

## Comportamiento frente a diferentes condiciones físico químicas presentes de procesamiento de los alimentos de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga (STEC) serotipo O157:H7

Piaggio M. C., Gasparovic A. M, Correa S. A., Cinto F, Busquet C. M, y Tanaro J. D. <sup>(1)</sup>

Autores: (1) Facultad de Bromatología, Universidad Nacional de Entre Ríos, Perón 64, Gualeguaychú, Entre Ríos, Argentina

Contacto: [mercedespiaggio@gmail.com](mailto:mercedespiaggio@gmail.com) y/o [mercedes.piaggio@uner.edu.ar](mailto:mercedes.piaggio@uner.edu.ar)

### RESUMEN

*Escherichia coli* productor de toxina Shiga (STEC) serotipo O157:H7 es un patógeno de transmisión alimentaria endémico en la Argentina, responsable principal del Síndrome Urémico Hemolítico. Algunas de sus cepas se consideran hipervirulentas (clado 8). Su capacidad de supervivencia en el ambiente, muchas veces incrementada por la producción de biofilm y su baja dosis infectiva representan un problema en la producción e industrialización de los alimentos. Los objetivos del presente estudio fueron evaluar la resistencia y el daño metabólico de 52 cepas de STEC O157:H7 del clado 8 y clados 4/5, frente a pH ácidos (RA), presión osmótica alta y baja (PO), ciclos de congelación y descongelación sucesivos (CCD), almacenamiento congelado (RC), inanición celular (IC) y presencia de antibióticos (PA). Se obtuvieron y cuantificaron inóculos en fase estacionaria ( $10^9$  células/ml) y se expusieron al medio TSB con pH 2,5 y 3,5; al medio TSB con 20% de NaCl; a solución de NaCl 0,85%, a agua destilada, a CCD sucesivos, a almacenamiento a  $-18^{\circ}\text{C}$  y a PA. Los tiempos de exposición fueron: 0, 2, 6, 8 y 12h para RA y PO, hasta 12 meses en ambiente congelado y hasta 7 días para el resto de las condiciones. Las cepas expuestas a IC se evaluaron hasta 30 días. Luego se cuantificaron las células viables en dos medios de cultivo y se calcularon los tiempos de reducción decimal (valor D) y la proporción de células injuriadas. El 100% de las cepas resultó RA y sensibles a PA. En las demás condiciones se presentaron diferentes comportamientos según cepa y factor. Se observa que las cepas del clado 8 son significativamente más resistentes al estrés ácido que las del clado 4/5 ( $p < 0.05$ ). No se observaron diferencias significativas en las resistencias de las cepas de ambos clados al estrés osmótico, por inanición y a los CCD. El daño metabólico varió según el tiempo de contacto y el factor. Se concluye que las cepas de *E. coli* O157:H7 presentes en el ambiente exhiben distintos grados de resistencia y que es necesario conocer su magnitud para poder delinear métodos de conservación eficaces.

**Palabras clave:** STEC O157:H7, resistencia, injuria, tiempo de reducción decimal, clado 8

## Introducción

*Escherichia coli* productor de toxina Shiga (STEC) serotipo O157:H7 es un patógeno de transmisión alimentaria cuyo reservorio principal son los rumiantes. Puede transmitirse al hombre a través de una gran variedad de alimentos, tanto de origen animal como vegetal, y es el serotipo prevalente asociado al Síndrome urémico hemolítico (SUH) (Pianciola y Rivas, 2018). Esta enfermedad es endémica en la Argentina, causando entre 300 y 500 casos nuevos por año (Boletín integrado de epidemiología, 2019). Las cepas de STEC presentan una gran diversidad genética por lo que los niveles de virulencia son cepa dependiente. Para que ocurra la infección por STEC, estos gérmenes poseen distintos factores de virulencia, como las citotoxinas Shiga, adhesinas, proteasas, lipopolisacáridos (LPS), flagelos, sistemas de captura de hierro y otras toxinas (Gyles, 2007; Guth y col., 2011). Algunas cepas son hipervirulentas (pertenecientes al clado 8), las cuales se asocian a casos severos de enfermedad humana. Dentro de las metodologías que permiten la subtipificación de las cepas se encuentra el estudio de los polimorfismos de nucleótido simple (del inglés *Single Nucleotide Polymorphism* o SNP) los cuales constituyen variaciones en la secuencia de ADN que afectan a una sola base (adenina, timina, citosina o guanina) en secuencias del genoma. Esta metodología permite el análisis filogenético de las cepas y agrupa a las mismas en clados. A partir de un brote de SUH producido por el consumo de espinacas, Manning y col. (2008) demostraron que los aislamientos pertenecientes al clado 8 muestran una mayor virulencia en comparación con el resto de los clados, motivo por el cual se les llamó cepas hipervirulentas. Por lo tanto, su virulencia incrementada, su baja dosis infectiva y su capacidad de supervivencia frente a las condiciones ambientales determinan que sea de sumo interés disminuir los niveles de contaminación en la industria de los alimentos y en la producción primaria (Piaggio y col., 2012).

La exposición de los microorganismos a distintas condiciones de estrés ambiental, como medios nutricionales mínimos, presencia de sustancias químicas en concentraciones tóxicas o factores físicos que alteren estructuras celulares o funciones metabólicas pueden provocar un daño celular subletal (injurias) o la muerte de las bacterias (Van Elsas y col., 2011). El daño celular subletal de los microorganismos presentes en los alimentos se presenta en la industria de los alimentos principalmente cuando los métodos de conservación utilizados resultan ineficaces, o cuando existen fallas en la aplicación de las tecnologías. A su vez esto se relaciona, en ocasiones, con una creciente demanda del consumidor de alimentos mínimamente procesados, en donde se busca preservar los caracteres sensoriales o nutricionales de los alimentos. Cuando los métodos de conservación aplicados, como por ejemplo las tecnologías de refrigeración o tratamientos térmicos, la acidificación, la desecación, el agregado de conservantes químicos, la irradiación, el uso de campos eléctricos de alta intensidad o campos magnéticos oscilantes, por nombrar métodos tradicionales y algunas tecnologías innovadoras, se aplican en intensidades subletales, los microorganismos que permanecen viables pueden ser causantes de Enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs). Las bacterias presentes en los alimentos pueden presentar una tolerancia natural a ciertos factores de estrés. Además, también se puede inducir una respuesta adaptativa, es decir, cambios fisiológicos y cambios estructurales que ayudan a las bacterias a adaptarse al nuevo ambiente. El estrés inducido por factores fisicoquímicos puede incrementar la virulencia en las células adaptadas (McClure, 2005) y puede generar una protección cruzada a otros factores drásticos. Las características de las células y su comportamiento frente a estos factores estresantes se pueden analizar en el laboratorio en condiciones controladas (ensayos experimentales) y, de este modo, obtener información de gran relevancia para el diseño de los métodos de conservación de los alimentos. Los **objetivos** del presente estudio fueron evaluar la resistencia de 52 cepas de STEC O157:H7 obtenidas de muestras ambientales y de muestras animales, frente a pH ácidos (RA), presión osmótica alta (RO), medio hiposmótico (MH), efecto de la congelación (RC), ciclos de congelación y descongelación (CCD), inanición celular (IC) y presencia de antibióticos (RPA) y el daño metabólico producto de la exposición a los agentes estresantes.

## Materiales y Métodos

### Cepas de STEC O157:H7

Las cepas STEC O157:H7 utilizadas en el presente estudio fueron aisladas de muestras ambientales y de reservorios animales. En la **Tabla N°1** se presentan sus principales características genotípicas. Las cepas conservadas a -30°C se inocularon en caldo tripticasa soja (TSB; Oxoid Ltd, Reino Unido) y se incubaron a 36 °C durante 24h. Se comprobó la pureza de las mismas sembrándolas en medio selectivo CHROMagar™O157. Para cada uno de los ensayos se utilizaron cultivos en fase estacionaria en una concentración aproximada de 10<sup>9</sup> UFC/ml de medio líquido (Álvarez-Ordóñez y col., 2013), los cuales se cuantificaron a través del método de recuento en placa, sembrando las diluciones seriadas de cada cepa en medio agar tripticasa soja (TSA, Oxoid Ltd, Reino Unido).

### Resistencia a factores estresantes

Los inóculos valorados se utilizaron en los ensayos de desafío frente a las condiciones estresantes, a saber: exposición a: TSB pH 2,5 (ajustado con ácido clorhídrico) (estrés ácido: RA) hasta 24h; ciclos de congelación y descongelación (CCD) (hasta 5 ciclos); persistencia en ambiente congelado (RC) (temperatura de -18°C) de 1 hasta 12 meses; TSB 20% de NaCl (estrés por presión osmótica alta (PO)); solución fisiológica (NaCl 0,85%) (inanición celular (IC)), y presencia de antibióticos (PA).

