

ARTÍCULO ORIGINAL

Supervivencia de VTEC O157 y no-O157 en agua de bebederos y materia fecal de bovinos

Rosana Polifroni*, Analía I. Etcheverría*,*, Guillermo H. Arroyo y Nora L. Padola

CIVETAN - CONICET - CICPA - FCV - UNICEN, Tandil, Buenos Aires, Argentina

Recibido el 2 de mayo de 2013; aceptado el 13 de marzo de 2014

PALABRAS CLAVE

VTEC;
Medio ambiente;
Tambo;
Agua;
Supervivencia

Resumen

Escherichia coli productor de verotoxina [*verotoxin-producing E. coli* (VTEC)] es el agente causal del síndrome urémico hemolítico (SUH), enfermedad que afecta principalmente a niños de edades comprendidas entre 6 meses y 5 años. La transmisión se produce por el consumo de alimentos contaminados, por el contacto directo con animales o con el medio ambiente y de persona a persona. En trabajos anteriores hemos determinado que el medio ambiente del tambo es un reservorio no animal de VTEC, por lo cual nos propusimos estudiar la supervivencia de 4 aislamientos VTEC (O20:H19; O91:H21; O157:H7 y O178:H19) en agua estéril de bebederos y en materia fecal de bovinos mediante el recuento de bacterias viables y la detección de genes de virulencia por PCR. Se demostró que la supervivencia de los distintos aislamientos VTEC (O157 y no-O157) varía en función de sus características intrínsecas y de las condiciones del medio ambiente en el que se encuentran. Las principales diferencias entre los aislamientos fueron el tiempo de supervivencia en los microcosmos y los recuentos máximos alcanzados. La capacidad para adaptarse y sobrevivir de estos microorganismos aumenta el riesgo de transmisión a las personas que trabajan en los establecimientos ganaderos o que se encuentran de visita en ellos, así como el riesgo de reinfección de los animales y de contaminación de los alimentos.

© 2013 Asociación Argentina de Microbiología. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

* El primer lugar de los autores es compartido entre la Dra. Rosana Polifroni y la Dra. Analía I. Etcheverría.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: analiain@vet.unicen.edu.ar (A.I. Etcheverría).

KEYWORDS

VTEC;
Environment;
Dairy farm;
Water;
Survival

Survival of VTEC O157 and non-O157 in water troughs and bovine feces**Abstract**

Verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) is the etiologic agent of hemolytic-uremic syndrome (HUS), which typically affects children ranging in age from six months to five years old. Transmission is produced by consumption of contaminated food, by direct contact with animals or the environment and from person to person. In previous studies we determined that the environment of a dairy farm is a non-animal reservoir; thus, we proposed to study the survival of 4 VTEC isolates (O20:H19; O91:H21; O157:H7 and O178:H19) in sterile water troughs and bovine feces by viable bacteria count and detection of virulence genes by PCR. It was demonstrated that the survival of different VTEC isolates (O157 and non-O157) varied in terms of their own characteristics as well as of the environmental conditions where they were found. The main differences between isolates were their survival time and the maximal counts reached. The competitive and adaptive characteristics of some isolates increase the infection risk for people that are visiting or working on a farm, as well as the risk for reinfection of the animals and food contamination.

© 2013 Asociación Argentina de Microbiología. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

Argentina es el país con mayor incidencia de síndrome urémico hemolítico (SUH) a nivel mundial (17/100 000 niños menores de 5 años)³⁷. El principal agente causal de esta afección es *Escherichia coli* productor de verotoxina VT1 y VT2 (VTEC)^{5,22}. Estas toxinas producen muerte celular en los tejidos de los órganos afectados: riñón, intestino, hígado, páncreas y sistema nervioso central¹. Los genes *vt₁* y *vt₂* se encuentran codificados en fagos que se insertan en el cromosoma bacteriano, lo cual facilita la transmisión horizontal de la información a otras bacterias^{5,20}. Otros factores de virulencia importantes de VTEC son la intimina, codificada por el gen *eae* y necesaria para producir la lesión de adherencia y borrado del enterocito (lesión A/E), y una hemolisina enterohemorrágica (EhxA) codificada en un plásmido^{32,44}. En cepas *eae* negativas se ha identificado una proteína autoaglutinante de membrana externa (Saa) que le permitiría la adherencia al tejido del intestino. Este hallazgo sugiere que el gen *eae* no sería esencial para la virulencia de VTEC³². La emergencia de la cepa O104:H4, con características enteroagregativas y enterohemorrágicas y causante de dos brotes de SUH y colitis hemorrágica (CH) en Alemania y Francia (859 casos de SUH y 50 muertos entre mayo y julio de 2011), refuerza la importancia de la transferencia horizontal de los factores de virulencia que están codificados en elementos genéticos móviles de *E. coli*, como plásmidos, fagos, transposones e islas de patogenicidad^{9,19,26}.

