

**CARRERA DEL INVESTIGADOR CIENTÍFICO Y TECNOLÓGICO**  
**Informe Científico<sup>1</sup>**

**PERIODO <sup>2</sup>: 2012-2013**

**1. DATOS PERSONALES**

*APELLIDO: PADOLA*

*NOMBRES: NORA LIA*

*Dirección Particular: Calle: N°:*

*Localidad: Tandil CP: 7000 Tel:*

*Dirección electrónica [nlpadola@vet.unicen.edu.ar](mailto:nlpadola@vet.unicen.edu.ar)*

**2. TEMA DE INVESTIGACION**

*CICLO ECOLOGICO DE ESCHERICHIA COLI VEROCITOTOXIGÉNICO: RESERVORIOS,  
MEDIO AMBIENTE Y ALIMENTOS*

**3. DATOS RELATIVOS A INGRESO Y PROMOCIONES EN LA CARRERA**

*INGRESO: Categoría: Adj c/d Fecha: 2/09/09*

*ACTUAL: Categoría: Adj s/d desde fecha: 30/11/2012*

**4. INSTITUCION DONDE DESARROLLA LA TAREA**

*Universidad y/o Centro: UNIVERSIDAD NACIONAL DEL CENTRO DELA PROVINCIA DE  
BUENOS AIRES*

*Facultad: FACULTAD CIENCIAS VETERINARIAS-CIVETAN-CONICET-CICPBA*

*Departamento: Sanidad Animal y Medicina Preventiva*

*Cátedra: Inmunoquímica y Biotecnología*

*Dirección: Calle: Paraje Arroyo Seco s7N N°:*

*Localidad: Tandil CP: 7000 Tel: 0249 4439850 int 256*

*Cargo que ocupa: Profesor Asociado*

**5. DIRECTOR DE TRABAJOS.** (En el caso que corresponda)

.....  
Firma del Director (si corresponde)

.....  
Firma del Investigador

<sup>1</sup> Art. 11; Inc. "e"; Ley 9688 (Carrera del Investigador Científico y Tecnológico).

<sup>2</sup> El informe deberá referenciar a años calendarios completos. Ej.: en el año 2014 deberá informar sobre la actividad del período 1°-01-2012 al 31-12-2013, para las presentaciones bianuales.

## **6. EXPOSICION SINTETICA DE LA LABOR DESARROLLADA EN EL PERIODO.**

*Durante el período informado (2012-2013) desarrollé las siguientes actividades cuya justificación detallo:*

*Las altas prevalencias de Escherichia coli productor de verotoxinas (VTEC) encontradas en distintas categorías de bovinos de tambo, y la menor prevalencia de VTEC encontrada en medio ambiente, nos llevó a plantearnos las posibles causas de su persistencia en el ambiente, bien bajo la forma de biofilms o en el estado de bacterias viables no cultivables. La Lic Rosana Polifroni defendió su Tesis Doctoral bajo mi dirección y la codirección de la Dra Analía Etcheverría en este tema. Los resultados obtenidos nos permitieron planificar la beca CICPBA de la Lic María Emilia Cáceres y actualmente con Beca de CONICET e inscripta en el Doctorado en Ciencia Animal para profundizar los estudios de biofilms en cepas autóctonas sometidas a situaciones de estrés térmico y ácido. Hemos comprobado el rol del bovino y del medio ambiente como reservorios de VTEC no sólo del serotipo O157:H7 sino de serotipos no-O157, diseñando estrategias de diagnóstico no selectivas. Pero debido a que muchos casos de síndrome urémico hemolítico (SUH) no se producen por la ingestión de carne bovina contaminada, comenzamos a investigar sobre otros posibles reservorios, como el pollo. Esta línea permitió el desarrollo de la Tesis Doctoral de la Vet Mónica Alonso bajo mi dirección y la codirección de la Dra Paula Lucchesi, que se defendió en 2012 y permitió comprobar que el pollo no sería reservorio de VTEC pero sí de Escherichia coli enteropatogénico (EPEC) y que la presencia de varios serotipos VTEC en carne de pollo podría deberse a contaminación cruzada con carne bovina. Actualmente, dirijo otra Becaria de CONICET (soy codirectora de la Tesis Doctoral) que tiene como objetivo determinar la presencia de VTEC y Salmonella, no solamente en criaderos de cerdos sino en toda su cadena productiva y de comercialización (en medias reses y en bocas de expendio minorista). Este trabajo de Tesis también contempla la detección de integrones en las cepas aisladas. Los integrones son cassettes de ADN que codifican para resistencia a varios antibióticos y que se transfieren horizontalmente entre cepas, aumentando el riesgo de la multiresistencia y su diseminación en el ambiente. Más allá de este proyecto, estamos trabajando en conjunto con el Dr Alejandro Soraci (Toxicología-FCV-UNCPBA) en la detección de integrones en cepas comensales de E. coli aisladas de cerdos y medio ambiente, y hemos establecido vínculos de colaboración con el grupo del Dr Gutkin (F. F y B-UBA) para la secuenciación genética de los integrones.*

*La difusión de nuestros resultados nos ha permitido trabajar en colaboración con otros grupos de investigación, como el del Dr Gerardo Leotta (Microbiología de los Alimentos-FCV-UNLP) con el cual planificamos y obtuvimos dos PICTO CIN 2011, en uno de los cuales integro el grupo responsable, en un trabajo denominado Carnicerías Saludables que contempla la determinación de bacterias productoras de ETAs en carnicerías de 3 municipios: Berisso, Tandil y Luján.*

*En 2010 el Dr Alfredo Torres, de la Universidad de Texas (USA) organizó LACER (Latin American Coalition for Escherichia coli Research) del cual soy miembro. De esta coalición surgió la publicación del libro Pathogenic Escherichia coli in Latin America. A. G. Torres (Ed.). Editado por: Bentham Science Publishers Ltd, Estados Unidos en el cual escribimos el capítulo: Diarrheagenic Escherichia coli in Argentina Chapter 10: pp. 142-161. Rivas, M.; Padola N. L.; Lucchesi P. M. A. and Massana, M. Dentro del marco de LACER fui invitada como conferencista al XXXV Congreso Chileno de Microbiología y a exponer en un workshop en el marco del Congreso en Mañuncillo, Chile.*

*Dentro del marco de un convenio con el Instituto de Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Paraguay estamos trabajando en un proyecto que contempla la detección de VTEC en bovinos paraguayos, pues no hay investigaciones realizadas en ganado en ese país. Una pasante concurrió a nuestro laboratorio para adquirir conocimiento y práctica sobre metodologías de biología molecular y actualmente las cepas aisladas y caracterizadas en Paraguay se subtipifican en nuestro laboratorio. El objetivo es comparar cepas de ambos países que puedan explicar la altísima incidencia de SUH en nuestro país y la baja incidencia en Paraguay.*

*Nuestro laboratorio posee un cepario de 600 cepas VTEC, aisladas durante distintas Tesis Doctorales. Estas cepas fueron obtenidas de bovinos, medio ambiente y alimentos. Estamos trabajando en la caracterización de estas cepas, principalmente en la detección molecular de proteínas que intervendrían en la colonización del bovino. El éxito de la colonización del bovino por VTEC y la aparente resistencia a la enfermedad sistémica son, en la actualidad, motivo de muchas especulaciones y controversias. Los factores que incrementan el éxito de VTEC para colonizar el intestino del bovino, incrementan en consecuencia el riesgo para la salud humana. Estos objetivos forman parte del proyecto de grupo que dirijo con la codirección de la Dra Analía Etcheverría y que adquiere particular importancia luego de la jubilación del Dr Alberto Parma que ha delegado la responsabilidad del laboratorio en la Dra Lucchesi y en mi persona.*

## 7. TRABAJOS DE INVESTIGACION REALIZADOS O PUBLICADOS EN ESTE PERIODO.

### 7.1 PUBLICACIONES.

- 1) **Alonso, MZ; Colello, R; Etcheverría, AI; Zárate, J; López, A; , Padola, NL, Parma, AE. Detección de genes de VTEC en muestras de carne provenientes de la ciudad de Nogoyá, Entre Ríos, Argentina. 2012. Revista del Colegio de Veterinarios, 50:40-41. Trabajo distinguido en las 7° Jornadas Internacionales de Veterinaria Práctica, agosto 2011.**

*Escherichia coli* verocitotóxico (VTEC) es un patógeno transmitido por alimentos asociado a casos de colitis hemorrágica o síndrome urémico hemolítico (SUH). El SUH es un desorden multisistémico caracterizado por presentar insuficiencia renal aguda, anemia hemolítica microangiopática y trombocitopenia (Elliot y Nichols, 2001). Constituye la principal causa de insuficiencia renal aguda y la segunda causa de insuficiencia renal crónica y de transplante renal en niños en la Argentina. Actualmente, nuestro país presenta el registro más alto de SUH en todo el mundo, con aproximadamente 500 casos nuevos declarados anualmente y una incidencia de 17/100,000 niños menores de 5 años de edad (Rivas y cols., 2010).

