%	I (IV)
<i>stx1/ag43/iha/hes</i>	2	2,6%	I (I, II, IV)
<i>stx1/stx2/ag43/hes/iha</i>	2	2,6%	I (III, IV)
<i>stx2/hes/iha</i>	2	2,6%	I (III, IV)
<i>stx1/stx2/hes/iha</i>	1	1,3%	I (III)
<i>stx2/hes/iha</i>	1	1,3%	I (III)
<i>stx1/stx2/iha</i>	1	1,3%	I (III)
<i>stx1/stx2/hes/iha/ag43</i>	1	1,3%	I (IV)
<i>stx2</i>	14	18,2%	N
<i>stx2/iha</i>	10	13%	N
<i>stx1/stx2</i>	6	7,8%	N
<i>stx1/iha</i>	5	6,5%	N
<i>stx2/hes/iha</i>	3	3,9%	N
<i>stx1/stx2/iha</i>	3	3,9%	N
<i>stx2/hes</i>	2	2,6%	N
<i>stx1</i>	2	2,6%	N
<i>stx1/stx2/hes</i>	1	1,3%	N

C= indica la clasificación de los aislados como LAA completa / I= indica la clasificación de los aislados como LAA incompleta / N= indica la clasificación de los aislados como LAA negativa. / I=Módulo I / II=Módulo II / III=Módulo III / IV=Módulo IV

Se han encontrado 21 perfiles de virulencia diferentes en los aislados estudiados, de los cuales, 9 carecen de la presencia de algún módulo de la isla LAA.

Se ha detectado la presencia de los genes *hes* e *iha* en aislados que no dieron producto de amplificación para los módulos I y II pero, sin embargo, fueron positivos para el módulo III y *ag43* en el 5,2% (4/77) de las muestras.

Los datos generados en el presente trabajo, indican la baja prevalencia de LAA en los aislamientos procedentes de bovinos en el Paraguay.

## 5. DISCUSIÓN

La infección por STEC ocurre por la ingestión de alimentos y agua contaminados en la mayoría de los casos, desencadenando en episodios de diarrea, que suele ser sanguinolenta en el 60% de los casos (67). El 15% de los cuadros gastrointestinales desencadenan el SUH, presentando típicamente como fallo renal, trombocitopenia y anemia hemolítica (68). Los individuos más vulnerables al desarrollo del SUH son los niños menores de 5 años y los adultos mayores, siendo fatal en el 3% al 5% de los casos o bien, aquellos individuos que logran sobrevivir, quedan con importantes secuelas cardíacas, neurológicas, así como trastornos de la función normal del hígado (20,69).

La portación de STEC en Paraguay en bovinos es muy alta, cerca del 80%, según datos generados en el año 2013 por Rivelli y colaboradores y Rojas y colaboradores en el año 2016, quienes reportan cifras de 84,8% y 79,5%, respectivamente (54,55). Esta prevalencia es mayor a la reportada en otros países de la región como Brasil y Argentina en los que se ha registrado un nivel de portación de 73% y 63%, respectivamente (70,71). Por otra parte, se ha estudiado también previamente la presencia de STEC en carne molida comercializada en el área Metropolitana de la ciudad de Asunción, encontrándose a este patógeno presente en el 100% de los locales incluidos (58). Sin embargo, a pesar de estos altos niveles de portación de STEC, tanto en bovinos, como en alimentos, en Paraguay es muy baja la incidencia del SUH. Sólo se ha reportado un caso esporádico de SUH causado por STEC en un niño de 2 años de edad por Chamorro Noceda en el año 2009, el cual, fue desencadenado por el serotipo O157:H7, correspondiente al grupo de las LEE-positivas (48).

Esta alta frecuencia de portación de STEC y la baja incidencia de SUH, por tanto, nos ha generado de la duda de que podría haber un sub-registro de casos de SUH causados por STEC debido a las limitaciones en los métodos de detección del agente etiológico, ya que se requieren de técnicas moleculares para la detección del factor de virulencia que clasifica al patógeno como STEC y, en la mayoría de los laboratorios de análisis clínicos, se utilizan métodos fenotípicos para la evaluación de los especímenes biológicos, los que se centran muchas veces en la presencia del

serotipo O157:H7, limitando así la detección de los otros serogrupos patógenos (72). La reciente incorporación de técnicas moleculares en múltiples laboratorios del país, inicialmente centrados en el diagnóstico de virus como el SARS-CoV2, podría representar una oportunidad a futuro del uso de la infraestructura generada hacia sistemas de vigilancia molecular de otros patógenos como por ejemplo las STEC, pudiendo ser una mejora importante en la detección de casos de SUH.

Se ha observado en estudios previos que el 85%-90% de los aislados STEC provenientes de bovinos, pertenecen al grupo de las STEC LEE-negativas y del 10% de los aislados LEE-positivos restantes, no se ha encontrado presencia del serotipo O157:H7 así como tampoco los serogrupos O104 y aquellos pertenecientes a las “big six” que son las no-O157 mayormente aisladas de cuadros clínicos graves (54,55,73,74). Esta prevalencia de portación y la predominancia de STEC LEE-negativas ha llevado a la búsqueda de posibles factores de patogenicidad en nuestros bovinos, enfocándose principalmente en la detección de la isla LAA, que representa la isla de patogenicidad más frecuente en el grupo de las LEE-negativas (38).