En Argentina, la mayoría de los casos de CH y SUH son producidos por el serotipo O157:H7, aunque serotipos no-O157 son responsables del 40 % de ellos³⁶. La transmisión se produce debido al consumo de alimentos contaminados, como carne mal cocida, vegetales de hoja, leche no pasteurizada, frutas, salames, mayonesas, yogures y aguas contaminadas⁴⁰. En los últimos 20 años se ha observado un incremento en el número de casos de enfermedad relacionados con el medio ambiente, a través del contacto con agua su-

perficial o subterránea y el contacto con el suelo en áreas de cría intensiva de ganado^{7,17,29,38}. Otros casos de infecciones con VTEC en humanos han ocurrido por el consumo de frutas y vegetales cultivados en suelos abonados con efluentes de granjas^{8,23,34}.

Se ha comprobado que la población rural expuesta al contacto directo con materia fecal de bovinos posee una incidencia mayor de casos de SUH (12,7 casos cada 100 000 habitantes) en comparación con la población urbana de la misma zona (7,1 casos cada 100 000 habitantes)³⁹. Estos antecedentes destacan la amenaza que representa para la salud pública la contaminación ambiental con este patógeno³⁵.

La supervivencia de *E. coli* O157:H7 en suelo, agua y heces de animales frente a condiciones estresantes del medio ambiente ha sido estudiada por muchos investigadores^{6,18,21,25,43}, aunque poco se conoce sobre el efecto del estrés en otros serotipos VTEC²⁸.

Recientemente nuestro grupo de investigación ha informado que en el medio ambiente de un tambo la prevalencia de VTEC fue menor que la observada en los animales del mismo establecimiento (23 % y 27 %, respectivamente)^{15,35}. Esto podría deberse a las condiciones estresantes del medio ambiente que desencadenarían diferentes respuestas al estrés, lo que permitiría la adaptación y supervivencia de diversas bacterias mediante la adopción de un metabolismo basal durante varias semanas^{30,39}. Las bacterias en estado de metabolismo basal reciben el nombre de bacterias viables pero no cultivables (VNC), pues son capaces de recuperar su culturabilidad bajo condiciones diferentes a las empleadas rutinariamente en los laboratorios²⁴, sin embargo, poco se conoce sobre su capacidad de supervivencia en distintos ambientes²⁷. Por tal motivo, nos propusimos estudiar el crecimiento y la supervivencia de 4 aislamientos VTEC (O20:H19; O91:H21; O157:H7 y O178:H19) en agua estéril de bebederos y en materia fecal de bovinos.

Materiales y métodos

Cepas utilizadas

Las cepas utilizadas en este estudio fueron O20:H19 (*ehxA*, *vt₁*, *vt₂*, *saa*, *sab*) y O157:H7 (*ehxA*, *eae*, *vt₂*), aisladas de bovinos de *feedlot*³¹; y O91:H21 (*ehxA*, *vt₂*, *saa*) y O178:H19 (*ehxA*, *eae*, *vt₂*, *saa*, *sab*), aisladas de bovinos de tambo^{14,31}. Estas pertenecen al cepario del Laboratorio de Inmunología y Biotecnología CIVETAN - CONICET - CICIPBA - FCV - UNICEN. La selección de los serotipos se realizó considerando los datos epidemiológicos de los casos de enfermedad en humanos, la prevalencia en el ganado, la presencia de genes codificantes de factores de virulencia y los antecedentes de resistencia al estrés ácido^{14,28,31}. Para facilitar la recuperación posterior en medios de cultivo, se generaron cepas resistentes a ácido nalidíxico por medio de exposiciones graduales a concentraciones crecientes del antibiótico (0,1; 0,2; 0,4; 0,8; 1,6; 3,2; 6,4; 12,8; 25 y 50 µg/ml).

Preparación e inoculación de las muestras de agua

Se recolectaron 15 l de agua de bebederos de un tambo, que se fraccionaron en Erlenmeyers (1 l en cada uno) y se autoclavarón³. Se corroboró la ausencia de bacterias portadoras de *vt₁*, *vt₂* mediante PCR¹³ y de bacterias resistentes a ácido nalidíxico mediante siembra en placas de agar MacConkey sorbitol con el agregado de ácido nalidíxico (50 µg/ml) (SMAC-NAL).