Las verocitotoxinas (codificadas por los genes *vt<sub>1</sub>* y *vt<sub>2</sub>*) son los principales factores de virulencia, que inhiben la síntesis proteica provocando la muerte celular (Strockbine *et al.*, 1986). Si bien la detección de dichos genes en zona confluyente sin el correspondiente aislamiento es incompleta y sólo puede considerarse como diagnóstico presuntivo, es un indicador de contaminación de las muestras analizadas (Fernández, *et al.*, 2009; Etcheverría *et al.*, 2010).

El bovino es el principal reservorio de la bacteria que es eliminada en sus heces y se transmite al hombre a través de la ingestión de alimentos o agua contaminados con materia fecal o por medio del contacto directo con estos animales o con su ambiente (Parma *et al.*, 2000; Parma *et al.*, 2003, Padola *et al.*, 2004, Fernández *et al.*, 2010). Durante la faena, y fundamentalmente durante el desollado y la evisceración llegan a las superficies de las reses y de las vísceras, cepas de VTEC procedentes de la flora intestinal del animal (Blanco *et al.*, 1996).

Debido a que no existen estudios relacionados con este patógeno en la ciudad de Nogoyá, Entre Ríos, Argentina y que se han registrado casos de SUH desde el año 1996, el Departamento de Zoonosis de la Municipalidad de Nogoyá sumado a iniciativas de profesionales del sector privado consideró necesario investigar la presencia de genes codificantes de verocitotoxinas en distintas muestras de carnes y chorizos obtenidas en dicha ciudad, habiendo recurrido a la cooperación del Laboratorio de Inmunoquímica y Biotecnología, FCV-UNCPBA.

*Mi aporte al trabajo fue la coordinación de las tareas de laboratorio y la planificación del resumen al Congreso. Los jurados publicaron los trabajos que fueron distinguidos.*

- 2) **Alonso, MZ Lucchesi, PMA, Rodríguez, EM, Parma, AE, Padola, NL. Enteropathogenic (EPEC) and Shigatoxigenic *Escherichia coli* (STEC) in broiler chickens and derived products at different retail stores. 2012. Food Control. 23: 351-355.**

Enteropathogenic (EPEC) and Shigatoxigenic *Escherichia coli* (STEC) are foodborne pathogens that cause potentially fatal infant diarrhea and hemolytic uremic syndrome, respectively. We investigated the presence of intimin and Shiga toxin encoding genes, as indicators of EPEC and STEC presence in cloacae and chicken products. The analyzed products were hamburgers, giblets and carcasses obtained from poultry and butcher shops. EPEC contamination predominated over STEC contamination in cloacae and chicken products, although some differences were detected when the kind of food or shop was taken into account. In particular, among chicken hamburgers we found a greater proportion of EPEC than STEC positive samples at poultry shops, while in butcheries STEC was predominant. This finding could suggest cross contamination during handling at butcheries. The results indicate that it is necessary to improve hygienic measures both during slaughtering and manipulation of chicken products at retail stores, to provide a safe product to consumers.

*Mi aporte a este trabajo fue la dirección de las actividades planteadas y la escritura y corrección del manuscrito, en conjunto con el resto de los autores. Este trabajo es parte de una Tesis Doctoral que dirijo.*

**3) Polifroni, R., Etcheverría, A.I., Fernández, D., Sanz, M.E., Cepeda, R., Parma, A.E. and Padola, N.L. Distribution and characterization of Shiga toxin-producing *E. coli* in environmental samples from a dairy farm. 2012 *Current Microbiology* 65: 337-343.**

Environmental samples were taken from ground, cattle water troughs, and feeders from a dairy farm with different STEC prevalence between animal categories (weaning calves, rearing calves, and dairy cows). Overall, 23 % of samples were positive for stx genes, stx2 being the most prevalent type. Isolates were analyzed by PCR monoplex to confirm generic *E. coli* and by two multiplex PCR to investigate the presence of *stx1*, *stx2*, *eae*, *saa*, *ehxA*, and other putative virulence genes encoded in STEC plasmids: *katP*, *espP*, *subA*, and *stcE*. The toxin genes were subtyped and the strains were serotyped. The ground and the environment of the rearing calves were the sites with the highest number of STEC-positive samples; however, cattle water troughs and the environment of cows were the places with the greater chance of finding stx2EDL933 which is a subtype associated with serious disease in humans. Several non-O157 STEC serotypes were detected. The serotypes O8:H19; O26:H11; O26:H-; O118:H2; O141:H-; and O145:H- have been associated with human illness. Furthermore, the emergent pathogen STEC O157:H- (*stx1-ehxA-eae*) was detected in the environment of the weaning calves. These results emphasize the risk that represents the environment as source of STEC, a potential pathogen for human and suggest the importance of developing control methods designed to prevent contaminations of food products and transmission from animal to person.

*La planificación del trabajo experimental y la escritura de la publicación se realizó bajo mi dirección en el marco de una beca del CONICET y la Tesis Doctoral.*

**4) Fernández, D.; Sanz, ME.; Parma AE.; Padola, NL. Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from newborn, weaning and rearing dairy calves. 2012. *Journal of Dairy Science* 95:5340-5343**

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) are causative agents of hemolytic-4 uremic syndrome (HUS) which is endemic in Argentina. The human transmission is mediated through feces of cattle, consumption of undercooked meat, nonpasteurized dairy products and vegetables or contaminated water. In this study, rectal swabs from 7 dairy calves were analysed by PCR to detect Stx1 and Stx2, the main virulence factors of STEC. In newborn, milk-fed and growing calves different STEC serotypes previously associated with severe disease in humans were found. This study shows that 10 STEC strains could be acquired early in life, enabling the infection of other animal categories and confirming the risk to public health.

*Mi aporte a este trabajo fue la dirección de las actividades planteadas, la escritura en conjunto con el Dr Fernández y la corrección del manuscrito*

**5) Fernández, D. y Padola, N.L. *Escherichia coli* verocitotóxico: varias cuestiones...y los tambos también. Revisión. 2012. *Revista Argentina de Microbiología* 44: 312-323**

*Escherichia coli* verocitotóxico (VTEC) es causante de brotes y casos esporádicos de colitis hemorrágica (CH) y síndrome urémico hemolítico (SUH). En Argentina el SUH es endémico, con 500 nuevos casos por año y una incidencia de 17/100 000 niños menores de 5 años. El serotipo aislado con mayor frecuencia es el O157:H7, aunque hay serotipos no-O157 que están asociados con la enfermedad en el hombre. VTEC produce verocitotoxinas y factores de virulencia accesorios como intimina, enterohemolisina y una proteína autoaglutinante llamada Saa. Diversos estudios realizados en varios países han confirmado que los bovinos de diferente edad son los principales reservorios de VTEC, y han demostrado altas prevalencias tanto de serotipos O157:H7 como no-O157, muchos de ellos involucrados en brotes de SUH y CH a nivel mundial. La transmisión de VTEC al hombre se produce por el consumo de carne mal cocida, de verduras y agua contaminadas por heces de portadores, así como por el contacto persona-persona y con el medio ambiente contaminado. Los tambos pueden contribuir al riesgo de infección por VTEC en humanos mediante el consumo de leche cruda, de productos lácteos o carne contaminada proveniente de bovinos lecheros, y también a través

del propio medio ambiente del tambó. Existe una amplia distribución y una alta prevalencia de serotipos VTEC en bovinos lecheros de Argentina, por lo cual es importante aplicar medidas de control y manejo que eviten la transmisión de cepas entre animales, ambiente y humanos.

*Esta revisión surgió como consecuencia de los resultados obtenidos en la Tesis Doctoral del Dr Fernández de la cual fui directora. Por lo tanto fui responsable de planificar la publicación y corregir el manuscrito.*

**6) Brusa V., Aliverti V., Aliverti F., Ortega Eneas E., de la Torre J.H., Linares L.H, Sanz M, Etcheverría A., Padola N. L., Galli L., Peral García P., Copes J., Leotta Gerardo A. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef retail markets from Argentina. 2013 Journal: *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*.2:171. doi:10.3389/fcimb.2012.00171**

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) are foodborne pathogens that cause mild or serious diseases and can lead to people death. This study reports the prevalence and characteristics of STEC O157 and non-O157 in commercial ground beef and environmental samples, including meat table, knife, meat mincing machine and manipulator hands (n= 450) obtained from 90 retail markets over a nine-month period. The STEC isolates were serotyped and virulence genes as *stx* (Shiga toxin), *rfb*O157 (O157 lipopolysaccharide), *fli*CH7 (H7 flagellin), *eae* (intimin), *ehxA* (enterohemolysin) and *saa* (STEC autoagglutinating adhesin), were determined. STEC O157 were identified in 23 (25.5%) beef samples and 16 (4.4%) environmental samples, while STEC non-O157 were present in 47 (52.2%) and 182 (50.5%), respectively. Among 54 strains isolated, 17 were STEC O157:H7 and 37 were STEC non-O157. The prevalent genotype for O157 was *stx2/eae/ehxA/fli*CH7 (83.4%), and for STEC non-O157 the most frequent ones were *stx1/stx2/saa/ehxA* (29.7%); *stx2* (29.7%); and *stx2/saa/ehxA* (27%). None of the STEC non-O157 strains were *eae*-positive. Besides O157:H7, other 20 different serotypes were identified, being O8:H19, O178:H19 and O174:H28 the prevalent. Strains belonging to the same serotype could be isolated from different sources of the same retail market. Also, the same serotype could be detected in different stores. In conclusion, screening techniques are increasingly sensitive, but the isolation of STEC non-O157 is still a challenge. Moreover, with the results obtained from the present work, although more studies are needed, cross-contamination between meat and the environment could be suspected.

