

27. Agroalimentos

***Escherichia coli* productor de toxina shiga (STEC) serotipo O157:H7 hipervirulentos: comportamiento frente a diferentes condiciones ambientales y de procesamiento de los alimentos**

Busquet, Melisa; Cinto, Florencia y Piaggio, Mercedes C.

melisa.busquet@hotmail.com; florencia.cinto@hotmail.com; mpiaggio@fb.uner.edu.ar

Facultad de Bromatología

Universidad Nacional de Entre Ríos

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, 2018). 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 toxinas Stx, 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),

asociándose 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 son 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 (son hipervirulentos) en comparación con el resto de los clados. 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 estrés ambiental, es decir a medios nutricionales mínimos, a condiciones químicamente tóxicas o a condiciones físicas subóptimas pueden provocar un daño celular subletal (injuria) o la muerte de las bacterias (Van Elsas, 2011). Estas condiciones se dan, en ocasiones, en la industria de los alimentos, sobre todo, cuando los métodos de conservación utilizados resultan ineficaces, o cuando existen fallas en la aplicación de las tecnologías. 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 Etas. Las bacterias presentes en los alimentos pueden presentar una tolerancia natural a ciertos factores de estrés y sobrevivir

debido a su constitución genética. Además, los factores de estrés pueden inducir una respuesta adaptativa, es decir, cambios fisiológicos y cambios estructurales que ayudan a las bacterias a adaptarse al nuevo ambiente. Además, el estrés inducido por factores fisicoquímicos puede incrementar la virulencia en las células adaptadas (McClure, 2005) y puede inducir 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).

Objetivos

Los objetivos del presente estudio fueron evaluar la resistencia de 22 cepas de STEC O157:H7 del clado 8 obtenidas de muestras ambientales, frente a pH ácidos (RA), presión osmótica alta (RO), efecto de la congelación (RC), ciclos de congelación y descongelación (CCD), inanición celular (IC) y presencia de antibióticos (RPA) y compararlas frente a aquellas pertenecientes a los clados 4/5. También se tuvo como finalidad evaluar 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 en un proyecto anterior (PID N° 9058) y caracterizadas fenotípicamente en nuestra facultad.

También fueron caracterizadas genotípicamente y subtipificadas por nuestro grupo de investigación en el *INEI-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán*.

Los criterios de inclusión de las cepas fueron: provenientes de muestras ambientales (agua ambiental); productoras de toxina Shiga (STEC); pertenecientes a los clado 8 y clado 4/5; y de genotipo *rfb*_{O157}; *fliC*_{H7}; *stx*; *eae*; *ehxA*.

Estos criterios se seleccionaron debido a que no hay información respecto del comportamiento de las cepas obtenidas de reservorios ambientales frente a las condiciones de procesamiento de los alimentos y a que los genotipos seleccionados se asocian a casos de enfermedad transmitida por alimentos como colitis hemorrágica y SUH (Tanaro y col. 2018) y, algunos de ellos (los del clado 8) son caracterizados como gérmenes hipervirulentos (Manning y col., 2008). Las cepas estudiadas presentaron las características genotípicas que se resumen en la **Tabla N° 1**.

Recuperación de las cepas crioconservadas

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 10⁹ UFC/ml de medio líquido (Álvarez-Ordóñez y col., 2013).

Cuantificación de los inóculos iniciales

Se determinó el número inicial de células microbianas 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). Este inóculo valorado se utilizó en los ensayos de desafío frente a las condiciones estresantes, a saber: exposición a TSB a pH 2,5 (ajustado con ácido clorhídrico) (estrés ácido) hasta 24h; ciclos de congelación y descongelación y persistencia en ambiente congelado (temperatura de -18°C) de 1 hasta 12 meses, TSB con 20% de NaCl (estrés por presión osmótica alta (RO); solución fisiológica (NaCl 0,85%) (inactivación celular (RIC)), y presencia de antibióticos (RPA).