Las cepas se cultivaron en un caldo nutritivo Luria-Bertani (LB) a 37 °C durante 18 h y se estimó la concentración bacteriana mediante la determinación de la DO_{600} , para poder inocular el agua de bebederos a razón de $10^{6,007}$ UFC/ml³. Los Erlenmeyers con agua inoculada se mantuvieron a temperatura ambiente (promedio: 16-20 °C), tapados y sin agitación. La recolección de muestras se realizó inmediatamente luego de la inoculación (hora 0), cada 24 h durante los primeros 4 días, cada 48 h hasta el día 8 y, a partir de entonces, se muestreó una vez por semana hasta que no se recuperaron bacterias por al menos 7 días consecutivos. La toma de muestras se realizó con pipeta de vidrio estéril luego de una agitación suave y en condiciones de esterilidad.

Se realizaron tres experimentos independientes: el primero, desde mayo hasta agosto de 2008; el segundo, desde septiembre hasta diciembre de 2009; y el último, desde agosto hasta noviembre de 2011.

En el ensayo de 2008 se estudió y comparó el crecimiento y la supervivencia de VTEC O157:H7 en el microcosmos del agua y en caldo nutritivo LB, utilizado como control de crecimiento. En cambio, en los ensayos de 2009 y de 2011, solo se utilizó el microcosmos del agua estéril de bebedero y se incorporaron al estudio las restantes cepas VTEC.

Estudio de viabilidad

El estudio de viabilidad de las cepas inoculadas se realizó mediante el recuento de colonias en placas de agar SMAC-NAL, a partir de diluciones estándares. Para la construcción de las curvas de crecimiento se utilizó el promedio del recuento de colonias obtenidas en dos diluciones decimales consecutivas, por duplicado.

PCR

Se tomó 1 ml de agua inoculada y se cultivó en 9 ml de caldo LB a 37 °C con agitación durante 18 h. Luego se tomaron 10 µl del cultivo y se diluyeron en 500 µl de agua bidestilada y se extrajo el ADN por lisis celular en caliente. Las condiciones de termociclado y las secuencias de los *primers* para *ehxA-eae-vt₁-vt₂* fueron descritas previamente por Paton y Paton³³.

Estudio *in vitro* de la viabilidad de VTEC O157 y no-O157 en muestras de materia fecal de bovinos

Se tomaron muestras de materia fecal y se seleccionaron para el ensayo aquellas que fueron negativas para *vt₁*, *vt₂* por PCR y con resultado negativo al cultivo en SMAC-NAL.

Estas muestras se inocularon con las cepas O91:H21, O178:H19 y O157:H7 en la misma concentración final (10^3 UFC/g) y con el procedimiento descrito anteriormente. La materia fecal se colocó en una bolsa dentro de contenedores plásticos y se mantuvo a la temperatura ambiente y en contacto con el aire.

En cada ocasión de muestreo, se tomó 1 g de materia fecal y se suspendió en 9 ml de solución fisiológica estéril. El sobrenadante se utilizó para realizar las mismas determinaciones y siguiendo la misma metodología que en el caso del agua (estudio de viabilidad y PCR).

Los resultados de tiempo de sobrevida y recuentos máximos se analizaron con análisis de varianza de un factor (ANOVA).

Resultados

Viabilidad de VTEC O157 y no-O157 en muestras de agua estéril de bebederos

A partir de los datos obtenidos en los ensayos realizados en años independientes, se calculó el promedio para graficar una curva de crecimiento para cada cepa (fig. 1). Se observó que las cepas no mostraron un mismo patrón de crecimiento y tampoco igual tiempo de sobrevida en el microcosmos ($p < 0,0005$). El serotipo O91:H21 sobrevivió más tiempo y alcanzó un recuento máximo de 10^6 UFC/ml, al igual que el O157:H7, mientras que las cepas O20:H19 y O178:H19 no superaron las 10^4 UFC/ml y sobrevivieron menos tiempo en el agua (tabla 1).

Los genes VTEC de todas las cepas estudiadas pudieron detectarse por PCR, aun cuando los recuentos en placas fueron inferiores a 10^1 UFC/ml de agua cuando se cultivaron durante 18 h a 37 °C con agitación.