*La publicación surgió de un trabajo en cooperación con el grupo del Dr Leotta.dentro del marco del proyecto Carnicerías saludables. Mi función fue dirigir las actividades desarrolladas en nuestro laboratorio y participar en la redacción del manuscrito.*

**7) Fernández D, Krüger A, Polifroni R, Bustamante A, Sanso AM, Etcheverría AI, Lucchesi PM, Parma AE and Padola N (2013). Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O130:H11 and O178:H19 isolated from dairy cows. 2013. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 3:9. doi: 10.3389/fcimb.2013.00009**

Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) are isolated from human patients with bloody diarrhea, hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome. In the last years, the infections with non-O157 serotypes are increasing their frequency of association with human disease. STEC produce Shiga toxin (Stx) and other virulence factors that could contribute to human pathogenesis. Cattle are the main reservoir and the transmission to humans is through the consumption of undercooked meat, non-pasteurized dairy products, and vegetables or water contaminated with feces. We have previously determined that O130:H11 and O178:H19 serotypes were the most prevalent in dairy cows from Argentina. In the present study, 37 and STEC isolates from dairy cows belonging to O130:H11 and O178:H19 serotypes, respectively, were characterized regarding to their cytotoxicity on Vero cells, *stx* subtypes, presence of *sab* and typing by multiple-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA). All strains demonstrated a cytotoxic effect, and in O130:H11 isolates, *stx2*EDL933 was the predominant subtype. In O178:H19 isolates the main *stx2* subtype was *stx2*vha. The *sab* gene was detected in 65% and 24% of the isolates belonging to O130:H11 and O178:H19, respectively. Only one MLVA profile was identified among the O130:H11 isolates meanwhile 10 MLVA profiles were

detected among the O178:H19 isolates which were grouped in two main clusters. In conclusion, our data show that O130:H11 and O178:H19 STEC isolates encode virulence factors associated with severe human disease and both serotypes should be considered for routinely testing. Our subtyping experiments showed that isolates could be distinguished based on the stx2 subtype and the presence/absence of sab gene, and for isolates belonging to O178:H19, also when the MLVA type was considered. However, but MLVA subtyping of O130:H11 isolates will require the development of more specific markers.

*Los serotipos publicados en ese trabajo fueron aislados y caracterizados durante la Tesis Doctoral del Dr Fernández que dirigí y fueron subtipificados para esta publicación en la cual planifiqué y supervisé la escritura del manuscrito.*

**8) Etcheverría A and Padola NL. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: factors involves in virulence and cattle colonization. 2013. Virulence 4: 5**

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) cause hemorrhagic colitis (HC) and hemolytic uremic syndrome (HUS) in humans. Outbreaks are linked to bovine food sources. STEC O157:H7 has been responsible for the most severe outbreaks worldwide. However, non-O157 serotypes have emerged as important enteric pathogens in several countries. The main virulence factor of STEC is the production of Shiga toxins 1 and 2. Additional virulence markers are a plasmid encoded enterohemolysin (ehxA), an autoagglutinating adhesin (Saa), a catalase-peroxidase (katP), an extracellular serine protease (espP), a zinc metalloprotease (stcE), a subtilase cytotoxin (subAB), among others. Other virulence factors are intimin and adhesins that had a roll in the adherence of STEC to bovine colon. This review focuses on the virulence traits of STEC and especially on those related to the adhesion to bovine colon. The known of the interaction between STEC and the bovine host is crucial to develop strategies to control cattle colonization.

*Este review fue escrito por invitación. En conjunto con la Dra Etcheverría realizamos la planificación y escritura del manuscrito.*

**9) Etcheverría Analía; Arroyo, Guillermo; Parma, Alberto; Padola, Nora Lía. SÍNDROME URÉMICO HEMOLÍTICO EL ROL DEL BOVINO COMO RESERVORIO DE *Escherichia coli* PRODUCTORES DE VEROCITOTOXINAS (VTEC). Arch Latin Nefr Ped 2013;13(1):000-000**

El síndrome urémico hemolítico (SUH) es un desorden multisistémico caracterizado por trombocitopenia, anemia hemolítica e insuficiencia renal aguda. La forma típica del SUH es causada por serotipos particulares de *Escherichia coli* productores de verocitotoxinas (VTEC). El SUH fue descrito por primera vez en Suiza por Gasser y cols. y a partir de 1964, los primeros casos en Argentina fueron estudiados por el Dr. Carlos Giannantonio. Un hito en el conocimiento de la enfermedad fue la publicación de Karmali demostrando categóricamente el papel protagónico de la relación entre la *E. coli* productoras de verotoxina y el SUH.4 Rivas y cols. analizaron 87 cepas de VTEC provenientes de pacientes con SUH, de las cuales 66 (75,8%) fueron serotipificadas como O157:H7 y 21 (24,1%) como VTEC no-O157. En Argentina, el SUH es una enfermedad endémica, con el registro más alto del mundo, con aproximadamente 420 casos declarados anualmente y una incidencia de 17/100 000 en niños menores de 5 años de edad. Posee un aumento estacional de casos en primavera y verano y afecta principalmente a niños entre los 6 meses y los 5 años de edad, siendo los pacientes generalmente niños eutróficos, de clase media, con buenas condiciones sanitarias y ambientales. Es la causa principal de insuficiencia renal aguda y la segunda causa de insuficiencia renal crónica y trasplante renal en niños en Argentina. La familia de bacterias conocidas como VTEC se caracterizan por producir toxinas denominadas verocitotoxinas (VTs) que son las responsables de las lesiones

trombóticas en la microvasculatura que forman la base histopatológica del SUH y del daño en las células endoteliales que es el evento clave en que subyace su patogénesis. Luego de ser ingerida y

resistir las condiciones ácidas del estómago, VTEC se une a las células del epitelio intestinal y libera las VTs que serán absorbidas hacia la circulación.<sup>13</sup> Las células endoteliales son un blanco importante para las toxinas, pero otros tipos celulares como células tubulares renales, células mesangiales, monocitos y plaquetas también pueden ser afectadas por las VTs.

*Esta revisión fue por invitación del Editor de la revista. Contempla el tema de trabajo de nuestro grupo de investigación. Planifiqué el contenido y supervisé la escritura del manuscrito.*

**10) Natalia Angel Villegas, José Baronetti, Inés Albesa, Rosana Polifroni, Alberto Parma, Analía Etcheverría, María Becerra, Nora Padola and Maria Paraje. Relevance of biofilms in the pathogenesis of STEC infection by biofilm formation. The Scientific World Journal. 2013, Article ID 607258, 7 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2013/607258>**

The present study was designed to determine the relationships among biofilm formation, cellular stress and release of Shiga toxin (Stx) by three different clinical Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains. The biofilm formation was determined using crystal violet stain in tryptic soy broth or thioglycollate medium with the addition of sugars (glucose or mannose) or hydrogen peroxide. The reactive oxygen species (ROSs) were detected by the reduction of nitro blue tetrazolium and reactive nitrogen intermediates (RNI) determined by the Griess assay. In addition, the activities of two antioxidant enzymes, superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT), were studied. For the cytotoxicity studies, Vero cells were cultured with Stx released of STEC biofilms. The addition of sugars in both culture mediums resulted in an increase in biofilm biomass, with a decrease in ROS and RNI

production, low levels of SOD and CAT activity, and minimal cytotoxic effects. However, under stressful conditions, an important increase in the antioxidant enzyme activity and high level of Stx production were observed. The disturbance in the prooxidant/antioxidant balance and its effect on the production and release of Stx evaluated under different conditions of biofilm formation may contribute to a better understanding of the relevance of biofilms in the pathogenesis of STEC infection.

*La publicación surgió de un trabajo en cooperación con el grupo de la Dra Paraje. Mi función fue dirigir las actividades desarrolladas en nuestro laboratorio y participé en la redacción del manuscrito.*

## **7.2 TRABAJOS EN PRENSA Y/O ACEPTADOS PARA SU PUBLICACIÓN.**

**7.3 TRABAJOS ENVIADOS Y AUN NO ACEPTADOS PARA SU PUBLICACION.** *Incluir un resumen de no más de 200 palabras de cada trabajo, indicando el lugar al que han sido enviados. Adjuntar copia de los manuscritos.*

Los siguientes trabajos fueron enviados durante el año 2013. A la fecha (20/5/14) ya se encuentran publicados.