Un estudio ya realizado previamente en Paraguay, ha evaluado la presencia de esta isla en bovinos provenientes de un establecimiento ganadero del Departamento de Cordillera, en el que se encontró 41% de portación completa de LAA (75). Por tanto, la interrogante a la cual se enfocó el presente trabajo fue verificar los niveles de portación de esta isla de patogenicidad en otros establecimientos ganaderos y Departamentos del Paraguay.

Nuestros resultados mostraron una baja frecuencia de portación de LAA en su forma completa, en apenas 6,5% (5/77) de los aislados STEC LEE-negativos, los cuales, son provenientes de bovinos de los Departamentos de San Pedro y Caaguazú. El fenómeno de portación de LAA-completa, aparentemente representa un evento puntual de ciertos establecimientos ganaderos, ya que al ampliar el número de establecimientos y el área geográfica de estudio, se observa una disminución en la frecuencia de portación de LAA, lo que sugiere que este factor de virulencia no se encuentra ampliamente distribuido en todos los establecimientos de los diferentes Departamentos del país. En otros países se han reportado frecuencias de portación completa de LAA mucho mayores que la obtenida en el presente trabajo. En

Argentina, un estudio realizado por Colello y colaboradores en el año 2018, ha encontrado 46% de portación de la isla LAA en muestras provenientes, tanto de ganado bovino, como de alimentos (43). Similarmente, en Chile se ha reportado una frecuencia de portación de 41,6% también en alimentos y bovinos, en un estudio realizado por Velez y colaboradores en el año 2020 (75).

En cuanto a las características de las STEC, el 80% (4/5) de los aislados portadores de LAA-completa, portaba además el gen *stx2*, mientras que el 20% (1/5) restante, portaba los genes *stx1/stx2*. Se ha encontrado, en investigaciones previas, que existe una asociación significativa entre aislados STEC LAA-completos y la portación del gen *stx2* (40,43). Esta portación simultánea de *stx2* con la isla LAA completa implica un gran riesgo para el desarrollo de un cuadro clínico severo, ya que se ha detectado esta isla en aislados clínicos causantes de cuadros de SUH y CH. Varios autores señalan que aquellos aislados codificantes de *stx2* se encuentran asociados al desarrollo de infecciones mucho más severas que aquellas que portan el gen *stx1* e incluso aquellos que portan la combinación de ambos genes, por lo que la presencia de ambos factores de virulencia se considera un marcador de riesgo potencial para el desarrollo de SUH (21,23,76). Montero y colaboradores han reportado, además, la co-ocurrencia de LAA con subtipos específicos de *stx2* relacionados a casos graves de infección. Los subtipos reportados por los mismos fueron *stx2a*, *stx2c*, *stx2d* y, en adición el subtipo *stx1a*, por lo que sería interesante subtipificar las toxinas del presente trabajo que se encontraron asociadas a la portación de LAA completa (13,38).

En adición, el 33,8% (26/77) de los aislados estudiados presentó la isla incompleta en diversas combinaciones e incluso se detectó la presencia de módulos individuales. Se ha encontrado al menos uno de los módulos presentes en el 91% (10/11) de los establecimientos ganaderos incluidos, lo que podría resultar en la adquisición de los demás módulos ya que el estudio realizado por Montero y colaboradores en el año 2017 sugiere que los módulos individuales pueden ser adquiridos de forma directa, o bien, la presencia de la isla incompleta podría deberse a la pérdida de alguno de estos (40). No obstante, no se ha encontrado aún ninguna asociación entre la infección con aislados STEC que presenten la isla LAA de forma

incompleta y el desarrollo de cuadros clínicos graves (SUH, CH) (40,43). Sin embargo, sería interesante estudiar la contribución que cada uno de los módulos genera, en cuanto a patogenicidad de la bacteria, ya que algunos factores de virulencia, como *iha*, han sido estudiados anteriormente y se observó que confiere a la bacteria la capacidad adherente en estudios *in vitro*, con lo cual, sería suficiente su presencia para el desarrollo del primer paso de la infección por STEC (41).

Por otra parte, el 59,7% (46/77) de los aislados restantes no presentó ninguno de los módulos de la isla de patogenicidad LAA. Con estos resultados, se podría sugerir que, a pesar de que el nivel de portación de STEC en bovinos del país sea en promedio del 80%, las cepas STEC que circulan en el Paraguay, podrían ser de un menor nivel de virulencia que las circulantes en otros países regionales. Esto se sugiere, ya que hasta la fecha se han realizado varios estudios enfocados en la caracterización molecular de las cepas STEC desde el año 2017 y se ha observado una baja frecuencia de los principales factores de virulencia implicados en cuadros clínicos graves, como la portación de STEC LEE-positivas encontradas en un promedio de apenas 5,5% y, en el presente trabajo, apenas 6,5% de la isla de patogenicidad predominante entre las STEC LEE-negativas (54–56).