Viabilidad y persistencia de VTEC O157 y no-O157 en muestras de materia fecal

Todas las cepas sobrevivieron en la materia fecal aproximadamente 60 días, aunque, al igual que lo sucedido en el ensayo del agua de bebedero, las cepas se comportaron de forma diferente. Las curvas de crecimiento obtenidas a partir de los resultados de los recuentos de cada cepa en el microcosmos del agua de bebedero y la materia fecal se

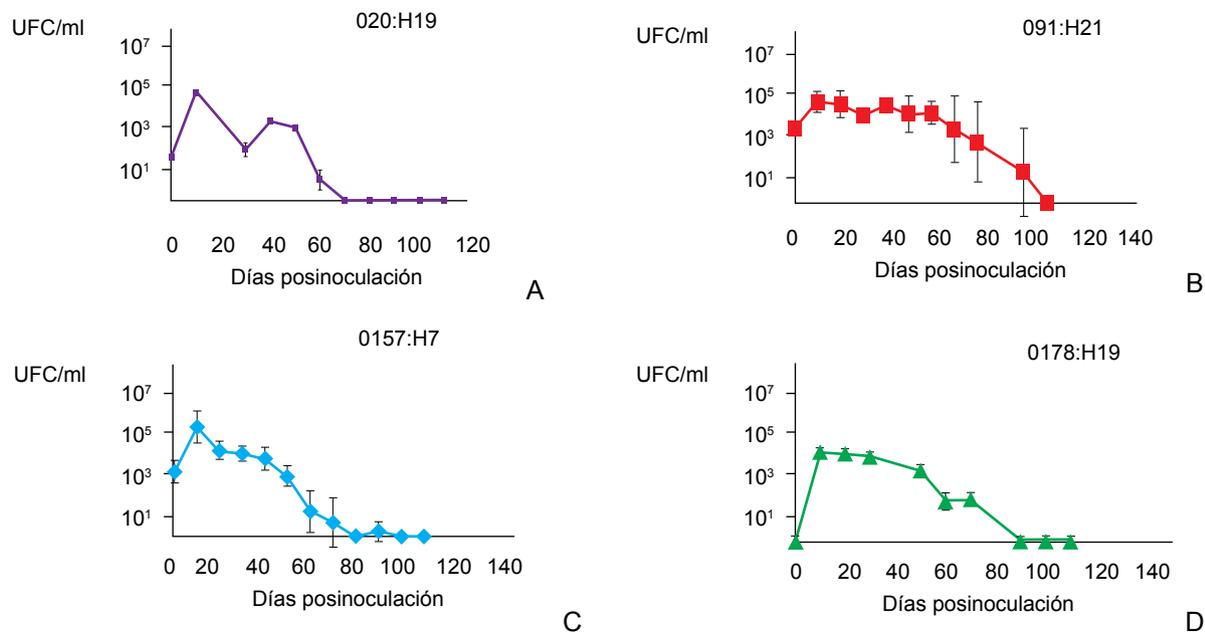


Figura 1 Curvas de crecimiento de las cepas VTEC en el microcosmos del agua estéril de bebederos de animales. A) O20:H19; B) O91:H21; C) O157:H7; D) O178:H19. Los gráficos se construyeron calculando los valores promedio obtenidos en los ensayos independientes.

Tabla 1 Supervivencia de VTEC O157 y no-O157 en agua estéril de bebederos

Aislamiento/ serotipo	Tiempo de supervivencia en el agua (días)	Recuento máximo (UFC/ml)
O91:H21 ^a	94	10 ⁵
O157:H7 ^a	78	10 ⁶
O178:H19 ^b	90	10 ⁴
O20:H19 ^b	71	10 ⁴

^a Valor promedio de los ensayos independientes.

^b Los valores corresponden a un solo ensayo.

presentan en la figura 2. Los aislamientos O91:H21 y O178:H19 presentaron recuentos superiores en la materia fecal, en tanto que la cepa O157:H7 mostró un comportamiento inverso, es decir, mayores recuentos en el agua que en la materia fecal.

Durante los primeros 15 días no pudieron obtenerse resultados de PCR a partir de un cultivo *overnight* (ON) en caldo LB. Entonces, las PCR se realizaron con colonias recuperadas de las placas de SMAC-NAL cultivadas durante 18 h a 37 °C ON; de esa manera se corroboró la identidad de las cepas inoculadas en cada caso.

Discusión

El medio ambiente puede ser una fuente de transmisión y diseminación de VTEC debido a la contaminación fecal repetida producida por los animales infectados. Wang y Doyle⁴³

observaron que O157:H7 fue capaz de sobrevivir 91 días en agua de lago a 15 °C. Existe una considerable variabilidad en la persistencia de estos agentes en aguas procedentes de diferentes fuentes y con diferente contenido de nutrientes y grado de competencia por parte de otros microorganismos del ecosistema^{3,4}. La importancia en la salud pública de los serotipos no-O157 nos llevó a analizar, además del O157:H7, la supervivencia de 3 aislamientos VTEC pertenecientes a los serotipos O91:H21, O20:H19 y O178:H19.