**11) Moredo, F; Colello, R; Sanz, M; Cappuccio, J; Carriquiriborde, M; Etcheverría, A; Perfumo, C; Padola, NL; Leotta, G. Escherichia coli con resistencia a múltiples antimicrobianos en granjas de producción porcina de la República Argentina. Analeta Veterinaria.**

Los objetivos del presente trabajo fueron: i) monitorear la resistencia de *E. coli* frente a diversos antimicrobianos frecuentemente utilizados con fines terapéuticos y profilácticos en explotaciones porcinas; ii) aislar y caracterizar fenotípicamente y genotípicamente *E. coli* toxigénicos provenientes de cerdos con diarrea pre y postdestete; iii) determinar la presencia de integrones clase 1 y 2 como posible mecanismo de diseminación de resistencia. Se procesaron 216 hisopados rectales de cerdos clínicamente sanos y con diarrea, de 15 granjas de producción porcina. El 46,6 % de los aislamientos presentó resistencia a múltiples antimicrobianos. El 93 % fueron resistentes a tetraciclina, el 59 % a

ciprofloxacina, el 52 % a florfenicol, 8 % a amoxicilina/ác. clavulánico y 0,6 % a gentamicina. No se observó resistencia a colistina. De 56 *E. coli*, 34 portaron al menos uno de los genes *int1* o *int2*. Se aisló *E. coli* toxigénico a partir del 53 % de los cerdos con diarrea. El uso inadecuado de antimicrobianos con fines profilácticos o terapéuticos en medicina veterinaria, implica un riesgo para la salud pública.

**12) Eulalia de la Torre; Rocío Colello; Nora Lía Padola; Analía Etcheverría; Edgardo Rodríguez, Fabián Amanto; María Ofelia Tapia; Alejandro Luis Soraci. Detection of integrase gene in *E. coli* isolated from pigs at different stages of production system. International Journal of Microbiology.**

Integrans are one of the genetic elements involved in the acquisition of antibiotic resistance. The aim of the present research is to investigate the presence of integrans in commensal *Escherichia coli* (*E. coli*) strains, isolated from pigs at different stages of production system and from the environment in an Argentinian farm. Five sows postpartum and five randomly chosen piglets from each litter were sampled by rectal swabs. They were sampled again at day 21 and at day 70. Environmental samples from the farm were also obtained. *E. coli* containing any integron class or combination of both integrons was detected by polymerase chain reaction in 100% of sows and in piglets at different stages of production: farrowing pen stage 68.1%;, weaning 60%, and growing/finishing 85.8%, showing an increase along the production system. From environmental samples 78.4% of *E. coli* containing any integron class was detected. We conclude that animals and farm environment can act as reservoirs for potential spread of resistant bacteria by means of mobile genetic elements as integrons, which has a major impact on production of food animals and that can reach man through the food chain, constituting a problem for public health.

**13) Polifroni, R; Etcheverría, A; Padola, NL. Supervivencia de VTEC O157 y no-O157 en agua de bebederos y materia fecal de bovinos. Revista Argentina de Microbiología.**

*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.

**14) Alonso; M; Padola, NL; Lucchesi, PMA. Caracterización de cepas *Escherichia coli* enteropatógeno (EPEC) aisladas en diferentes etapas del proceso de faena de pollos. Revista Argentina de Microbiología.**

En Argentina, *Escherichia coli* enteropatógeno (EPEC) es uno de los agentes más prevalentes aislados de niños con diarrea. Debido a que la contaminación con este patotipo en productos de pollo podría ocurrir durante el proceso de faena, nos planteamos como objetivo aislar y caracterizar EPEC de muestras de animales vivos (cloacas), carcasas evisceradas sin lavar, carcasas lavadas y agua del tanque de enfriamiento. Se caracterizaron 29 aislamientos de EPEC que presentaron una amplia variedad de serotipos, algunos de los cuales (O2:H40, O8:H19 y O108:H9) han sido informados en otras especies animales. También se encontró el serotipo O45:H8, aislado con anterioridad de niños con diarrea.

Se detectaron aislamientos de los serotipos O2:H40, O108:H9 y O123:H32 en distintas etapas del proceso de faena, lo que sugiere que el procesamiento no se realiza en forma adecuada. Se torna necesario reforzar las medidas de control e higiene en las distintas etapas del proceso para disminuir la contaminación microbiana.

**15) Colello R, Etcheverría AI, Di Conza JA, Gutkind GO, Padola NL. Antibiotic resistance and integrons in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC). Brazilian Journal of Microbiology.**

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) cause hemorrhagic colitis (HC) and hemolytic-uremic 11 syndrome in humans (HUS). Cattle are the main reservoir of STEC and transmission to humans occurs through contaminated food and water. Antibiotics are used in pig production systems to combat disease and improve productivity and play a key role in the dissemination of antibiotic resistance genes to the bacteria. Integrons have been identified in resistant bacteria allowing for the acquisition and dissemination of antibiotic resistance genes. STEC strains isolated from humans and animals have developed antibiotic resistance. In our laboratory, 21 non-157 STEC strains isolated from pigs were analyzed to detect class 1 and 2 integrons by PCR. Eight carried integrons, 7 of them harbored *intl2*. In another study 545 STEC strains were also analyzed for the presence of *intl1* and *intl2*. Strains carrying *intl1* belonged to isolates from environment (n=1), chicken hamburger (n=2), dairy calves (n=4) and pigs (n=8). Two strains isolated from pigs harbored *intl2* and only one *intl1/intl2*, highlighting the presence of *intl2* in pigs. The selection for multiresistant strains may contribute to the emergence of antibiotic resistant pathogens and will facilitate the spreading of mobile resistance elements to other bacteria.

**7.4 TRABAJOS TERMINADOS Y AUN NO ENVIADOS PARA SU PUBLICACION. Incluir un resumen de no más de 200 palabras de cada trabajo.**

**16) Alonso, M., Sanz, M., Kruger, A., Lucchesi, P.M.A., Padola, N. L. Serotypes and *stx* subtypes of Shigatoxigenic *Escherichia coli* isolated from chicken derived products**

Shigatoxigenic *Escherichia coli* (STEC) is an important foodborne pathogen related with Public Health that cause hemolytic uremic syndrome (HUS). In the present study, we isolated and characterized STEC strains from chicken derived products.

STEC isolates were obtained from giblet and chicken hamburger samples. Most of them carried the *stx*<sub>2</sub> gene and its variants (*stx*<sub>2vhb</sub>, *stx*<sub>2EDL933</sub> and *stx*<sub>2vha</sub>) associated with severe disease humans and detected with high frequency in isolates from bovine cattle. The isolates corresponded to different serotypes and some of them, like O91:H14, O113:H21, O130:H11 and O178:H19, have also been isolated from patients with diarrhea, hemorrhagic colitis, HUS and cattle in our country. Our results indicate that chicken derived products are important sources of STEC that could be associated with human disease.

**17) Alonso, M., Sanz, M., Kruger, A., Lucchesi, P.M.A., Padola, N. L. Enteropathogenic *Escherichia coli* isolated from chicken and derived product**

Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) is the leading cause of diarrhea in infants less than two years of age. In the present study, EPEC strains from chicken and derived products were characterized and presented a wide variety of serotypes. Some of them have also been reported in other animal species (O2:H40, O5:H40) and in children with diarrhea (O8:H-). Most of them carried intimin  $\beta$  and none carried *bfpA* gene. Our results indicate that chicken and its products are important sources of EPEC strains that could be associated with human disease

**7.5 COMUNICACIONES.** *Incluir únicamente un listado y acompañar copia en papel de cada una. (No consignar los trabajos anotados en los subtítulos anteriores).*

**2012** Padola, N.L., Etcheverría, A.I., Lucchesi, P.M.A., Krüger, A., Sanz, M.E., Fernández, D., Alonso, M.Z., Polifroni, R., Parma, A.E  
Prevalent STEC serotypes isolated from cattle, foods and environment in Argentina  
VTEC 2012 Amsterdam (Holanda), 8th International Symposium on Shiga Toxin (Verocytotoxin) Producing *Escherichia coli* Infections. May 6-9 2012. P-199. Abstract Book p. 204. Resumen en Zoonoses and Public Health, 2012, 59 (Suppl. 1) pág. 81.

Alonso, M.Z.; Parma, A.E; Lucchesi, P.M.A.; Padola, N.L.

Verocytotoxigenic (VTEC) and enteropathogenic (EPEC) *Escherichia coli* presence in chicken and retail products increase from the farm to the market"

VTEC 2012 Amsterdam (Holanda), 8th International Symposium on Shiga Toxin (Verocytotoxin) Producing *Escherichia coli* Infections. May 6-9 2012 P-183. Abstract Book p. 194. Resumen en Zoonoses and Public Health, 2012, 59 (Suppl. 1) pág. 74.