**Tabla N° 1.** Características principales de las cepas estudiadas

Tipo de Muestra	Código	Factores de virulencia		Toxinas Shiga		Clado	q933	q2f	Determinantes de virulencia putativos							
		PCR		var 1	var 2				ECSP_0242	ECSP_1773	ECSP_2687	ECSP_2870	ECSP_3286	ECSP_3620 (norV)		
A	A3-1-9	<i>rfbA</i>	<i>flhC</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>ehxA</i>	2a	4/5	-	+	+	-	+	-	-	+
B	A3-13-2	<i>rfbA</i>	<i>flhC</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>ehxA</i>	2a	4/5	-	+	+	-	+	-	-	+
B	A3-14-9	<i>rfbA</i>	<i>flhC</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>ehxA</i>	2a	4/5	-	+	+	-	+	-	-	+
B	A3-2-10	<i>rfbA</i>	<i>flhC</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>ehxA</i>	2a	4/5	-	+	+	-	+	-	-	+
B	A3-4-10	<i>rfbA</i>	<i>flhC</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>ehxA</i>	2a	4/5	-	+	+	-	+	-	-	+
B	A3-7-3	<i>rfbA</i>	<i>flhC</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>ehxA</i>	2a	4/5	-	+	+	-	+	-	-	+
B	A3-8-27	<i>rfbA</i>	<i>flhC</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>ehxA</i>	2a	4/5	-	+	+	-	+	-	-	+
B	A3-9-12	<i>rfbA</i>	<i>flhC</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>ehxA</i>	2a	4/5	-	+	+	-	+	-	-	+
B	P3-3-1	<i>rfbA</i>	<i>flhC</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>ehxA</i>	2a	4/5	+	+	+	-	+	-	-	+
B	A3-16-1	<i>rfbA</i>	<i>flhC</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>ehxA</i>	2a	4/5	-	+	+	-	+	-	-	+
B	Y1-6-20	<i>rfbA</i>	<i>flhC</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>ehxA</i>	2a	4/5	-	+	+	-	+	-	-	+
B	E2-5-4	<i>rfbA</i>	<i>flhC</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>ehxA</i>	2a	4/5	-	+	+	-	+	-	-	+
B	E2-6-2	<i>rfbA</i>	<i>flhC</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>ehxA</i>	2a	4/5	-	+	+	-	+	-	-	+
B	E2-7-1	<i>rfbA</i>	<i>flhC</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>ehxA</i>	2a	4/5	-	+	+	-	+	-	-	+
B	A3-10-7	<i>rfbA</i>	<i>flhC</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>ehxA</i>	2a	4/5	-	+	+	-	+	-	-	+
B	E2-10-1	<i>rfbA</i>	<i>flhC</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>ehxA</i>	2a	4/5	-	+	+	-	+	-	-	+
A	AP1-12-6	<i>rfbA</i>	<i>flhC</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>ehxA</i>	2a	4/5	-	+	+	-	+	-	-	+
B	V2-9-1	<i>rfbA</i>	<i>flhC</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>ehxA</i>	2a	4/5	-	+	+	-	+	-	-	+
B	B1-8-31	<i>rfbA</i>	<i>flhC</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>ehxA</i>	2a	8	-	+	+	-	+	-	-	+
A	V1-4-1	<i>rfbA</i>	<i>flhC</i>	<i>stx2</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>ehxA</i>	2a/2c	8	+	+	+	+	+	+	+
B	V1-1-4	<i>rfbA</i>	<i>flhC</i>	<i>stx2</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>ehxA</i>	2a/2c	8	+	+	+	+	+	+	+
B	P3-2-2	<i>rfbA</i>	<i>flhC</i>	<i>stx2</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>ehxA</i>	2a/2c	8	-	+	+	+	+	+	+
B	A2-8-20	<i>rfbA</i>	<i>flhC</i>	<i>stx2</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>ehxA</i>	2a/2c	8	+	+	+	+	+	+	+
B	AL1-5-22	<i>rfbA</i>	<i>flhC</i>	<i>stx2</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>ehxA</i>	2a/2c	8	+	+	+	+	+	+	+
A	A7-18-1	<i>rfbA</i>	<i>flhC</i>	<i>stx2</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>ehxA</i>	2a/2c	8	+	+	+	+	+	+	+
B	A8-10-6	<i>rfbA</i>	<i>flhC</i>	<i>stx2</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>ehxA</i>	2a/2c	8	+	+	+	+	+	+	+
B	A3-6-6	<i>rfbA</i>	<i>flhC</i>	<i>stx2</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>ehxA</i>	2a/2c	8	+	+	+	+	+	+	+
B	A7-10-1	<i>rfbA</i>	<i>flhC</i>	<i>stx2</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>ehxA</i>	2a/2c	8	+	+	+	+	+	+	+
B	A8-7-1	<i>rfbA</i>	<i>flhC</i>	<i>stx2</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>ehxA</i>	2a/2c	8	+	+	+	+	+	+	+
B	AO1-1-1	<i>rfbA</i>	<i>flhC</i>	<i>stx2</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>ehxA</i>	2a/2c	8	+	+	+	+	+	+	+
B	P3-5-1	<i>rfbA</i>	<i>flhC</i>	<i>stx2</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>ehxA</i>	2a/2c	8	+	+	+	+	+	+	+
A	AO1-3-3	<i>rfbA</i>	<i>flhC</i>	<i>stx2</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>ehxA</i>	2a/2c	8	+	+	+	+	+	+	+
B	AO1-2-4	<i>rfbA</i>	<i>flhC</i>	<i>stx2</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>ehxA</i>	2a/2c	8	+	+	+	+	+	+	+
B	E2-9-4	<i>rfbA</i>	<i>flhC</i>	<i>stx2</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>ehxA</i>	2a/2c	8	+	+	+	+	+	+	+
B	A7-13-9	<i>rfbA</i>	<i>flhC</i>	<i>stx2</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>ehxA</i>	2a/2c	8	+	+	+	+	+	+	+
A	A7-17-14	<i>rfbA</i>	<i>flhC</i>	<i>stx2</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>ehxA</i>	2a/2c	8	+	+	+	+	+	+	+
B	AF2-10-3	<i>rfbA</i>	<i>flhC</i>	<i>stx2</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>ehxA</i>	2a/2c	8	+	+	+	+	+	+	+
C	050208 8	<i>rfbA</i>	<i>flhC</i>	<i>stx2</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>ehxA</i>	1a	2c	4/5	-	+	+	-	-	+
C	071006 1-2-3	<i>rfbA</i>	<i>flhC</i>	<i>stx2</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>ehxA</i>	1a	2c	4/5	-	+	+	-	-	+
C	071006 16b	<i>rfbA</i>	<i>flhC</i>	<i>stx2</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>ehxA</i>	1a	2c	4/5	-	+	+	-	-	+
C	071706 31	<i>rfbA</i>	<i>flhC</i>	<i>stx2</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>ehxA</i>	1a	2c	4/5	-	+	+	-	-	+
C	071706 36	<i>rfbA</i>	<i>flhC</i>	<i>stx2</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>ehxA</i>	1a	2c	4/5	-	+	+	-	-	+
C	041806 16b	<i>rfbA</i>	<i>flhC</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>ehxA</i>	2c	4/5	-	+	+	-	+	-	-	+
C	071706 2b	<i>rfbA</i>	<i>flhC</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>ehxA</i>	2c	4/5	-	+	+	-	+	-	-	+
C	071706 1-2-3	<i>rfbA</i>	<i>flhC</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>ehxA</i>	2c	4/5	-	+	+	-	+	-	-	+
C	071706 26	<i>rfbA</i>	<i>flhC</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>ehxA</i>	2c	4/5	-	+	+	-	+	-	-	+
E	103006	<i>rfbA</i>	<i>flhC</i>	<i>stx2</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>ehxA</i>	2a/2c	8	+	+	+	+	+	+	+
E	092500-3(6)	<i>rfbA</i>	<i>flhC</i>	<i>stx2</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>ehxA</i>	1a	2c	4/5	-	+	+	-	-	+
E	100201-1(1)	<i>rfbA</i>	<i>flhC</i>	<i>stx2</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>ehxA</i>	1a	2c	4/5	-	+	+	-	-	+
E	031103-3( 4)	<i>rfbA</i>	<i>flhC</i>	<i>stx2</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>ehxA</i>	1a	2a/2c	4/5	-	+	+	-	-	+
E	031103-22( 24)	<i>rfbA</i>	<i>flhC</i>	<i>stx2</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>ehxA</i>	1a	2a/2c	4/5	-	+	+	-	-	+
E	031103-3(2)	<i>rfbA</i>	<i>flhC</i>	<i>stx2</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>ehxA</i>	1a	2a/2c	4/5	-	+	+	-	-	+

Ref: A: agua superficial no expuesta a detritus; B: Agua superficial expuesta a detritus, C: Hisopados rectales bovinos, E. aguas superficiales abiertas (ríos, arroyos, lagunas), ND: no determinado

### Ensayo de resistencia a la acidez

Se utilizó la metodología propuesta por Elhadidy y Álvarez-Ordóñez (2016) con modificaciones. Las cepas estudiadas fueron inoculadas en tubos con caldo TSB a pH 2,5. Durante cada tratamiento se tomaron 0,1 ml de la suspensión bacteriana a intervalos de tiempo establecidos y se realizaron diluciones seriadas para llevar a cabo el recuento (UFC/ml) de las células viables posterior al tratamiento. Las diluciones se realizaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se sembraron en el medio no selectivo TSA y en el medio selectivo-diferencial EMB. Los intervalos de tiempo de exposición al ácido fueron de: 2, 6, 8 y 12 h. Para cada cepa se llevaron a cabo dos ensayos independientes. En cada uno de los ensayos se incorporó un control de cepa sin exposición al ácido y un control negativo (medios de cultivo sin inocular).