Esta baja frecuencia de portación de cepas STEC virulentas es un aspecto bastante positivo a nivel de Salud Pública y se condice con la baja incidencia de SUH, así como la baja incidencia de enfermedad diarreica aguda provocada por STEC en niños menores de 5 años, la cual, es de apenas un 4,26%, según un estudio realizado en el año 2016 por Canata y colaboradores (77). Además, datos del Instituto Nacional de Nefrología, han declarado que las principales causas de insuficiencia renal en el país son la diabetes mellitus y la hipertensión arterial, siendo el 20% de etiología desconocida (78). Sin embargo, para constatar que los aislados STEC son realmente poco virulentos, y que esta baja incidencia de SUH no se debe a un sub-registro de casos, el siguiente paso considerado por nuestro grupo de investigación es la búsqueda de otras PAI descritas recientemente que también se encuentran implicadas en el proceso de colonización del grupo de las STEC LEE-negativas.

Entre estas PAI, se encuentran el Locus de Invasión e inhibición del crecimiento dependiente del Contacto (LIC por “Locus of Invasion and Contact-dependent growth inhibition”) y el Locus de Adhesión y Colonización (LAC por “Locus of Adhesion and Colonization”), los cuales, se encuentran implicados en el proceso de invasión del epitelio intestinal y en la colonización/adhesión las células, respectivamente, y que aún deben ser investigados entre aquellos aislados en los cuales se ha detectado LAA, tanto de forma completa e incompleta, ya que se ha demostrado que ambas islas presentan una alta probabilidad de co-ocurrencia con LAA (37,38). Además, también se ha observado en otros trabajos la co-ocurrencia de LAA con los subtipos *stx1a*, *stx2a*, *stx2c* y *stx2d*, los cuales representan los subtipos de Stx responsables de los casos más severos de infección por STEC (13,38). Por esto, es de interés para el grupo de investigación lograr en un futuro próximo la subtipificación de los genes *stx* tanto en aquellos aislados asociados a LAA, como en los aislados LAA negativos.

Por otro lado, el Locus con Actividad de Proteólisis (LPA por “Locus of Proteolysis Activity”), implicado en procesos de destrucción del epitelio y la Isla de Patogenicidad Codificante de Subtilasa (SE-PAI por “Subtilase-Encoding Pathogenicity Island”) que presenta una actividad sinérgica con las toxinas Shiga sobre las síntesis proteica; son islas de patogenicidad distribuidas entre STEC LEE-negativas que deberían ser investigadas dentro del 59,7% de los aislados del presente estudio que han resultado negativos para todos los módulos de LAA, ya que se ha observado que estas se excluyen mutuamente con LAA (37–39).

Además de la baja frecuencia de los factores de virulencia más importantes de STEC, tampoco se ha registrado hasta la actualidad la portación del serotipo O157:H7 en bovinos, así como la circulación de los serogrupos O26, O45, O103, O111, O121 y O145 que representan a las denominadas “big six” y que, junto con O157:H7, son los serotipos predominantes asociados con grandes brotes de SUH en todo el mundo (54–56). Sin embargo, se ha visto que O91, O130, O113 y O174 son los serogrupos STEC asociados a la portación de LAA-completa que se han visto implicados en mayor frecuencia con los casos más severos de infección (35,79–81). Algunos de estos serogrupos (O91 y O113) se encuentran dentro del seropatotipo C

de la clasificación de STEC propuesta por Karmali y colaboradores en el año 2003, basada en la frecuencia con la que estos serotipos han sido reportados en enfermedades humanas y sus asociaciones con los brotes y las complicaciones severas que se presentaron (SUH y CH). En el serototipo C, se incluyen a aquellos serotipos que no han sido responsables de grandes brotes, pero han sido asociados a casos esporádicos de SUH (82). Estos serogrupos aún no han sido objetos de estudio en el país, sin embargo, se han detectado a O91 y O130 en materia fecal de bovinos en un estudio realizado en el año 2018 (56), por lo que el siguiente paso sería la detección de estos serogrupos en los aislados incluidos en el presente trabajo y la inclusión de los serogrupos O113 y O174.

Cabe destacar que el alto nivel de portación de STEC en bovinos paraguayos representa un problema importante, tanto para la salud pública como para la industria cárnica, ya que Paraguay constituye el tercer país consumidor de carne en el mundo, con un estimado de 26 a 27 kg de carne de res per cápita al año (83,84). Además, es uno de los principales países exportadores de carne bovina a nivel mundial, ubicándose en el puesto 7, actualmente. Esta industria representa el 12,1% del PIB, responsable del 15% al 20% de los ingresos económicos por exportación y genera una fuente de trabajo para aproximadamente 358.000 personas (59,85). Actualmente, 42 países forman parte del destino de exportación de carne vacuna paraguaya, con lo que las cantidades exportadas anualmente llegan a las 250.000 toneladas (86). Con estos datos, se demuestra lo importante que es la industria cárnica para el país y la importancia de la ausencia de patógenos en los productos cárnicos, ya que el rechazo de los cargamentos generaría una gran pérdida económica para el país.