Lucchesi P.M.A.1, Krüger A.1, Padola N.L.2, Etcheverría A.I.2, Sanz M.E.3, Fernández D.1, Alonso M.Z.1, Polifroni R.1, Arroyo G.H.1, Parma A.E.3

Differences in virulence genes frequency among VTEC isolates from cattle, foods and environment

VTEC 2012 Amsterdam (Holanda), 8th International Symposium on Shiga Toxin (Verocytotoxin) Producing *Escherichia coli* Infections. May 6-9 2012. Abstract Book p. 190. Resumen en Zoonoses and Public Health, 2012, 59 (Suppl. 1) pág. 71

Colello; R; Moredo, F.; Etcheverría, A.; Leotta, G.; Parma, A.; Padola; N.

Detection of integrons class 1 and class 2 in STEC strains isolated from pigs

VTEC 2012 Amsterdam (Holanda), 8th International Symposium on Shiga Toxin (Verocytotoxin) Producing *Escherichia coli* Infections. May 6-9 2012

**2012** de la Torre E, Colello R, Padola NL, Etcheverría A, Amanto F, Tapia MO, Soraci A. Detección de integrones en *E. coli* aisladas de cerdos en una granja de la provincia de Buenos Aires. XI Congreso Nacional de Producción Porcina, XVII Jornadas de Actualización Porcina, VI Congreso de Producción Porcina del Mercosur, 14-17 de agosto de 2012, Salta, Argentina.

MOREDO F, SANZ M, ETCHEVERRÍA A, PADOLA NL, QUIROGA MA, PERFUMO CJ, LEOTTA G. *Escherichia coli* productor de toxina Shiga en cerdos sin manifestación clínica de diarrea. XVII Jornadas de Actualización Porcina. XI Congreso Nacional de Producción Porcina. VI Congreso de Producción Porcina del Mercosur, 14-17 de Agosto de 2012, Salta, Argentina.

Brusa V, Aliverti V, Aliverti F, Ortega EE, de la Torre JH, Linares LH, Sanz M, Etcheverría A, Padola NL, Galli L, Peral García P, Leotta GA. Detección, Aislamiento y Caracterización de *Escherichia coli* productor de toxina shiga en carne bovina molida y muestras ambientales de carnicerías de la ciudad de Berisso. Congreso Microal. Buenos Aires, octubre 2012

**2013** DE LA TORRE, E; COLELLO, R; PADOLA, NL; ETCHEVERRÍA, A; AMANTO, F; TAPIA, O; SORACI, A.  
MULTIRESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS Y PRESENCIA DE INTEGRONES EN *E. coli* AISLADAS DE CERDOS EN UNA GRANJA DE LA PROVINCIA DE BUENOS AIRES. 8vas Jornadas Internacionales de Veterinaria Práctica. 10 de agosto, Mar del Plata. Organizada por Colegio Veterinarios de la Prov de Buenos Aires

MJ Ruiz, M Sanz, L Elichiribety, C Villalobo, A Krüger, R Colello, G Arroyo, D Fernández, O Olivera, G Leotta, O López, NL Padola, A Etcheverría  
Carnicerías Saludables: Detección de *Escherichia coli* O157:H7 y no-O157:H7 en carne picada fresca y en instalaciones de comercios minoristas. XII Congreso Argentino de Microbiología. II Congreso de Microbiología Agrícola y Ambiental. Buenos Aires, Argentina

ME Cáceres, A Etcheverría, NL Padola  
Formación de biofilm y expresión de curlis en aislamientos VTEC O157:H7 y O145:H-. XII Congreso Argentino de Microbiología. II Congreso de Microbiología Agrícola y Ambiental. Buenos Aires, Argentina

C Villalobo, L Elichiribety, MJ Ruiz, A Krüger, R Colello, ME Cáceres, G Arroyo, M Sanz, O Olivera, G Leotta, O López, A Etcheverría, NL Padola  
Carnicerías Saludables: determinación de la calidad microbiológica en carne picada fresca y en instalaciones de comercios minoristas. XII Congreso Argentino de Microbiología. II Congreso de Microbiología Agrícola y Ambiental. Buenos Aires, Argentina

## 2013

Castro, A; Catena, M; Monteavaro, C; Padola, N L; Teruel, M  
Orientador para estructurar la integración de la escritura de la Tesina. I Congreso nacional y VI Simposio Virtual Tres T. FCV-UNCPBA. 5 y 6 de septiembre

Colello, R.; Etcheverría, A.I.; Padola, N.L. Un enemigo oculto en nuestros alimentos. Cuarta Jornada de Alimentación de Olavarría. Facultad de Ingeniería. UNCPBA. Olavarría. Octubre, 2013.

Cáceres M.E., Etcheverría A., Polifroni R., Padola N.L. "SUPERVIVENCIA DE BACTERIAS EN EL AMBIENTE". Cuarta Jornada de Alimentación de Olavarría. Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, Argentina. 9 de Octubre 2013.

Ruiz, M. Julia, Padola, Nora Lía, Etcheverría, Analía. Evaluación de indicadores de higiene en carnicerías del partido de Tandil. Cuarta Jornada de Alimentación de Olavarría. Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires. Presentación de póster y publicación en formato digital.

Cáceres M.E, Padola NL, Etcheverría A, Polifroni R. "BIOFILM EN CEPAS VTEC Y EPEC. EFECTOS DE ESTRÉS ÁCIDICO Y TÉRMICO". I Congreso Internacional Científico y Tecnológico de la Provincia de Buenos Aires. Comisión de Investigaciones Científicas, Buenos Aires, Argentina.

### **7.6 INFORMES Y MEMORIAS TECNICAS.** *Incluir un listado y acompañar copia en papel de cada uno o referencia de la labor y del lugar de consulta cuando corresponda.*

-Primer Taller Análisis de Riesgo. *E. coliverotoxigénicas*. SENASA. Invitación y participación en el grupo de expertos. Chivilcoy. Redacción de las memorias técnicas.

-Participación por invitación en la Comisión Interdisciplinaria de STEC-VTEC para el IPCVA (Instituto de Promoción de la carne vacuna Argentina). Se delinearon estrategias de intervención con la presentación de varios módulos multidisciplinarios que tienen como objetivo mejorar la calidad microbiológica de la carne.

## **8. TRABAJOS DE DESARROLLO DE TECNOLOGÍAS.**

**8.1 DESARROLLOS TECNOLÓGICOS.** *Describir la naturaleza de la innovación o mejora alcanzada, si se trata de una innovación a nivel regional, nacional o internacional, con qué financiamiento se ha realizado, su utilización potencial o actual por parte de empresas u otras entidades, incidencia en el mercado y niveles de facturación del respectivo producto o servicio y toda otra información conducente a demostrar la relevancia de la tecnología desarrollada.*

**8.2 PATENTES O EQUIVALENTES.** *Indicar los datos del registro, si han sido vendidos o licenciados los derechos y todo otro dato que permita evaluar su relevancia.*

**8.3 PROYECTOS POTENCIALMENTE TRANSFERIBLES, NO CONCLUIDOS Y QUE ESTAN EN DESARROLLO.** *Describir objetivos perseguidos, breve reseña de la labor realizada y grado de avance. Detallar instituciones, empresas y/o organismos solicitantes.*

Comisión Interdisciplinaria de STEC-VTEC para el IPCVA (Instituto de Promoción de la carne vacuna Argentina). Participación en otros módulos y coordinación del módulo 4: Evaluación de sustancias y microorganismos con efecto probiótico y otros sistemas relevantes de prevención de aplicación pre-faena y faena. Los objetivos están dirigidos a evaluar la condición del bovino como portador de cepas VTEC (O157 y no-O157), para el desarrollo a futuro de estrategias de prevención que aseguren la inocuidad de alimentos y eviten la transmisión de estas cepas al hombre. El módulo se encuentra en la etapa previa a la ejecución, previendo la misma para el segundo semestre del año 2014.

**8.4 OTRAS ACTIVIDADES TECNOLÓGICAS CUYOS RESULTADOS NO SEAN PUBLICABLES** *(desarrollo de equipamientos, montajes de laboratorios, etc.).*

**8.5 Sugiera nombres (e informe las direcciones) de las personas de la actividad privada y/o pública que conocen su trabajo y que pueden opinar sobre la relevancia y el impacto económico y/o social de la/s tecnología/s desarrollada/s.**

**9. SERVICIOS TECNOLÓGICOS.** *Indicar qué tipo de servicios ha realizado, el grado de complejidad de los mismos, qué porcentaje aproximado de su tiempo le demandan y los montos de facturación.*

Desde 2003 soy responsable del Laboratorio de ADN. FCV. UNCPBA (Resolución del HCA N° 153/2003). El Laboratorio de ADN, creado por resolución de HCA N° 116/03 depende de la gestión de la FCV-UNCPBA y realiza servicios para distintas fiscalías en temas referidos a abigeato e identificación genética de animales. Se trabaja por demanda de servicios, por lo que no se puede asegurar un tiempo fijo. El Lab de ADN no factura servicios. Estamos trabajando bajo convenio de colaboración con el IGEVET-UNLP y he sido convocada para dictar conferencias a Fiscales, productores agropecuarios tanto en Argentina como en Paraguay.