**Estrés por congelamiento-descongelamiento:** se realizó una dilución 1/10 de la suspensión bacteriana en fase estacionaria en tubos eppendorf conteniendo caldo TSB. Estas suspensiones bacterianas fueron sometidas a ciclos de congelación en freezer, a una temperatura de  $-18^{\circ}\text{C}$  durante 22,5 h, seguido de descongelación a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 1,5 h (duración de 1 ciclo). En cada ciclo de descongelación se tomó 0,1 ml de la suspensión expuesta y se realizaron diluciones seriadas e inocularon como en el ensayo de resistencia a acidez. La experiencia completa consistió en someter las bacterias a 5 ciclos de congelación-descongelación.

**Persistencia en ambiente congelado:** se realizó una dilución 1/10 de la suspensión bacteriana en fase estacionaria en tubos eppendorf conteniendo caldo TSB. Estas suspensiones bacterianas fueron sometidas a congelación en freezer, a una temperatura de  $-18^{\circ}\text{C}$ . Una vez por mes se retiró un tubo del freezer y se cuantificó la cantidad remanente de microorganismos, tanto en medio TSA (células viables) como en medio EMB (células injuriadas). El estudio completo duró 12 meses. Cada ensayo fue replicado dos veces y se calculó la media del número de viables y la desviación estándar en cada experimento.

**Estrés osmótico:** las cepas estudiadas fueron inoculadas en tubos con caldo TSB con 20% de NaCl. Durante cada tratamiento se tomaron 0,1 ml de la suspensión bacteriana a intervalos de tiempo establecidos y se realizaron diluciones seriadas. Estas diluciones se sembraron en el medio no selectivo TSA y en el medio selectivo-diferencial EMB, para determinar el número de colonias en dichos medios (UFC/ml). Los intervalos de tiempo de exposición fueron de: 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 días. Cada ensayo fue replicado tres veces y se calculó la media del número de viables y la desviación estándar en cada experimento.

**Estrés nutricional o estrés por inanición:** las cepas estudiadas fueron inoculadas en tubos conteniendo solución fisiológica (NaCl al 0,85%) y se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  durante todo el ensayo. Durante cada tratamiento se tomaron 0,1 ml de la suspensión bacteriana a intervalos de tiempo establecidos y se realizaron diluciones seriadas. Estas diluciones se sembraron en el medio no selectivo TSA y en el medio selectivo-diferencial EMB, para determinar el número de colonias en dichos medios (UFC/ml). Los intervalos de tiempo de exposición fueron de: 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 días. Cada ensayo fue replicado tres veces. Finalizados los 7 días de cuantificación diaria de las cepas supervivientes la evaluación continuó con una frecuencia semanal hasta cumplido el mes de exposición. En este caso se tomó una ansada del cultivo y se sembró en ambos medios de cultivo, para determinar su viabilidad (cepa viable/no viable).

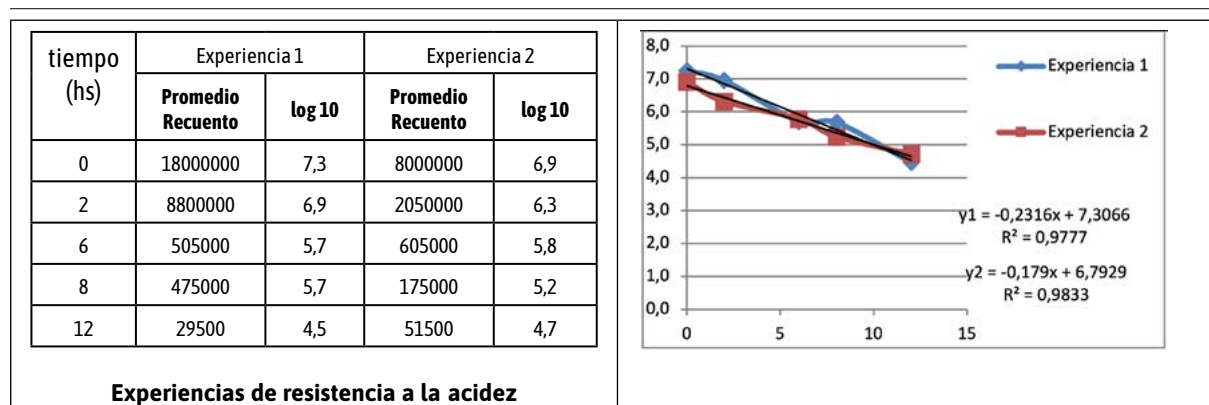
En la **Figura N°1** (Resultados) se muestran los valores obtenidos de la exposición a estrés ácido para una de las cepas estudiadas (cepa A3-10-7) y el gráfico de supervivencia y la cinética de inactivación correspondiente a dicha cepa. Con esos valores se realizó el cálculo del valor D. El valor D se calculó a partir de la pendiente de la curva de supervivencia ( $D = -1/\text{pendiente}$ ). Para el resto de las cepas se muestra directamente el valor D calculado. Los valores D se calcularon en: horas para estrés ácido, para el estrés osmótico y para el estrés por inanición y en ciclos para estrés por congelación y descongelación sucesivos. Para realizar el cálculo de células dañadas subletalmente o injuriadas debido a las condiciones medioambientales se determinó la diferencia entre los recuentos obtenidos mediante la siembra en medios generales, respecto de los medios selectivos y diferenciales.

**Resistencia a antibióticos:** la evaluación de la resistencia de las cepas de STEC frente a antibióticos se realizó utilizando el método de difusión en agar (método de Kirby-Bauer) según el protocolo experimental propuesto por Hudzicki, 2009. Los antibióticos evaluados fueron: ampicilina (AMP), amoxicilina-clavulánico (AMC), cefalotina (KF), ácido nalidixico (NA), ciprofloxacina (CIP), amicacina (AK), gentamicina (CN), estreptomycin (S), tetraciclinas (TE), trimetoprima-sulfametoxazol (TMS), nitrofurantoina (F), fosfomicina (FOS). Los resultados se expresaron como: sensible (S), intermedio (I) y resistente (R).

## Resultados y Discusión

### Resistencia a la acidez

En la **Figura N° 1** se muestran los resultados obtenidos de la experiencia de estrés ácido para la cepa STEC A3-10-7, el gráfico de las curvas de supervivencia y la cinética de inactivación. Las curvas de supervivencia mostraron, al igual que con el resto de las cepas, una cinética de primer orden, con diferentes grados de ajuste ( $R^2$ ). Para las cepas restantes estudiadas sólo se presentan los valores D calculados (**Tabla N°2**).



**Figura N°1:** Experiencias de resistencia a la acidez de la cepa A3-10-7. A: tabla de datos; B Gráfico de las curvas de supervivencia

El tiempo de reducción decimal (valor D) se utiliza para caracterizar la velocidad de muerte de los microorganismos cuando se exponen a distintas condiciones ambientales drásticas como temperaturas elevadas, acidez, ambientes oxidativos, sustancias antimicrobianas, etc. El valor D, es decir, el tiempo necesario para reducir en un ciclo logarítmico una población bacteriana (reducir la población a la décima parte del número inicial) se calculó a partir de la pendiente de la curva de supervivencia ( $D = -1/\text{pendiente}$ ). En la **Tabla N° 2** se presentan los valores D de la totalidad de las cepas estudiadas.

En relación a la resistencia a la acidez, el 100% de las cepas resultaron resistentes. Las cepas del clado 8 fueron significativamente más resistentes ( $p < 0.05$ ) al estrés ácido que las del clado 4/5. Del mismo modo, las cepas que presentaron las variantes de las toxinas  $stx_{2a}/stx_{2c}$  fueron estadísticamente más resistentes que el resto de las cepas portadoras de otras variantes de toxinas, a saber,  $stx_{2a}$ ;  $stx_{2c}$ ;  $stx_{1a}/stx_{2c}$ ;  $stx_{1a}/stx_{2a}/stx_{2c}$  y las cepas que presentaron los antiterminadores Q 933 y Q 21 también fueron significativamente más resistentes que aquellas que solo presentaban el antiterminador Q 21. Los valores D variaron desde 2.7 h, hasta 17.7 h, lo cual muestra la gran diferencia en resistencias que presentan las cepas estudiadas. La media de valores D para las cepas del clado 4/5 fue de 4,5 h y para las del clado 8 fue de 8,8 h. Debido a que en los primeros ensayos todas las cepas resultaron resistentes a pH 2,5, no se continuó evaluando la resistencia a pH 3,5. No se observaron diferencias significativas entre los va-

lores D de las cepas provenientes de diferentes orígenes ( $P > 0.05$ ), aunque sí se observaron diferencias significativas entre las cepas con presencia de factores genéticos putativos determinantes de virulencia ECSP\_0242; ECSP\_1773; ECSP\_2687; ECSP\_2870; ECSP\_3286; ECSP\_3620 (norV). La proporción de células injuriadas por ambiente ácido varió en función del tiempo de contacto, desde un 18% a un 90% de células injuriadas.