Las perspectivas en un futuro próximo, se enfocan en determinar los subtipos de Stx en los aislados criopreservados en el biobanco del IICS ya que se ha observado que algunos subtipos se encuentran más estrechamente asociados a las enfermedades en humanos, así como la clasificación de las LAA-positivas en sus correspondientes filogrupos, ya que en el estudio de Montero y colaboradores, la estructura completa de LAA fue identificada exclusivamente en aislados STEC del filogrupo B1 (40). Lo que sugiere que una característica genética es requerida para la

adquisición de la isla. La detección de los serogrupos O91, O113, O130 y O174 en los aislados en estudio, también forma parte de los intereses más próximos del grupo de investigación, de manera a que se puedan generar nuevos datos epidemiológicos acerca del tema.

## 6. CONCLUSIÓN

La PCR en formato múltiple empleada permitió la detección de los módulos I, II y III de la isla LAA. Los genes *hes*, *iha* y *Ag43* fueron detectados exitosamente tras la estandarización de la técnica de PCR simple, permitiendo la detección completa de la isla LAA.

La portación de la isla LAA completa es baja en los aislados analizados, mientras que la detección de los componentes de forma parcial, característica de una isla LAA incompleta, es cercana al 34%.

## 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Croxen MA, Law RJ, Scholz R, Keeney KM, Wlodarska M, Finlay BB. Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev. 2013;26(4):822-80.
2. Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev. 1998;11(1):142-201.
3. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli*. Nat Rev Microbiol. 2004;2(2):123-40.
4. Croxen MA, Finlay BB. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. Nat Rev Microbiol. 2010;8(1):26-38.
5. Wanke CA. To Know *Escherichia coli* Is to Know Bacterial Diarrheal Disease. Clin Infect Dis. 2001;32(12):1710-2.
6. Allocati N, Masulli M, Alexeyev MF, Di Ilio C. *Escherichia coli* in Europe: An Overview. Int J Environ Res Public Health. 2013;10(12):6235-54.
7. Mayer CL, Leibowitz CS, Kurosawa S, Stearns-Kurosawa DJ. Shiga Toxins and the Pathophysiology of Hemolytic Uremic Syndrome in Humans and Animals. Toxins. 2012;4(11):1261-87.
8. Stearns-Kurosawa DJ, Oh S-Y, Cherla RP, Lee M-S, Tesh VL, Papin J, et al. Distinct renal pathology and a chemotactic phenotype after enterohemorrhagic *Escherichia coli* shiga toxins in non-human primate models of hemolytic uremic syndrome. Am J Pathol. 2013;182(4):1227-38.
9. Smith JL, Fratamico PM. Chapter 7 - *Escherichia coli* as a Pathogen\*. En: Dodd CER, Aldsworth T, Stein RA, Cliver DO, Riemann HP, editores. Foodborne Diseases (Third Edition). Third Edition. Academic Press; 2017. p. 189-208.
10. OMS. *E. coli*, datos y cifras [Internet]. Organización Mundial de la Salud. 2018. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/e-coli>
11. Page A, Liles W. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Infections and the Hemolytic-Uremic Syndrome. Med Clin North Am. 2013;97:681-95.
12. Ballem A, Gonçalves S, Garcia-Meniño I, Flament-Simon SC, Blanco JE, Fernandes C, et al. Prevalence and serotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in dairy cattle from Northern Portugal. PLOS ONE. 2020;15(12):e0244713.

13. Organization WH, Food, Nations AO of the U. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and food: attribution, characterization, and monitoring: report. World Health Organization; 2018. (Microbiological risk assessment series;31).
14. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Reports of Selected *E. coli* Outbreak Investigations [Internet]. Centers for Disease Control and Prevention. 2021. Disponible en: <https://www.cdc.gov/ecoli/outbreaks.html>
15. Etcheverría A, Arroyo a, Padola N. Síndrome Urémico Hemolítico. El Rol Del Bovino Como Reservorio De *Escherichia coli* Productores De Verocitotoxinas (VTEC). Arch Latinoam Nefrol Pediátrica. 2013;13:29.
16. Kim J-S, Lee M-S, Kim JH. Recent Updates on Outbreaks of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* and Its Potential Reservoirs. Front Cell Infect Microbiol. 2020;10.
17. Gonzalez AGM, Cerqueira AMF. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in the animal reservoir and food in Brazil. J Appl Microbiol. 2020;128(6):1568-82.
18. Frozi JB, Domingues JR, Esper LMR, Corrêa da Rosa JM, Silva ALS da C, Gonzalez AGM, et al. Survival of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 in Minas frescal cheese. Food Sci Technol. 2015;35(1):108-14.
19. Johansson KE, Ståhl A-L, Arvidsson I, Loos S, Tontanahal A, Rebetz J, et al. Shiga toxin signals via ATP and its effect is blocked by purinergic receptor antagonism. Sci Rep. 2019;9(1):14362.
20. Joseph A, Cointe A, Mariani Kurkdjian P, Rafat C, Hertig A. Shiga Toxin-Associated Hemolytic Uremic Syndrome: A Narrative Review. Toxins. 2020;12(2):67.
21. Sperandio V, Pacheco AR. Shiga toxin in enterohemorrhagic *E.coli*: regulation and novel anti-virulence strategies. Front Cell Infect Microbiol. 2012;2.
22. Fraser ME, Fujinaga M, Cherney MM, Melton-Celsa AR, Twiddy EM, O'Brien AD, et al. Structure of Shiga Toxin Type 2 (Stx2) from *Escherichia coli* O157:H7. J Biol Chem. 2004;279(26):27511-7.
23. Chan YS, Ng TB. Shiga toxins: from structure and mechanism to applications. Appl Microbiol Biotechnol. 2016;100(4):1597-610.
24. Hall G, Kurosawa S, Stearns-Kurosawa DJ. Shiga Toxin Therapeutics: Beyond Neutralization. Toxins. 2017;9(9):291.
25. Obrig TG. *Escherichia coli* Shiga Toxin Mechanisms of Action in Renal Disease. Toxins. 2010;2(12):2769-94.