## **10. PUBLICACIONES Y DESARROLLOS EN:**

### **10.1 DOCENCIA**

Guía de Trabajos Prácticos de Inmunología Básica, destinada a alumnos de 2° año de la carrera de Veterinaria. La guía consta de 7 trabajos prácticos, contiene también el perfil del curso, los temas de los talleres y consignas de cada taller. Centro de Estudiantes. FCV. UNCPBA

## 10.2 DIVULGACIÓN

### 11. DIRECCION DE BECARIOS Y/O INVESTIGADORES. Indicar nombres de los dirigidos, Instituciones de dependencia, temas de investigación y períodos.

- 2007** Director Beca Doctoral Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica de Lic. Rosana Polifroni: Detección y caracterización genotípica de VTEC Viabiles No cultivables y potencialmente formadoras de biofilms en un tambo de la Cuenca Mar y Sierra. FCV-UNICEN. Co-director: MV Analía Etcheverría
- 2010** Director Beca Posgrado tipo II CONICET de Lic. Rosana Polifroni: Detección y caracterización genotípica de VTEC Viabiles No cultivables y potencialmente formadoras de biofilms en un tambo de la Cuenca Mar y Sierra. FCV-UNICEN. Co-director: MV Analía Etcheverría
- 2011** Director Beca Posdoctoral CONICET del Dr Daniel Fernández. El bovino como reservorio de VTEC. Respuesta del huésped a la colonización gastrointestinal por *E. coli* O157 y no-O157. FCV-UNICEN
- 2011** Director Beca Posgrado Tipo I CONICET de Lic Rocío Colello. Detección y caracterización molecular de bacterias implicadas en enfermedades transmitidas por alimentos en la cadena productiva porcina. FCV-UNICEN
- 2013** Director Beca Estudio CIC-PBA María Emilia Cáceres. Formación de Biofilm en cepas VTEC y EPEC de distinto origen sometidas a distintas condiciones de estrés ácido y térmico. FCV-UNCPBA.
- 2014** Director Beca Posgrado Tipo II CONICET de Lic Rocío Colello. Detección y caracterización molecular de bacterias implicadas en enfermedades transmitidas por alimentos en la cadena productiva porcina. FCV-UNICEN

#### Co-dirección de becas

- 2006** Co-director Beca Doctoral CONICET de MV Daniel Fernández. “Estudios de la ecología de *Escherichia coli* verocitotoxigénico en rodeos lecheros de la Cuenca Mar y sierras. Su rol como contaminante de la leche y del medio ambiente. FCV-UNICEN. Director: Dr Alberto Parma
- 2006** Co-director Beca Doctoral de CONICET de MV Mónica Alonso. Caracterización genotípica de *Escherichia coli* verocitotoxigénica (VTEC) y *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) aisladas de pollo y alimentos derivados. FCV-UNICEN. Director: Dra Paula Lucchesi
- 2009** Co-director Beca Posgrado tipo II CONICET de MV Daniel Fernández. “Estudios de la ecología de *Escherichia coli* verocitotoxigénico en rodeos lecheros de la Cuenca Mar y sierras. Su rol como contaminante de la leche y del medio ambiente. FCV-UNICEN. Director: Dr Alberto Parma
- 2010** Co-director Beca Posgrado tipo II CONICET MV Mónica Alonso. Caracterización genotípica de *Escherichia coli* verocitotoxigénica (VTEC) y *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) aisladas de pollo y alimentos derivados. FCV-UNICEN. Director: Dra Paula Lucchesi
- 2014** Co-director Beca Posgrado Tipo I CONICET de Lic María Julia Ruiz. Aislamiento y caracterización de *Lactobacillus* spp. con actividad inhibitoria de bacterias implicadas en enfermedades transmitidas por alimentos. Aplicación en planta faenadora de carne porcina.

FCV-UNICEN

**12. DIRECCION DE TESIS.** *Indicar nombres de los dirigidos y temas desarrollados y aclarar si las tesis son de maestría o de doctorado y si están en ejecución o han sido defendidas; en este último caso citar fecha.*

Director de la Tesis Doctoral de MV Daniel Fernández. “Estudios de la ecología de *Escherichia coli* verocitotóxico en rodeos lecheros de la Cuenca Mar y sierras. Su rol como contaminante de la leche y del medio ambiente. Doctorado en Ciencia Animal. FCV-UNICEN. Calificación 10/10. Defensa 22 de marzo de 2011.

Director Tesis Doctoral MV Mónica Alonso. Caracterización genotípica de *Escherichia coli* verocitotóxica (VTEC) y *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) aisladas de pollo y alimentos derivados. Doctorado en Ciencia Animal. FCV-UNICEN. Calificación 10/10. Defensa: 16 de octubre de 2012

Director de la Tesis Doctoral de Lic Rosana Polifroni. Detección y caracterización genotípica de *Escherichia coli* verocitotóxico (VTEC) viables no cultivables (VNC) y potencialmente formadoras de biofilms en muestras de medio ambiente de tambo. “Doctorado en Ciencia Animal. FCV-UNICEN. Calificación 10/10. Defensa 21 de agosto de 2012

Codirector Tesis Doctoral de Lic Rocío Colello. Detección y caracterización molecular de bacterias implicadas en enfermedades transmitidas por alimentos en la cadena productiva porcina. Doctorado en Ciencia Animal. FCV-UNICEN

**13. PARTICIPACION EN REUNIONES CIENTIFICAS.** *Indicar la denominación, lugar y fecha de realización, tipo de participación que le cupo, títulos de los trabajos o comunicaciones presentadas y autores de los mismos.*

Los Congresos fueron informados en el punto 7.5.

Curso de Acreditación de Médicos Veterinarios para el Programa Nacional de Control y Erradicación de la Tuberculosis bovina.

Resolución HCA N° 042/04. Disertante por el área de Inmunología. Tandil, 18 y 19 de octubre. 2012

Especialización en Seguridad Alimentaria. Módulo Bacterias patógenas: *E. coli* O157:H7 y no-O157: Situación Epidemiológica. Fac. Cs VEt. UNLP-Junio 2012

Especialización en Seguridad Alimentaria. Módulo Bacterias patógenas: *E. coli* O157:H7 y no-O157: Situación Epidemiológica. Fac. Cs VEt. UNLP-Junio 2013

8vas Jornadas Internacionales de Veterinaria Práctica

Conferencia: STEC O157 y no-O157: epidemiología. 10 de agosto, Mar del Plata. Organizada por Colegio Veterinarios de la Prov de Buenos aires

Workshop La Microbiología más allá del laboratorio: Experiencias de microbiólogos exitosos.

Disertación: ***Experiencias de una editora de revistas científicas***

XXXV Congreso Chileno de Microbiología- 26 de noviembre, Maintencillo, Chile.

Simposio1. Latin American Coalition for *Escherichia coli* Research (LACER)

Disertación: *E. coli* productora de toxina Shiga: Pasado, Presente y Futuro. XXXV Congreso Chileno de Microbiología- 26 al 30 de noviembre, Maintencillo, Chile.

**14. CURSOS DE PERFECCIONAMIENTO, VIAJES DE ESTUDIO, ETC.** *Señalar características del curso o motivo del viaje, período, instituciones visitadas, etc.*

**2012.** Viaje a Amsterdam, Holanda al Congreso VTEC 2012 y reunión con el coordinador del Grupo LACER, del cual soy miembro.

**2013.** Viaje a Santiago de Chile al XXXV Congreso Chileno de Microbiología, como disertante invitada. Además se realizaron reuniones de los miembros del Grupo LACER para coordinar futuros trabajos en cooperación.

**15. SUBSIDIOS RECIBIDOS EN EL PERIODO.** *Indicar institución otorgante, fines de los mismos y montos recibidos.*

2012-13 PICT-2010-1655. Estudio comparativo de Escherichia coli verocitotoxigénicos (VTEC) en reservorios, alimentos y humanos. Adjudicado FONCyT. Responsables: Dra Nora Lía Padola \$320000

PICTO CIN II Prevención de Enfermedades Transmitidas por Alimentos: determinación de la calidad microbiológica y aislamiento de Salmonella sp Escherichia coli O157:H7 y no-O157 en carne picada fresca destinada a consumo minorista PICTO-2010-0082. Responsable Dr G. Leotta., Nora Lía Padola, Analía Etcheverría. \$ 200000

Escherichia coli verocitotoxigenico  
01-01-012 al 31/12/14  
Director: Nora Lía Padola  
Codirector: Analía Etcheverría

2011-2013 Subsidios Institucional para Investigadores CIC. CIC-PBA\$3600- \$5600 \$6000

Subsidio para Asistencia de Reuniones Científicas y Tecnológicas.“VTEC 2012 - 8th International Symposium on Shiga toxin (Verocytotoxin) producing Escherichia coli Infections”.- Acta N° 1352. CIC-PBA \$7500

PICT 2012 2398 RIESGO POTENCIAL DE RESISTENCIA BACTERIANA RELACIONADO CON EL USO DE ANTIBIÓTICOS EN GRANJAS DE PRODUCCION INTENSIVA DE CERDOS.Director: Dr Alejandro Soraci

**16. OTRAS FUENTES DE FINANCIAMIENTO.** *Describir la naturaleza de los contratos con empresas y/o organismos públicos.*

**17. DISTINCIONES O PREMIOS OBTENIDOS EN EL PERIODO.**

Guest Associate Editor. Journal Frontiers in Cellular and Infection Microbiology

**18. ACTUACION EN ORGANISMOS DE PLANEAMIENTO, PROMOCION O EJECUCION CIENTIFICA Y TECNOLÓGICA.** *Indicar las principales gestiones realizadas durante el período y porcentaje aproximado de su tiempo que ha utilizado.*

2011-2013-

2013-2015 Jefe de Departamento SAMP-FCV-UNCPBA.