Existen distintos mecanismos implicados en la adaptación de las bacterias a medios estresantes. El más estudiado, el cual también está involucrado en la regulación de la fase estacionaria de crecimiento, involucra la síntesis de un factor sigma alternativo o sustituto. El factor sigma es la subunidad de la ARN polimerasa que reconoce y se une a los promotores específicos en la secuencia de ADN. Las bacterias codifican diferentes factores sigmas intercambiables y el principal factor sigma 70 ( $\sigma_{70}$ ) es responsable del reconocimiento de la mayoría de los promotores implicados en la fase de crecimiento exponencial. Entre los factores sigmas alternativos se encuentra el 38 ( $\sigma^{38}$ ) o factor sigma S ( $\sigma_S$ ) que conduce la expresión de un regulón especialmente involucrado en los cambios fisiológicos de la fase estacionaria y en la regulación y expresión de proteínas que participan en la respuesta general al estrés (Hengge-Aronis, 2000; Loewen y col., 1998).

Debido a que la acidez del estómago es una barrera química importante para la protección de los individuos frente a los agentes causantes de ETAs, aquellos patógenos alimentarios que presentan capacidad de resistir en ambientes ácidos exhiben una ventaja para su supervivencia a través del tránsito gastrointestinal. Esto es una preocupación en salud pública y en la industria de los alimentos, ya que el uso de ácidos orgánicos, ya sea por acidificación artificial o por fermentación acidoláctica, forma parte de las tecnologías de conservación de alimentos. La adaptación y resistencia a la acidez que presentan ciertos patógenos alimentarios puede no sólo permitirles mantenerse viables en ambientes ácidos, sino también proliferar en aquellos alimentos con acidez moderada, que normalmente afectarían a muchos de los patógenos alimentarios. La resistencia al estrés ácido es un fenómeno complejo que varía según las especies bacterianas y es dependiente de la fase de crecimiento en que se encuentren, como así también del tipo de ácido con el que se disminuya el pH y de la forma de exposición (Buchanan y Edelson, 1999).

La alta resistencia de las cepas evaluadas en este estudio puede deberse a que para sobrevivir a los pHs bajos presentes en los alimentos y al pH extremadamente bajo presente en el ácido del estómago, *E. coli* O157 ha desarrollado distintos mecanismos de resistencia (Large y col., 2005; Lin y col., 1996). Estos mecanismos le permiten mantener el pH citoplasmático en valores compatibles con los sistemas biológicos. Uno de ellos, llamado sistema oxidativo, es un mecanismo de fase estacionaria, inducido por ácido, reprimido por glucosa y regulado mediante RpoS. Otro mecanismo, el sistema Glutamato dependiente, también es inducido en fase estacionaria, pero requiere la expresión de un glutamato descarboxilasa, un glutamato putativo y glutamato exógeno para funcionar. El tercer sistema es arginina dependiente y requiere la presencia de una arginina descarboxilasa ácido inducible y de arginina extracelular (Richard y Foster, 2003). El sistema Lisina descarboxilasa dependiente y el Ornitina descarboxilasa dependiente requieren la presencia de estos aminoácidos y del antiporte que intercambia el producto descarboxilado por un nuevo sustrato. Los sistemas Glutamato y Arginina dependientes permiten a la bacteria sobrevivir a condiciones extremadamente ácidas (aproximadamente pH 2,5), mientras que los sistemas Lisina y Ornitina dependientes, trabajan en un pH ácido externo moderado (pH aproximado 4,5). Para mantener el pH interno, a medida que van ingresando compuestos ácidos exógenos, las enzimas descarboxilasas reemplazan el grupo  $\alpha$ -carboxilo del aminoácido específico por un protón del citoplasma. Esto genera el consumo de un protón y la generación del producto final de la reacción y dióxido de carbono, los cuales son transportados fuera de la célula por los antiportes específicos.

En lo que respecta a la resistencia a condiciones de presión osmótica alta se observó que la media de valores D para las cepas fue de 7,6hs, con mínimo de 4.9 h y máximo de 12.8 h. Se observó mucha menor

variación en las resistencias de las cepas que para el caso de la acidez. La media de valores D para las cepas del clado 4/5 fue de 7.2 h y para las del clado 8 fue de 8,3 h. No se observaron diferencias significativas entre los valores D de las cepas pertenecientes a los clados 8 y 4/5 ( $p > 0,05$ ), como así tampoco entre las cepas portadoras de toxinas  $stx_{2c}$  y  $stx_{2a}/stx_{2c}$  ( $p > 0,05$ ). A pesar que las cepas presentaron cierta resistencia a la presión osmótica elevada, ninguna de las cepas estudiadas resultó viables (cultivables) luego del segundo día de exposición, siendo el tiempo de persistencia máximo de 48hs. Los porcentajes de células injuriadas variaron en función del tiempo de contacto, desde un 20% a un 100%, a medida que avanzó el tiempo de exposición. No se observaron diferencias significativas entre los valores D de las cepas provenientes de diferentes orígenes ( $p > 0,05$ ) entre las cepas portadoras de los diferentes factores de virulencia putativos ni entre las cepas portadoras de las variantes de las toxinas. Esto indicaría que independientemente del origen de las cepas o sus características genotípicas las mismas resultan afectadas en medios de alta presión osmótica. El conocimiento sobre la resistencia de estos microorganismos a los factores de estrés comúnmente utilizados en la industria de los alimentos, puede conducir al desarrollo de nuevas estrategias para controlar el riesgo de síndrome urémico hemolítico (SUH) e implementar métodos de conservación eficaces.