En nuestro trabajo, la cepa O157:H7 se recuperó a partir del agua inoculada hasta los días 104, 62 y 69 posinoculación en tres ensayos independientes. Cuando la misma cepa se inoculó en materia fecal sin autoclavar, a los 60 días la presencia de VTEC fue equivalente a la observada en el agua estéril de bebedero (10 UFC/g en materia fecal y 10 UFC/ml en agua), aunque las dinámicas de crecimiento fueron distintas. En el agua se observó que el crecimiento fue muy rápido durante los primeros 10 días, con un recuento máximo de 10⁶ UFC/ml, para luego descender bruscamente, mientras que en la materia fecal el crecimiento fue más lento. Así, a los 10 días apenas se superaron las 10⁴ UFC/g, para decrecer luego paulatinamente hasta el día 50. Esta dinámica poblacional puede explicarse por la disponibilidad de nutrientes de fácil acceso en el microcosmos del agua, que VTEC utiliza rápidamente durante los primeros días, pero cuando se reduce su disponibilidad, la población comienza a declinar lentamente. En el caso de la materia fecal, también podría suceder esto, lo que se sumaría a la competencia y antagonismo que podría existir con otros microorganismos del ecosistema⁴¹. El comportamiento de aislamientos O157:H7 de distinto origen ha sido distinto ante diferentes condiciones ambientales^{2,42}.

Si bien los trabajos de supervivencia de cepas no-O157 en distintos microcosmos son más escasos, se ha demostrado

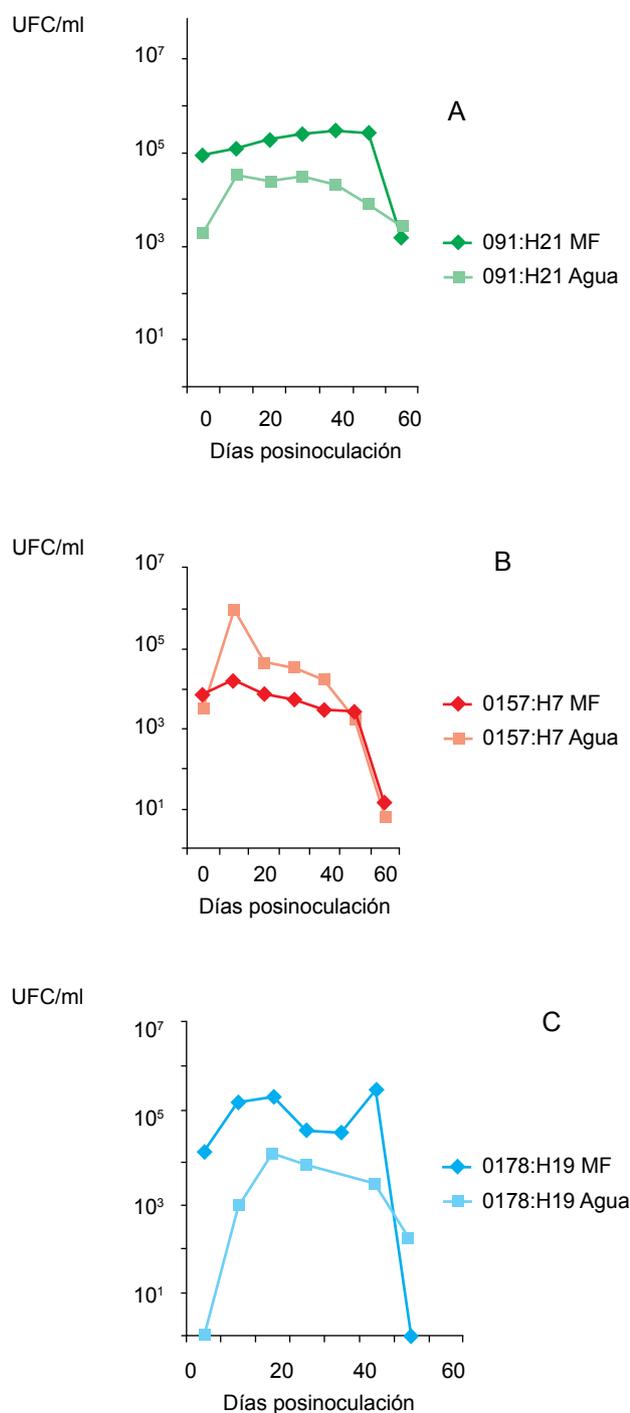


Figura 2 Curvas de crecimiento de las cepas VTEC. A) O91:H21; B) O157:H7; C) O178:H19 en el microcosmos de la materia fecal de bovinos (MF) y en el agua estéril de bebederos (Agua). Los gráficos se construyeron calculando los valores promedio obtenidos en los ensayos independientes.