26. Farfan MJ, Torres AG. Molecular Mechanisms That Mediate Colonization of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Strains. *Infect Immun.* 2012;80(3):903-13.
27. Paton AW, Srimanote P, Woodrow MC, Paton JC. Characterization of Saa, a Novel Autoagglutinating Adhesin Produced by Locus of Enterocyte Effacement-Negative Shiga-Toxigenic *Escherichia coli* Strains That Are Virulent for Humans. *Infect Immun.* 2001;69(11):6999-7009.
28. Hua Y, Zhang J, Jernberg C, Chromek M, Hansson S, Frykman A, et al. Molecular Characterization of the Enterohemolysin Gene (*ehxA*) in Clinical Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolates. *Toxins.* 2021;13(1):71.
29. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol.* 2004;2(2):123-40.
30. Zhang Y, Liao Y-T, Sun X, Wu VCH. Is Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O45 No Longer a Food Safety Threat? The Danger is Still Out There. *Microorganisms.* 2020;8(5):782.
31. Torres AG, Amaral MM, Bentancor L, Galli L, Goldstein J, Krüger A, et al. Recent Advances in Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Research in Latin America. *Microorganisms.* 2018;6(4).
32. Hegde NV, Jayarao BM, DebRoy C. Rapid Detection of the Top Six Non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O Groups in Ground Beef by Flow Cytometry. *J Clin Microbiol.* 2012;50(6):2137.
33. Newton HJ, Sloan J, Bulach DM, Seemann T, Allison CC, Tauschek M, et al. Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* Strains Negative for Locus of Enterocyte Effacement. *Emerg Infect Dis.* 2009;15(3):372-80.
34. Krause M, Barth H, Schmidt H. Toxins of Locus of Enterocyte Effacement-Negative Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. *Toxins.* 2018;10(6).
35. Mellmann A, Fruth A, Friedrich AW, Wieler LH, Harmsen D, Werber D, et al. Phylogeny and Disease Association of Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* O91. *Emerg Infect Dis.* 2009;15(9):1474-7.
36. Cundon C, Edith M, Roldán F, Montero C, Navarro A, Padola N, et al. Detección Y Caracterización Preliminar De *Escherichia coli* O174 Productor De Toxina. *Rev SNS.* 2015;1:52-63.
37. Schmidt H, Zhang WL, Hemmrich U, Jelacic S, Brunder W, Tarr PI, et al. Identification and characterization of a novel genomic island integrated at *selC* in locus of enterocyte effacement-negative, Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 2001;69(11):6863-73.

38. Montero DA, Canto FD, Velasco J, Colello R, Padola NL, Salazar JC, et al. Cumulative acquisition of pathogenicity islands has shaped virulence potential and contributed to the emergence of LEE-negative Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains. *Emerg Microbes Infect.* 2019;8(1):486-502.
39. Michelacci V, Tozzoli R, Caprioli A, Martínez R, Scheutz F, Grande L, et al. A new pathogenicity island carrying an allelic variant of the Subtilase cytotoxin is common among Shiga toxin producing *Escherichia coli* of human and ovine origin. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* 2013;19.
40. Montero DA, Velasco J, Del Canto F, Puente JL, Padola NL, Rasko DA, et al. Locus of Adhesion and Autoaggregation (LAA), a pathogenicity island present in emerging Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* strains. *Sci Rep.* 2017;7.
41. Tarr PI, Bilge SS, Vary JC, Jr, Jelacic S, Habeeb RL, et al. Iha: a Novel *Escherichia coli* O157:H7 Adherence-Confering Molecule Encoded on a Recently Acquired Chromosomal Island of Conserved Structure. *Infect Immun.* 2000;68(3):1400.
42. Reidl S, Lehmann A, Schiller R, Salam Khan A, Dobrindt U. Impact of O-glycosylation on the molecular and cellular adhesion properties of the *Escherichia coli* autotransporter protein Ag43. *Int J Med Microbiol.* 2009;299(6):389-401.
43. Colello R, Vélez MV, González J, Montero DA, Bustamante AV, Del Canto F, et al. First report of the distribution of Locus of Adhesion and Autoaggregation (LAA) pathogenicity island in LEE-negative Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from Argentina. *Microb Pathog.* 2018;123:259-63.
44. Galli L, Miliwebsky E, Irino K, Leotta G, Rivas M. Virulence profile comparison between LEE-negative Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains isolated from cattle and humans. *Vet Microbiol.* 2010;143(2):307-13.
45. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012. *EFSA J.* 2014;12(2).
46. Bettelheim KA. The non-O157 shiga-toxigenic (verocytotoxigenic) *Escherichia coli*; under-rated pathogens. *Crit Rev Microbiol.* 2007;33(1):67-87.
47. Soledad-Cadona J, Bustamante AV, González J, Mariel-Sanso A. Pathogenicity Islands Distribution in Non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STEC). *Genes.* 2018;9(2).
48. Chamorro Noceda LA. Hemolytic Uremic Syndrome Caused by Shiga Toxin type 2 Produced by Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7: First Case Described in Paraguay. *Pediatría Asunción.* 2009;36(2):127-32.