Tabla N°

Código interno	Factores de virulencia		Clado	Valor D pH2,5 (horas)	Valor D Estrés osmótico (horas)	Valor D, Estrés congelación y descongelación (ciclos)	Valor D Estrés por inanición (h)
	PCR						
A3-1-9	<i>rfbA</i>	<i>flhC</i> / <i>stx2a</i> / <i>stx2c</i> / <i>eae</i> / <i>ehxA</i>	4/5	6,20 ± 0,48	5,3 ± 0,33	1,90 ± 0,62	42,83 ± 16
A3-13-2	<i>rfbA</i>	<i>flhC</i> / <i>stx2a</i> / <i>stx2c</i> / <i>eae</i> / <i>ehxA</i>	4/5	4,37 ± 1,65	6,29 ± 0,61	0,94 ± 0,17	36,00
A3-14-9	<i>rfbA</i>	<i>flhC</i> / <i>stx2a</i> / <i>stx2c</i> / <i>eae</i> / <i>ehxA</i>	4/5	3,44 ± 0,36	6,11 ± 0,19	1,55 ± 0,05	33,94
A3-2-10	<i>rfbA</i>	<i>flhC</i> / <i>stx2a</i> / <i>stx2c</i> / <i>eae</i> / <i>ehxA</i>	4/5	4,29 ± 0,56	6,33 ± 0,42	1,25 ± 0,46	46,17 ± 7
A3-4-10	<i>rfbA</i>	<i>flhC</i> / <i>stx2a</i> / <i>stx2c</i> / <i>eae</i> / <i>ehxA</i>	4/5	3,87 ± 0,37	6,89 ± 0,90	0,90 ± 0,14	35,79 ± 3
A3-7-3	<i>rfbA</i>	<i>flhC</i> / <i>stx2a</i> / <i>stx2c</i> / <i>eae</i> / <i>ehxA</i>	4/5	5,21 ± 0,26	10,91 ± 0,02	1,11 ± 0,56	66,16 ± 8
A3-8-27	<i>rfbA</i>	<i>flhC</i> / <i>stx2a</i> / <i>stx2c</i> / <i>eae</i> / <i>ehxA</i>	4/5	4,37 ± 0,37	5,9 ± 0,07	0,89 ± 0,03	31,81 ± 3
A3-9-12	<i>rfbA</i>	<i>flhC</i> / <i>stx2a</i> / <i>stx2c</i> / <i>eae</i> / <i>ehxA</i>	4/5	5,02 ± 0,34	7,44 ± 0,08	1,89 ± 0,05	52,22 ± 5
P3-3-1	<i>rfbA</i>	<i>flhC</i> / <i>stx2a</i> / <i>stx2c</i> / <i>eae</i> / <i>ehxA</i>	4/5	5,88 ± 0,97	12,8 ± 1,80	1,2 ± 0,22	35,32
A3-16-1	<i>rfbA</i>	<i>flhC</i> / <i>stx2a</i> / <i>stx2c</i> / <i>eae</i> / <i>ehxA</i>	4/5	2,71 ± 0,38	6,22 ± 0,01	0,98 ± 0,05	50,40
Y1-6-20	<i>rfbA</i>	<i>flhC</i> / <i>stx2a</i> / <i>stx2c</i> / <i>eae</i> / <i>ehxA</i>	4/5	4,50 ± 1,05	7,29 ± 0,61	1,04 ± 0,17	40,00
E2-5-4	<i>rfbA</i>	<i>flhC</i> / <i>stx2a</i> / <i>stx2c</i> / <i>eae</i> / <i>ehxA</i>	4/5	3,28 ± 0,51	5,13 ± 0,5	1,15 ± 0,05	42,02
E2-6-2	<i>rfbA</i>	<i>flhC</i> / <i>stx2a</i> / <i>stx2c</i> / <i>eae</i> / <i>ehxA</i>	4/5	4,81 ± 0,81	7,35 ± 0,49	1,00 ± 0,49	39,20
E2-7-1	<i>rfbA</i>	<i>flhC</i> / <i>stx2a</i> / <i>stx2c</i> / <i>eae</i> / <i>ehxA</i>	4/5	4,27 ± 0,38	7,09 ± 0,50	0,9 ± 0,30	35,50
A3-10-7	<i>rfbA</i>	<i>flhC</i> / <i>stx2a</i> / <i>stx2c</i> / <i>eae</i> / <i>ehxA</i>	4/5	4,95 ± 0,89	11,5 ± 0,06	1,53 ± 0,02	38,64
E2-10-1	<i>rfbA</i>	<i>flhC</i> / <i>stx2a</i> / <i>stx2c</i> / <i>eae</i> / <i>ehxA</i>	4/5	3,29 ± 0,44	5,70 ± 0,57	1,00 ± 0,10	35,81
AP1-12-6	<i>rfbA</i>	<i>flhC</i> / <i>stx2a</i> / <i>stx2c</i> / <i>eae</i> / <i>ehxA</i>	4/5	5,61 ± 0,78	7,12 ± 0,32	1,15 ± 0,67	45,18
V2-9-1	<i>rfbA</i>	<i>flhC</i> / <i>stx2a</i> / <i>stx2c</i> / <i>eae</i> / <i>ehxA</i>	4/5	6,00 ± 0,40	5,9 ± 0,30	1,19 ± 0,53	40,83
B1-8-31	<i>rfbA</i>	<i>flhC</i> / <i>stx2a</i> / <i>stx2c</i> / <i>eae</i> / <i>ehxA</i>	8	4,82	10,10 ± 0,11	1,98 ± 0,34	33,57
V1-4-1	<i>rfbA</i>	<i>flhC</i> / <i>stx2a</i> / <i>stx2c</i> / <i>eae</i> / <i>ehxA</i>	8	5,98	6,31 ± 0,20	1,45 ± 0,18	38,64
V1-1-4	<i>rfbA</i>	<i>flhC</i> / <i>stx2a</i> / <i>stx2c</i> / <i>eae</i> / <i>ehxA</i>	8	11,3	8,10 ± 0,11	1,28 ± 0,44	51,57
P3-2-2	<i>rfbA</i>	<i>flhC</i> / <i>stx2a</i> / <i>stx2c</i> / <i>eae</i> / <i>ehxA</i>	8	17,67	9,58 ± 0,29	1,41 ± 0,25	29,95
A2-8-20	<i>rfbA</i>	<i>flhC</i> / <i>stx2a</i> / <i>stx2c</i> / <i>eae</i> / <i>ehxA</i>	8	12,88	10,51 ± 0,6	1,21 ± 0,17	40,61
AL1-5-22	<i>rfbA</i>	<i>flhC</i> / <i>stx2a</i> / <i>stx2c</i> / <i>eae</i> / <i>ehxA</i>	8	6,55	6,34 ± 0,18	1,23 ± 0,15	49,2
A7-18-1	<i>rfbA</i>	<i>flhC</i> / <i>stx2a</i> / <i>stx2c</i> / <i>eae</i> / <i>ehxA</i>	8	9,06	9,28 ± 0,29	ND	ND
A8-10-6	<i>rfbA</i>	<i>flhC</i> / <i>stx2a</i> / <i>stx2c</i> / <i>eae</i> / <i>ehxA</i>	8	8,84	9,91 ± 0,02	0,98 ± 0,10	53,84
A3-6-6	<i>rfbA</i>	<i>flhC</i> / <i>stx2a</i> / <i>stx2c</i> / <i>eae</i> / <i>ehxA</i>	8	5,8	5,22 ± 0,09	1,15 ± 0,17	45,84
A7-10-1	<i>rfbA</i>	<i>flhC</i> / <i>stx2a</i> / <i>stx2c</i> / <i>eae</i> / <i>ehxA</i>	8	4,37	N	1,47 ± 0,20	39,8
A8-7-1	<i>rfbA</i>	<i>flhC</i> / <i>stx2a</i> / <i>stx2c</i> / <i>eae</i> / <i>ehxA</i>	8	10,61	4,9 ± 0,07	1,04 ± 0,29	50,4
AO1-1-1	<i>rfbA</i>	<i>flhC</i> / <i>stx2a</i> / <i>stx2c</i> / <i>eae</i> / <i>ehxA</i>	8	12,53	10,00 ± 0,17	0,81 ± 0,17	39,61
P3-5-1	<i>rfbA</i>	<i>flhC</i> / <i>stx2a</i> / <i>stx2c</i> / <i>eae</i> / <i>ehxA</i>	8	6,55	6,44 ± 0,08	1,24 ± 0,28	56,2
AO1-3-3	<i>rfbA</i>	<i>flhC</i> / <i>stx2a</i> / <i>stx2c</i> / <i>eae</i> / <i>ehxA</i>	8	8,72	8,58 ± 0,43	1,04 ± 0,03	45,92
AO1-2-4	<i>rfbA</i>	<i>flhC</i> / <i>stx2a</i> / <i>stx2c</i> / <i>eae</i> / <i>ehxA</i>	8	7,15	6,34 ± 0,18	1,13 ± 0,15	41,2
E2-9-4	<i>rfbA</i>	<i>flhC</i> / <i>stx2a</i> / <i>stx2c</i> / <i>eae</i> / <i>ehxA</i>	8	5,01	10,41 ± 1,67	1,07 ± 0,01	46,37
A7-13-9	<i>rfbA</i>	<i>flhC</i> / <i>stx2a</i> / <i>stx2c</i> / <i>eae</i> / <i>ehxA</i>	8	7,94	9,41 ± 1,97	1,19 ± 0,25	ND
A7-17-14	<i>rfbA</i>	<i>flhC</i> / <i>stx2a</i> / <i>stx2c</i> / <i>eae</i> / <i>ehxA</i>	8	9,01	11,00 ± 0,17	1,44 ± 0,15	ND
AF2-10-3	<i>rfbA</i>	<i>flhC</i> / <i>stx2a</i> / <i>stx2c</i> / <i>eae</i> / <i>ehxA</i>	8	15,01	12,00 ± 0,29	1,84 ± 0,35	66,3
050206 8	<i>rfbA</i>	<i>flhC</i> / <i>stx2a</i> / <i>stx2c</i> / <i>eae</i> / <i>ehxA</i>	4/5	3,41 ± 0,25	7,42 ± 0,31	1,98 ± 0,20	55,00
071006 9	<i>rfbA</i>	<i>flhC</i> / <i>stx2a</i> / <i>stx2c</i> / <i>eae</i> / <i>ehxA</i>	4/5	5,10 ± 0,85	7,99 ± 0,62	1,84 ± 0,15	43,20
071006 1-2-3	<i>rfbA</i>	<i>flhC</i> / <i>stx2a</i> / <i>stx2c</i> / <i>eae</i> / <i>ehxA</i>	4/5	4,32 ± 0,63	6,42 ± 0,55	0,99 ± 0,41	41,02
071006 16b	<i>rfbA</i>	<i>flhC</i> / <i>stx2a</i> / <i>stx2c</i> / <i>eae</i> / <i>ehxA</i>	4/5	5,63 ± 0,85	6,49 ± 0,49	1,80 ± 0,43	39,81
071706 31	<i>rfbA</i>	<i>flhC</i> / <i>stx2a</i> / <i>stx2c</i> / <i>eae</i> / <i>ehxA</i>	4/5	4,00 ± 0,71	6,09 ± 0,55	0,98 ± 0,31	36,30
071706 36	<i>rfbA</i>	<i>flhC</i> / <i>stx2a</i> / <i>stx2c</i> / <i>eae</i> / <i>ehxA</i>	4/5	4,32 ± 0,40	9,5 ± 0,20	1,78 ± 0,20	39,10
041806 16b	<i>rfbA</i>	<i>flhC</i> / <i>stx2a</i> / <i>stx2c</i> / <i>eae</i> / <i>ehxA</i>	4/5	3,80 ± 0,54	5,20 ± 0,56	1,50 ± 0,31	36,00
071706 2b	<i>rfbA</i>	<i>flhC</i> / <i>stx2a</i> / <i>stx2c</i> / <i>eae</i> / <i>ehxA</i>	4/5	4,90 ± 0,76	6,82 ± 0,44	1,20 ± 0,32	42,18
071706 1-2-3	<i>rfbA</i>	<i>flhC</i> / <i>stx2a</i> / <i>stx2c</i> / <i>eae</i> / <i>ehxA</i>	4/5	6,00 ± 0,50	6,5 ± 0,29	1,30 ± 0,54	41,80
103006	<i>rfbA</i>	<i>flhC</i> / <i>stx2a</i> / <i>stx2c</i> / <i>eae</i> / <i>ehxA</i>	8	6,15	6,24 ± 0,50	1,80 ± 0,59	44,1
092900-3(6)	<i>rfbA</i>	<i>flhC</i> / <i>stx2a</i> / <i>stx2c</i> / <i>eae</i> / <i>ehxA</i>	4/5	3,57 ± 0,66	5,99 ± 0,66	0,98 ± 0,37	37,50
100201-(1)	<i>rfbA</i>	<i>flhC</i> / <i>stx2a</i> / <i>stx2c</i> / <i>eae</i> / <i>ehxA</i>	4/5	4,64 ± 0,37	6,12 ± 0,99	1,55 ± 0,25	44,50
031103-(3,4)	<i>rfbA</i>	<i>flhC</i> / <i>stx2a</i> / <i>stx2c</i> / <i>eae</i> / <i>ehxA</i>	4/5	3,79 ± 0,58	7,43 ± 0,62	1,35 ± 0,56	49,18
031103-(22,24)	<i>rfbA</i>	<i>flhC</i> / <i>stx2a</i> / <i>stx2c</i> / <i>eae</i> / <i>ehxA</i>	4/5	4,97 ± 0,39	5,99 ± 0,80	0,95 ± 0,34	37,88
031103-(32)	<i>rfbA</i>	<i>flhC</i> / <i>stx2a</i> / <i>stx2c</i> / <i>eae</i> / <i>ehxA</i>	4/5	4,31 ± 0,25	8,92 ± 0,52	1,41 ± 0,55	65,20