que el serotipo O26 es más resistente que el O157 y que el O111 en materia fecal a 15 °C, y se ha propuesto que dicha capacidad está íntimamente asociada a la temperatura, a la concentración bacteriana del inóculo, al grado de deshidratación de la muestra y a la presencia de antagonistas

microbianos, de manera similar a lo que sucede con el serotipo O157:H7^{12,16,18}.

Si comparamos los comportamientos de los aislamientos O91:H21 y O178:H19 en los dos microcosmos analizados, luego de 50 días de ensayo observamos en los recuentos diferencias de más de 1 log en la materia fecal con respecto a los obtenidos en el agua estéril, lo que sugiere que podría existir una mejor adaptación a ciertas condiciones de la materia fecal, como la acidez y la competencia microbiana. Los resultados de la cepa O91:H21 concuerdan con lo presentado por Molina *et al.*²⁸.

Recientemente, Sawant *et al.*⁴¹ han descrito un mecanismo de inhibición dependiente de la interacción íntima entre VTEC y *E. coli* saprófitas antagonistas presentes en la materia fecal. Este mecanismo es independiente de cualquier elemento soluble, como una bacteriocina o toxina extracelular, y de la presencia de fagos. Aunque aún no se conoce en detalle se ha sugerido que la inhibición dependiente de la proximidad presenta una acción de eliminación de la competencia cuando las condiciones son momentáneamente desfavorables, que deja así a la "cepa inhibidora" con una ventaja numérica para cuando las condiciones se restablezcan y pueda, de esta forma, acceder a mayor cantidad de nutrientes.

Desnues *et al.*¹⁰ indicaron que ante la restricción de nutrientes, las células pierden lentamente la capacidad de reproducirse debido al deterioro oxidativo, pero dependiendo del grado de deterioro, esta puede llegar a restablecerse. La pérdida irreversible de los mecanismos de soporte de la vida bacteriana es consecuencia del incremento de la carbonilación de las proteínas durante el estrés. Sin embargo, solo una fracción de la población sufre inmediatamente estas consecuencias, mientras que el resto se adapta lentamente modificando su expresión de genes¹¹. Este proceso aleatorio y progresivo provoca la muerte paulatina de la población a lo largo del tiempo.

En conclusión, todas las cepas VTEC poseen gran capacidad de supervivencia tanto en agua como en materia fecal, circunstancia que aumenta el riesgo de transmisión para las personas que trabajan o que se encuentren de visita en establecimientos ganaderos, así como el de reinfección para los animales.

Estos resultados ponen de manifiesto la necesidad de profundizar los estudios acerca de las relaciones de antagonismo entre las cepas VTEC y otros miembros del ecosistema que abarca los bebederos, la materia fecal animal y el suelo, con el fin de identificar nuevas alternativas para el control de estos patógenos en los ambientes de producción animal y reducir así el riesgo de contaminación de los alimentos derivados de estas producciones y de transmisión al hombre por el contacto directo con el ambiente.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

Los autores agradecen a María R. Ortiz por su asistencia técnica y a la Lic. Silvina Etcheverría por el análisis estadís-

tico. Este trabajo recibió financiamiento por parte de FON-CYT PICT 1728/OC-AR Proy 38059, CIC y SECYT-UNCPBA. NL Padola es miembro de la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia Buenos Aires (CICPBA), A. I. Etcheverría es miembro de CONICET, y R. Polifroni realizó este trabajo con una beca doctoral interna de CONICET.