49. Florentín L. Prevalencia de insuficiencia renal aguda y de sus etiologías más frecuentes en pacientes nefrológicos pediátricos. *Arch. argent. pediatr.* 2001;99(3):219-27.
50. Zambrano O P, Delucchi B A, Cavagnaro S F, Hevia J P, Rosati M MP, Lagos R E, et al. Síndrome hemolítico urémico en Chile: presentación clínica, evolución y factores pronósticos. *Rev Médica Chile.* 2008;136(10):1240-6.
51. Zampano O. P, Delucchi B. Á, Hevia J. P, Nazal Ch. V, Rosati M. P, Barrera B. P, et al. Síndrome hemolítico urémico en Santiago de Chile: Evolución de la función renal y factores pronósticos. *Rev Chil Pediatría.* 2005;76(1):48-56.
52. Eymann A, Coccia P, Raddavero C, Lafi G, Ferraris V, Ramírez J, et al. Prevalencia y evolución clínica del síndrome urémico hemolítico típico entre hermanos. *Arch Argent Pediatría.* 2016;114:553-6.
53. Bentancor A. Síndrome urémico hemolítico en áreas urbanas. *Rev Argent Microbiol.* 2016;48(1):1-4.
54. Rojas N, Guillén Fretes R. Caracterización del perfil de virulencia de aislados de *Escherichia coli* productores de la toxina shiga (STEC) de materia fecal de ganado bovino y carne molida en el año 2016. [Instituto de Investigación en Ciencias de la Salud]: Universidad Nacional de Asunción; 2017.
55. Rivelli Zea SM, Padola NL, Etcheverría AI, Florentín M, Acuña P, Rodríguez F, et al. Caracterización molecular de aislamientos de *Escherichia coli* productores de toxina Shiga obtenidos en 2 establecimientos ganaderos del Paraguay. *Rev Argent Microbiol.* 2020;52(2):131-5.
56. Acuña P, Guillen R, Rodriguez F. Frecuencia De Los Ocho Grandes Serogrupos De Aislados De *Escherichia coli* Productores De Toxina Shiga (STEC) Obtenidos De Materia Fecal De Ganado Bovino Del Departamento De Cordillera En El Año 2016 [Trabajo de Grado]. [Facultad de Ciencias Químicas]: Universidad Nacional de Asunción; 2018.
57. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with drinking unpasteurized commercial apple juice--British Columbia, California, Colorado, and Washington, October 1996. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 1996;45(44):975.
58. Rojas N, Martinez A, Acuña P, Rodríguez F, Padola N, Guillén R. Detection of Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* in Ground Beef: Evaluation of Contamination Levels in Butcheries of The Metropolitan Zone in Asuncion, Paraguay. *J Pure Appl Microbiol.* 2019;13:77-83.
59. Asociación Rural del Paraguay. Introducción a Paraguay y su sector cárnico [Internet]. ARP; 2017. Disponible en: <https://www.arp.org.py/images/Paraguay-y-el-Sector-Carnico.pdf>