Tabla Nº 1. Subtipo y genotipo de las cepas estudiadas

ID N°	<i>stx</i> _{1a}	<i>stx</i> _{2a}	<i>stx</i> _{2c}	Clado	SG	<i>q</i> ₉₃₃	<i>q</i> ₂₁	LSPA-6	ECSP	ECSP	ECSP	ECSP	ECSP	ECSP	eae	Hly	H7
		_0242	_1773						_2687	_2870/2872	_3286	_3620					
A3-10-7	-	-	+	4/5	20/23	-	+	201111	+	-	+	-	-	+	+	+	+
A3-13-2	-	-	+	4/5	20/23	-	+	211111	+	-	+	-	-	+	+	+	+
A3-14-9	-	-	+	4/5	20/23	-	+	211111	+	-	+	-	-	+	+	+	+
A3-16-1	-	-	+	4/5	20/23	-	+	201111	+	-	+	-	-	+	+	+	+
A3-7-3	-	-	+	4/5	20/23	-	+	201111	+	-	+	-	-	+	+	+	+
A3-8-27	-	-	+	4/5	20/23	-	+	211111	+	-	+	-	-	+	+	+	+
A3-9-12	-	-	+	4/5	20/23	-	+	201111	+	-	+	-	-	+	+	+	+
P3-3-1	-	-	+	4/5	20/23	-	+	211111	+	-	+	-	-	+	+	+	+
E2-9-4	-	+	+	8	31	+	+	211111	+	-	+	+	+	+	+	+	+
AO1-1-1	-	+	+	8	31	+	+	211111	+	-	+	+	+	+	+	+	+
AO1-3-3	-	+	+	8	31	+	+	211111	+	-	+	+	+	+	+	+	+
P3-2-2	-	+	+	8	31	-	+	211111	+	+	+	+	+	+	+	+	+
V1-1-4	-	+	+	8	31	+	+	211111	+	+	+	+	+	+	+	+	+
V1-4-1	-	+	+	8	31	+	+	211111	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A3-6-6	-	+	+	8	31	+	+	211111	+	-	+	+	+	+	+	+	+
A8-10-6	-	+	+	8	31	+	+	211111	+	-	+	+	+	+	+	+	+
A8-7-1	-	+	+	8	31	+	+	211111	+	-	+	+	+	+	+	+	+
P3-5-1	-	+	+	8	31	+	+	211111	+	-	+	+	+	+	+	+	+
A7-10-1	-	+	+	8	31	+	+	211111	+	-	+	+	+	+	+	+	+
A7-13-9	-	+	+	8	31	+	+	211111	+	-	+	+	+	+	+	+	+
A7-17-14	-	+	+	8	31	+	+	211111	+	-	+	+	+	+	+	+	+
A7-18-1	-	+	+	8	31	+	+	211111	+	-	+	+	+	+	+	+	+

Estrés ácido: se realizaron dos ensayos diferentes para determinar la acción de un ambiente ácido. El primero consistió en una modificación del ensayo propuesto por Berry y Cutter (2000) para determinar la adaptación y resistencia a la acidez de las cepas a diferentes pH. En el segundo ensayo se determinó la resistencia a la acidez de las cepas a pH 2,5, según la metodología propuesta por Elhadidy y Álvarez-Ordóñez (2016).

Ensayo de adaptación y resistencia a la acidez (modificado de Berry y Cutter, 2000):

Para disponer de bacterias ácido-adaptadas (A) y no-adaptadas (NA), las cepas se inocularon en caldo soja tripticasa (TSB) con 1% de glucosa (como único sustrato de fermentación) y sin glucosa respectivamente, y se incubaron por 18h a 37°C. Posteriormente estos cultivos se sembraron en dos series de tubos conteniendo TSB acidificados con HCl y ácido acético a pH 2,5; 3,5; 4,0 y 4,5. Los tiempos de exposición de las cepas a cada pH fueron de 4 hs. Al finalizar dicha incubación, los cultivos se repicaron en placas del medio no selectivo agar tripticasa soja (TSA) y del medio selectivo eosina azul de metileno (EMB, Biokar diagnosis). Se consideró “cepa resistente a ácido” (R) a las que desarrollaron en TSA y en agar EMB, a partir de los cultivos con 1% de glucosa

(cepas A) y sin glucosa (cepas NA). Aquellas que desarrollaron solo en medio no selectivo se consideraron “medianamente sensibles” (MS) y las que no desarrollaron se consideraron “sensibles” (S). El esquema de trabajo se muestra en la Figura N° 1.

