

CARRERA DEL INVESTIGADOR CIENTÍFICO Y TECNOLÓGICO
Informe Científico¹

PERIODO ²: 2014-2015

1. DATOS PERSONALES

APELLIDO: PADOLA

NOMBRES: NORA LIA

2. TEMA DE INVESTIGACION

*ESCHERICHIA COLI VEROCITOTOXIGÉNICO: CARACTERIZACIÓN
MOLECULAR Y CONTROL EN RESERVORIOS Y ALIMENTOS*

3. DATOS RELATIVOS A INGRESO Y PROMOCIONES EN LA CARRERA

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

PROMOCION: Categoría: Adj s/d desde fecha: 30/11/2012

PROMOCION: Categoría Independiente desde fecha 4/05/2015

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

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

² 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.

En el período 2014-2015 desarrollé las siguientes actividades cuya justificación detallo:

Las altas prevalencias de Escherichia coli productor de toxina shiga (STEC) encontradas en distintas categorías de bovinos de tambo, y la menor prevalencia de STEC 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 en bajo mi dirección 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. Se están subtipificando genéticamente las cepas STEC del cepario con factores de virulencia adicionales para estudiar qué incidencia tendrían en la formación de biofilms, que son comunidades bacterianas que se adhieren a superficies inertes, tema particularmente importante pues hemos detectado una alta contaminación del ambiente de las carnicerías incluyendo picadoras, mesadas y cuchillas.

Hemos comprobado el rol del bovino y del medio ambiente como reservorios de STEC no sólo del serotipo O157:H7 sino también 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 cerdo. Actualmente, dirijo otra Becaria de CONICET (soy codirectora de la Tesis Doctoral que será defendida en junio de 2016) que tiene como objetivo determinar la presencia de STEC y Salmonella, en criaderos de cerdos y 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, colaboración que se ha plasmado en publicaciones internacionales. La Lic Colello ha obtenido una beca posdoctoral de CONICET de la cual soy Directora.

En 2010 el Dr Alfredo Torres, de la Universidad de Texas (USA) organizó LACER (Latin American Coalition for Escherichia coli Research) de la 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. En el año 2014 se planificó la publicación de un libro, el cual está siendo editado actualmente: Escherichia coli in the Americas, siendo autora junto con las Dras Etcheverría, Bentancor, Lucchesi y Kruger del capítulo 7: E. coli in animals. Soy coordinadora de la mesa redonda del Simposio LACER: Serotipos/Genotipos de Escherichia coli patógena emergentes en animales, alimentos, ambiente y humanos a desarrollarse en el marco del XXIII Congreso Latinoamericano de Microbiología a desarrollarse en Rosario en setiembre de 2016.

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. En diciembre de 2015 realizó una pasantía la Lic Natalia Rojas (que cursa la Maestría en el Instituto de Ciencias de la Salud de Asunción) para afianzar los conocimientos y metodologías en lo referente al procesamiento microbiológico de STEC en alimentos.

Nuestro laboratorio posee un cepario de 600 cepas STEC, 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.

Actualmente se está trabajando en nuestro grupo en bacterias probióticas que disminuyen la eliminación de VTEC en bovinos y que es de importancia previo a faena, proyecto de la Dra Etcheverría que aisló las bacterias probióticas durante su Tesis Doctoral. El proyecto con bovinos y que contempla ensayos in vivo obtuvo el segundo premio de SENASA en la convocatoria 2014. Actualmente se están realizando los ensayos en un campo experimental de SENASA en la localidad de Azul. Dentro de las medidas de control hay

una Tesis Doctoral (Lic María Julia Ruiz) que se focaliza en el estudio de la actividad inhibitoria de *Lactobacillus* y *E. coli* sobre bacterias productoras de ETAs, para ser utilizadas sobre alimentos y otra Tesis Doctoral (Lic Mauro García) que se abocará a la purificación de bacteriocinas y productos metabólicos inhibitorios de STEC y *Salmonella* y de las cuales soy codirectora.

He sido convocada como experta para formar parte de la Comisión STEC del Instituto de Promoción de la carne vacuna argentina (IPCVA) para delinear estrategias que eviten la contaminación de la carne, particularmente en ganado en pie y en alimentos. Hoy nuestro país está sufriendo la devolución por parte de la Unión Europea de containers con carne argentina contaminada, con pérdidas millonarias para los frigoríficos y los productores pecuarios.

La discusión en el mundo es si todas las cepas STEC son patógenas y qué métodos de diagnóstico usar. Hemos sido pioneros en utilizar métodos de diagnóstico no selectivos y estamos trabajando con otros grupos para la modificación del Código Alimentario Argentino, formando parte de la Comisión de Criterios microbiológicos de CONAL.

Formo parte de LACER (Latinoamerican Coalition for *Escherichia coli* Research) y en el marco de LACER fui invitada a dictar dos conferencias en el Congreso Chileno de Microbiología. A Partir de allí, estamos trabajando en cooperación con el grupo del Dr Roberto Vidal de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Chile quien ha trabajado durante los últimos 8 años en la caracterización de STEC aisladas de pacientes y alimentos incluyendo el desarrollo de nuevas metodologías, caracterización de genes de virulencia, uso de métodos moleculares para determinar la similitud genética y el estudio de nuevos inmunógenos con amplia experiencia en inmunoproteómica. El Dr Vidal ha identificado un grupo de genes con funciones de adherencia y autoagregación, ubicados en una estructura en mosaico y que podría constituir un nuevo mecanismo de colonización utilizado por cepas de STEC LEE-negativas. Los bovinos son reservorios de estas cepas, y hay casos de enfermedad producidas por ellas. Sin embargo, no se han esclarecido los mecanismos de colonización de estas cepas en humanos ni en reservorios, ni tampoco existen criterios microbiológicos que permitan su identificación y control contemplando la identificación de esta novel isla de patogenicidad en bovinos y la detección de anticuerpos en sueros bovinos contra nuevos antígenos por inmunoproteómica. Este proyecto forma parte de la beca posdoctoral de CONICET de rocío Colello que comienza en junio de 2016.

Miembros del laboratorio y padres de niños afectados de SUH formamos parte de luSUH filial Tandil que tiene como objetivo difundir las medidas de prevención a través de charlas en las escuelas y jardines, con folletos y en la prensa. Hemos contribuido con nuestros resultados de grupo a enfatizar que no es sólo la carne picada el alimento por el cual se transmite la enfermedad sino el contacto directo con los animales, medio ambiente, contaminación cruzada, haciendo énfasis en la correcta manipulación de alimentos.

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

7.1 PUBLICACIONES.

1) Polifroni, R; Etcheverría, A; Padola, NL. (2014) Supervivencia de VTEC O157 y no-O157 en agua de bebederos y materia fecal de bovinos. Revista Argentina de Microbiología, 46: 126-132

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.

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

2) Alonso; M; Sanz, M; Padola, NL; Lucchesi, PMA. (2014) Caracterización de cepas *Escherichia coli* enteropatógeno (EPEC) aisladas en diferentes etapas del proceso de faena de pollos. Revista Argentina de Microbiología, 46: 122-125

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.

La planificación del trabajo experimental y la escritura de la publicación se realizó en conjunto con la Dra Lucchesi en el marco de una beca del CONICET y la Tesis Doctoral respectivamente.

**3) Eulalia de la Torre; Rocío Colello; Nora Lía Padola; Analía Etcheverría; Edgardo Rodríguez, Fabián Amanto; María Ofelia Tapia; Alejandro Luis Soraci. (2014) Detection of integrase gene in *E. coli* isolated from pigs at different stages of production system. International Journal of Microbiology. Volume 2014, Article ID 489569, 7 pages
<http://dx.doi.org/10.1155/2014/489569>.**

Integrases 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 integrases 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.

Mi contribución al trabajo fue la planificación experimental de la detección de integrones y selección de cepas, y la escritura y corrección del manuscrito. Este trabajo forma parte de un proyecto que se realiza en conjunto con el Dr Soraci y forma parte de un PICT 2012.

4) Padola NL. (2014) Advances in detection methods for Shiga toxin –producing *Escherichia coli* (STEC). Frontiers Commentary Article. doi: 10.3389/fmicb.2014.00277.

A commentary on Detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in ground beef using Genedisc real-time PCR system by Fratamico, P.M., and Bagi, L.K. (2012). *Front. Cell Infect. Microbiol.* 2:152. doi: 10.3389/fcimb.2012.00152

Debido a que soy Editor Asociado de Frontiers, me solicitaron que publicara un comentario sobre un artículo que había editado. Frontiers Commentary es evaluado por expertos antes de su publicación.