Bibliografía

- Amirlak I y Amirlak B. Haemolytic uraemic syndrome: an overview. *Nephrology*. 2006;11:213-8.
- Arnold KW, Kaspar, CW. Starvation-and stationary-phase induced acid tolerance in *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol*. 1995;61:2037-9.
- Avery LM, Williams AP, Killham K, Jones DL. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in waters from lakes, rivers, puddles and animal-drinking troughs. *Sci Total Environ*. 2008;389:378-85.
- Barcina I. Survival strategies of enteric bacteria in aquatic systems. *Microbiologia*. 1995;11:389-92.
- Blaser MJ. Bacteria and diseases of unknown cause: hemolytic-uremic syndrome. *J Infect Dis*. 2004;189:552-63.
- Bolton DJ, Byrne CM, Sheridan JJ, McDowell DA, Blair IS. The survival characteristics of a non-toxicogenic strain of *Escherichia coli* O157:H7. *J Appl Microbiol*. 1999;86:407-11.
- Caprioli A, Morabito S, Brugere H, Oswald E. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. *Vet Res*. 2005;36:289-311
- Centers for Disease Control and Prevention. Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks-United States, 2006. *MMWR* 2009;58:609-15 [Online; consultado Mar 2013]. Disponible en: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5822a1.htm>
- Cobbold R, Desmarchelier P. Horizontal transmission of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* within groups of dairy calves. *Appl Environ Microbiol*. 2002;68:4148-52.
- Desnues B, Cuny C, Grégori G, Dukan S, Aguilaniu H, Nyström T. Differential oxidative damage and expression of stress defense regulons in culturable and non-culturable *Escherichia coli* cells. *EMBO Rep*. 2003;4:400-4.
- Duffitt AD, Reber RT, Whipple A, Chauret C. Gene expression during survival of *Escherichia coli* O157:H7 in soil and water. *Int J Microbiol*. 2011 [Online; consultado Feb 2013]. Disponible en: <http://www.hindawi.com/journals/ijmb/2011/340506/>
- Duffy G. Verocytotoxicogenic *Escherichia coli* in animal faeces, manures and slurries. *J Appl Microbiol*. 2003;94:594-103.
- Etcheverría AI, Padola NL, Sanz ME, Polifroni R, Krüger A, Passucci J, Rodríguez EM, Taraborelli AL, Ballerio M, Parma AE. Occurrence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) on carcasses and retail beef cuts in the marketing chain of beef in Argentina. *Meat Sci*. 2010;86:418-21.
- Fernández D, Irino K, Sanz ME, Padola NL, Parma AE. Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from dairy cows in Argentina. *Lett App Microbiol*. 2010;51:377-82.
- Fernández, D. Estudio de aspectos ecológicos de *Escherichia coli* verocitotóxico en rodeos lecheros de la Cuenca Mar y Sierras. Su rol como contaminante de la leche y del medio ambiente. Tesis Doctoral 2011. Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires. Tandil.
- Fremaux B, Prigent-Combaret C, Delignette ML, Mallen B, Dothal M, Gleizal A, Vernozy-Rozand C. Persistence of Shiga toxin- *Escherichia coli* O26 in various manure-amended soil types. *J Appl Microbiol*. 2008;104:296-304.
- Fremaux B, Prigent-Combaret C, Vernozy-Rozand C. Long-term survival of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in cattle effluents and environment: an updated review. *Vet Microbiol*. 2008;132:1-18.
- Fukushima H, Hoshina K, Gomyoda M. Long-term survival of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26, O111, and O157 in bovine feces. *Appl Environ Microbiol*. 1999;65:5177-81.
- Grad YH, Lipsitch M, Feldgarden M, Arachchi HM, Cerqueira GC, Fitz Gerald M, Godfrey P, Haas BJ, Murphy CI, Russ C, Sykes S, Walker BJ, Wortman JR, Young S, Zeng Q, Abouelleil A, Bochicchio J, Chauvin S, DeSmet T, Gujja S, McCowan C, Montmayeur A, Steelman S, Fridodt-Møller J, Petersen AM, Struve C, Krogfelt KA, Bingen E, Weill FX, Lander ES, Nusbbaum C, Birren B W, Hung DT, Hanage WP. Genomic epidemiology of the *Escherichia coli* O104:H4 outbreaks in Europe, 2011. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012;109:3065-70.
- Gyles CL. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: An overview. *J Animal Sci*. 2006;85:E45-62.
- Habteselassie M, Bischoff M, Blume E, Applegate B, Reuhs B, Brouder S, Turco RF. Environmental controls on the fate of *Escherichia coli* in soil. *Water Air Soil Poll*. 2008;190:143-55.
- Karmali, MA, Mascarenhas, M, Shen, S, Ziebell, K, Johnson, S, Reid-Smith, R, Isaac-Renton, J, Clark, C, Rahn, K, Kaper, JB. 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;41:4930-40.
- Kaspar C, Doyle ME, Archer J. White paper on non-O157:H7 Shiga toxin-producing *E. coli* from meat and non-meat sources FRI Food Saf Rev. 2010 [Online; revisado 26 Nov 2012]. Disponible en: <http://fri.wisc.edu/docs/pdf/FRIBriefNonO157STEC410.pdf>
- Lleò MM, Benedetti D, Tafi MC, Signoretto C, Canepari P. Inhibition of resuscitation from the viable but non-culturable state in *Enterococcus faecalis*. *Environ Microbiol*. 2007;9:2313-20.
- Maule, A. Survival of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157 in soil, water and on surfaces. *Symp Ser Soc Appl Microbiol*. 2000;29:571-78.
- Mellmann A, Bielaszewska M, Karch H. Intrahost genome alterations in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Gastroenterol*. 2009;136:1925-38.
- Mizuone Y, Wai SN, Takade A, Yoshida SC. Restoration of culturability of starvation-stressed and low-temperature-stressed *Escherichia coli* O157 cells by using H2O2-degrading compounds. *Arch Microbiol*. 1999;172:63-7.
- Molina PM, Parma AE, Sanz ME. Survival in acidic and alcoholic medium of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 and non-O157:H7 isolated in Argentina. *BMC Microbiol*. 2003;3:17-23.
- Ogden ID, Hepburn NF, MacRae M, Strachan NJ, Felon DR, Rusbridge SM, Pennington, TH. Long-term survival of *Escherichia coli* O157 on pasture following an outbreak associated with sheep at a scout camp. *Lett Appl Microbiol*. 2002;34:100-4.
- Oliver JD. The viable but nonculturable state in bacteria. *Review. J Microbiol*. 2005;43:93-100.
- Padola NL, Sanz ME, Blanco JE, Blanco J, Etcheverría AI, Arroyo GH, Usera MA, Parma AE. Serotypes and virulence genes of Shiga toxigenic *Escherichia coli* (STEC) isolates from a feedlot in Argentina. *Vet Microbiol*. 2004;100:3-9.
- Paton AW, Srimanote P, Woodrow MC, Paton JS. 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;69:6999-7009.
- Paton AW, Paton JC. Direct detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by multiplex PCR for *stx1*, *stx2*, *eae*, *ehxA* and *saa*. *J Clin Microbiol*. 2002;40:271-4.