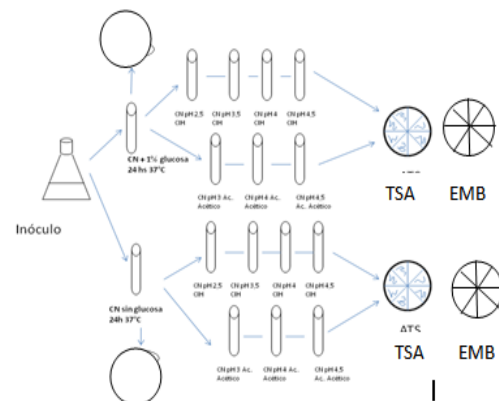


Figura N°1. Esquema de trabajo del ensayo de adaptación y resistencia a la acidez (modificado de Berry y Cutter, 2000)

Ensayo de resistencia a la acidez según la metodología propuesta por Elhadidy y Álvarez-Ordóñez (2016):

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 algunos casos (indicados en los resultados), no se alcanzaron hacer ambos ensayos, por lo que queda para completar en la próxima etapa. 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). El esquema de trabajo se muestra en la Figura N° 2.

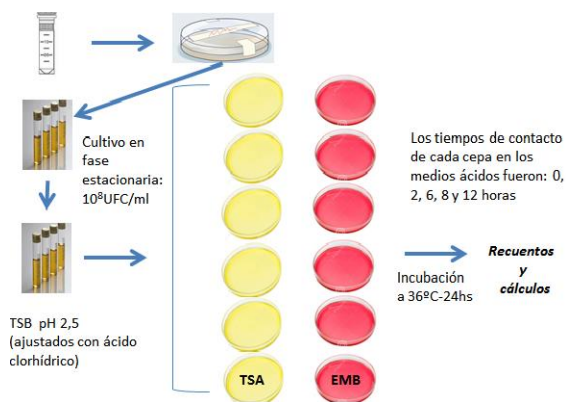


Figura N°2. Esquema de trabajo del ensayo de resistencia a la acidez según Elhadidy y Álvarez-Ordóñez (2016)

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°C durante 22,5 h, seguido de descongelación a 37°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. 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). La experiencia completa consistió en someter las bacterias a 5 ciclos de congelación-descongelación. Cada ensayo fue replicado tres veces y se calculó la media del número de viables y la desviación estándar en cada experimento. Los datos se analizaron por regresión lineal y el valor de la pendiente fue tomado como la cantidad de viables que sobreviven por ciclo de congelación-descongelación.

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. Los datos se analizaron por regresión lineal y el valor de la pendiente fue tomado como la cantidad de viables que sobreviven por ciclo de congelación-descongelación.

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°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 y se calculó la media del número de viables y la desviación estándar en cada experimento. Los datos se analizaron por regresión lineal y el valor de la pendiente fue tomado como la cantidad de viables que sobreviven por ciclo de congelación-descongelación.

Supervivencia de las cepas en medio sin nutrientes: Las cepas estudiadas fueron inoculadas en tubos conteniendo solución fisiológica (NaCl al 0,85%) y se incubaron a 37°C durante todo el ensayo. Cada día se tomó una ansada del cultivo y se sembró en el medio no selectivo TSA y en el medio selectivo-diferencial EMB, para determinar su viabilidad (cepa viable/noviable). El ensayo duró hasta que cada cepa perdió su capacidad de crecer en los medios mencionados.