En relación al estrés nutricional se observó que la totalidad de las cepas resultaron resistentes. Los valores D variaron desde 29 hs, hasta 66 hs, lo cual muestra la gran diferencia en resistencias que presentan las cepas estudiadas. La media de valores D para las cepas fue de 43 hs, no se observaron diferencias significativas entre los valores D de las cepas pertenecientes al clado 8 y a los clados 4/5, entre aquellas portadoras de los antiterminadores Q 933 y Q 21, entre las cepas provenientes de diferentes orígenes y entre las cepas portadoras de los diferentes factores de virulencia putativos, ni entre las cepas

portadoras de las variantes de las toxinas ( $p > 0.05$ ). El comportamiento de estas cepas fue diferente a lo encontrado por Malone y col. (2007), quienes, al evaluar cepas de STEC con diferentes alelos Q, encontraron que aquellas que presentaban los antiterminadores  $Q_{933}$  mostraban una mayor sensibilidad a los tratamientos de altas presiones osmóticas, calor y radiación uv, comparadas con las que presentaban los antiterminadores  $Q_{21}$ . La cantidad de células dañadas subletalmente varió en función del tiempo de contacto, desde un 5 % hasta un 32%. La totalidad de las cepas permaneció viable durante 30 días en las condiciones especificadas, aunque al día 16 el 100% de las mismas presentaba daño metabólico subletal. Esto muestra que las cepas de *E. coli* O157:H7 presentes en el ambiente exhiben una gran resistencia al estrés nutricional. Esto resulta de gran relevancia ya que en la industria de los alimentos en la cual los agentes patógenos pueden encontrarse en situaciones de gran abundancia de nutrientes como también períodos en los cuales se presenta limitación de los mismos, tales como los intervalos de producción, períodos posteriores a los procedimientos de limpieza y remoción de materia orgánica depositada. Esta capacidad de sobrevivir a inanición celular, asociada con la capacidad de producción de biofilms mejora las condiciones de resistencia microbiana. El comportamiento de las cepas asociadas a este estudio coincide con los encontrados por Elhadidy y Álvarez-Ordóñez (2016).

Un comportamiento similar al encontrado para el estrés nutricional y osmótico se presentó respecto de la resistencia de las cepas a los ciclos de congelación y descongelación. Se observó que las curvas de supervivencia también mostraron una cinética de primer orden con distintos grados de ajuste. Los valores  $R^2$  de cada curva variaron desde 0,86 a 0,99. Los valores D oscilaron entre 0,8 ciclos hasta 1,9 ciclos, siendo la media de 1,3 ciclos. Los % de células injuriadas variaron en función del tiempo de contacto, desde un 45% en los primeros ciclos a un 100% de células injuriadas a partir del cuarto CCD, lo cual muestra que el proceso de congelación y descongelación produce un daño estructural que no permite que las células puedan crecer en condiciones estresantes. No se observó diferencias significativas entre los valores D de las cepas pertenecientes a los clados 8 y 4/5 ( $p > 0,05$ ), así como tampoco de las cepas portadoras de las variantes toxigénicas  $stx_{2c}$  y  $stx_{2a}/stx_{2c}$  ( $p > 0,05$ ). En cuanto a la resistencia de las cepas estudiadas en el almacenamiento congelado durante un año a  $-18^{\circ}\text{C}$ , se evidenció una pérdida de viabilidad de entre 2,2 log y 5 log UFC/ml en el tiempo de estudio.

En relación a la resistencia de las cepas a los diferentes antibióticos ensayados se observó que la totalidad de las mismas se presentan como sensibles.

La alta virulencia de STEC O157 y la prevalencia en Argentina del SUH implica que es de sumo interés evaluar los factores ambientales que influyen en la supervivencia de las cepas. STEC puede encontrarse en nichos ecológicos que presenten diferentes factores estresantes, tanto en el medio ambiente como en las distintas industrias de producción y procesamiento de alimentos. Estas condiciones también se pueden encontrar en el organismo humano, en donde las barreras químicas y la respuesta inmunológica de las personas actúan para proteger al organismo de la infección. Estos factores incluyen fluctuaciones de pH, osmolaridad, temperatura y disponibilidad de oxígeno, entre otros. A su vez, en la industria de los alimentos se utilizan tecnologías de conservación que se basan en aplicar tensiones físicas y químicas con el objetivo de inactivar o limitar el crecimiento de bacterias patógenas (Alvarez-Ordóñez et al., 2015).

Las cepas pertenecientes al clado 8 que mostraron una resistencia significativamente mayor a los ambientes ácidos, han demostrado ser más virulentos y más frecuentemente asociados con la infección humana que las cepas pertenecientes a otros clados (Manning et al., 2008).



## Conclusiones

En base a los resultados obtenidos en el presente estudio podemos concluir que las cepas de STEC O157:H7 de los clados 8 y 4/5 presentes en el ambiente exhiben distintos grados de resistencia a condiciones drásticas ambientales, siendo la totalidad de las mismas resistentes a medios muy ácidos (pH2.5) y sensibles a la presencia de antibióticos. Además, las cepas del clado 8 son significativamente más resistentes al estrés ácido que las del clado 4/5. En las demás condiciones se presentan diferentes comportamientos según cepa y factor, no encontrándose diferencias en el comportamiento de las mismas en función del clado al que pertenecen. El conocimiento sobre la resistencia de este patógeno a los factores de estrés comúnmente encontrados en la industria de los alimentos puede conducir al desarrollo de nuevas estrategias para controlar el riesgo de SUH e implementar métodos de conservación eficaces para la destrucción de este patógeno alimentario. Las diferencias en el comportamiento de las cepas frente a los agentes estresantes, muestra la utilidad de considerar un pool de distintas cepas al realizar ensayos de desafío en matrices alimentarias.