60. González-Escalona N, Kase JA. Virulence gene profiles and phylogeny of Shiga toxin-positive *Escherichia coli* strains isolated from FDA regulated foods during 2010-2017. PLOS ONE. 2019;14(4):e0214620.
61. Ennis C, McDowell D, Bolton D j. The prevalence, distribution and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) serotypes and virulotypes from a cluster of bovine farms. J Appl Microbiol. 2012;113(5):1238-48.
62. Jose JJM, Brahmadathan KN. Evaluation of simplified dna extraction methods for EMM typing of group a streptococci. Indian J Med Microbiol. 2006;24(2):127.
63. Oliveira CF de, Paim TG da S, Reiter KC, Rieger A, D'azevedo PA. Evaluation Of Four Different Dna Extraction Methods In Coagulase-Negative Staphylococci Clinical Isolates. Rev Inst Med Trop São Paulo. 2014;56(1):29.
64. Lorenz TC. Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. J Vis Exp JoVE. 2012;(63).
65. Montero D, Orellana P, Gutiérrez D, Araya D, Salazar JC, Prado V, et al. Immunoproteomic Analysis To Identify Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Outer Membrane Proteins Expressed during Human Infection. Infect Immun. 2014;82(11):4767-77.
66. Abe CM, Salvador FA, Falsetti IN, Vieira MAM, Blanco J, Blanco JE, et al. Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) strains may carry virulence properties of diarrhoeagenic *E. coli*. FEMS Immunol Med Microbiol. 2008;52(3):397-406.
67. Bruyand M, Mariani-Kurkdjian P, Gouali M, de Valk H, King LA, Le Hello S, et al. Hemolytic uremic syndrome due to Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection. Med Mal Infect. 2018;48(3):167-74.
68. Karpman D, Loos S, Tati R, Arvidsson I. Haemolytic uraemic syndrome. J Intern Med. 2017;281(2):123-48.
69. Tarr PI, Gordon CA, Chandler WL. Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome. The Lancet. 2005;365(9464):1073-86.
70. Ferreira MRA, Freitas Filho EG, Pinto JFN, Dias M, Moreira CN. Isolation, prevalence, and risk factors for infection by shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in dairy cattle. Trop Anim Health Prod. 2014;46(4):635-9.
71. Padola N, Sanz M, Blanco J, Blanco M, Blanco J, Etcheverría A, et al. Serotypes and virulence genes of Shigatoxigenic *Escherichia coli* (STEC) isolates from a feedlot in Argentina. Vet Microbiol. 2004;100:3-9.
72. Parsons BD, Zelyas N, Berenger BM, Chui L. Detection, Characterization, and Typing of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. Front Microbiol. 2016;7.

73. Triplett OA, Xuan J, Foley S, Nayak R, Tolleson WH. Immunomagnetic Capture of Big Six Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Strains in Apple Juice with Detection by Multiplex Real-Time PCR Eliminates Interference from the Food Matrix. *J Food Prot.* 2019;82(9):1512-23.
74. Beutin L, Martin A. Outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) O104:H4 infection in Germany causes a paradigm shift with regard to human pathogenicity of STEC strains. *J Food Prot.* 2012;75(2):408-18.
75. Vélez MV, Colello R, Etcheverría AI, Vidal RM, Montero DA, Acuña P, et al. Distribution of Locus of Adhesion and Autoaggregation and *hes* Gene in STEC Strains from Countries of Latin America. *Curr Microbiol.* 2020;77(9):2111-7.
76. Jm R, Cm T, Ab R, Mk W. Critical roles for *stx2*, *eae*, and *tir* in enterohemorrhagic *Escherichia coli*-induced diarrhea and intestinal inflammation in infant rabbits . Vol. 71, *Infection and immunity*. *Infect Immun*; 2003.
77. Canata MG, Navarro R, Velázquez G, Rivelli S, Rodríguez F, Céspedes A, et al. Caracterización molecular de factores de virulencia de aislados *Escherichia coli* obtenidas de heces de niños con gastroenteritis del Hospital Central de Instituto de Previsión Social en el 2012. *Pediatría Asunción.* 2016;43(1):12-6.
78. Prieto F, Cabañas C, Villagra V. Características de los pacientes en espera de trasplante renal. *Mem Inst Investig En Cienc Salud.* 2015;13:49-57.
79. Bando SY, Iamashita P, Guth BE, Dos Santos LF, Fujita A, Abe CM, et al. A hemolytic-uremic syndrome-associated strain O113:H21 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* specifically expresses a transcriptional module containing *dicA* and is related to gene network dysregulation in Caco-2 cells. *PloS One.* 2017;12(12):e0189613.
80. Fouladkhah AC, Bisha B. Advances in Prevention of Foodborne Pathogens of Public Health Concern during Manufacturing. *MDPI*; 2019. 168 p.
81. Zhang W, Nadirk J, Kossow A, Bielaszewska M, Leopold SR, Witten A, et al. Phylogeny and phenotypes of clinical and environmental Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O174. *Environ Microbiol.* 2014;16(4):963-76.
82. Karmali MA, Mascarenhas M, Shen S, Ziebell K, Johnson S, Reid-Smith R, et al. Association of genomic O island 122 of *Escherichia coli* EDL 933 with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* seropathotypes that are linked to epidemic and/or serious disease. *J Clin Microbiol.* 2003;41(11):4930-40.
83. Meador MM. Paraguay Livestock and Products Annual 2019. *USDA Foreign Agricultural Service*; 2019.
84. Ultima Hora. El consumidor paraguayo de carne es cada vez más exigente. *ultimahora.com*. Anuario 2020. 2019;1.

85. Laino LD, Laino I, Musálem K. Comercio Internacional y Competitividad de la Producción Ganadera en Paraguay. Poblac Desarro. 2018;24(46):99-109-109.
86. La Nacion. Exportación de carne paraguaya llega ahora a 42 destinos. La Nación. 2020;1.