Determinación de los parámetros de resistencia a las condiciones de estrés

Con los resultados obtenidos se graficaron las curvas de supervivencia y se estudió la cinética de inactivación, y el daño metabólico subletal producto del estrés sufrido por las células.

Se calculó el tiempo de reducción decimal (valor D) a partir de los gráficos de supervivencia, representando $\log(N/N_0)$ frente al tiempo. Se calculó el valor r^2 . Para cada factor estresante se obtuvo una recta de pendiente negativa. La pendiente de dicha recta se utilizó para el cálculo de los valores D. Los valores D se calcularon en: horas para estrés ácido y oxidativo y en días para estrés por congelación-descongelación.

En la **Tabla N°2** y en la **Figura N°3** (Resultados) se muestran los valores de los recuentos obtenidos para una de las cepas estudiadas (cepa A3-10-7) y el gráfico de supervivencia 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 ($D = -1/\text{pendiente}$).

Cálculo de células dañadas por condiciones medio ambientales

La diferencia en los recuentos obtenidos en la siembra en medios generales, respecto de los medios selectivos y diferenciales, se utilizó para determinar el porcentaje de células dañadas subletalmente o injuriadas.

Determinación de resistencia a antibióticos

Para la evaluación de la resistencia de las cepas de STEC frente a antibióticos, se utilizó el método de difusión en agar (método de Kirby-Bauer) (Hudzicki, 2009). Los antibióticos evaluados fueron: ampicilina (AMP), amoxicilina clavulánico (AMC), cefalotina (KF), ácido nalidíxico (NA), ciprofloxacina (CIP), amicacina (AK), gentamicina (CN), estreptomina (S), tetraciclinas (TE), trimetoprima-sulfametoxazol (TMS), nitrofurantoína (F), fosfomicina (FOS). Los resultados se expresaron como: sensible (S), intermedio (I) y resistente (R).

Resultados y Discusión

Adaptación y resistencia a la acidez de cepas de *E. coli* O157

Se realizó un ensayo preliminar con el fin de conocer el grado de sensibilidad de las cepas a los diferentes pHs. De las 4 cepas estudiadas el 100% de las cepas adaptadas (A) y no adaptadas (NA) resultaron resistentes a los medios acidificados con ácido clorhídrico hasta valores de pH de 2,5; 3,5; 4,0 y 4,5. Sin embargo, las cepas mostraron diferencias en su capacidad de resistir y crecer en los medios TSA y EMB cuando el caldo se acidificó con un ácido orgánico (ácido acético). En este caso se pudo observar que las cuatro cepas tanto en condiciones de (A) y (NA) resultaron sensibles a pH 3,5; dos de las cepas adaptadas

resultaron sensibles a pH 4,0, una resultó injuriada y una se mostró resistente. De las cepas no adaptadas todas resultaron sensibles a dicho pH (pH 4). En cuanto a la resistencia al medio acidificado a pH 4,5, tres de las cepas (A) resultaron injuriadas y una se mostró resistente. En relación a las no adaptadas, dos cepas resultaron injuriadas y una evidenció resistencia. Debido a que en este ensayo preliminar las cuatro cepas resultaron ser resistentes al medio acidificado con ácido clorhídrico a pH 2,5, sin haberse podido distinguir entre cepas adaptadas previamente a condiciones de acidez, los estudios posteriores se realizaron mediante la metodología propuesta por Elhadidy y Álvarez-Ordóñez (2016).

Resistencia a la acidez (según la metodología propuesta por Elhadidy y Álvarez-Ordóñez, 2016)

En la Tabla N°2 y **Figura N° 3** 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. Para las cepas restantes estudiadas solo se presentan los valores D calculados.