2010-y sigo Miembro de LACER (Latin American Coalition for Escherichia coli Research)

2011 y sigo Miembro del Comité Académico de la Especialización en Seguridad Alimentaria. Facultad de Ciencias Veterinarias-UNLP.

Miembro ONG luSUH (lucha contra el síndrome urémico hemolítico)

**19. TAREAS DOCENTES DESARROLLADAS EN EL PERIODO.** *Indicar el porcentaje aproximado de su tiempo que le han demandado.*

Curso Inmunología Básica- cuatrimestral (2º año de la Carrera de Medicina Veterinaria)

Curso Inmunología Especial -Bimestral (4º año de la Carrera Medicina Veterinaria)

Estos cursos se dictan durante el primer cuatrimestre, dedicándole el 25% aproximadamente de mi tiempo.

(11 h/ semana)

Curso de Biotecnología Molecular, para el Doctorado en Ciencia Animal. (Categ. A, CONEAU). RHCA 101/01. 01/10/2001. Este curso es obligatorio del Doctorado en Ciencia Animal y se dicta cada dos años.

Clases dictadas: Aplicaciones de la biología molecular en las prácticas forenses. Determinación de perfiles genéticos en bovinos. Aplicaciones en Producción Animal.

Sistema Inmunitario y Vacunas recombinantes

**20. OTROS ELEMENTOS DE JUICIO NO CONTEMPLADOS EN LOS TITULOS ANTERIORES.** *Bajo este punto se indicará todo lo que se considere de interés para la evaluación de la tarea cumplida en el período.*

**2012** Evaluador Tesis de Grado para optar al título de Licenciado en Tecnología de los Alimentos de Virginia Rodrigue z Coronel. Tema: Tema: Detección de fagos de cepas de *Escherichia coli* verotoxigénico (VTEC) aisladas de alimentos cárnicos. Fecha de defensa: 24 de mayo de 2012.

**2012** Evaluador Tesina de Grado de la Carrera de Medicina Veterinaria del Alumno Federico Conde. Tema: Isoeritrolisi Neonatal en Potrillos. Defensa: 15/10/2012

**2013** Evaluador Tesina de Grado de la Carrera de Medicina Veterinaria del Alumno Eugenia Farizano. Tema: Caso clínico de pénfigo foliáceo. Defensa: 12 de diciembre.

**2013** Evaluador Tesina de Grado de la Carrera de Medicina Veterinaria del Alumno Franco Fiorani. Tema: Inoculación intradérmica de un lisado de taquizoítos de *Neospora caninum* en hembras bovinas. Defensa 12 de diciembre

**2012** Evaluador del Manuscrito ID Ref.12/052 para Comité Editorial de Revista Argentina de Microbiología

**2012** Evaluador del Manuscrito AJMR 12-1583 para Comité Editorial de African Journal of Microbiology

- 2012 Evaluador del Manuscrito PAD 12-08-0195 para Comité Editorial de FEMS Pathogens and Disease
- 2012 Evaluador del Manuscrito PONE-D-12-25481 para Comité Editorial de Plos ONE
- 2013 Evaluador del Manuscrito PAD -12-08-0195.R1 para Comité Editorial de FEMS Pathogens and Disease
- 2013 Evaluador del Manuscript Ref.13/013 para Comité Editorial de Revista Argentina de Microbiología
- 2013- Evaluador del manuscrito RCB-19-44 EV-1 para el Comité Editorial de la Revista Colombiana de Biotecnología.
- 2013 Evaluación manuscrito para el Comité Editorial de la Revista Veterinaria y Zootecnia-Colombia

## 21. TITULO Y PLAN DE TRABAJO A REALIZAR EN EL PROXIMO PERIODO.

*Desarrollar en no más de 3 páginas. Si corresponde, explicita la importancia de sus trabajos con relación a los intereses de la Provincia.*

### CICLO ECOLOGICO DE ESCHERICHIA COLI VEROCITOTOXIGÉNICO: RESERVORIOS, MEDIO AMBIENTE Y ALIMENTOS

Director: Padola, Nora Lía Prof. Adjunto Iqca y Biotcnol- Invest Adj CIC-PBA

Codirector: Etcheverría, Analía Prof. Adjunto Iqca y Biotcnol- CIC

Hemos demostrado que en Argentina los serotipos VTEC están ampliamente distribuidos entre los bovinos. El conocimiento de cómo actúan estas cepas en los animales, principalmente aquellas EHEC no-O157 de las que no hay investigaciones realizadas, permitirá ver qué factores intervienen en la colonización en el ganado. Dada la severidad de los síntomas y la frecuencia de secuelas renales y neurológicas, el SUH tiene un gran impacto social y existe una importante demanda para el desarrollo de un tratamiento o de estrategias de prevención. La disminución del riesgo de la transmisión de este patógeno humano contribuirá a evitar los altísimos costos económicos que conlleva la atención y tratamiento de los niños afectados y que es de aproximadamente 7 millones de pesos (datos correspondientes a 300 casos en el 2005). Actualmente, el Ministerio de Salud ha informado que cada año se producen más de 400 casos nuevos. Este proyecto contempla la investigación sobre aspectos integrales y específicos de la epidemiología de VTEC en animales. Los estudios en bovinos y pollos acerca de la colonización, y rol de la toxina en la patogenia del bovino permitirá elaborar estrategias para intervenir en una de las etapas de la cadena epidemiológica y así disminuir la transmisión de estos patógenos al hombre, disminuyendo de esta manera la posibilidad de contraer la enfermedad al ingerir alimentos contaminados.

#### Objetivos

-General: Estudiar factores ecológicos en cepas VTEC aisladas de reservorios, medio ambiente y alimentos, que influyan en la colonización de los animales, en la supervivencia en el medio ambiente formando biofilms o bajo formas de estrés y en la contaminación a lo largo de distintos puntos de la cadena de producción-comercialización. Este objetivo permitirá generar estrategias de prevención para disminuir los riesgos en la salud pública.

#### -Específicos:

- Determinar la presencia de Escherichia coli O157 y no-O157 en cerdos en las distintas etapas de producción y en el producto final a nivel de boca de expendio minorista,
- Determinar por PCR factores de adherencia y colonización en cepas VTEC aisladas de bovinos, pollos, porcinos, medio ambiente y alimentos.
- Determinar en las bacterias aisladas y sometidas a diferentes tipos de estrés, la capacidad potencial de formar biofilms.
- Caracterizar las cepas aisladas por la presencia de genes de resistencia a antimicrobianos de importancia en salud pública.
- Estudiar la viabilidad y persistencia de VTEC en muestras de agua y materia fecal mediante estudios in vitro.

- Evaluar la eliminación intermitente en bovinos de distintos sistemas de producción.
- Estudiar la adherencia de las cepas seleccionadas (O157:H7 y no-O157) y de verocitotoxinas purificadas a explantos de distintas regiones de intestino bovino y de pollos.

La selección de las cepas se realizará teniendo en cuenta los factores de virulencia y de colonización.

- Determinar la presencia de anticuerpos con actividad neutralizante anti soma bacteriano y anti-verocitotoxina en suero de bovinos naturalmente infectados con VTEC.

Para cumplir con los objetivos:

- 1) Determinar la presencia de *Escherichia coli* O157 y no-O157 en cerdos en las distintas etapas de producción y en el producto final a nivel de boca de expendio minorista.

Se tomarán muestras en:

- Criadero: materia fecal por hisopado rectal para cada una de las categorías, instalaciones: 50 ml de agua de bebederos, 25 g del alimento de los comederos
- Frigorífico: Se tomarán muestras mediante hisopados de medias reses e instalaciones (bandejas, cuchillos, mesadas) según el Reglamento (CE) N° 2073/2005 de la Comisión de 15 de noviembre de 2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios (Diario Oficial de la Unión Europea L 338/1).
- Boca de expendio: Se tomarán muestras de hisopos de instalaciones, utensilios, cortes de carne fresca y productos finales como por ejemplo embutidos secos según el Reglamento (CE) N° 2073/2005 de la Comisión de 15 de noviembre de 2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios (Diario Oficial de la Unión Europea L 338/1).