## 8. ANEXOS

### 8.1 Anexo 1

En el proyecto marco se utilizaron metodologías de muestreo validadas y publicadas internacionalmente por investigadores para establecer el número adecuado de bovinos a ser estudiados, los cuales sugieren que 4 bovinos son representativos por establecimiento ganadero teniendo como expectativa una prevalencia de portación de STEC del 80%, con un margen de error del 10% e índice de confianza del 95%. Por tanto, incluyendo 4 bovinos por cada uno de los 11 establecimientos, fueron estudiados finalmente 44 bovinos en el proyecto inicial, a los cuales, se les tomó muestras de materia fecal mediante hisopado rectal.

El flujograma de trabajo seguido en el proyecto marco, realizado por Rojas y colaboradores en el año 2017, es descrito brevemente a continuación. La materia fecal recolectada a través de hisopos estériles, fue cultivada en agar Mac Conkey e incubadas a 37°C durante 24 horas. La zona de confluencia fue tomada como universo de la microbiota intestinal para evaluar la presencia de genes codificantes de las toxinas Shiga 1 y/o 2. Para ello, se tomaron dos alícuotas de la zona de confluencia, una de ellas fue inoculada en un tubo con agua estéril para la extracción del material genético, y la otra, en un tubo conteniendo BHI-glicerol al 15% para la criopreservación de la misma a -80°C.

El material genético obtenido fue sometido a la técnica de PCR para la detección de los genes *stx1* y/o *stx2* a fin de determinar la portación de STEC en bovinos. Aquellas muestras criopreservadas, cuyo ADN haya amplificado para alguno de los genes *stx*, fueron cultivadas en agar Luria Bertani e incubadas a 37°C por 24 horas. Se tomaron de 6 a 50 colonias individuales de este cultivo y fueron inoculadas en medio LB líquido y sometidas posteriormente a agitación constante durante 24 horas a 37°C. Se tomaron dos alícuotas del medio líquido a las 24 horas: una para la obtención de material genético y otra para la criopreservación en BHI-glicerol al 15% a -80°C. Aquellas colonias individuales para las cuales se haya detectado la presencia de los genes *stx1* y/o *stx2* por PCR, fueron sometidas posteriormente a las siguientes determinaciones: a) Confirmación de género y especie de *E. coli* mediante pruebas bioquímicas (TSI, LIA, SIM, Citrato) y

amplificación del gen *16S*; b) Detección de factores de virulencia accesorios (*saa*, *ehxA*, *eae*); c) Detección del gen *rfbO157* para evaluar la presencia del serogrupo O157.

8.2 Anexo 2

*Universidad Nacional de Asunción*  
 Dirección General de Investigación Científica y Tecnológica  
 INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS DE LA SALUD  
 COMITÉ CIENTIFICO (CC)  
 COMITÉ de ETICA en INVESTIGACION (CEI)

**INFORME DE ACEPTACION DE PROTOCOLO**

A : NATALIA ROJAS  
 C.C. : GUILLEN R, RODRIGUEZ F, MARTINEZ A.  
 Código : P51/2015  
 Fecha : 08/03/2016

Por la presente informamos que el *protocolo de investigación* remitido a estos Comités para su revisión bajo el título de:

**“Caracterización del perfil de virulencia de aislados de *Escherichia coli* productores de la toxina shiga (STEC) de materia fecal de ganado bovino y carne molida en el año 2016”.**

Ha sido aceptado



  
 COMITÉ CIENTIFICO (CC)  
 Dra. Soledad Campos  
 Coordinadora



  
 COMITÉ DE ETICA EN INVESTIGACION (CEI)  
 Dra. Eva Nara  
 Coordinadora

8.3 Anexo 3

*Universidad Nacional de Asunción*  
 RECTORADO  
 INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS DE LA SALUD  
 COMITÉ CIENTÍFICO (CC)  
 COMITÉ de ÉTICA en INVESTIGACION (CEI)

**INFORME DE ACEPTACION DE PROTOCOLO**  
**ADENDA**

A : PATRICIA ACUÑA  
 C.C. : ROSA GUILLÉN, FÁTIMA RODRÍGUEZ, MELISA FLORENTIN,  
 NATALIA ROJAS.  
 Código : P07/2019 ADENDA DEL P49/2018  
 Fecha : 06/06/2019

Por la presente informamos que el protocolo de investigación remitido a estos Comités para su revisión bajo el título de:

**"DETECCIÓN DE GENES DEL LOCUS DE ADHESIÓN Y AUTOAGREGACIÓN (LAA) EN AISLADOS STEC LEE- NEGATIVOS, PROVENIENTES DE MATERIA FECAL DE GANADO BOVINO DEL AÑO 2016".**



COMITÉ CIENTÍFICO (CC)  
 Dra. Vivian Giménez  
 Coordinadora

Ha sido aceptado



COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACION (CEI)  
 Dra. Eva Nara  
 Coordinadora

-----  
 Dr. Cecilio Báez c/ Dr. Gaspar Villamayor-Campus Universitario UNA  
 Dr. Cecilio Báez c/ Dr. Gaspar Villamayor-Campus Universitario UNA  
 -----