Tabla N°2. Experiencias de resistencia a la acidez de la cepa A3-10-7

tiempo (hs)	Experiencia 1		Experiencia 2	
	Promedio Recuento	log 10	Promedio Recuento	log 10
0	18000000	7,3	8000000	6,9
2	8800000	6,9	2050000	6,3
6	505000	5,7	605000	5,8
8	475000	5,7	175000	5,2
12	29500	4,5	51500	4,7

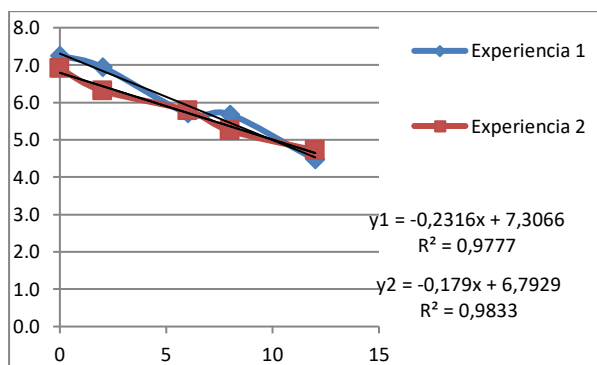


Figura N°3.: Gráfico de las curvas de supervivencia de resistencia a la acidez de la cepa A3-10-7

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°3 se presentan los valores D de la totalidad de las cepas estudiadas.

Tabla N°3. Media y desviación estándar de los Tiempos de reducción decimal (valor D) para pH 2.5 (estrés ácido)

Cepas	Clade	Valor D pH2,5 (horas)
A3-10-7	4/5	4,95 ± 0,89
A3-13-2	4/5	4,37 ± 1,65
A3-14-9	4/5	3,44 ± 0,36
A3-16-1	4/5	2,71 ± 0,38
A3-7-3	4/5	5,21 ± 0,26
A3-8-27	4/5	4,37 ± 0,37
A3-9-12	4/5	5,02 ± 0,34
P3-3-1	4/5	5,88 ± 0,97
E2-9-4	8	5,01
AO1-1-1	8	12,53
AO1-3-3	8	8,72
P3-2-2	8	17,67
V1-1-4	8	4,82
V1-4-1	8	3,98
A3-6-6	8	5,8
A8-10-6	8	8,84
A8-7-1	8	10,61
P3-5-1	8	5,55
A7-10-1	8	4,37
A7-13-9	8	7,94
A7-17-14	8	9,01
A7-18-1	8	9,06

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. Los valores D variaron desde 4,8hs, hasta 17hs, lo cual muestra la gran diferencia en resistencias que presentan las cepas estudiadas. La media de valores D para

las cepas fue de 9,3hs. No se observó diferencias significativas entre los valores D calculados a pH 2,5 y 3,5 ($P > 0.05$). Los % de células injuriadas variaron en función del tiempo de contacto, desde un 20% 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 (σ_{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 factor sigma 38 (σ^{38}) o factor sigma S (σ_S) que conduce la expresión de un regulón especialmente involucrado en los cambios fisiológico 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. 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 solo 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 una 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 α -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 (Peng y col., 2011).

Resistencia a Ciclos de Congelación y Descongelación

La **Tabla N°4** presenta los Valores D promedios y las desviaciones estándares correspondientes a condiciones de estrés por congelaciones y descongelaciones sucesivas.

Tabla N°3. Media y desviación estándar de los Tiempos de reducción decimal (valor D) para estrés por congelación y descongelación

Cepas	Clado	Valor D Estrés congelación y descongelación (ciclos)
A3-10-7	4/5	1,53 ± 0,02
A3-13-2	4/5	0,94 ± 0,17
A3-14-9	4/5	1,04 ± 0,05
A3-16-1	4/5	0,98 ± 0,05
A3-7-3	4/5	1,25 ± 0,46
A3-8-27	4/5	0,89 ± 0,03
A3-9-12	4/5	0,99 ± 0,05
P3-3-1	4/5	1,2 ± 0,22
E2-9-4	8	1,07 ± 0,01
AO1-1-1	8	0,81 ± 0,17
AO1-3-3	8	1,04 ± 0,03
P3-2-2	8	1,41 ± 0,25
V1-1-4	8	1,08 ± 0,34
V1-4-1	8	1,45 ± 0,18
A3-6-6	8	1,15 ± 0,17
A8-10-6	8	0,98 ± 0,10
A8-7-1	8	1,04 ± 0,29
P3-5-1	8	1,24 ± 0,28
A7-10-1	8	1,47 ± 0,20
A7-13-9	8	1,19 ± 0,25
A7-17-14	8	1,27 ± 0,07
A7-18-1	8	N