5) PadolaNL and EtcheverríaAI (2014) Shigatoxin producing *Escherichia coli* in human, cattle, and foods. Strategies for detection and control. Front. Cell. Infect. Microbiol. 4:89. doi:10.3389/fcimb.2014.00089

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in human, cattle, and foods. Strategies for detection and control Nora L. Padola* and Analía I. Etcheverría

*Correspondence: nlpadola@vet.unicen.edu.ar

Edited and reviewed by: Yousef Abu Kwaik, University of Louisville School of Medicine, USA

Keywords: STEC, cattle, food, environment, virulence factors

Como editores del e-book correspondiente, se solicitó que escribiéramos la Editorial del ebook, que también es editada y revisada por expertos.

6) Eulalia de la Torre, Rocío Colello, Daniel Fernández, Analía Etcheverría, José Di Conza, Gabriel O. Gutkind, María Ofelia Tapia, Susana N. Dieguez, Alejandro Luis Soraci, Nora Lía Padola (2015) Multidrug resistance in *E. coli* carrying integrons isolated from a farm pig with moderate antibiotic use. The Journal of General and Applied Microbiology.

The emergence and dissemination of antimicrobial resistance in bacteria derived from food-producing animals is a consequence of intensive agricultural and veterinary use of antimicrobial compounds. The inappropriate use and prescribing of antibiotics, along with their use as growth promoters, is the main cause of the development of resistance. The potential risk of the transfer of this resistance through the food chain by bacteria such as *Escherichia coli* (*E. coli*), including food borne pathogens such as Shiga toxin-producing *E. coli*, implies a problema for public health (van den Bogaard and Stobberingh, 2000). Horizontal gene transfer is an important route of the dissemination.

Integrons are genetic elements able to capture gene cassettes encoding antibiotic resistance from the environment and incorporate them by site-specific recombination. Integrons are gene-capture and expression systems characterized by the presence of an *intI* gene encoding an integrase, a recombination site (*attI*), and a promoter. The most frequently reported mobile integrons are class 1 and class 2 integrons, which have been shown to contribute to the spread of antimicrobial resistance genes.

Mi contribución al trabajo fue la planificación experimental de la detección de integrones y selección de cepa y la escritura y corrección del manuscrito. La caracterización de las regiones variables se realizó en el marco de la colaboración con el grupo del Dr Gutkind. Este trabajo forma parte de un proyecto que se realiza en conjunto con el Dr Soraci y forma parte de un PICT 2012.

7) Natalia Angel Villegas, José Baronetti, Inés Albesa, Analía Etcheverría, M. Cecilia Becerra, Nora L. Padola, M. Gabriela Paraje. (2015) Effect of antibiotics on cellular stress generated in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 and non-O157 biofilms. Toxicology in Vitro 29 1692–1700.

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) are important food-borne pathogens, with the main virulence factor of this bacterium being its capacity to secrete Shiga toxins (Stxs). Therefore, the use of certain antibiotics for the treatment of this infection, which induces the liberation of Stxs, is controversial. Reactive oxygen and nitrogen species are also involved in the pathogenesis of different diseases. The purpose of this study was to analyze the effects of antibiotics on biofilms of STEC and the relationships between cellular stress and the release of Stx. To this end, biofilms of reference and clinical strains were treated with antibiotics (ciprofloxacin, fosfomicin and rifaximin) and the production of oxidants, the antioxidant defense system and toxin release were evaluated. Ciprofloxacin altered the prooxidant-antioxidant balance, with a decrease of oxidant metabolites and an increase of

superoxide dismutase and catalase activity, being associated with high-levels of Stx production. Furthermore, inhibition of oxidative stress by exogenous antioxidants was correlated with a reduction in the liberation of Stx, indicating the participation of this phenomenon in the release of this toxin. In contrast, fosfomicin and rifaximin produced less alteration with a minimal production of Stx. Our data show that treatment of biofilm-STEC with these antibiotics induces oxidative stress-mediated release of Stx.

Participé en la caracterización de las cepas y en la corrección del manuscrito. El trabajo es parte de la colaboración con el grupo de la Dra Paraje.

8) Cecilia Cundon · Edith Marey · Fernanda Roldán · Clotilde S. Canosa Montero · Armando Navarro · Nora Lia Padola · Pilar Gadea · Ximena Blanco Crivelli · Jessica Babich · Daniela Rocchi · María Cecilia Kiernicki · Susana Binotti · Andrea Calzetta Resio · Adriana Bentancor
Detección y caracterización preliminar de *Escherichia Coli* O174 productor de toxina. SNS N.º 8, abril-junio de 2015. ISSN 2314-2901 / revistasns@senasa.gov.ar

El síndrome urémico hemolítico (SUH), una enfermedad transmitida por alimentos, es la principal causa de insuficiencia renal aguda y la segunda causa de insuficiencia renal crónica y de trasplante renal en niños en la Argentina, con 400 a 500 notificaciones anuales de casos. Este síndrome origina los costos más elevados para el Sistema Nacional de Salud. Se considera que *Escherichia coli* productora de toxina Shiga (STEC) es el agente etiológico más frecuente del SUH. Dentro de este patotipo STEC asociado a SUH, se destaca el serotipo STEC O157:H7 que representa el 60 % de dichos aislamientos. Otros serogrupos STEC no-O157 representan el 40 % de los aislamientos de STEC provenientes de SUH. La prevalencia de cada serotipo depende de cada país. Se informó que los cuatro serogrupos prevalentes en la Argentina dentro de los no-O157 son O145, O121, O26 y O174. De ellos, el serogrupo O174 se destaca como problemática local y no está cubierto por protocolos de diagnóstico europeos ni americanos. Las infecciones por STEC en la Argentina, por su naturaleza endémica, su alta incidencia y la presentación de brotes difusos, difieren de las de otras regiones referenciales en materia normativa. Para asegurar la calidad e inocuidad agroalimentaria, podría ser incluido el diagnóstico de O174 en alimentos. El objetivo de este proyecto es evaluar técnicas diagnósticas específicas de este serogrupo.

Mi contribución al trabajos fue el aislamiento y caracterización de las cepas O174.

9) Colello R, Etcheverría AI, Di Conza JA, Gutkind GO, Padola NL. (2015) Antibiotic resistance and integrons in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC). *Brazilian Journal of Microbiology*. 46, 1, 1-5

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) cause hemorrhagic colitis (HC) and hemolyticuremic 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 facilitate the spreading of the mobile resistance elements to other bacteria.

Review referido al tema de Tesis Doctoral de la Lic Colello. Participé en el diseño, escritura y corrección del manuscrito

10) Fabiana A. Moredo, Pablo E. Piñeyro, Gabriela C. Márquez, Marcelo Sanz, Rocío Colello, Analía Etcheverría, Nora L. Padola, María A. Quiroga, Carlos J. Perfumo, Lucía Galli, Gerardo A. Leotta. Enterotoxigenic *Escherichia coli* Subclinical Infection in Pigs: Bacteriological, Genotypic Characterization and Antimicrobial Resistance Profiles: A Cross-Sectional Study in 11 Farrow-to-Finish Farms. Volume 12, Number 8, Mary Ann Liebert, Inc. DOI: 10.1089/fpd.2015.1959 Foodborne Pathogens and Disease: <http://mc.manuscriptcentral.com/foodborne>

Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) is the major pathogen responsible for neonatal diarrhea, postweaning diarrhea, and edema disease in pigs. Although it can be harmless, ETEC is also present in the intestines of other animal species and humans, causing occasional diarrhea outbreaks. The evaluation of this pathogen's presence in food sources is becoming an increasingly important issue in human health. In order to determine the prevalence of ETEC in nondiarrheic pigs, 990 animals from 11 pig farms were sampled. Using end-time polymerase chain reaction (PCR), *eltA*, *estI* genes, or both, were detected in 150 (15.2%) animals. From the positive samples, 40 (26.6%) ETEC strains were isolated, showing 19 antibiotic-resistance patterns; 52.5% of these strains had multiple antibiotic resistances, and 17.5% carried the *intI2* gene. The most prevalent genotypes were *rfbO157/estII/aidA* (32.5%) and *estI/estII* (25.0%). The *estII* gene was identified most frequently (97.5%), followed by *estI* (37.5%), *astA* (20.0%), and *eltA* (12.5%). The genes coding the fimbriae F5, F6, and F18 were detected in three single isolates. The *aidA* gene was detected in 20 ETEC strains associated with the *estII* gene. Among the isolated ETEC strains, *stx2e/estI*, *stx2e/estI/estII*, and *stx2e/estI/estII/intI2* genotypes were identified. The ETEC belonged to 12 different serogroups; 37.5% of them belonged to serotype O157:H19. Isolates were grouped by enterobacterial repetitive intergenic consensus-PCR into 5 clusters with 100.0% similarity. In this study, we demonstrated that numerous ETEC genotypes cohabit and circulate in swine populations without clinical manifestation of neonatal diarrhea, postweaning diarrhea, or edema disease in different production stages. The information generated is important not only for diagnostic and epidemiological purposes, but also for understanding the dynamics and ecology of ETEC in pigs in different production stages that can be potentially transmitted to humans from food animals.

Mi participación en el trabajo fue la planificación y coordinación de la serotipificación y caracterización genética de integrones, la escritura y corrección del manuscrito.

11) Alejandra Krüger, Paula M. A. Lucchesi, A. Mariel Sanso, Analía I. Etcheverría, Ana V. Bustamante, Julia Burgán, Luciana Fernández, Daniel Fernández, Gerardo Leotta, Alexander W. Friedrich, Nora L. Padola and John W. A. Rossen. Genetic characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26:H11 strains isolated from animal, food, and clinical samples. (2015) *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 5:74. doi: 10.3389/fcimb.2015.00074

The Shiga toxin producing *Escherichia coli* (STEC) may cause serious illness in human. Here we analyze O26:H11 strains known to be among the most reported STEC strains causing human infections. Genetic characterization of strains isolated from animal, food, and clinical specimens in Argentina showed that most carried either *stx1a* or *stx2a* subtypes. Interestingly, *stx2a*-positive O26:H11 rarely isolated from cattle in other countries showed to be an important proportion of O26:H11 strains circulating in cattle and food in our region. Seventeen percent of the isolates harbored more than one gene associated with antimicrobial resistance. In addition to *stx*, all strains contained the virulence genes *eae-b*, *tir*, *efa*, *iha*, *espB*, *cif*, *espA*, *espF*, *espJ*, *nleA*, *nleB*, *nleC*, and *iss*; and all except one contained *ehxA*, *espP*, and *cba* genes. On the other hand, *toxB* and *espI* genes were exclusively observed in *stx2*-positive isolates, whereas *katP* was only found in *stx1a*-positive isolates. Our results show that O26:H11 STEC strains circulating in Argentina, including those isolated from humans, cattle, and meat products, present a high pathogenic potential, and evidence that cattle can be a reservoir of O26:H11 strains harboring *stx2a*.

Mi participación en el trabajo fue la selección de las cepas, la planificación de la caracterización molecular de las cepas, la escritura y corrección del manuscrito.

12) Nora Lía Padola, Analía Margheritis y Ana V. Bustamante. Capítulo 2. Abigeato: del lugar del hecho al laboratorio. En *Genética forense no-humana*. Compilado por Pilar Peral García ; Guillermo Giovambattista ; María Verónica Ripoli. - 1a ed. - La Plata : Universidad Nacional de La Plata, 2014. E-Book. ISBN 978-950-34-1181-0

El abigeato es uno de los delitos rurales que comprende el robo de animales por su carne, ya sea para consumo propio o con el fin de comercializarla. Este delito es clasificado por el Código Penal de la Nación como delito contra la propiedad y como figura especial del hurto. En cuanto a la sanción penal, es más gravoso que el hurto genérico. La tipificación penal responde a la necesidad de mayor protección del ganado, que por su naturaleza debe ser dejado en campo abierto, imposibilitando la custodia efectiva de sus propietarios. El Código Rural de la Provincia de Buenos Aires regula los hechos, actos y bienes de la actividad rural. Según su artículo 2, un establecimiento rural es —todo inmueble que, situado fuera de los tejidos de las ciudades o pueblos de la provincia, se destine a la cría, mejora y engorde del ganado, actividades de granja o cultivo de la tierra, a la avicultura u otras crianzas, fomento o aprovechamiento semejante|| (Código Rural de la Provincia de Buenos Aires y leyes complementarias, 2004).

Existen dos tipos bien definidos de abigeato que se diferencian no sólo por la cantidad de animales sustraídos, sino por la propia modalidad delictiva. El abigeato más común (por la cantidad de hechos denunciados) se denomina de baja escala; en él se sustrae la carne de uno o dos animales y los restos del/los bovinos se abandonan en el campo. El otro tipo de abigeato es el de mediana y gran escala; consiste en el apoderamiento de varios animales que son retirados vivos del campo en camiones tipo jaula o cerealeros, siendo una actividad delictiva mucho más compleja. En cualquiera de los casos de abigeato, la investigación se lleva a cabo según las reglas de la Criminalística. Según la Asociación Criminalista de California (*California Association of Criminalists*; <https://www.cacnews.org/>) esta disciplina es —la profesión y la disciplina científica dirigida al reconocimiento, identificación, individualización y evolución de las evidencias físicas mediante la aplicación de las ciencias auxiliares en el campo de las ciencias legales||. La hipótesis básica de la criminalística es que el criminal siempre deja en el lugar del hecho algo que de algún modo revela la existencia de un delito y de esa manera permite establecer la identidad de su autor. Encontrar ese —algo|| es el objetivo de la mencionada ciencia. Es preciso saber qué se quiere estudiar para recién entonces orientar la tarea y, con el método correspondiente, hacer la investigación adecuada. En el resultado final de toda investigación, mucho depende de los primeros pasos que dé el investigador que primero tome contacto con el hecho (Criminalística y lugar del hecho, 2014).

En la investigación del hecho punible se recorren al menos cuatro grandes etapas:

- Búsqueda de indicios en el lugar de los hechos.
- Su recolección y envío al laboratorio.
- Análisis de laboratorios e interpretación de los resultados.
- Elaboración del informe pericial y defensa del mismo en el juicio oral.

Participé en el diseño, elaboración y corrección del capítulo

13) Padola, NL y Etcheverría, Analía (Ed). Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in human, cattle and foods. Strategies for detection and control. *Frontiers Research Topics. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* DOI 10.3389/978-2-88919-293-9 ISSN 1664-8714 ISBN 978-2-88919-293-9. Noviembre 2014.

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) is an important foodborne pathogen associated with both outbreaks and sporadic cases of human disease, ranging from uncomplicated diarrhoea to haemorrhagic colitis

(HC) and haemolytic uraemic syndrome (HUS). STEC affects children, elderly and immuno-compromised patients. STEC is capable of producing Shiga toxin type 1 (Stx1), type 2 (Stx2) or both, encoded by *stx1* and *stx2* genes, respectively. These strains are likely to produce putative accessory virulence factors such as intimin (encoded by *eae*), an enterohaemolysin (EhxA) and an autoagglutinating protein commonly associated with eae-negative strains (Saa), both encoded by an enterohaemorrhagic plasmid. Several studies have confirmed that cattle are the principal reservoir of STEC (O157 and non-O157:H7 serotypes) and many of these serotypes have been involved in HUS and HC outbreaks in other countries. Transmission of STEC to humans occurs through the consumption of undercooked meat, vegetables and water contaminated by faeces of carriers and by person-to-person contact. Diagnostic methods have evolved to avoid selective diagnostics, currently using molecular techniques for typing and subtyping of strains. Control is still a challenge, although there are animal vaccines directed against the serotype O157:H7

En este ebook participé como editora del mismo y de las publicaciones que lo conforman.

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

M. Z. Alonso, M. E. Sanz, K. Irino, A. Krüger, P. M. A. Lucchesi, N. L.

Padola Isolation of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* from chicken and chicken-derived products. British Poultry Science. En prensa

Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) strains from chicken and chicken-derived products were isolated and characterised. 2. The strains presented a wide variety of serotypes, some have been reported in other animal species (O2:H40, O5:H40) and in children with diarrhoea (O8:H-). Most of the strains carried intimin β . 3. The results indicate that chicken and chicken products are important sources of atypical EPEC strains that could be associated with human disease, and highlight the need to improve hygiene practices in chicken slaughtering and meat handling.

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.

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

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

Ruiz, M.J.; Colello, R.; Padola, N.L.; Etcheverría, A.I. Evaluación de actividad inhibitoria de *Lactobacillus* spp. aislados de cerdo sobre *Escherichia coli* productor de toxina shiga. X Congreso de Microbiología General Samige. Libro de Resúmenes, código FM-007. Mar del Plata, Argentina, Julio 2014.

Lucchesi, P.; Etcheverría, A.; Sanso, A., Krüger, A.; Bustamante, A.; **Colello, R.**; Cadona, J.; González, J.; Ruiz, J.; Cáceres, E.; Burgán, J.; Sanz, M.; Arroyo, G.; Lenzi, L.; Fernández, D.; Padola, N. 2014. *Escherichia coli* verotoxigénica: reservorios, variabilidad genética y virulencia. 16 Encuentro Nacional de Investigación Pediátrica. Libro de resúmenes, pág. 25. Tandil, Argentina, Julio 2014.

Colello, R.; Etcheverría, A.I.; Padola, N.L. Aislamiento y caracterización genotípica de *Escherichia coli* verocitotoxigénico a partir de canales de cerdos y carne despostada en buenos aires, Argentina. XV Jornadas Argentinas de Microbiología. Libro de resúmenes, pág. Libro de resúmenes, pág. 147. Córdoba, Argentina, Agosto 2014.

María E. Cáceres, Daniel Fernández, Marcelo E. Sanz, Analía I. Etcheverría, Nora L. Padola. **“CHARACTERIZATION OF A LARGE PLASMID IN SHIGA TOXIN-PRODUCING *Escherichia coli* O157 AND NON-O157 STRAINS ISOLATED FROM CATTLE”**. X Congreso de Microbiología General, SAMIGE. Libro de Resúmenes. Código: MM-016. 2, 3 y 4 de Julio 2014. Mar del Plata, Provincia de Buenos Aires, Argentina.

Rivelli, S.; Guillén, R.; Rodríguez, F.; Etcheverría, A. I.; Padola, N. L.; Russomando, G. PERFIL DE VIRULENCIA DE AISLAMIENTOS DE *Escherichia coli* PRODUCTORES DE TOXINA SHIGA PROVENIENTES DE GANADO BOVINO PARAGUAYO. XV Jornadas Argentinas de Microbiología. Libro de resúmenes, pág. Libro de resúmenes. Córdoba, Argentina, Agosto 2014.

Cundon C., Rumi V., Blanco Crivelli X., Gadea P., Schelotto F., Varela G., Padola N.L., Bentancor A.B. Caracterización preliminar de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga O174. XXII Congreso Latinoamericano De Microbiología (XXII ALAM). Cartagena de Indias, Colombia. 4 - 7 de Noviembre, 2014. Publicado en la Revista Hechos Microbiológicos 2014, 5:2 (s2):195.

Gogorza L.; Fernández D.; Fernández V.; Sanz M; Echeverría A.; Estein S.; Padola N. VII Jornadas y Reunión Anual de la Asociación Argentina de Inmunología Veterinaria. DOCENCIA EN INMUNOLOGÍA ADAPTACIÓN DE TRABAJOS PRACTICOS PARA EL ITEM DIAGNÓSTICO EN INMUNOPATOLOGÍA

2015 Colello, R.; Krüger, A.; Rossen, J.W.A.; Friedrich, A.W.; Etcheverría A.I.; Padola, N.L.: (2015). Antibiotic resistance genes in class 1 integron-positive STEC strains isolated from cattle, pigs and food. 9th International Symposium On ShigaToxin (Verocytotoxin) Producing *Escherichia coli* Infections (VTEC 2015). Boston, 13-16 de septiembre 2015

Colello, R.; Ruiz M. J.; Sanz M.E.; Etcheverría A.I.; Padola N.L (2015). Detection and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in pigs and pig carcasses in Argentina. 9th International Symposium On ShigaToxin (Verocytotoxin) Producing *Escherichia coli* Infections (VTEC 2015). Boston, 13-16 de septiembre 2015. 9th International Symposium On ShigaToxin (Verocytotoxin) Producing *Escherichia coli* Infections (VTEC 2015). Boston, 13-16 de septiembre 2015

Krüger A.; Lucchesi P.M.A.; Sanso A.M.; Etcheverría A.I.; Bustamante A.V.; Fernández, D.; Burgán, J.; Fernández, L.; Leotta, G.; Rossen J.W.A.; Padola, N.L.; Friedrich, A.W. (2015). Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26:H11 strains isolated from animal, food, and clinical sources in Argentina. 9th International Symposium On ShigaToxin (Verocytotoxin) Producing *Escherichia coli* Infections (VTEC 2015). Boston, 13-16 de septiembre 2015

Cáceres, M.E.; Fernández, D.; Rodríguez, E.M.; Etcheverría, A.I.; Padola, N.L. (2015). Putative virulence factors and adhesins in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from cattle of different ages from Argentina. 9th International Symposium On ShigaToxin

(Verocytotoxin) Producing *Escherichia coli* Infections (VTEC 2015). Boston, 13-16 de septiembre 2015

Etcheverría, A.I.; Arroyo, G.H.; Gaguine L, Padola N.L. (2015). Effect of bismuth hydroxide gel on Verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. 9th International Symposium On ShigaToxin (Verocytotoxin) Producing *Escherichia coli* Infections (VTEC 2015). Boston, 13-16 de septiembre 2015

Ruiz, M.J.; Colello, R; Padola, N.L.; Etcheverría, A.I. (2015). Evaluation of the inhibitory activity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* by *Lactobacillus spp.* isolated from pigs. 9th International Symposium On ShigaToxin (Verocytotoxin) Producing *Escherichia coli* Infections (VTEC 2015). Boston, 13-16 de septiembre 2015

Lucchesi, P. M. A; Gutiérrez, S. E.; Etcheverría, A. I.; Estein, S. M.; Padola, N. L.; Lützelshwab, C.; Fernández, V.; Fernández, D.; Arroyo, G. H.; Sanz, M. E. Estrategias para facilitar la comprensión de conceptos y mecanismos inmunológicos.
2º JORNADA DE ENSEÑANZA DE MEDICINA VETERINARIA - Con especial interés en Microbiología, Epidemiología, Inmunología y Enfermedades Infecciosas. Mar del Plata, 28 de agosto

Docentes de Inmunología Básica: Lucchesi, P. M. A; Padola, N. L.; Gutiérrez, S. E.; Lützelshwab, C.; Etcheverría, A. I.; Estein, S. M.; Sanz, M. E.; Arroyo, G. H.; Fernández, D.; Fernández, V. Docentes de Microbiología: Soto, P.; Monteavaro, C.; Echeverría, H.; Cacciato, C.; Doumecq, M. L.; Bottini, E. Docentes de Virología: Morán, P.; Gogorza, L.; Dolcini, G.; Pérez, S.; Rensetti, D. Propuesta para la interacción entre los cursos de Inmunología Básica, Microbiología y Virología en la FCV-UNCPBA.

II JORNADA INTERNACIONAL Y VIII JORNADA Y REUNIÓN ANUAL DE LA ASOCIACIÓN ARGENTINA INMUNOLOGÍA VETERINARIA. Tandil, 25 y 26 de noviembre.

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

-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 Viables 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 Viables 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
- Director Beca Posgrado Tipo I CONICET 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.
- 2015** Director Beca Entrenamiento CIC-PBA Victoria Velez. Influencia del Hipoclorito de Sodio en biofilms formados por *Escherichia coli*
- 2016** Director Beca Posdoctoral CONICET de Lic Rocío Colello. El bovino como reservorio de *Escherichia coli* verocitotoxigénica LEE-negativas: caracterización de nuevos factores implicados en la colonización intestinal. 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* verocitotoxigénico 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* verocitotoxigénica (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* verocitotoxigénico (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

Director Beca Posgrado Tipo I CONICET 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.

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

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.

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

9th International Symposium On ShigaToxin (Verocytotoxin) Producing *Escherichia coli* Infections (VTEC 2015). Boston, 13-16 de septiembre 2015.
Asistencia al Congreso y Reunión con miembros del Grupo LACER.

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

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

2011-2015 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

Subsidio para Asistencia de Reuniones Científicas y Tecnológicas.“VTEC 2015 - 9th International Symposium on Shiga toxin (Verocytotoxin) producing Escherichia coli Infections”.-. CIC-PBA \$8000

2014 PICT 2013-1749

Aislamiento de *Lactobacillus* spp con actividad inhibitoria de bacterias implicadas en enfermedades transmitidas por alimentos
Integrante Grupo Responsable

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.

Associate Editor. Journal Frontiers in Cellular and Infection Microbiology

2014 Premios SENASA 2014-2015 a la Investigación, Transferencia y comunicación en Sanidad, Calidad e Inocuidad agroalimentaria.
2º Premio a la Investigación y Transferencia en Inocuidad y Calidad Agroalimentaria de Equipos consolidados al proyecto “Regulación de la colonización de cepas VTEC mediante el uso de bacterias probióticas en el bovino. Estudio de factores implicados en la colonización.

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.

2015-2017 Consejera Superior. FCV-UNCPBA

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

Miembro ONG luSUH (lucha contra el síndrome urémico hemolítico)

2014 Miembro de la Comisión de Criterios Microbiológicos de CONAL (Comisión Nacional de Alimentos)

Integrante Comisión interdisciplinaria STEC del IPCVA (Instituto de Promoción de la Carne vacuna argentina)

Integrante del Foro Seguridad Alimentaria del CONICET a través de la Unidad ejecutora CIVETAN

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

2014 I Curso Síndrome Urémico Hemolítico. CEBASEV. Centro Buenos Aires para la Capacitación de los Servicios Veterinarios. Disertante: Reservorios de STEC. Buenos Aires 24 al 27 de junio. 32 hs

2015 Curso *Escherichia coli* productor de toxina Shiga en alimentos. Disertante: Reservorios de STEC. CEBASEV. Buenos Aires, 24 y 26 de junio 2015

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, 27 y 28 de noviembre.

2015 9nas Jornadas Internacionales de Veterinaria Práctica

Conferencia: STEC O157 y no-O157: reservorios. 28 de agosto, Mar del Plata. Organizada por Colegio Veterinarios de la Prov de Buenos aires

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

- 2014** Conferencia sobre epidemiología de E. coli O157 y no-O157, reservorios y alimentos. Sociedad Rural de Bolívar
- 2015.** Actualización en temas de Zoonosis. Tema de la charla: síndrome Urémico Hemolítico. Sociedad Rural de Tandil.

**21. *ESCHERICHIA COLI* VEROCITOTOXIGÉNICO: CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y CONTROL EN RESERVORIOS Y ALIMENTOS
Enero 2016 – Dic 2019**

Objetivos

-General:

Caracterizar cepas VTEC que influyan en la colonización de los animales y en la supervivencia en el medio ambiente, y evaluar estrategias de inhibición de la colonización en reservorios y alimentos.

-Específicos:

- Determinar los factores putativos de adherencia y colonización presentes en cepas VTEC (LEE negativas y LEE positivas) aisladas de bovinos y estudiar su distribución en distintos serotipos.
- Evaluar la capacidad de las cepas de formar biofilms.
- Caracterizar las cepas aisladas por la presencia de genes de resistencia a antimicrobianos de importancia en salud pública.
- Estudiar la adherencia de las cepas VTEC a las líneas celulares HEP-2 y a explantos de distintas regiones de intestino bovino.
- Evaluar la capacidad de bacterias probióticas de inhibir el desarrollo de cepas VTEC en el intestino bovino y en alimentos.
- Determinar si sueros de bovinos natural y artificialmente infectados con VTEC, reconocen los distintos factores de adherencia y colonización caracterizados en este proyecto.

Estado actual del conocimiento sobre el tema

Desde hace más de tres décadas, *Escherichia coli* verocitotoxigénico (VTEC) es considerado un patógeno emergente, principalmente transmitido por alimentos, asociado a casos esporádicos y brotes de diarrea, colitis hemorrágica (CH) y síndrome urémico hemolítico (SUH) (Rivas *et al.*, 2007). Actualmente, nuestro país presenta el registro más alto de casos de SUH a nivel mundial, con aproximadamente 500 casos nuevos declarados anualmente y una incidencia de 17/100000 niños menores de 5 años de edad (Rivas *et al.*, 2010). Debido a la patogenicidad y morbilidad de VTEC para el hombre, y especialmente para la población infantil, y conociendo la elevada incidencia del SUH en nuestro país, existe una gran demanda para el desarrollo de tratamientos y estrategias de prevención.

Desde el reconocimiento de VTEC como patógeno, frecuentemente se identificó a cepas del serotipo O157:H7 como responsables de enfermedad. Por lo cual gran parte del conocimiento actual de VTEC está asociado a cepas de este serotipo. Sin embargo, el número de infecciones asociadas a VTEC non-O157 han comenzado a ganar predominancia creciente en los últimos años (Wang, 2013) representando nuevos desafíos para el diagnóstico y el control de VTEC.

Las cepas VTEC se caracterizan por su capacidad de producir unas toxinas, denominadas verocitotoxinas (VTs), que tienen la propiedad de destruir *in vitro* las células de la línea Vero (Konowalchuk *et al.*, 1977). Si bien estas toxinas son las principales responsables del daño que se observa en el síndrome urémico hemolítico sobre riñón y diferentes órganos blanco, otros mecanismos de virulencia son necesarios para la colonización de VTEC, etapa necesaria para la patogénesis que le permite superar las defensas del huésped y establecerse en el intestino (Gyles, 2007). El mecanismo de adherencia al enterocito mejor caracterizado en VTEC está mediado por una proteína de membrana externa, denominada intimina, que está codificada en el gen *eae* del cromosoma bacteriano. Este mecanismo produce una lesión intestinal típica denominada "attaching and effacing" (A/E) (Jerse *et al.*, 1991) que involucra cambios estructurales en la célula epitelial del intestino grueso incluyendo la pérdida de las microvellosidades (Elliot *et al.*, 2001). Las proteínas bacterianas necesarias para la formación de este tipo de lesión están codificadas en una isla de patogenicidad, denominada locus para el borrado del enterocito (LEE) (Guth *et al.*, 2010). Existen estudios recientes sobre la regulación de distintos efectores de VTEC en conjunto con la expresión de genes del LEE, que evidencian que la expresión de los factores de virulencia ocurriría en forma coordinada con el metabolismo bacteriano y la fisiología intestinal (Mellies y Lorenzen, 2014).

Durante muchos años, y debido a que gran parte de las cepas VTEC asociadas a enfermedad, incluyendo las O157, portan esta isla LEE, se ha considerado la presencia de LEE, en particular el gen *eae*, como factor de riesgo, o marcador de cepas de mayor virulencia (Ethelberg *et al.*, 2004). Sin embargo, diferentes cepas VTEC que carecen de LEE (denominadas LEE-negativas) han sido aisladas en brotes y casos esporádicos de SUH, por ejemplo cepas de los serotipos O91:H21, O113:H21 y O174:H21 (Paton *et al.*, 1999; Girardeau *et al.*, 2005; Bielaszewska *et al.*, 2011). Por esto, actualmente se considera que la presencia de la región LEE no sería esencial para la patogénesis, o bien, sus funciones estarían reemplazadas por otros factores en cepas LEE-negativas.

El mecanismo de colonización no está bien dilucidado en las cepas LEE-negativas, y es probable que sea diferente entre ellas debido a que es un grupo genética y filogenéticamente diverso. Sin el locus LEE, las cepas VTEC LEE-negativas deben adherirse al epitelio intestinal por medios distintos al complejo intimina/Tir. Se han descrito factores de virulencia únicos en cepas LEE-negativas, como la adhesina aglutinante de STEC (Saa) (Paton *et al.*, 2001), el autotransportador Sab (Herold *et al.*, 2009a) y la citotoxina subtilasa (SubAB) (Paton *et al.*, 2004) todos codificados en el plásmido de virulencia pO113 (Steyert *et al.*, 2012), aunque hay algunas cepas que carecen de este plásmido.

Recientemente, el grupo de trabajo del Dr. Roberto Vidal (Facultad de Medicina, Universidad de Chile) identificó un antígeno de membrana externa que está presente exclusivamente en cepas VTEC LEE-negativas (Montero *et al.*, 2014) al que denominaron Hes (Haemagglutinin from Shiga toxin-producing *E. coli*). Además existen otros genes que codifican adhesinas como Iha (Tarr *et al.*, 2000), Ag43 que participa en autoagregación y formación de biofilms (van der Woude y Henderson 2008) y un marco abierto de lectura (ORF) identificado por Shen *et al.* (2004) que podría codificar para una proteína con funciones de adhesión y hemaglutinación. Estos factores podrían ser utilizados como predictores de virulencia de cepas VTEC.

VTEC tiene una ecología compleja y el bovino cumple un papel significativo en la exposición del hombre a este patógeno. En distintos países, entre los que se incluye a la Argentina, se realizaron numerosos estudios sobre la prevalencia de VTEC que permitieron confirmar el rol del ganado bovino como principal reservorio (Sanz *et al.*, 1998; Mercado *et al.*, 2004; Padola *et al.*, 2004; Amezcua-lopez *et al.*; 2014). Nuestro grupo de trabajo determinó que los terneros fueron portadores de los serotipos de mayor virulencia para el hombre (Fernández *et al.*, 2010), mientras que en bovinos adultos en matadero y pastoreo se encontraron serotipos compartidos con alimentos cárnicos (Parma *et al.*, 2000). En bovinos, la infección por VTEC no produce enfermedades graves como en el hombre y se piensa que estas bacterias se han adaptado a un estilo de vida “comensal” en animales adultos (Smith *et al.*, 2002). La detección frecuente de anticuerpos anti-VT en suero y calostro de bovinos demuestra que la persistencia de la infección por VTEC en estos animales no se debe a la incapacidad de los mismos para responder a VTEC y sus productos. Probablemente, VTEC ha elaborado un mecanismo que limita activamente la inflamación intestinal, mantiene la homeostasis intestinal y, finalmente, permite la colonización persistente (Johnson *et al.*, 1996). Sin embargo, las investigaciones respecto a sitios de colonización y adherencia en bovinos son controversiales y están basadas principalmente en cepas O157:H7. Dada la variabilidad de VTEC, resulta importante el estudio de la adhesión a células epiteliales intestinales de cepas VTEC no-O157, lo cual contribuiría significativamente a la identificación de los mecanismos por los cuales estos patógenos colonizan el intestino.

Desafortunadamente, el diagnóstico y control de animales infectados dentro de un rodeo no es sencillo debido a que este patógeno no produce ningún efecto en la salud ni en la eficiencia de producción de los bovinos. Por otro lado, la eliminación de VTEC al medio es intermitente, lo que dificulta la identificación de los animales positivos. Por lo tanto, las estrategias para disminuir la carga de patógenos en los reservorios no debe focalizarse en un pequeño grupo de animales identificados como positivos, sino, debe poder aplicarse a grandes grupos de animales en el campo en las diferentes fases de producción, inmediatamente previo a la entrada al frigorífico y en plantas procesadoras de alimentos (Callaway *et al.*, 2004).

La presencia de animales portadores de VTEC no sólo es importante por la posibilidad de contaminación de las carcasas en la faena y de la leche durante el ordeño, sino también por la contaminación del agua y del ambiente (Wallace, 1999). Por lo tanto, las estrategias para reducir la prevalencia de VTEC en rumiantes permitirán disminuir el ingreso de carne, vegetales, frutas, leche y agua contaminados a la cadena alimentaria y en consecuencia, limitar la incidencia de infección en humanos (Stevens *et al.*, 2002).

La vacunación es una de las estrategias válidas para reducir la carga de VTEC en bovinos. El objetivo del uso de la misma es reducir la susceptibilidad del bovino a la colonización por VTEC, disminuir la duración o el nivel de dicha colonización. En Argentina se está trabajando en el desarrollo de una vacuna a partir de dos proteínas recombinantes de VTEC O157:H7: un fragmento carboxilo-terminal de la intimina y EspB (Cataldi y cols, 2008). Por otro lado, en algunos países, hay disponibles 2 vacunas comerciales dirigidas también a reducir la colonización de *E. coli* O157. Una de ellas incluye como antígeno a proteínas del sistema de secreción tipo III codificado en el locus LEE y la otra contiene un receptor de sideróforos y una porina (Besser *et al.*, 2014). Al

evaluar esta última vacuna, Cernicchiaro *et al.* (2014) determinaron que, a pesar de ser efectiva contra VTEC O157, no lo fue para VTEC de otros serogrupos. Dada la emergencia y aumento de serotipos VTEC asociados con enfermedad severa en humanos (Miko *et al.*, 2014), se remarca la importancia de identificar los mecanismos por los que estas bacterias colonizan el intestino para, luego, desarrollar estrategias de intervención que disminuyan la colonización de los animales antes de la faena, para lograr mayor impacto en el mejoramiento de la seguridad de los alimentos. Asimismo, se deben implementar estrategias que permitan controlar VTEC en alimentos, para lo cual es necesario el estudio de la actividad de bacterias probióticas que se utilizan como sistemas de biopreservación (Harris *et al.*, 1992).

Metodología

Para cumplir con los objetivos:

- ***Determinar los factores putativos de adherencia y colonización presentes en cepas VTEC (LEE negativas y LEE positivas) aisladas de bovinos y estudiar su distribución en distintos serotipos.***

Se trabajará con una colección de 300 aislamientos VTEC LEE-negativos provenientes de bovinos de distintos sistemas productivos: feedlot, pastoreo y tambo, que pertenecen a nuestro laboratorio (Laboratorio de Inmunoquímica y Biotecnología, Centro de Investigación Veterinaria de Tandil CIVETAN- UNCPBA) y que han sido caracterizados previamente en cuanto a presencia de factores de virulencia y serotipos (Sanz *et al.*, 1998; Parma *et al.*, 2000; Padola *et al.*, 2004; Fernández *et al.*, 2010.). Se utilizarán como controles negativos cepas VTEC LEE-positivas.

La detección de genes de virulencia se realizará mediante PCR, entre ellos, los genes codificantes de adhesinas putativas tales como *hes* (Montero *et al.*, 2015), *ag43* (van der Woude and Henderson 2008), *iha* (Tarr *et al.*, 2000), *pagC* (Shen *et al.*, 2004), *eatA* (Montero *et al.*, 2014) que formarían parte de una estructura en forma de módulo. Para los ensayos siguientes, se seleccionarán cepas teniendo en cuenta los factores de virulencia y de colonización.

- ***Evaluar la capacidad de las cepas de formar biofilms.***

En las VTEC aisladas se detectará la presencia de la fimbria curli mediante 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).

Se evaluará la producción de biofilms sobre matrices de poliestireno y de acero inoxidable. Ambos materiales constituyen la materia prima de numerosos utensilios, herramientas y equipos que están en contacto con alimentos, por lo que evaluar la capacidad de formar biofilms de microorganismos patógenos sobre los mismos resulta de suma utilidad para diseñar programas de limpieza, desinfección y reducir los posibles focos de infección.

El ensayo además se realizará a dos temperaturas distintas (37°C y 22°C) según la metodología descrita en Uhlich et al., (2006) con modificaciones. Las temperaturas elegidas representan, por un lado la temperatura corporal (37°C) y por el otro la temperatura a la cual se considera se optimiza la producción de curli (22°C) (Ryu et al., 2004).

Cada cepa seleccionada conservada a -70 °C se cultivarán en caldo Luria Bertani (LB) a 37°C por 18 h. Se realizarán diluciones 1:10 en LB sin cloruro de sodio (LBNS) para cada cultivo y una alícuota de 100 µl se sembrará en la microplaca de poliestireno de 96 pocillos que contienen 100 µl de caldo LBNS control. Las microplacas se incubarán por 48 h a 37°C y 22°C y se teñirán con cristal violeta al 0,1% durante 30 min a temperatura ambiente. El colorante será removido y se disolverá el colorante adherido a los biofilms con alcohol etílico 96% para la medición de la DO.

Todos los ensayos se realizarán por triplicado y en eventos independientes para cada una de las cepas. El análisis de los resultados se realizará teniendo en cuenta lo descrito por Stepanovic et al., (2000) con adaptaciones de Gómez et al., (2013) mediante los cuales se podrán clasificar a las cepas estudiadas según la DO obtenida para cada una como: No Formadoras, Débiles Formadoras, Moderadas Formadoras y Fuertes Formadoras de Biofilms.

Se cultivarán las cepas en caldo LB a 37°C por 18 h, se realizarán diluciones 1:100 en LBNS que se colocarán en placas de Petri estériles conteniendo una lámina de acero inoxidable (2 cm x 2 cm), y se incubarán a 37°C y a 22°C por 48 h. Luego de la incubación, las láminas se teñirán con cristal violeta al 0,1% por 30 min. El colorante adherido se solubilizará con alcohol etílico 96% por 30 min y se determinará la DO a 595 nm (Silagyi, 2007, con modificaciones)

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 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.

- ***Estudiar la adherencia de las cepas VTEC a las líneas celular HEp-2 y a explantos de distintas regiones de intestino bovino.***

Adherencia a células HEp-2: Se utilizará la metodología descrita por Etcheverría *et al.* (2011). Para evaluar la capacidad de adherencia de VTEC se utilizará la línea celular HEp-2. Para los ensayos de adhesión se utilizará como control negativo *Escherichia coli* HB101, una cepa no adherente empleada en diferentes estudios *in vitro* similares al propuesto.

Ensayos *ex vivo* de adherencia a explantos de colon bovino: para el estudio de la interacción de VTEC con células intestinales se utilizará la técnica gold estándar de adherencia a explantos bovinos, según Etcheverría *et al.* (2011). Se empleará para cada cepa (VTEC LEE-negativa) el

anticuerpo primario serotipo-específico y se realizará la técnica de peroxidasa antiperoxidasa, utilizando un segundo anticuerpo anti-bovino marcado.

- ***Evaluar la capacidad de bacterias probióticas de inhibir el desarrollo de cepas VTEC en el intestino bovino y en alimentos.***

In vitro: Se trabajará con bacterias probióticas (*Lactobacillus* y *E. coli*) aisladas previamente en el Laboratorio de Inmunoquímica y Biotecnología. El ensayo se realizará siguiendo el procedimiento de inoculación por picadura propuesto por Gagliano y Hinsdill (1970), con modificaciones en base al estudio de Schillinger y Lücke (1987). Los probióticos se sembrarán por puntura en placas de MRS agar/TSA. Luego de la incubación a 37 °C por 48 h las placas serán expuestas a vapores de cloroformo por 15 minutos para inactivar las bacterias que hubieran crecido. Se cubrirán las placas con una capa de agar Tripticasa Soya (TSA) blando (0,75% de agar) conteniendo los microorganismos patógenos sobre los cuales se va a evaluar la actividad inhibitoria. La lectura se realizará mediante la observación de zonas translúcidas indicativas de inhibición de crecimiento de las patógenas por acción de las bacterias probióticas (Daeschel y Klaenhammer, 1985).

In vivo: inoculación experimental de bovinos con cepas O157 y no O157 y probióticas seleccionadas previamente. Se utilizará también una cepa no-O157 EPEC (no productora de toxinas) como control

Los ensayos *in vivo* se realizarán en un Campo Experimental propiedad del SENASA ubicado en el partido de Azul, provincia de Buenos Aires. El establecimiento posee también un laboratorio con el equipamiento suficiente para hacer el procesamiento inicial de las muestras. Se inoculará una cepa O157:H7, 2 cepas no-O157 que difieran en algún factor de colonización, y una *E. coli* probiótica. Como control para evaluar diferencias en la colonización y/o adherencia relacionadas con la presencia de la toxina, se inoculará una EPEC O91 (*vt-*, *eae+*). Todas las cepas se harán resistentes a ácido nalidíxico (50 µg/ml) para facilitar su posterior recuperación a partir de las muestras de materia fecal.

Se inoculará una concentración de 1×10^9 ufc, mediante sonda bucoesofágica.

Los animales se muestrearán, diariamente a partir del día 1 post-inoculación hasta el día 10, aproximadamente y luego se realizarán muestreos en días alternos y por último, semanales. Un g de materia fecal se resuspenderá en 9 ml de solución fisiológica estéril y se sembrará en placas de agar SMAC con ácido nalidíxico (50 µg/ml). A partir del día 14, a las muestras de materia fecal de todos los animales se les realizará cultivo con enriquecimiento previo en caldo LB. Se realizará PCR multiplex y monoplex para confirmar en las bacterias eliminadas los genes de virulencia presentes.

Se sacrificarán los animales siguiendo las normas del Comité de Bioética, cuyos principios se expresan en el "Acta sobre Bienestar Animal" de la FCV-UNCPBA. Para evaluar la adherencia de las cepas VTEC y probióticas, de cada animal se tomarán muestras de distintas regiones del tracto gastrointestinal y se procesarán para ser analizadas por técnicas de inmunohistoquímica.

- ***Determinar si sueros de bovinos natural y artificialmente infectados con VTEC, reconocen los distintos factores de adherencia y colonización caracterizados en este proyecto.***

Se realizarán ensayos de inmunoproteómica: la metodología a emplear es la descrita por Montero *et al.* (2014). Se analizarán 40 sueros que fueron extraídos previamente de bovinos de feedlot VTEC positivos y LEE-negativos (Padola *et al.*, 2004) y de los animales inoculados durante el ensayo *in vivo*.

Los sueros corresponden a bovinos de los cuales se han aislado serotipos O157 y no-O157, teniendo identificados los animales individualmente y las cepas caracterizadas fenotípica y genotípicamente. Se determinará la inmunorreactividad de los sueros a diferentes antígenos de membrana de VTEC, especialmente a Hes. Se identificarán antígenos inmunogénicos reconocidos por IgG bovina a través de análisis de inmunoproteómica de extractos de membrana externa utilizando una metodología ya puesta a punto (Montero et al., 2014) y que consiste en: extracción de proteínas de membrana externa de cepas VTEC LEE-negativas y de *E. coli* comensal HS usada como control; SDS-PAGE; análisis 2-dimensiones-PAGE; Western blot usando sueros bovinos; análisis por Maldi-tof.

Plan de actividades total, estado de avance del proyecto y cronograma futuro

- Determinar los factores putativos de adherencia y colonización presentes en cepas VTEC (LEE negativas y LEE positivas) aisladas de bovinos y estudiar su distribución en distintos serotipos. **1º y 2º semestre**
- Evaluar la capacidad de las cepas de formar biofilms. **2º y 3º semestre**
- Caracterizar las cepas aisladas por la presencia de genes de resistencia a antimicrobianos de importancia en salud pública. **3º semestre**
- Estudiar la adherencia de las cepas VTEC a las líneas celular HEp-2 y a explantos de distintas regiones de intestino bovino. **3º y 4º semestre**
- Evaluar la capacidad de bacterias probióticas de inhibir el desarrollo de cepas VTEC en el intestino bovino y en alimentos. **4º y 5º semestre**
- Determinar si sueros de bovinos natural y artificialmente infectados con VTEC, reconocen los distintos factores de adherencia y colonización caracterizados en este proyecto. **5º y 6º semestre**

Estado de avance del proyecto

La mayoría de las técnicas empleadas en la ejecución de las actividades mencionadas en la planificación precedente ya han sido puestas a punto y controladas con estándares. Se ha iniciado la caracterización genotípica de parte del cepario de VTEC existente en el Laboratorio determinando genes de virulencia y presencia de integrones. Se han puesto a punto las técnicas para la caracterización geno-fenotípica de cepas potencialmente formadoras de biofilms y también las relacionadas a la adherencia de VTEC a explantos (IHQ) como así también los ensayos de inhibición de VTEC por bacterias probióticas.

Aportes académicos y/o transferencias esperados

El proyecto contempla la investigación de factores que influyan en la colonización de VTEC en bovinos, para poder de esa manera identificar estrategias con el objetivo de evitar la

transmisión de uno de los patógenos que afectan la Salud Pública en Argentina. 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 VTEC no-O157 carentes de LEE, de las que hay escasas investigaciones realizadas, permitirá identificar nuevos factores que intervienen en la colonización en el ganado. Esto es importante porque el éxito de la colonización en el bovino constituye una amenaza para la Salud Pública. Dada la severidad de los síntomas causados por VTEC en humanos y la frecuencia de secuelas renales y neurológicas, el síndrome urémico hemolítico tiene un gran impacto social y existe una importante demanda para el desarrollo de un tratamiento o de estrategias de prevención, desarrollo de métodos de diagnóstico en alimentos y control en animales. La identificación de nuevos marcadores en cepas VTEC no-O157 que faciliten su detección en alimentos y animales representa un importante aporte que influye en todos los sectores: salud, agroganadero y económico. Se debe establecer cuáles VTEC no-O157 representan peligro biológico para reforzar el sistema de aseguramiento de la calidad en los procesos de elaboración industrial, como así también la imagen de los productos argentinos en el resto del mundo, debido a que en los últimos años se han sufrido rechazos de carne desde países de la Unión Europea debido a contaminación con VTEC no-O157. Los objetivos del proyecto en su conjunto tienden a mejorar la Salud Pública a través del control de la cadena epidemiológica por la que VTEC llega desde el bovino al hombre, estudiando el primer eslabón de la cadena de transmisión. 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, a los que deben sumarse los pacientes de años anteriores que deben continuar controlándose y los que resultaron con diferentes secuelas.

Bibliografía

- Amézquita-lópez, B. A.; Quiñones, B.; Lee, B. G.; Chaidez, C. (2014). *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 4
- Besser, T. E., Schmidt, C. E., Shah, D. H., Shringi, S. *Microbiol Spectrum* 2(5):EHEC-0021-2013. doi:10.1128/microbiolspec.EHEC-0021-2013
- Bielaszewska, M.; Mellmann, A.; Zhang, W.; Köck, R.; Fruth, A.; Bauwens, A.; Peters, G.; Karch, H. (2011). *Lancet Infect Dis*. 11:671-676.
- Callaway, T.R.; Anderson, R.C.; Edrington, T.S.; Genovese, P.J.; Harvey, R.B.; Poole, T.L.; Nisbet, D.J. (2004) *Animal Health Research Reviews*. 5: 35-47
- Cataldi A, Yevsya T, Viste DA, Schulze K, Castro-Parodi M, Larzábal M, Ibarra C, Mercado EC, Guzmán CA. (2008). *Vaccine*. **26**, 566267.
- Cernicchiaro, N.; Renter, D. G.; Cull, C. A.; Paddock, Z. D.; Shi, J X.; Nagaraja, T. G. (2014) *J. Food Protect.*, **77**: 752-737
- Elliot, M. and Nichols, W. (2001). *Clinical Proceedings*. 76: 1154-1162.
- Etcheverría, A.I.; Arroyo, G.H.; Alzola, R.; Parma, A.E. (2011). *International Scholarly Research Network*. doi: 10.5402/2011/697020, 5 page.
- Ethelberg, S.; Olsen, K.E.P.; Scheutz, F.; Jensen, C.; Schiellerup, P.; Enberg, J.; Petersen, A.M.; Olesen, B.; Gerner-Smidt, P.; Mølbak, K. (2004). *Emerg. Infect. Dis*. 10:842-7.
- Feng PC, Monday SR, Lacher DW, Allison L, Siitonen A, Keys C, Eklund M, Nagano H, Karch H, Keen J, Whittam TS. (2007) *Emerg Infect Dis*. 13,1701-6.
- Feil, E.J., Li, B.C., Aanensen, D.M., Hanage, W.P., Spratt, B.G. (2004). *J. Bacteriol* 186: 1518–1530.
- Fernández, D.; Irino, K.; Sanz, M. E.; Padola, N. L.; Parma, A.E. (2010) *Letters in Applied Microbiology*. 51, 377–382.
- Guth, B.E.C.; Prado, V.; Rivas, M. (2010). Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Latin America. In: Torres AG, ed. Pathogenic *Escherichia coli* in Latin America. Bentham Science Publishers Ltd: United States, 65-83.
- Girardeau, J.P.; Dalmasso, A.; Bertin, Y.; Ducrot, C.; Bord, S.; Livrelli, V.; Vernozy-Rozand, C.; Martin, C. (2005). *J. Clin. Microbiol*. 43:6098–107.
- Gyles C.L. (2007). *Journal of Animal Science*. **85**, E45-E62.
- Herold, S.; James C. Paton, J.C. and Adrienne W. Paton, A.E.W. (2009). *Infection and Immunity*. **77**, 3234-3243.
- Herold S, Paton JC, Srimanote P, Paton AW. 2009b. *Microbiology* 155:3554–63.
- Jerse, A.E.; Yu, J.; Tall, B.D.; Kaper, J.B. (1991). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:7839-7843
- Johnson, R.P.; Cray, W.C.Jr; Johnson, S.T. (1996). *Infection and Immunity*. 64: 1879-1883.
- Konowalchuk, J.; Speirs, J.I.; Stavric, S. (1977). *Infection and Immunity*. **18**, 775-779.
- Mellies J, Lorenzen E. (2014). *Microbiol. Spec* 2(4): EHEC-0004-2013
- Mercado, E.C.; Gioffré, A.; Rodríguez, S.M.; Cataldi, et al. (2004). *Journal of Veterinary Medicine. B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health*. **B 51**, 82–88.
- Miko, A.; Rivas, M.; Bentancor, A.; Delannoy, S.; Fach, P.; Beutin, L. (2014). *Front. Cell. Infect. Microbiol*. 4:78.
- Montero, D.; Del Canto, F.; Puente, J.L.; Salazar, J.C.; Vidal, R. (2015). 6th Congress of European Microbiology, The Netherlands, FEMS, pp: 1089.
- Montero, D.; Orellana, P.; Gutiérrez, D.; Araya, D.; Salazar, J.C.; Prado, V.; Oñate, A.; Del Canto, F.; Vidal, R. (2014). *Infect. Immun*. 82:4767–77.
- Padola, N.L.; Sanz, M.E.; Blanco, J.E.; Blanco, Met al (2004). *Veterinary Microbiology* **100**, 3–9.

- Parma, A.E.; Sanz, M.E.; Blanco, J.E.; Blanco, J.; Viñas, M.R.; Blanco, M., Padola N.L.; Etcheverría, A.I. (2000). *European Journal of Epidemiology*. **16**, 757-762.
- Paton, A.W.; Srimanote, P.; Talbot, U.M.; Wang, H.; Paton J.C. (2004). *J. Exp. Med.* 200:35–46.
- Paton, A.W.; Srimanote, P.; Woodrow, M.C.; Paton, J.C.. (2001). *Infection and Immunity*. **69**: 6999-7009.
- Paton, A.W.; Woodrow, M.C.; Doyle, R.M.; Lanser, J.A.; Paton, J.C. (1999). *J. Clin. Microbiol.* 37:3357–3361.
- Qi, W.; Lacher, D.W.; Bumbaugh, A.C.; Hyma, K.E.; Ouellette, L.M.; Large, T.M.; Tarr, C.L.; Whittam, T.S. (2004). Proceedings of the 2004 IEEE Computational Systems Bioinformatics Conference.
- Ren, C.P.; Chaudhuri, R.R.; Fivian, A.; Bailey, C.M.; Antonio, M.; Barnes, W.M.; Pallen, M.J. (2004). *J. Bacteriol.* 186:3547–60.
- Rivas, M.; Leotta, G.; Chinen, I. (2007). Manual de Procedimientos Diagnóstico y caracterización de *Escherichia coli* O157 productor de toxina Shiga a partir de alimentos. Departamento Bacteriología. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas A.N.L.I.S. "Dr. Carlos G. Malbrán".
- Rivas M, Padola NL, Luchessi PM, Masana M. (2010). Diarrheogenic *Escherichia coli* in Argentina. En: Torres AG, editor. Pathogenic *Escherichia coli* in Latin America. Oak Park IL, USA, Bentham Science Publishers Ltd, , p. 142-61.
- Sanz, M.E.; Viñas, R.M.; Parma, A.E. (1998). *European Journal of Epidemiology*. **14**, 399-403.
- Schmidt, H.; Bitzan, M.; Karch, H. (2002). Pathogenic aspects of Shiga toxin-producing *E. coli* infections in humans. Págs. 241-262. In: Duffy, G.; Garvey, P.; McDowell, D.A. (eds.), Verocitotoxigenic *Escherichia coli*, Food & Nutrition Press Inc., Trumbull.
- Shen, S.; Mascarenhas, M.; Rahn, K.; Kaper, J.B.; Karmali, M.A. (2004). *Infect. Immun.* 72:1496–1503.
- Stevens, M.P.; vanDiemen, P.M.; Frankel, G.; Phillips, A.D.; Wallis, T.S. (2002).. *Infection and Immunity*. **70**, 5158-5166
- Steyert, S.R.; Sahl, J.W.; Fraser, C.M.; Teel L.D.; Scheutz, F.; Rasko D.A. (2012). *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2:133.
- Tarr, P.I.; Bilge, S.S.; Vary Jr., J.C.; Jelacic, S.; Habeeb, R.L.; Ward, T.R.; Baylor, M.R.; Besser, T.E. (2000). *Infection and Immunity*. **68**, 1400–1407.
- van der Woude, M.W.; Henderson, I.R. (2008). *Annu. Rev. Microbiol.* 62:153–169.
- Vincze, T.; Posfai, J.; Roberts, R.J. (2003). *Nucleic Acids Res.* 31:3688–91.
- Wallace, J.S. (1999). The ecological cycle of *Escherichia coli* O157:H7. Págs. 195-223. In *Escherichia coli* O157:H7 in farm animals. C.S. Stewart and HJ Flint, (eds.). Wallingford, Oxon: CAB International.
- Wang F, Yang Q, Kase JA, Meng J, Clotilde LM, Lin A, Ge B. (2013). *Foodborne Pathog Dis.* 10(8):665-77

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 (puntos 1 al 21), en formato .doc zipeado, configurado para papel A-4 y libre de virus.

- b. 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:

- a. 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.