Metodología

Se utilizará PCR para realizar un tamizaje de vt a partir de la zona confluyente de los cultivos bacterianos. A las muestras vt positivas se les realizará PCR para detectar el gen eae específico de *E. coli* O157 y a las positivas a este factor, se les realizará separación inmunomagnética para aislar *E. coli* O157. De esta manera, no se ejercerá presión de selección, pues de las muestras vt positivas pero negativas a O157, se podrán aislar serotipos no-O157 (Padola y cols., 2002; 2004; Parma y cols., 1996; 2000; Sanz y cols., 1998). Los factores de virulencia (vt1, vt2, eae, saa, ehxA) de los aislamientos se determinarán utilizando PCR multiplex (Paton y Paton, 2002) y luego se serotificarán mediante las técnicas de aglutinación en placa mediante el empleo de antiseros O específicos y aglutinación en tubo para antígeno H.

- 2) Determinar por PCR factores de adherencia y colonización en cepas VTEC aisladas de bovinos, pollos, porcinos, medio ambiente y alimentos.

Se analizarán las cepas VTEC aisladas y caracterizadas previamente para poner a punto las técnicas de PCR que permitan detectar genes codificantes de adhesinas putativas (Ipf, lifA, iha) y para adhesinas fimbriales y afimbriales (afa 8, F17, cs31A) según Szalo y cols. (2002), Efa 1 según Stevens y cols. (2002), Sab según Herold y cols. (2009), AIDA (aah y AIDA-I) (Nierwerth y cols., 2001), fim, agn43 y agn43 EDL933 (Brandt et al., 2011 y Biscola et al., 2011).

- 3) Determinar en las bacterias aisladas y sometidas a diferentes tipos de estrés, la capacidad potencial de formar biofilms

En las VTEC aisladas se detectará la presencia de la fimbria curli mediante la implementación y puesta a punto de una reacción de PCR para detectar los genes que codifican proteínas para las subunidades de curlina (csgA) y el regulador transcripcional (csgD) y del regulador indirecto de la expresión de csgA (crl). Debido a que es importante no sólo detectar los genes codificantes de la fimbria involucrada en la formación de biofilms, sino también evaluar su producción, se utilizará una metodología basada en el cultivo de las cepas en agar Luria Bertani modificado (sin NaCl) suplementado con rojo Congo y azul brillante G de Coomassie. Los resultados se basan en el análisis visual de las placas incubadas a 37° C durante 24 hs. y a 28° C por 5 días. Un resultado positivo se da cuando la colonia bacteriana presenta una coloración rosada, violácea o roja (+, ++, +++). Se interpreta un resultado como negativo cuando la colonia permanece blanca (-) (Bokranz y cols., 2005; Robbe-Saule y cols., 2006; Ryu y Beuchat, 2005). Posteriormente, se reproducirán biofilms sobre superficies inertes como placas de poliestireno, utilizando la técnica desarrollada por Robbe-Saule y cols., 2006 y Urlich y cols., 2006). Para evaluar la formación de biofilms bajo distintas condiciones de estrés, se seleccionarán 30 cepas no-O157 y 5 O157 que se someterán a diferentes condiciones de acidez (pH ácido y pH básico) y estrés térmico (5°C y

54°C) (Molina et al.; 2003) para evaluar la expresión de la fimbria curli mediante placas de Rojo Congo y la posterior producción de biofilm en placas de poliestireno. Este ensayo se realizará por triplicado y en eventos independientes para cada una de las cepas seleccionadas y para cada situación de estrés.

- 4) Caracterizar las cepas aisladas por la presencia de genes de resistencia a antimicrobianos de importancia en salud pública.

En las cepas VTEC aisladas se detectará la presencia de los integrones mediante la implementación y puesta a punto de una reacción de PCR para detectar los genes de los integrones de clase 1 (intl1), clase 2 (intl2), clase 3 (intl3) según metodología descrita por Rosser et al. (1999), Oman et al. (2002), Shibata et al. (2003), respectivamente.

- 5) Estudiar la viabilidad y persistencia de VTEC en muestras de agua y materia fecal mediante estudios in vitro.

Se inoculará agua de bebederos de animales previamente autoclavada con *E. coli* O157:H7 resistente a ácido nalidíxico (50 µg/ml) a una concentración final de 10<sup>3</sup> UFC ml<sup>-1</sup> y en otra matriz con una cepa VTEC no-O157 también resistente a ácido nalidíxico. El mismo procedimiento se realizará con muestras de materia fecal bovina (negativas a VTEC)

Se tomarán muestras a intervalos regulares y se realizarán:

- Conteo de viabilidad mediante el recuento en placas a partir de diluciones estándares en Agar MacConkey sorbitol con ácido nalidíxico.
- Detección de bacterias totales y bacterias viables mediante la utilización del kit Live/Dead BacLight Bacterial Viability Test (Invitrogen). Este kit permite distinguir bacterias con su membrana intacta (coloración verde) de aquellas bacterias que tienen su membrana dañada (coloración roja).
- Determinación de la recuperación mediante la siembra en placas de agar Luria Bertani modificado con 0,1% de piruvato de sodio (m/m) (Mizunoe y cols., 1999). Este reactivo permite a las bacterias estresadas recuperar su condición de crecer en medios de cultivo. Si bien los resultados de otros investigadores son controvertidos, consideramos útil la información que esta técnica aporta.
- PCR directo en simultáneo con PCR previo enriquecimiento de la muestra.

- 6) Evaluar la eliminación intermitente en bovinos de distintos sistemas de producción.

Se tomarán muestras cada 15 días a animales de distinto sistema productivo (feedlot, tambo y pastoreo) y se utilizará la metodología descrita en el punto 1.

- 7) Estudiar la adherencia de las cepas seleccionadas (O157:H7 y no-O157) y de verocitotoxinas purificadas a explantos de distintas regiones de intestino bovino y de pollos.

Determinar la presencia de anticuerpos anti soma bacteriano y anti-verocitotoxina en suero de bovinos naturalmente infectados con VTEC. Para el estudio de la interacción de VTEC con células intestinales se utilizará la técnica gold estándar de adherencia a explantos bovinos según Baehler y cols (2000) y Girard y cols. (2007). Se utilizará para cada cepa (O157 y no-O157) el anticuerpo primario serotipo-específico y se realizará la técnica de peroxidasa antiperoxidasa, utilizando un segundo anticuerpo anti-conejo marcado (Alzola y cols., 2004). Este mismo ensayo se realizará con 35 sueros de bovinos naturalmente infectados que fueron detectados por PCR como positivos a distintos serotipos de VTEC (Padola y cols, 2004). Los sueros corresponden a animales que habían sido detectados positivos a uno o más serotipos en 10 muestreos previos y animales que siempre fueron negativos. Para determinar la presencia y localización de la verocitotoxina en los explantos se utilizará una técnica de inmunohistoquímica, utilizando la subunidad B de VT2 purificada y en un ensayo paralelo la toxina VT2 completa clonada. Se revelará ambas presencias con anticuerpos monoclonales anti VT2. La presencia de anticuerpos antitoxina en suero de animales naturalmente infectados se realizará utilizando la técnica anteriormente descrita utilizando un segundo anticuerpo marcado.

---

**Condiciones de la presentación:**

- 
- A. El Informe Científico deberá presentarse dentro de una carpeta, con la documentación abrochada y en cuyo rótulo figure el Apellido y Nombre del Investigador, la que deberá incluir:
- Una copia en papel A-4 (puntos 1 al 21).
  - Las copias de publicaciones y toda otra documentación respaldatoria, en otra carpeta o caja, en cuyo rótulo se consignará el apellido y nombres del investigador y la leyenda "Informe Científico Período .....".
  - Informe del Director de tareas (en los casos que corresponda), en sobre cerrado.
- B. Envío por correo electrónico:
- Se deberá remitir por correo electrónico a la siguiente dirección: [infinvest@cic.gba.gob.ar](mailto:infinvest@cic.gba.gob.ar) (puntos 1 al 21), en formato .doc zipeado, configurado para papel A-4 y libre de virus.
  - En el mismo correo electrónico referido en el punto a), se deberá incluir como un segundo documento un currículum resumido (no más de dos páginas A4), consignando apellido y nombres, disciplina de investigación, trabajos publicados en el período informado (con las direcciones de Internet de las respectivas revistas) y un resumen del proyecto de investigación en no más de 250 palabras, incluyendo palabras clave.
- C. Sistema SIBIPA:
- Se deberá petitionar el informe en la modalidad on line, desde el sitio web de la CIC, sistema SIBIPA (ver instructivo).

---

**Nota:** El Investigador que desee ser considerado a los fines de una promoción, deberá solicitarlo en el formulario correspondiente, en los períodos que se establezcan en los cronogramas anuales.