34. Piérard D, De Greve H, Haesebrouck F, Mainil J. O157:H7 and O104:H4 Vero/Shiga toxin-producing *Escherichia coli* outbreaks: respective role of cattle and humans. *Vet Res.* 2012;43:13-37.
35. Polifroni R, Etcheverría AI, Sanz ME, Cepeda RE, Krüger A, Lucchesi PMA, Fernández D, Parma AE, Padola NL. Molecular characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from the environment of a dairy farm. *Curr Microbiol.* 2012;65:337-43.
36. Rivas M, Miliwebsky E, Chinen I, Roldan CD, Balbi L, Garcia B, Fiorilli G, Sosa-Estani S, Kincaid J, Rangel J, Griffin PM. The Case-Control Study Group. Characterization and epidemiologic subtyping of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from hemolytic uremic syndrome and diarrhea cases in Argentina. *Foodborne Pathog Dis.* 2006;3:88-96.
37. Rivas M, Padola NL, Lucchesi PMA, Masana M. Diarrheagenic *Escherichia coli* in Argentina. En: Torres AG, editor. *Pathogenic Escherichia coli in Latin America.* Illinois, Bentham Science Publishers Ltd.; 2010. p. 348-92.
38. Rivero M, Passucci J, Lucchesi P, Signorini M, Alconcher L, Rodríguez E, Rocha Martín V, Meneguzzi B, San Juan F, Ballesteros B, Tarabla H. Epidemiología del síndrome urémico hemolítico en dos regiones de la Provincia de Buenos Aires. *Medicina.* 2013;73:127-35.
39. Rozen Y, Belkin S. Survival of enteric bacteria in seawater. *FEMS Microbiol Rev.* 2006;25:513-29.
40. Sanz ME. Detección de factores de virulencia en *Escherichia coli* toxigénicas y estudio de su incidencia en la salud pública y sanidad animal. Tesis Doctoral 1999. Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires. Tandil.
41. Sawant AA, Casavant NC, Call DR, Besser TE. Proximity-dependent inhibition in *Escherichia coli* isolated from cattle. *Appl Environ Microbiol.* 2011;77:2345-51.
42. Wang G; Zhao T, Doyle MP. Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in bovine feces. *Appl Environ Microbiol.* 1996;62:2567-70.
43. Wang G, Doyle MP. Survival of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in water. *J Food Prot.* 1998;61:662-7.
44. Werber D, Fruth A, Buchholz U, Prager R, Kramer MH, Ammon A, Tschäpe H. Strong association between Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* O157 and virulence genes *stx2* and *eae* as possible explanation for predominance of serogroup O157 in patients with haemolytic uremic syndrome. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2003;22:726-30.