Las curvas de supervivencia a partir de las cuales se calcularon los valores D mostraron una cinética de primer orden. Los valores D variaron desde 0,81ciclos,

hasta 1,5 ciclos. La media de valores D para las cepas fue de 1.14 ciclos. No se observó diferencias significativas entre los valores D de las cepas pertenecientes al clado 8 y a los clados 4/5 ($P > 0.05$). Los % de células injuriadas variaron en función del tiempo de contacto, desde un 20% en los primeros ciclos a un 100% de células injuriadas a partir del cuarto CCD.

Resistencia presión osmótica alta y a estrés por inanición

La **Tabla N°4** presenta los Valores D promedios y las desviaciones estándares correspondientes a condiciones de estrés por presión osmótica elevada y estrés por inanición. En relación al estrés nutricional se observa que la totalidad de las cepas resultaron resistentes. Los valores D variaron desde 1.2 días, hasta 2.1 días. La media de valores D para las cepas fue de 1.64 días. No se observó diferencias significativas entre los valores D de las cepas pertenecientes al clado 8 a los clados 4/5 ($P > 0.05$).

Tabla N°4. Media y desviación estándar de los Tiempos de reducción decimal (valor D) para estrés presión osmótica elevada y estrés por inanición

Cepas	Clade	Valor D Estrés osmótico (horas)	Valor D Estrés por inanición (días)
A3-10-7	4/5	11,5 ± 0,06	1,61± 0,11
A3-13-2	4/5	6,29 ± 0,61	1,50± 0,20
A3-14-9	4/5	6,11 ± 0,19	1,41± 0,01
A3-16-1	4/5	6,22 ± 0,01	2,10 ± 0,06
A3-7-3	4/5	10,91± 0,02	1,58 ± 0,05
A3-8-27	4/5	5,9 ± 0,07	1,32 ± 0,33
A3-9-12	4/5	7,44 ± 0,08	2,10 ± 0,45
P3-3-1	4/5	12,8 ± 1,80	1,50 ± 0,07
E2-9-4	8	10,41± 1,67	1,93 ± 0,55
AO1-1-1	8	10,00 ± 0,17	1,70 ± 0,32
AO1-3-3	8	8,58 ± 0,43	1,91 ± 0,18
P3-2-2	8	9,58± 0,29	1,22 ± 0,06
V1-1-4	8	10,1± 0,11	1,40 ± 0,16

En cuanto al estrés por ambiente con alta presión osmótica la totalidad de las cepas resultaron presentar una mayor sensibilidad, no pudiendo recuperar las cepas luego del segundo día de exposición. Los valores D variaron desde 5.9hs, hasta 12.8hs. La media de valores D para las cepas fue de 8.9hs. No se observó diferencias significativas entre los valores D de las cepas pertenecientes al clado 8 a los clados 4/5 ($P > 0.05$).

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.

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 verocytotoxigenic *Escherichia coli* strains. *International journal of food microbiology*, 161(3), 220-230.

Berry, E.D., y Cutter, C.N. (2000). Effects of acid adaptation of *Escherichia coli* O157: H7 on efficacy of acetic acid spray washes to decontaminate beef carcass tissue. *Applied and environmental microbiology*, 66(4), 1493-1498.

Boletín integrado de vigilancia epidemiológica de la Argentina. Ministerio de Salud. Año 2018. En: https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/biv_411_se23.pdf

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.
- 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.
- Loewen PC, Hu B, Strutinsky 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., Tanaro 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.

fundamental and public health aspects. *The ISME journal*, 5(2), 173.

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. *Argentina y Ambiente 2012: 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. E-Book. ISBN 978-987-28123-2-4. 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. Foodborne 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: