



ASOCIACIÓN LATINOAMERICANA
DE NEFROLOGÍA PEDIÁTRICA

ARCHIVOS LATINOAMERICANOS DE
**NEFROLOGÍA
PEDIÁTRICA**

Órgano oficial de la Asociación
Latinoamericana de Nefrología Pediátrica

Miembro de la INTERNATIONAL PEDIATRIC NEPHROLOGY ASSOCIATION (IPNA)

ÍNDICE

Editorial

Ramón Exeni 3

**PRIMER SIMPOSIO ARGENTINO DE ESCHERICHIA COLI
PRODUCTOR DE TOXINA SHIGA RESPONSABLE DEL
SÍNDROME URÉMICO HEMOLÍTICO**

20 al 22 de abril de 2022

LIBRO DE RESÚMENES..... 4

REGLAMENTO DE PUBLICACIONES 60

Crema de Bismuto Chobet® CON PECTINA

“REDUCE la ACTIVIDAD de la TOXINA SHIGA responsable del daño endotelial, base patogénica del SUH”

“INHIBE la EXPRESIÓN de los GENES que CODIFICAN la TOXINA SHIGA en la Escherichia coli infectada”



MASSO, M.; GARCIA, H.; GAGUINE, S.L.; ZOTTA, E.; IBARRA, C.
El Gel de Hidróxido de Bismuto protege el colon humano de la acción patogénica de E. Coli O157:H7 Productor de toxina shiga tipo 2. *Physiological mini Reviews*. 2014;Vol 7 3 RD National Meeting of teachers of physiology and biophysics Congress of the Argentinean Physiological Society 2014 October: 132.

MASSO, M.; GARCIA, H2.; ZOTTA, E.; IBARRA, C.
Bismuth hydroxide gel prevents human colon from cytotoxic action induced by EHEC. VETEC 2015 9th International Symposium On Shiga Toxin (Verocytotoxin) Producing Escherichia coli Infections.

SUBILS, T.; CASABONNE, C.; BALAGUE, C.
The inhibitory effect of colloidal bismuth hydroxide gel on Escherichia coli O157:H7 and on the activity of Shiga toxins», *BMC Research Notes*, 2014, 7:875.

El uso combinado de Crema de Bismuto Chobet con pectina y Sales de Hidratación Oral (SHO):

- **DISMINUYE la DURACIÓN de la DIARREA**
- **REMITE LA DIARREA CASI DOS VECES MÁS RAPIDAMENTE frente a aquellos paciente que solo recibieron SHO**

Oviedo, A.; Díaz, M.; Valenzuela, M.L.; Vidal, V.; Racca, L.; Bottai, H.; Priore, G.; Peluffo, G.; Di Bartolomeo, S.; Cabral, G.; Toca, M.C.
Acute Diarrhoea in Children: Determination of Duration Using a Combined Bismuth Hydroxide Gel and Oral Rehydration Solution Therapy vs. Oral Rehydration Solution. *Children* 2016, 3, 45.



Ante
los **PRIMEROS**
SINTOMAS de
DÍARREA

Para mayor información consulte a nuestro
Departamento Científico: 4545-5454

SCH soubeiran chobet
ESPECIALIDADES MEDICINALES DESDE 1912



ASOCIACIÓN
LATINOAMERICANA DE
NEFROLOGÍA PEDIÁTRICA
Miembro de la
INTERNATIONAL
PEDIATRIC NEPHROLOGY
ASSOCIATION (IPNA)

Consejo Directivo

Secretario General

Melvin Bonilla (Puerto Rico)

Secretaria Tesorera

Nilka De Jesús Gonzalez (Puerto Rico)

Ex-Secretaria General

Vera Koch (Brasil)

Secretario General Electo

Francisco Cano (Chile)

SECRETARIOS ASISTENTES

Zona 1:

México, Centroamérica y Caribe

Judith Exanthus (Haiti)

Yolanda Fuentes (México)

Zona 2:

Venezuela, Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia

Marcos Saldaña (Bolivia)

Peter Hualipa (Perú)

ZONA 3:

Paraguay, Uruguay, Brasil, Argentina, Chile

Laura Alconcher (Argentina)

Felipe Cavagnaro (Chile)

Representantes ante IPNA

Francisco Cano (Chile)

Florencio Mc Carthy (Panama)

Jaime Restrepo (Colombia)

Nilzete Liberato Bresolin (Brasil)

Editor Jefe de la Revista Archivos

Latinoamericanos de Nefrología Pediátrica

Ramón Exeni (Argentina)

Presidente del Congreso ALANEPE 2020

Mara Medeiros (México)

Edición digital.

Registro de la Propiedad Intelectual: 329.386.

Los trabajos y opiniones que se publican en

Archivos Latinoamericanos de Nefrología Pediátrica

son de exclusiva responsabilidad de los autores.

Todos los derechos reservados. Ninguna parte de esta publicación puede ser reproducida o transmitida en ninguna forma y por ningún medio digital, mecánico, de fotocopia, grabación u otros, sin permiso previo escrito de la Asociación Latinoamericana de Nefrología Pediátrica.

IDEOGRAFICA
SERVICIOS EDITORIALES

ideografica1988@gmail.com

ARCHIVOS LATINOAMERICANOS DE NEFROLOGÍA PEDIÁTRICA

Órgano oficial de la Asociación
Latinoamericana de Nefrología Pediátrica

Editor Responsable

Ramón Exeni (Argentina)

Coeditores

Carlos Saieh Andoníe (Chile)

Francisco Cano (Chile)

Maria Goretti Penido (Brasil)

Mara Medeiros Domingo (México)

Comité Editorial

Adragna, Marta (Argentina)

Alconcher, Laura (Argentina)

Alvarez Elías, Catalina (México)

Baez Mendez de Ladoux, Diana (Paraguay)

Bonilla, Félix Melvin (Puerto Rico)

Bresolin, Nilzete Liberato (Brasil)

Coccia, Paula (Argentina)

Cánepa, Carlos (Argentina)

Cavagnaro, Felipe (Chile)

De Jesús Gonzalez, Nilka (Puerto Rico)

Exeni, Andrea Mariana (Argentina)

Exeni, Claudia Elena (Argentina)

Ferraris, Jorge (Argentina)

Florentín de Merech, Leticia (Paraguay)

Florín, José (Cuba)

Freire Valencia, Oswaldo (Ecuador)

Freundlich, Michael (USA)

Gajardo Zurita, Macarena (Chile)

García Druck, Clotilde (Brasil)

Gastelbondo Amaya, Ricardo (Colombia)

Gordillo, Berta Blum de (México)

Grimoldi, Irene (Argentina)

Grünberg, José (Uruguay)

Higueras, Walter (Perú)

Koch, Vera (Brasil)

Lahoz, Marta (Argentina)

Lascurain de Arza, Ana (Paraguay)

Lima, Eleonora (Brasil)

López, Michelle (Venezuela)

Madrigal, Gilbert C. (Costa Rica)

Martini, Rodolfo (Argentina)

Medeiros Domingo, Mara (México)

Mejía, Natalia (Colombia)

Mendoza de Herman, Gladis (Guatemala)

Miceli, Susana (Argentina)

Monteverde, Marta (Argentina)

Mora Muñoz, Alejandra (México)

Muñoz Arispe, Ricardo (México)

Orta Sibú, Nelson (Venezuela)

Pinto, Viola (Chile)

Rahman, Ricardo (Argentina)

Rebori, Anabella (Uruguay)

Restrepo, Consuelo (Colombia)

Restrepo, Jaime (Colombia)

Reyner, Loza (Perú)

Rodríguez Iturbe, Bernardo (Venezuela)

Sakihara Asato, Graciela (Perú)

Saldaña, Marcos (Bolivia)

Salusky, Isidro (USA)

Sandoval Díaz, Mabel (Nicaragua)

Santiago, Adriana (Argentina)

Urdaneta, Eliexer (Venezuela)

Valles, Patricia (Argentina)

Vásquez, Luis (Argentina)

Vázquez, Aida (Argentina)

Velasco Suárez, María (Uruguay)

Velásquez Jones, Luis (México)

Viard, Verónica (Argentina)

Verocay, Cristina (Uruguay)

Wainsztein, Raquel (Argentina)



ASOCIACIÓN LATINOAMERICANA
DE NEFROLOGÍA PEDIÁTRICA

ISSN 1667-4170

ARCHIVOS LATINOAMERICANOS DE
**NEFROLOGÍA
PEDIÁTRICA**

Órgano oficial de la Asociación
Latinoamericana de Nefrología Pediátrica

Miembro de la INTERNATIONAL PEDIATRIC NEPHROLOGY ASSOCIATION (IPNA)

ÍNDICE

Editorial

Ramón Exeni 3

**PRIMER SIMPOSIO ARGENTINO DE ESCHERICHIA COLI
PRODUCTOR DE TOXINA SHIGA RESPONSABLE DEL
SÍNDROME URÉMICO HEMOLÍTICO**

20 al 22 de abril de 2022

LIBRO DE RESÚMENES..... 4

REGLAMENTO DE PUBLICACIONES 60

Editorial

Tenemos el placer de publicar los trabajos presentados en el **1^{er} Simposio Argentino de VTEC** efectuado en Buenos Aires los días 20, 21 y 22 de Abril de este año.

Como podrán apreciar los trabajos son del más alto nivel y servirán de base para la realización de trabajos que hagan mas comprensible los diversos aspectos de la etiopatogenia del Síndrome Urémico Hemolítico (SUH).

Concurrieron investigadores de Latinoamérica y fue un honor, en forma virtual, el disfrutar de una conferencia del *Dr. Mohamed Karmaili*, descubridor del rol de las bacterias productoras de verotoxina como agente etiológico del SUH.

A consecuencia de su participación, se restableció un contacto con el *Dr. Karmali* quien envió propuestas a las *Dras. María Marta Amaral* y *Cristina Ibarra* para participar en un proyecto sumamente importante denominado RAP para analizar múltiples parámetros en pacientes con SUH. Por otra parte, recibí una invitación para unirme al grupo de investigación.

El Simposio fue un éxito, destacándose la labor del Comité Organizador, ejemplo de organización y compromiso con tan importante evento.

Un hecho trascendente para la marcha de ALANEPE y sus relaciones con la IPNA fue el comienzo como Consejera en el Council de la IPNA de la *Dra. Laura Alconcher*.

Laura ocupa tan importante cargo como representante de la Zona integrada por Argentina, Brasil, Uruguay, Chile y Paraguay.

Deseamos el mayor de los éxitos y nunca tan merecida la designación para este cargo por su intensa labor en ALANEPE y su dedicación y compromiso sin límites.

Dr. Ramon Exeni

Editor

Archivos Latinoamericanos de Nefrología Pediátrica

VTEC Argentina 2022

1º Simposio Argentino sobre *Escherichia coli* productor de toxina Shiga responsable del Síndrome Urémico Hemolítico



LIBRO DE RESÚMENES

Del 20 al 22 de abril de 2022 se celebró el **1º Simposio Argentino sobre *Escherichia coli* productor de toxina Shiga responsable del Síndrome Urémico Hemolítico**.

El evento tuvo lugar en la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires (UBA) y en el EEA-AMBA-Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA).

El mismo fue organizado de manera conjunta por el INTA, la Facultad de Medicina-UBA, la Asociación Argentina de Microbiología (AAM) y la Asociación Civil “Lucha contra el Síndrome Urémico Hemolítico” (LuSUH).

El objetivo central fue lograr un espacio de encuentro multidisciplinario destinado al intercambio de conocimientos de investigación científica básica y aplicada referentes a la salud humana, la sanidad animal y los ecosistemas ambientales.

A partir de este encuentro se espera poder fortalecer los vínculos entre los diferentes grupos que a nivel nacional realizan investigación en esta área y contribuir a generar una mayor conciencia en la sociedad sobre el Síndrome Urémico Hemolítico.



Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria



COMITÉ ORGANIZADOR

Presidente:

Mariano Larzábal, IABIMO-CONICET-INTA

Vicepresidenta:

María Marta Amaral, IFIBIO-Houssay-CONICET, FMED-UBA

Videopresidenta 2^{da}:

Nora Lía Padola, CIVETAN, FCV-UNCPBA

Secretario General:

Angel Cataldi, IABIMO-INTA-CONICET

Prosecretaria:

Victoria Ramos, IMEX-CONICET-Academia de Medicina

Tesorera:

Cristina Ibarra, IFIBIO-Houssay-CONICET, FMED-UBA

Protesorera:

Isabel Chinen, INEI-ANLIS "Dr. Carlos Malbrán"

Vocales:

Marcelo Da Rocha, Asociación LuSUH,

Analía Etcheverría, CIVETAN, FCV-UNCPBA

Lucía Galli, IGEVET-FCV-UNLP

Alejandra Ricca, EEA-AMBA-INTA, UNAHUR

COMITÉ CIENTÍFICO

Laura Alconcher, Hospital Penna, Bahía Blanca

María Marta Amaral, IFIBIO, FMED-UBA

Marcela Belardo, IESCODE-UNPaz

Adriana Bentancor, FCV-UBA

Victoria Brusa, IGEVET-FCV-UNLP

Carolina Carbonari, INEI-ANLIS "Dr. Carlos Malbrán"

Angel Cataldi, IABIMO-CONICET-INTA

Isabel Chinen, INEI-ANLIS "Dr. Carlos Malbrán"

Analía Etcheverría, CIVETAN, FCV-UNCPBA

Ramón Exeni, Hospital del Niño R. Exeni, La Matanza.

Silvina Fadda, CERELA-CONICET, Tucumán

Lucía Galli, IGEVET-FCV-UNLP

Cristina Ibarra, IFIBIO, FMED-UBA

María Ángeles Jure, FBQyF-UNT.

Mariano Larzábal, IABIMO-CONICET-INTA

Ana Paula Lucchesi, CIVETAN, FCV-UNCPBA

Nora Lía Padola, CIVETAN, FCV-UNCPBA

Marina Palermo, IMEX-CONICET-Academia de Medicina

Alejandra Ricca, EEA AMBA-INTA-UNAHUR

LOS ORGANIZADORES DEL SIMPOSIO VTEC ARGENTINA 2022 AGRADECEN EL APOYO DE LAS SIGUIENTES ENTIDADES:

INSTITUCIONES OFICIALES

Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria

Ministerio de Producción, Ciencia e Innovación Tecnológica

Ministerio de Salud de La Provincia De Buenos Aires

Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (Conicet)

Comisión de Investigaciones Científicas (CIC)

Agencia Nacional de Promoción de la Investigación, el Desarrollo Tecnológico y la Innovación

Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas "Dr. Carlos G. Malbrán"

Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

Facultad de Veterinaria, Universidad Nacional De Tandil

Facultad de Veterinaria, Universidad Nacional De La Plata

Universidad Nacional de Hurlingham

ASOCIACIONES NO GUBERNAMENTALES

Asociación Lucha Contra el Síndrome Urémico Hemolítico

Asociación para la Prevención del Síndrome Urémico Hemolítico

Asociación En Memoria de Luz

OTRAS INSTITUCIONES AUSPICIANTES

Red de Seguridad Alimentaria del Conicet

Sociedad Argentina de Pediatría

Academia Nacional de Medicina

PALABRAS DE BIENVENIDA

Estimadas y estimados colegas, amigas y amigos:

*En nombre del Comité Organizador les damos una cordial bienvenida al **1° Simposio sobre Escherichia coli productor de toxina Shiga responsable del Síndrome Urémico Hemolítico** denominado VTEC Argentina 2022. Este Simposio se ha organizado de manera conjunta con el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires, la Asociación Argentina de Microbiología y la Asociación Civil “Lucha contra el Síndrome Urémico Hemolítico” (LuSUH).*

Este evento surge a partir de la necesidad de un espacio a nivel nacional para realizar un encuentro multidisciplinario destinado al intercambio de conocimientos de investigación científica básica y aplicada referentes a la salud humana, la sanidad animal y los ecosistemas ambientales. Además, la elevada incidencia del Síndrome Urémico Hemolítico en Argentina nos convoca a asumir un compromiso social considerando que un encuentro científico con enfoque transversal facilitará la implementación de programas, políticas, legislación e investigación para lograr mejores resultados sobre la salud pública. Este Simposio también fortalecerá los vínculos entre los diferentes grupos que a nivel nacional realizan investigación en esta área, a partir de la actualización científica, la capacitación de recursos humanos, contribuyendo también a generar una mayor conciencia en la sociedad sobre esta enfermedad.

Queremos agradecer principalmente a los miembros de los Comités Organizador y Científico por su gentileza y enorme generosidad al dedicar gran parte de su tiempo a la gestión del evento. A todas las personas de la Facultad de Medicina y del INTA-AMBA que colaboraron en la organización de este Simposio.

Agradecemos también el apoyo financiero de la Universidad de Buenos Aires (UBA), del Fondo para la Investigación Científica y Tecnológica (FONCYT), del Ministerio de Salud de la Provincia de Buenos Aires, de la Fundación ARGEN-INTA, del Instituto de Promoción de la Carne Vacuna Argentina y de la Asociación Civil “Lucha contra el Síndrome Urémico Hemolítico” (LuSUH), como así también a la colaboración de los diferentes patrocinantes. Además, queremos hacer una mención especial a la Asociación Argentina de Microbiología (AAM) por su gran apoyo y asesoramiento en la organización.

Esperamos poder retribuir con las actividades del VTEC Argentina 2022 a todos los inscriptos que con su voto de confianza hicieron posible este Simposio. Por último, agradecemos a todos los disertantes, científicos argentinos y extranjeros destacados, que se comprometieron a participar y que abordarán temáticas diversas de gran interés para todos los grupos de investigación. Deseamos que este Simposio sea de provecho para todos y especialmente que contribuya a la formación de los jóvenes investigadores de nuestro país.

Esperamos que este Simposio sea realmente de su agrado.

Dra. María Marta Amaral

IFIBIO-Houssay-CONICET, FMED-UBA
Vicepresidenta VTEC Argentina 2022

Dr. Mariano Larzábal

IABIMO-INTA-CONICET
Presidente VTEC Argentina 2022

Día 1: 20 de ABRIL de 2022

CONFERENCIA PLENARIA

PANORAMA ACTUAL DEL SÍNDROME URÉMICO HEMOLÍTICO EN ARGENTINA

RAMÓN EXENI

Servicio de Nefrología, Hospital del Niño Prof. Dr Ramón Exeni, La Matanza, Provincia de Buenos Aires. raexeni@gmail.com

Entre los aspectos epidemiológicos del SUH se destaca la edad de comienzo que cambia notablemente desde la década del 60 registrándose casos de la enfermedad en niños mayores y adolescentes. En un trabajo que efectuamos en el año 1994 la edad promedio fue de 13,3 meses mientras que en la actualidad superan los 2 años y se registran casos en niños mayores y adolescentes, con frecuencia creciente. Respecto del número de casos por año es claro que en las cifras oficiales existe un sub-registro motivado por la falta del cumplimiento de la denuncia obligatoria, hecho muy frecuente y que confunde sobre la verdadera incidencia de casos en nuestro país. Se resaltan los aportes de numerosos grupos de investigación en investigación básica y clínica. En el análisis de los casos de SUH causados por neumococo se observa que a partir de cambios en la composición de la vacuna por el agregado de estos antígenos bacterianos se observó una disminución del número de pacientes causadas por este germen. Además, a partir de la determinación del título de anticuerpos obtenidos por nuestro grupo en colaboración con el IMEX-CONICET de la Academia de Medicina se constata la alta incidencia de anticuerpos anti-Stx en niños sanos sin ninguna relación con la toxina. Finalmente se analiza el tratamiento con Eculizumab en pacientes con SUH típico. El Eculizumab es un anticuerpo monoclonal IgG humanizado recombinante que inhibe la acción del complemento terminal y está indicado para el SUH atípico. Se discute su uso en el caso de 2 niños con SUH típico y severísimo compromiso neurológico que no habían respondido a ninguna medicación anticonvulsivante. Los resultados fueron excelentes y el motivo de la presentación de estos casos es el de llamar la atención del problema que representa la falta de este medicamento en nuestro país. Vivimos en constante angustia cuando un paciente lo requiere y chocamos con la imposibilidad de conseguirlo. Se crean situaciones de mucha tensión entre el grupo médico y familiar entorpeciendo el correcto tratamiento del paciente. Otros estudios actualmente se dirigen a lograr tratamientos adecuados y parece promisorio la línea que intenta bloquear la unión de los receptores GB3 y la toxina. Sin embargo, hasta el presente no existe un tratamiento efectivo para el SUH típico.

MESA REDONDA

AVANCES EN EL CONOCIMIENTO DE ASPECTOS CLÍNICOS EN NIÑOS CON SUH TÍPICO

Coordinador: Ramón Exeni

Servicio de Nefrología, Hospital del Niño Prof. Dr Ramón Exeni, La Matanza, Provincia de Buenos Aires. raexeni@gmail.com

PREDICTORES DE FORMAS GRAVES DE SUH Y POSIBLES IMPLICANCIAS TERAPÉUTICAS

LAURA ALCONCHER

Servicio de Nefrología Infantil. Hospital Interzonal Dr José Penna Bahía Blanca Provincia de Buenos Aires. laura.alconcher.la@gmail.com

El Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) asociado a *Escherichia coli* productor de toxina Shiga (STEC) es una enfermedad prevenible que tiene un fuerte impacto para el paciente y un alto costo para el sistema de salud. Dos a tres por ciento de los pacientes con STEC-SUH fallecen en la etapa aguda. Es una de las causas más frecuentes no sólo de injuria renal aguda sino también de enfermedad renal crónica, diálisis y trasplante. Es una microangiopatía trombótica sistémica que puede comprometer cualquier órgano, siendo el compromiso del sistema nervioso central (SNC), colon y corazón las principales causas de muerte. El objetivo de esta presentación es describir predictores de formas graves al ingreso del paciente, que han sido identificados en los últimos años, y las implicancias terapéuticas que algunos de ellos podrían tener. Leucocitos, hematocrito, hemoglobina y ácido úrico elevados, así como sodio, albúmina y complemento (C3) bajo se han asociado a formas graves de enfermedad. Las pérdidas por diarrea en días previos al ingreso, la disminuida ingesta, la pérdida de líquido por lesión vascular puede llevar a hipovolemia y hemoconcentración que se expresa por hematocrito y hemoglobina elevados. La disminución del flujo sanguíneo e hiperviscosidad favorece la formación de trombos y aumenta la isquemia. Hematocrito y hemoglobina elevados fueron descriptos como predictores independientes de mayor requerimiento de diálisis, diálisis más prolongadas, mayor compromiso del SNC, del colon y mayor riesgo de muerte. Por lo tanto, debemos prestar especial atención al estado de hidratación de los pacientes al ingreso. Si tienen signos de hemoconcentración, deben expandirse con solución fisiológica a 10 ml/kg/d para disminuir el riesgo de trombosis y evitar que al fallo renal por microangiopatía trombótica se sume una necrosis tubular aguda. Estas prescripciones deben ser controladas para evitar complicaciones por sobrecarga de volumen en un paciente oligoanúrico. La activación de la vía alterna del complemento ha sido documentada en varias series de pacientes con SUH-STEC. Balestracci y col. encontraron C3 disminuido en un tercio de los pacientes con SUH-STEC, resultando ser un predictor independiente de formas severas. Eculizumab, un anti-

cuerpo monoclonal contra el C5 usado en el tratamiento de los SUH por alteración genética de la vía alterna del complemento, se ha indicado en pacientes con SUH-STECC con resultados prometedores, pero aún no concluyentes. Finalmente, la hiperuricemia con valores superiores a 10 mg/dl implicaría un riesgo de nefropatía por uratos también pasible de una intervención terapéutica.

ACIDO ÚRICO: SU IMPORTANCIA EN EL PERIODO AGUDO Y SECUELAS A LARGO PLAZO EN NIÑOS CON SUH TÍPICO

ALEJANDRO BALESTRACCI

Unidad de Nefrología, Hospital General de Niños Pedro de Elizalde, CABA- abalestracci@yahoo.com.ar

El síndrome urémico hemolítico asociado a *Escherichia coli* productor de toxina Shiga (STEC-SUH) es una causa frecuente de lesión renal aguda en pediatría. La presencia de hiperuricemia fue propuesta como un factor adicional de daño renal independientemente de la etiología de la falla renal ya que su concentración elevada en plasma promueve la obstrucción tubular renal mediante el depósito de cristales y estimula una respuesta inflamatoria y profibrótica. Por lo tanto, normalizar los niveles de ácido úrico (AU) podría ser beneficioso en todos los niños con lesión renal aguda; sin embargo, pese a que han sido comunicados niveles elevados de AU en pacientes con STEC-SUH, hay escasa información acerca de su tratamiento. En esta exposición se analizarán las distintas opciones terapéuticas disponibles para disminuir los niveles de AU durante la fase aguda en pacientes con STEC-SUH y se revisará nuestra experiencia en el tratamiento de esta complicación con allopurinol y con rasburicasa. Estudios epidemiológicos, principalmente en adultos, describieron la asociación entre hiperuricemia y complicaciones metabólicas a largo plazo, incluyendo el desarrollo y la progresión de la enfermedad renal crónica, de hipertensión arterial, de síndrome metabólico, de eventos cardiovasculares y de muerte. Superado el periodo agudo del STEC-SUH, aproximadamente el 30% de los sobrevivientes desarrollan enfermedad renal crónica en periodos variables de tiempo. En esta línea, recientemente se observó en pacientes con STEC-SUH que la reducción de los niveles de AU durante el periodo agudo se asocia con mejor evolución renal alejada. En acuerdo con esto, en esta presentación se compartirán nuestros resultados, que confirman a la exposición prolongada a niveles elevados de AU como un factor de riesgo de secuela renal durante el seguimiento alejado.

SEVERO COMPROMISO ORGÁNICO MÚLTIPLE EN NIÑOS CON SUH POR *E. COLI* PRODUCTOR DE TOXINA SHIGA

PATRICIA G VALLÉS

Hospital Pediátrico H Notti. Facultad de Ciencias Médicas. UNCuyo Mendoza pvalles@fcm.uncu.edu.ar

El Síndrome Urémico Hemolítico asociado a *Escherichia coli* productor de toxina Shiga (SHU-STECC-HUS) es la principal causa de injuria renal aguda (IRA) pediátrica en Argentina. La toxina Shiga (Stx) pero también el lipopolisacárido (LPS) y la propia lesión endotelial provocada por el efecto de ambos factores activan el sistema inmunitario, desencadenando una intensa respuesta inflamatoria. La activación de la respuesta inflamatoria provoca la liberación de citoquinas y quimioquinas, el reclutamiento de leucocitos y monocitos, y la activación de las cascadas del complemento y tromboticas, durante la etapa temprana de SHU-STECC. Este estudio retrospectivo describe 44 pacientes pediátricos SHU-STECC con síndrome de disfunción orgánica múltiple (MODS) en la fase inicial de la enfermedad; de un total de 362 pacientes con diagnóstico de SUH típico ingresados en el Hospital Notti Mendoza Argentina durante un periodo de 15 años. Se incluyeron pacientes con pródromo de diarrea sanguinolenta. que presentaron tempranamente luego del ingreso al hospital, injuria renal aguda (AKI), inestabilidad hemodinámica y disfunción orgánica múltiple severa, no simultánea. Las formas graves asociadas al síndrome de disfunción orgánica múltiple (MODS) fueron definidas como la ocurrencia de dos o más de las siguientes condiciones: compromiso neurológico mayor, severas complicaciones gastrointestinales, cardiovasculares, respiratorias graves y/o sepsis. Cuarenta y cuatro pacientes de 35.4 ± 4.1 meses ingresaron en la unidad de cuidados intensivos en los dos primeros días posteriores al diagnóstico de SUH, por un período de 21 ± 2 días. Requhirieron ventilación mecánica asistida 41 pacientes, soporte inotrópico temprano 37 pacientes y 28 pacientes desarrollaron shock séptico. Cuarenta y un pacientes presentaron Injuria renal aguda (AKI), anuria $12,3 \pm 1,6$ días, requiriendo terapia de reemplazo renal por 12 ± 1 días. Cuarenta y un pacientes desarrollaron disfunción neurológica, 33 sufrieron convulsiones tónico-clónicas generalizadas y 4 pacientes, convulsiones tónico-clónicas focalizadas. Se demostró miocardiopatía dilatada en 3 pacientes, disfunción sistólica del ventrículo izquierdo en 4 pacientes, hipertensión arterial en 17 pacientes. Cuatro pacientes presentaron hemorragia pulmonar y dos pacientes sufrieron de síndrome de distrés respiratorio agudo. De los nueve pacientes que presentaron afectación digestiva, 6 pacientes sufrieron enterorragia y colitis hemorrágica, 1 pancreatitis, 1 prolapso rectal y el último insuficiencia hepática severa Se realizó colectomía por necrosis colónica transmural en 3 pacientes. Treinta y siete pacientes fueron tratados con recambio plasmático terapéutico y 28 recibieron Metilprednisolona (10 mg/kg durante 3 días). De los 32 pacientes que sobrevivieron, se observaron secuelas neurológicas en 11 pacientes e insuficiencia renal crónica en 5 pacientes. Las secuelas neurológicas evaluadas 3 a 6 meses posteriores al alta, mostraron discapacidad severa en 3 pacientes, discapacidad moderada inferior en 7 y en 1 paciente buena recuperación. En SUH-STECC la severa presentación clínica de inicio

sugiere una respuesta inflamatoria amplificada después de la exposición a la toxina Shiga y/o LPS de *E. coli*. Nuestros resultados subrayan la necesidad del reconocimiento inicial de estas formas severas de STEC-HUS asociadas con disfunción orgánica múltiple las cuales requieren de cuidados intensivos y terapia enfocada a cada una de las complicaciones

TRASPLANTE EN NIÑOS CON SUH TÍPICO

PAULA A. COCCIA

Instituto Universitario Hospital Italiano de Buenos Aires, CABA. paula.coccia@hospitalitaliano.org.ar

Aproximadamente el 60 al 70 % de los pacientes que presentan SUH por STEC se recuperan sin secuelas luego de la etapa aguda de la enfermedad. El resto queda con un grado variable de secuelas asociadas fundamentalmente al fallo renal agudo y presentan evidencia de daño renal irreversible expresado por hipertensión arterial (HTA), proteinuria o caída de filtrado glomerular. Dado que la proteinuria es un indicador de progresión de enfermedad renal a largo plazo, generalmente estos pacientes reciben como tratamientos inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA) o bloqueantes de los receptores de angiotensina (ARAI). La caída de filtrado glomerular es la secuela renal más grave y se clasifica de acuerdo con los estadios de Enfermedad renal crónica en 5 grados, cada uno con un filtrado glomerular más bajo. Puede potencialmente evolucionar o progresar en el tiempo llegando a estadios terminales (grado 5) que requieren terapia de sustitución renal como diálisis crónica o trasplante renal. De hecho, en nuestro centro de nefrología pediátrica en el Hospital Italiano de Buenos Aires, el SUH por STEC es la segunda causa de insuficiencia renal crónica en pediatría, responsable del 20% de los trasplantes renales en niños y adolescentes.

Los factores de riesgo de la etapa aguda más comúnmente asociados con secuelas graves son la presencia de leucocitosis mayor a 20.000 por mm³ al debut y la persistencia del fallo renal, expresada sobre todo como anuria prolongada por más de 10 días y el tiempo prolongado en diálisis. La hemodiálisis puede generar mayor hipotensión intradialítica e isquemia renal que la diálisis peritoneal y este factor podría potencialmente enlentecer la recuperación del daño renal producido por la enfermedad. La deshidratación del paciente al debut de la enfermedad es un factor de riesgo bien documentado de mortalidad y gravedad de la enfermedad en la etapa aguda pero no ha sido completamente estudiado como otro factor de riesgo adicional para el desarrollo de secuelas a largo plazo. En la misma línea de investigación, algunos autores han intentado validar distintos scores para identificar pacientes que al ingreso en guardia presentan mayor riesgo de desarrollar formas graves de la enfermedad y por lo tanto secuelas más graves a largo plazo. Ninguno de estos scores han sido aún validados en nuestro país. En aquellos pacientes en los cuales se requiere realizar un trasplante renal, la recurrencia de la enfermedad es excepcional. En aquellos pacientes que presentan microangiopatía trombótica post trasplante renal no relacionada a rechazo humoral, es necesario descartar la presencia de alguna mutación asociada a los factores del complemento y la asociación con el uso de inhibidores de calcineurina. En general la sobrevida del injerto en los pacientes que fueron trasplantados luego de un SUH por STEC es muy buena, y similar a las de aquellos pacientes trasplantados por otras causas de enfermedad renal crónica en pediatría.

MESA REDONDA

EPIDEMIOLOGÍA: VIGILANCIA Y DIAGNÓSTICO/DETECCIÓN DE STEC EN ARGENTINA BAJO EL CONCEPTO DE UNA SALUD

COORDINADORA:

ELIZABETH MILLIWEBSKY

Servicio Fisiopatogenia, Departamento Bacteriología, INEI-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán" emiliwebsky@gmail.com

ACTUALIZACIÓN EN ESTRATEGIAS DE DIAGNÓSTICO Y VIGILANCIA

ISABEL CHINEN

Servicio Fisiopatogenia, Departamento Bacteriología, INEI-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán", CABA. ichinen05@gmail.com

El síndrome urémico hemolítico (SUH) asociado a la infección por *E. coli* productor de toxina Shiga (STEC) es de gran preocupación en Argentina por su alta incidencia (6,33 casos/100.000 niños <5 años, 2020). La vigilancia del SUH e infecciones por STEC se realiza a través de estrategias (SNVS 2.0 – SISA): Vigilancia universal de casos clínicos, Vigilancia basada en laboratorio, Sistema de unidades centinela, y Epidemiología molecular. En este marco el Laboratorio de Referencia Nacional (LRN) contribuye aportando mejoras al diagnóstico de STEC y otros *Escherichia coli* diarregénico (DEC; enterotoxigénico-ETEC, enteroagregativo-EAEC, enteropatógeno-EPEC, enteroinvasivo-EIEC), y brindando soporte a los laboratorios de la Red. En el año 2021, 167 (25%) casos resultaron STEC+ por cultivo-PCR, de un total de 679 casos humanos recibidos en el LRN [26/112 (23%) diarreas, 48/228 (19%) diarrea sanguinolenta (DS), 93/258 (36%) SUH, 13/70 (19%) asintomáticos]; observándose un incremento en la detección gracias a la aplicación de PCR-RT. En dos casos de DS, se detectaron cepas híbridas de los patotipos EAEC-stx y STEC/EPEC. En 8 casos (SUH/D/Contactos) se observó coinfección por STEC/STEC (n=2) o STEC/DEC (n=6). Se estudiaron 3 brotes de O157 (n=2)

y O145 (n=1), y mediante PFGE se pudo comprobar la identidad de los patrones. De 79 casos de SUH STEC+ por cultivo-PCR (con muestra de suero), 62 (78%) pudieron ser confirmados por Glyco-iELISA. De 162 casos de SUH STEC- por PCR (con muestra de suero), 135 (85,8%) pudieron ser diagnosticados por Glyco-ELISA. El diagnóstico de la infección por STEC en los casos de SUH se logró en un 88%, mediante cultivo-PCR (36%) y Glyco-iELISA (52%). Entre las investigaciones realizadas en nuestro laboratorio, hemos avanzado en las estrategias de análisis mediante MALDI-TOF. Para discriminar STEC O157 de otros *E. coli*, de manera rápida y confiable se propuso la búsqueda de picos Biomarcadores (Flex Analysis) y análisis proteómico (ClinProTools). La combinación del modelo matemático con el manual mejoró la sensibilidad y especificidad lográndose clasificar en forma correcta el 98.5% de los aislamientos. Otra iniciativa en etapa de implementación inicial es la aplicación de la secuenciación de genoma completo, herramienta de alta resolución, para el diagnóstico referencial y la vigilancia. Se han diseñado los algoritmos de análisis en línea de comando, y utilizando también softwares comerciales (BioNumerics v.8) y abiertos de uso libre (Galaxy TRAKR/Aries), y se está evaluando la mejora en tiempo y precisión para su aplicación en la rutina como aporte al fortalecimiento del sistema. Dado el avance tecnológico, en los últimos años se incrementó la disponibilidad de equipos de PCR-RT y MALDI-TOF en los hospitales, para lo cual se propone incluir su aplicación en los algoritmos diagnósticos locales. Para ello se ha avanzado en talleres virtuales a 4 provincias (2021) y se continúa con la capacitación al resto de la Red. A fin de dar una respuesta integral a la vigilancia, además del aporte de las nuevas tecnologías, es necesario fortalecer la estrategia de trabajo conjunto interdisciplinario, de manera de poder avanzar en establecer medidas de prevención efectivas que permitan disminuir la incidencia en nuestro país.

RESERVORIOS Y MEDIO AMBIENTE: CUANDO STEC SE ADAPTA PARA SOBREVIVIR

NORA LÍA PADOLA

Facultad Ciencias Veterinarias- CIVETAN-Universidad Nacional de Centro de la Provincia de Buenos Aires.
nlpadola@vet.unicen.edu.ar

El bovino es el principal portador de STEC, aunque no el único, y la infección no produce enfermedades graves como en el hombre. Las bacterias se han adaptado a un estilo de vida “comensal” en animales adultos y son eliminadas en la materia fecal, pudiendo contaminar su cuero y el medio ambiente, favoreciendo la transmisión de STEC al humano, tanto por contacto directo con animales, contacto con el medio ambiente o por la contaminación de los productos derivados durante la faena. De esa manera, STEC puede sobrevivir en el ambiente, y en otras superficies, formando biofilms, mediante la acción de genes que expresan en forma coordinada y no siempre en conjunto, proteínas con función de adherencia y autoagregación. Si bien la mayoría de las cepas STEC tiene la capacidad de formar biofilm, existe una variación individual marcada no relacionada al serotipo ni al origen de las cepas. Las prevalencias de STEC en distintas categorías de bovinos (jóvenes y adultos) de distintos sistemas de producción (intensivos y extensivos) confirman la liberación intermitente de STEC en sus heces, la multiplicidad de cepas reflejadas en un gran abanico de STEC no-O157 y en menor grado O157, con diversidad de factores de virulencia, tanto intra como inter serotipos. Esa misma diversidad se observó en las cepas STEC aisladas de medio ambiente (suelo, comederos, agua de bebida) demostrando la importancia del ambiente en la transmisión de estas cepas tanto al ser humano, como a los animales que habitan en él. El aislamiento y caracterización de cepas STEC no-O157 relacionadas clonalmente entre el ambiente de tambos y los animales que lo habitan, confirman esta teoría. STEC sobrevive en el suelo y en materia fecal por más de 2 meses, mostrando una capacidad de adaptación diferencial y propia ante los distintos ambientes, aumentando así el riesgo de transmisión ambiente-animales-humano, en una tríada contemplada bajo el paradigma “Una Salud”.

PATAGONIA ARGENTINA, PARTICULARIDADES EPIDEMIOLÓGICAS EN LA ISLA DE TIERRA DEL FUEGO

ADRIANA BENTANCOR

Cátedra de Microbiología, Centro de Estudios Transdisciplinarios de Epidemiología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires. aben@fvet.uba.ar

El Sistema Nacional de Vigilancia de la Salud ha visualizado la distribución de casos de SUH en Argentina. La región sur del país presenta las mayores tasas y Tierra del Fuego (TDF) presenta un modelo epidemiológico particular: hay poco o nulo ingreso de animales del continente, el tránsito de carne está limitado por razones sanitarias, se destaca la ganadería ovina con elevado consumo estival de su carne y presenta asentamientos informales dependientes del agua de chorrillos con cloacas a cielo abierto. Para esta región cabe preguntarse cuáles son los puntos críticos a trabajar para mejorar la salud de la población. Se analizó la contaminación de diversas fuentes, con protocolos estandarizados, IMS, rastillaje por PCR, aislamiento y caracterización. Se analizaron 282 muestras de carne molida (93 carnicerías en tres rondas de muestreo), 194 muestras de hisopado de bovinos en playa de faena (104 de *feedlot* y 90 de campo), 50 animales en pie en *feedlot*, 382 esponjados de carcasas ovinas, 368 hisopados ovinos en playa de faena y la contaminación de los chorrillos de agua de consumo. Se incluyó dos estudios de brote de SUH con 3 perros contacto al caso. Se avanzó en la evaluación de riesgo mediante 250 encuestas CAP (conocimientos, actitudes y percepción) en la comunidad. La contaminación detectada en carne molida fue 12/282 *stx2+* con 3 aislamientos. En bovinos

del *feedlot* detectamos 18/104 *stx+* con 13 aislamientos y de pastoreo 12/90 *stx+* con 4 aislamientos. No hubo diferencias en la detección de cepas STEC considerando el tipo de producción bovina y la playa de faena. Entre 5,7 al 15% de los bovinos fueron portadores de STEC, proporción menor a la del resto del país. En 4/50 muestras de los animales del *feedlot* se aisló EPEC O157. En ovinos 24/382 carcasas fueron *stx+* y se aisló 8 STEC. De hisopados ovinos 98/368 hisopados fueron *stx+*, con 12 aislamientos. De ninguna fuente se aisló a los serotipos STEC considerados por el Código Alimentario Argentino, pero se detectó STEC O157 en 6/382 carcasas ovinas y 2/282 muestras de carne bovina por PCR o inmunocromatografía, respectivamente. De los estudios de brote se detectó 1/3 perros *stx2+*. Respecto a la contaminación hídrica 4/60 muestras fueron *stx+*. Los resultados de encuestas CAP de TDF destacan, a diferencia de otras comunidades, la pérdida de cadena de frío y descongelamiento inadecuado en el hogar. Si bien TDF tiene temperaturas ambientales bajas todo el año, las temperaturas hogareñas, son altas y constantes, pudiendo ser causal de ETA incluso si la contaminación del alimento estuviera por debajo del límite de detección del ensayo. El impacto epidemiológico de los aislamientos en un sistema productivo cerrado también debe considerar otras fuentes junto a la atipia de los aislamientos. En TDF se conjugan variables no consideradas previamente, algunas pueden hacerse extensivas a la Patagonia. Hasta ahora se destaca la contaminación antrópica de chorrillos y las prácticas hogareñas microbiológicamente inadecuadas, que escapan de los controles ejecutables sobre la cadena comercial de alimentos, pero que pueden ser integradas mediante el sistema educativo formal.

DETECCIÓN DE *Escherichia coli* PRODUCTOR DE TOXINA SHIGA (STEC) EN SISTEMAS ACUÁTICOS PAMPEANOS

GUILLERMINA NUOZZI

Laboratorio de Limnología y Microbiología Acuática, Departamento de Ciencias Básicas y Experimentales, Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires (UNNOBA). guillerminanuozzi@gmail.com