## Bibliografía

- ÁLVAREZ-ORDÓÑEZ, A., Alvseike, O., Omer, M. K., Heir, E., Axelsson, L., Holck, A., y Prieto, M. (2013). Heterogeneity in resistance to food-related stresses and biofilm formation ability among verocytotoxinogenic *Escherichia coli* strains. *International journal of food microbiology*, 161(3), 220-230.
- BOLETÍN INTEGRADO DE VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA DE LA ARGENTINA. Ministerio de Salud. Año 2019. En: <https://www.argentina.gob.ar/salud/epidemiologia/boletinesepidemiologicos>
- BUCHANAN RL, Edelson SG. pH-Dependent stationary-phase acid resistance response of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in the presence of various acidulants. *J Food Prot.* 1999; 62 (3): 211-218
- ELHADIDY, M., y Álvarez-Ordóñez, A. (2016). Diversity of survival patterns among *Escherichia coli* O157:H7 genotypes subjected to food-related stress conditions. *Frontiers in microbiology*, 7, 322.
- GUTH BEC, Prado V, Rivas M. Capítulo 5: Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. En: *Pathogenic Escherichia coli in Latin America*. Torres AGT (eds). Bentam Science Publishers, 2011, p. 65-83.
- GYLES, C. L. (2007). Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: An overview 1. *Journal of animal science*, 85(13\_suppl), E45-E62.
- HENGGE-ARONIS R. The general stress response in *Escherichia coli*. En: *Bact Stress Resp*. Storz y Hengge Editores. Washington: ASM Press, 2000.
- HUDZICKI, J. (2009). Kirby-Bauer disk diffusion susceptibility test protocol. Protocol ASM. <https://www.asmscience.org/content/education/protocol/protocol.3189?crawler=redirect>
- LARGE, T. M., Walk, S. T., & Whittam, T. S. (2005). Variation in acid resistance among Shiga toxin-producing clones of pathogenic *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71(5), 2493-2500.
- LEE, K. I., French, N. P., Jones, G., Hara-Kudo, Y., Iyoda, S., Kobayashi, H., ... & Kumagai, S. (2012). Variation in stress resistance patterns among stx genotypes and genetic lineages of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157. *Applied and environmental microbiology*, 78(9), 3361-3368.
- LIN, J., Smith, M. P., Chapin, K. C., Baik, H. S., Bennett, G. N., & Foster, J. W. (1996). Mechanisms of acid resistance in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62(9), 3094-3100.
- LOEWEN PC, Hu B, Stravinsky J, Sparling R. Regulation in the rpoS regulon of *Escherichia coli* O157:H7. *Can J Microbiol.* 1998; 44: 707-717.
- MALONE, A. S., Yousef, A. E., & LeJeune, J. T. (2007). Association of prophage antiterminator Q alleles and susceptibility to food-processing treatments applied to *Escherichia coli* O157 in laboratory media. *Journal of food protection*, 70(11), 2617-2619.

- MANNING, S. D., Motiwala, A. S., Springman, A. C., Qi, W., Lacher, D. W., Ouellette, L. M., ... & Zhang, W. (2008). Variation in virulence among clades of *Escherichia coli* O157: H7 associated with disease outbreaks. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(12), 4868-4873.
- McCLURE P. Capítulo 10: *Escherichia coli*: virulence, stress response and resistance. En: Understanding pathogen behavior. Virulence, stress response and resistance. 1st edition. Abington, England, CRC Press LLC, 2005.
- FENG P, Lampel KA, Karch H, Whittam TS. Genotypic and phenotypic change in the emergence of *Escherichia coli* O157:H7. *J Infect Dis*. 1998; 177: 1750-1753.
- LARGE TM, Seth TW, Whittam TS. Variation in acid resistance among Shiga toxin-producing clones of pathogenic *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol*. 2005; 71 (5): 2493-2500.
- LIN J, Smith MP, Chapin KC, Baik HS, Bennett GN, Foster JW. Mechanisms of acid resistance in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*. 1996; 62: 3094-3100.
- PIANCIOLA, L., y Rivas, M. (2018). Genotypic Features of Clinical and Bovine *Escherichia coli* O157 Strains Isolated in Countries with Different Associated Disease Incidences. *Microorganisms*, 6(2).
- RICHARD HT, Foster JW. Acid resistance in *Escherichia coli*. *Adv Appl Microbiol*. 2003; 52: 167-186.
- PIAGGIO M.C., Tinaroo J.D., Gasparovic A.M.C., Lound L.H.. Efficacy of sodium hypochlorite to inactivate *Escherichia coli* O157:H7 on contaminated lettuce (*Lactuca sativa*). VTEC2018. 10th International Symposium. Florencia. Italia. 6-9 de mayo de 2018.
- PIAGGIO, M.C., A. M. Gasparovic, F. Procura y J. D. Tanaro. 2012. Eficiencia de una laguna de estabilización en el saneamiento de efluentes de feedlot en Entre Ríos, Argentina. Libro de Trabajos Completos del I Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología Ambiental, y I Congreso Nacional de la Sociedad Argentina de Ciencia y Tecnología Ambiental. Ed. Asociación Argentina para el Progreso de las Ciencias. Pag. 848 -852
- TANARO, J. D., Leotta, G. A., Lound, L. H., Galli, L., Piaggio, M. C., Carbonari, C. C., y Rivas, M. (2010). *Escherichia coli* O157 in bovine feces and surface water streams in a beef cattle farm of Argentina. *Food-borne pathogens and disease*, 7(4), 475-477.
- TANARO, J. D., Pianciola, L. A., D'Astek, B. A., Piaggio, M. C., Mazzeo, M. L., Zolezzi, G., & Rivas, M. (2018). Virulence profile of *Escherichia coli* O157 strains isolated from surface water in cattle breeding areas. *Letters in applied microbiology*, 66(6), 484-490.
- VAN ELSAS, J. D., Semenov, A. V., Costa, R., & Trevors, J. T. (2011). Survival of *Escherichia coli* in the environment: fundamental and public health aspects. *The ISME journal*, 5(2), 173.

## Indicadores de producción

### PUBLICACIONES Con Referato

- Tanaro, J. D., Pianciola, L. A., D'Astek, B. A., Piaggio, M. C., Mazzeo, M. L., Zolezzi, G., & Rivas, M. (2018). Virulence profile of *Escherichia coli* O157 strains isolated from surface water in cattle breeding areas. *Letters in applied microbiology*, 66(6), 484-490. Sin referato

### Premios y distinciones

- Mención Especial para Melisa Busquet por el trabajo: Busquet, M; Cinto, F. y Piaggio, M.C. *Escherichia coli* productor de toxina shiga (STEC) serotipo O157:H7 hipervirulentos: comportamiento frente a diferentes condiciones ambientales y de procesamiento de los alimentos. XXVI Jornadas de Jóvenes Investigadores de la Asociación de Universidades Grupo Montevideo. Mendoza, del 17 al 19 de octubre de 2018.

## PRESENTACIONES A CONGRESOS NACIONALES

Piaggio M.C., Gasparovic A.M., Busquet M.C. (2017). Resistencia a la acidez de cepas de *Escherichia coli* O157:H7 productor de toxina Shiga (STEC) del clado 8. II Congreso de Bromatología y Nutrición -CByN-. Organizado por la Facultad de Bromatología, Gualeguaychú, 1, 2 y 3 de noviembre de 2017. Trabajo elegido para presentación oral.

Gasparovic A.M.C. Piaggio M.C., Lound L.H., Tanaro J.D. (2017). Lavado y desinfección con hipoclorito de sodio de lechuga contaminada con *Escherichia coli* O157:H7. II Congreso de Bromatología y Nutrición -CByN- Organizado por la Facultad de Bromatología, Gualeguaychú, 1, 2 y 3 de noviembre de 2017. Trabajo elegido para presentación oral.

Piaggio M.C. *Biofilms microbianos: Escherichia coli productor de toxina Shiga (STEC) O157:H7 procedente de aguas ambientales y reservorio animal*. III Congreso de Bromatología y Nutrición -CByN- Facultad de Bromatología, UNER. 5 de septiembre del 2019. Trabajo elegido para presentación oral.

## PRESENTACIONES A CONGRESOS INTERNACIONALES

Piaggio M.C.<sup>1</sup>, Tanaro J.D.<sup>1</sup>, Gasparovic A.M.C.<sup>1</sup>, Lound L.H.<sup>1</sup> (2018) Efficacy of sodium hypochlorite to inactivate *Escherichia coli* O157:H7 on contaminated lettuce (*Lactuca sativa*). VTEC2018. 10 th International Symposium. Florencia. Italia. 6-9 de mayo de 2018.

Piaggio M.C; Cinto, F.; Busquet CM. y Gasparovic A.M. (2018). Supervivencia de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga (STEC) O157:H7 provenientes de aguas superficiales en diferentes condiciones ambientales. VI Simposio Latinoamericano de Inocuidad Alimentaria y III Simposio Argentino de Inocuidad Alimentaria, 25- 27 de septiembre de 2018. Pag. 79-80- 1a ed. - Buenos Aires, Libro digital, PDF. ISBN 978-987-46701-1-3

Piaggio M.C; Cinto, F.; Busquet CM., Gasparovic A.M. y Tanaro J.D. 2018. 2018. Capacidad de formación de biofilm de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga (STEC) O157:H7 provenientes de muestras ambientales. VI Simposio Latinoamericano de Inocuidad Alimentaria y III Simposio Argentino de Inocuidad Alimentaria, 25- 27 de septiembre de 2018. Pag 68-69 1a ed. - Buenos Aires. Libro digital, PDF. ISBN 978-987-46701-1-3

Piaggio MC, Gasparovic AM, Correa SA, Busquet CM, Cinto F y Tanaro JD. Supervivencia de *Escherichia coli* O157:H7 productor de toxina Shiga (STEC) hipervirulentos en condiciones de estrés nutricional. Libro de resumen. VII Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CICYTAC 2018). Córdoba, 1-3 de octubre de 2018. Pag. 452-53. 1ra ed. Córdoba: Ministerio de Ciencia y Tecnología de la provincia de Córdoba, 2018. ISBN 978987-45380-9-3.

Busquet, M; Cinto, F. y Piaggio, M.C. *Escherichia coli* productor de toxina shiga (STEC) serotipo O157:H7 hipervirulentos: comportamiento frente a diferentes condiciones ambientales y de procesamiento de los alimentos. XXVI Jornadas de Jóvenes Investigadores de la Asociación de Universidades Grupo Montevideo. Mendoza, del 17 al 19 de octubre de 2018. Pag 553. Trabajo seleccionado primero en orden de mérito. Res CD 147/18.

Gasparovic A M, Correa S A, Busquet C M, Cinto F y Piaggio M C. Daño celular y muerte de *Escherichia coli* O157:H7 productor de toxina Shiga (STEC) hipervirulentos en condiciones de estrés osmótico. VII Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CICYTAC 2018). Córdoba, 1-3 de octubre de 2018. Pag. 450-51. 1ra ed. Córdoba: Ministerio de Ciencia y Tecnología de la provincia de Córdoba, 2018. ISBN 978-987-45380-9-3.

Correa S A, Gasparovic A M, Tanaro J D y Piaggio MC. Tolerancia de Escherichia coli O157:H7 productor de toxina Shiga (STEC) hipervirulentos a ciclos de congelación y descongelación. VII Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CICYTAC 2018). Córdoba, 13 de octubre de 2018. Pag. 448-9. 1ra ed. Córdoba: Ministerio de Ciencia y Tecnología de la provincia de Córdoba, 2018. ISBN 978-987-45380-9-3.

Cinto, F., Busquet, M y Piaggio, M.C. 2019 Capacidad de adhesión y formación de biofilm de Escherichia coli productor de toxina Shiga (STEC) serotipo O157:H7 procedente de aguas medioambientales y reservorios bovinos. XXVII Jornadas de Jóvenes Investigadores de la Asociación de Universidades Grupo Montevideo (AUGM). Universidad Federal de São Carlos (UFSCar), Brasil, el 23, 24 y 25 de octubre de 2019. Trabajo seleccionado primero en orden de mérito. Res. CD 252/19.

### SERVICIOS ESPECIALIZADOS Y ASISTENCIA TÉCNICA A TERCEROS

En el marco de la línea de investigación se realizan servicios a terceros de análisis de STEC O157:H7 en alimentos, tanto a empresas industrializadoras de alimentos como a organismos del estado (municipales o provinciales) cuando ellos lo solicitan, principalmente en casos de sospecha de alimentos implicados en casos de SUH.

También se colaboró con ONG vinculadas a la protección del medio ambiente, como la Asamblea ambiental de Gualaguaychú. La colaboración radicó en: estudios ambientales (frecuencia anual) y capacitaciones en lo relacionado a la prevención de la contaminación del agua procedente de la producción y el manejo de desechos humanos y de efluentes derivados de la producción primaria de animales. De estas actividades no hay constancia (certificados), ya que forman parte de las acciones relacionadas con la comunidad que no se enmarcan bajo un convenio formal.

### CURSOS DICTADOS COMO CONSECUENCIA DE LA INVESTIGACIÓN REALIZADA

Título	Lugar	Año
Curso teórico práctico con evaluación. Aprobado por Res. CD N° 275/18. Dependencia organizadora: Proyecto PID 9088 Cátedras de Microbiología General y Microbiología de Alimentos, Cátedra de Microbiología y Parasitología, Facultad de Bromatología, UNER Carga horaria total: 30 h	Facultad de Bromatología	Inicio: 1/11/18 Finalización 10/12/18
Curso teórico práctico con evaluación. Aprobado por Res. CD 252/19 Dependencia organizadora: Proyecto PID 9088	Facultad de Bromatología	Inicio 22/08/2019
Cátedras de Microbiología General y Microbiología de Alimentos, Cátedra de Microbiología y Parasitología, Facultad de Bromatología, UNER Carga horaria total: 40 h. Constancia Pag:		Finalización: 10/10/2019

### TÍTULO DE POSGRADO OBTENIDO

Título de Posgrado	Fecha de Obtención	Fs.
Mercedes C. Piaggio título obtenido: “Especialista Docente en Neurociencia Cognitiva Aplicada a la Educación”. Universidad de Concepción del Uruguay (UCU) e Instituto de neurociencias aplicadas del Río Uruguay (INARU). Año 2018. Promedio 8,73/10.	28/11/18	
Alejandra M. C. Gasparovic- Título obtenido: Magister en Microbiología Molecular. UNSAM-ANLIS “Instituto Carlos G. Malbrán”.	07/04/2017	
José Daniel Tanaro. Culminando el doctorado la UBA. Actualmente, haciendo las correcciones indicadas por los evaluadores de su trabajo de Tesis.	-	

### ACTIVIDADES DE EXTENSIÓN REALIZADAS

Descripción
<ul style="list-style-type: none"> <li>Disertación en la “Semana de la Enseñanza Agropecuaria”, Inst. Agrotécnico Gualaguaychú D-71. Tema: “Estrategias de prevención de la contaminación de aguas superficiales con STEC en áreas de engorde feedlot”. 8 de agosto de 2018. Constancia Fs.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>Capacitación al sector gastronómico de la Ciudad de Federación, Entre Ríos. Temario: Higiene y Manipulación de Alimentos, con énfasis en la prevención del SUH. Actividad organizada en el marco de los proyectos PID 9088 y del Proyecto de integración de las funciones universitarias “Prácticas Integrales y Territorio 2016”: “Gastronomía y Corredores Turísticos. Una apuesta por la Inocuidad Alimentaria y la Alimentación Saludable”. Federación, 24 de octubre de 2018.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>Disertación y actividad práctica demostrativa de los integrantes y la becaria del proyecto en “Acércate a la Ciencia”, XV edición de la Semana Nacional de la Ciencia y la Tecnología propuesta por el Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva de la Nación. Fac. de Bromatología. 25 y 26 de septiembre de 2017. Presentación realizada en el marco de las actividades del proyecto PID 9088. Constancia Fs.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>Capacitación al sector gastronómico de la ciudad de Colón, Entre Ríos, en Higiene y Manipulación de Alimentos, con énfasis en la prevención del SUH, en el marco de los proyectos PID 9088 y del Proyecto de integración de las funciones universitarias “Prácticas Integrales y Territorio 2016”: “Gastronomía y Corredores Turísticos. Una apuesta por la Inocuidad Alimentaria y la Alimentación Saludable”. Ciudad de Colón, viernes 18 de agosto de 2017</li> </ul>

## OTRAS ACTIVIDADES QUE CREA IMPORTANTE CONSIGNAR

Descripción	
<ul style="list-style-type: none"><li>• Disertación en el Ciclo de seminarios oficiales de la Facultad de Bromatología. Tema presentado: "Capacidad de formación de Biofilms de STEC O157:H7. Importancia en la industria de los alimentos. Facultad de Bromatología. 23 de agosto de 2018. Constancia Fs..</li></ul>	
<ul style="list-style-type: none"><li>• Disertación en el Ciclo de seminarios oficiales de la Facultad de Bromatología. Tema presentado: "Resistencia a Antibióticos, a la Acidez y al Efecto del Hipoclorito de Sodio en Cepas de Escherichia coli O157:H7 Productor de Toxina Shiga (STEC)". Facultad de Bromatología. 14 de diciembre de 2017. Constancia Fs</li></ul>	

**PID 9088**

**Denominación del Proyecto**

Escherichia coli productor de toxina Shiga (STEC): producción de biofilm y comportamiento frente a diferentes condiciones ambientales y de procesamiento en alimentos

**Director**

PIAGGIO, Mercedes Carolina

**Codirector**

TANARO, José Daniel

**Unidad de Ejecución**

Facultad de Bromatología (UNER)

**Dependencia**

Facultad de Ciencias de la Educación

**Contacto**

[mercedespiaggio@gmail.com](mailto:mercedespiaggio@gmail.com) y/o [jdtanaro@yahoo.com.ar](mailto:jdtanaro@yahoo.com.ar) y/o [mercedes.piaggio@uner.edu.ar](mailto:mercedes.piaggio@uner.edu.ar)

**Integrantes del proyecto**

Gasparovic, Alejandra María; Correa, Silvina Analía, Almeida, María Laura; Chichizola, María Griselda

**Fechas de iniciación y de finalización efectivas**

01/02/2017 y 31/01/2019

Aprobación del Informe Final por Resolución CS N°499/20 (17/12/2020)