En el marco de distintos proyectos de investigación se analizaron los ensamblajes microbianos planctónicos en sistemas acuáticos superficiales pampeanos (lagunas, ríos) utilizados con fines recreativos (pesca, deportes acuáticos e inmersiones) y altamente impactados por actividades antrópicas (ganadería, rotaciones de soja-maíz-trigo, urbanizaciones). Estos análisis se realizaron mediante diferentes metodologías, tales como secuenciación masiva del gen 16S ARNr, ddPCR y técnicas de cultivo bacteriológico. En algunos de los sistemas acuáticos estudiados se identificaron bacterias potencialmente patógenas, como *Salmonella sp.*, *Legionella spp.*, *Edwardsiella tarda*, *Morganella morganii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Vibrio vulnificus*, entre otras. Mientras que, se observó que *E. coli* estuvo presente en todos los sistemas acuáticos estudiados y que en el 23% de las muestras tomadas, los niveles de *E. coli* superaron los valores guía para uso recreativo (SRHN, 2003: 293 NMP/100 mL para uso moderadamente frecuente), constituyendo un potencial riesgo sanitario para la población que utiliza estos cuerpos de agua. Por este motivo, surgió la necesidad de profundizar el estudio de *E. coli* y analizar la composición genética y el tipo de cepas (i. e. patogénicas o no-patogénicas) presentes en el agua de estos sistemas, con el fin de evaluar la contaminación microbiana y tomar medidas apropiadas de manejo de estos valiosos recursos acuáticos de nuestro país. Para ello, se estudiaron estacionalmente durante el año 2020 los ríos pampeanos Rojas y Salado (provincia de Buenos Aires) y se determinaron distintas variables físicas y químicas in situ con sensores de campo (pH, conductividad, temperatura, oxígeno disuelto, etc.), nutrientes disueltos (amonio y fósforo), sulfatos, cloruros y demanda química O₂ mediante técnicas espectrofotométricas. Se cuantificaron coliformes totales, termotolerantes (CTER) y *E. coli* por el método NMP. Los 541 tubos positivos para *E. coli* fueron sembrados en agar MacConkey para su posterior identificación mediante 3 PCR- múltiples: PCR *stx1/stx2 /rfbO157*, PCR *eae/lt/stp/sth*, PCR *aggR/ipaH*. La abundancia de CTER y *E. coli*, correlacionaron positivamente con las concentraciones de amonio en ambos ríos ($r > 0.57$, $p < 0.05$, $n = 16$), sugiriendo su relación con descargas cloacales. En el 20% de las muestras tomadas en cada río, los niveles de *E. coli* superaron los valores guía para uso recreativo, moderadamente frecuente (NMP/100mL). Del total de las muestras, 11 fueron DEC+, pudiéndose detectar STEC-*stx1/stx2* en un sitio del río Rojas y STEC- *stx2* en un sitio del río Salado, sugiriendo un impacto de las actividades ganaderas. Asimismo, EAEC (S2; n=2) fue aislado en el río Rojas; y EAEC (S2; n=3), EPEC (S1; n=3), y ETEC (S4; n=1) en el río Salado. Además, en diferentes sitios del río Rojas y del río Salado se obtuvieron resultados positivos para *aggR*, *lt*, *st*, *stx 2*, *rfb O157*, *eae* mediante PCR, sin aislamiento. El hallazgo de STEC/DEC es sumamente importante en cursos de aguas superficiales y permanentes incluyendo espacios de uso recreativo. Estos resultados preliminares plantean la necesidad de implementar medidas de protección, manejo y mitigación, así como también efectivizar el monitoreo de STEC/DEC y las condiciones físico-químicas, de nuestros valiosos recursos acuáticos.

CONFERENCIA VIRTUAL

COORDINADORA: **ADRIANA SUCARI**

Presidente de la Asociación Argentina de Microbiología. adrisucari@gmail.com

CELEBRATION OF THE 1ST ARGENTINIAN STEC/VTEC SYMPOSIUM. OPPORTUNITIES TO ENHANCE TRANSLATIONAL RESEARCH IN HUS USING ADVANCED ANALYTICS

MOHAMED KARMALI

Toronto, Canadá, makarma21@gmail.com, mkarmali@rogers.com

Apart from its staggering human cost with millions of reported cases and deaths globally the Covid pandemic has caused collateral damage to multiple functions of society including science. Biomedical research, education and career development have been seriously hampered. This, the very first, Argentinian VTEC Symposium is thus an exceptional occasion to celebrate the rejuvenation of scientific activities after the dark days of the pandemic. A major consequence of the pandemic has been the acceleration of advanced information technology to radically transform many aspects of life that experienced a setback during the pandemic including areas of science, health, commerce, communications, government services, etc. Such innovations, especially in digital technology and advanced analytics, provide a unique opportunity to enhance scientific productivity in translational medicine, and accelerate improvements in patient outcomes. Accordingly, my colleagues and I have been devising an approach to achieve this especially for rare conditions such as HUS. The design of our concept incorporates a unique data transfer/input, processing, and reporting capability, and enables monitoring of specific disease trajectories over time based on quantitative disease monitoring parameters, both in individuals and in populations. The design allows matching and pooling of uniform de-identified data sets from multiple patients with the same disease to increase the robustness of statistical analysis. It also allows identification of subgroups within populations, and correlation of trends in disease trajectories with demographics, clinical phenotypes, genotypes, pathogen subtypes, socio-economic risk factors, and preventive or therapeutic interventions, in near real time, with graphical outputs. One of our many next steps includes attracting medical and scientific collaboration to help identify specific diseases and research questions that can be usefully addressed by this approach to advance science and enhance patient outcomes.

COMUNICACIONES ORALES

AVANCES EN EL CONOCIMIENTO DE ASPECTOS CLÍNICOS / EPIDEMIOLOGÍA: VIGILANCIA Y DIAGNÓSTICO/DETECCIÓN DE STEC EN ARGENTINA

COORDINADORAS:

CLAUDIA CARBONARI

Servicio Fisiopatogenia. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán" ccarbonari@anlis.gob.ar

ELSA ZOTTA

Instituto de Fisiología y Biofísica (IFIBIO-Houssay-CONICET), Departamento de Ciencias Fisiológicas, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires. ezotta@fmed.uba.ar

ANÁLISIS FENO-GENOTÍPICO Y PREVALENCIA DE *ESCHERICHIA COLI*

PRODUCTOR DE TOXINA SHIGA EN DIARREAS AGUDAS SANGUINOLENTAS EN LA PAMPA, ARGENTINA

TORRES PM¹, TAMBORINI AL³, GALLO RML¹, CASABONA M³, DALLA VIA V³, MASÓ MY³, ROGA ERVITI MC³, SCARONE N³, DIAZ P².

1. Hospital Dr. Segundo Taladriz. 2. Hospital Comunitario Generalista Evita. 3. Hospital Dr. Lucio Molas Santa Rosa, La Pampa. pamatorr@hotmail.com

La enfermedad diarreica aguda (EDA) constituye un problema grave para la salud pública con altas tasas de morbi-mortalidad. La provincia de La Pampa es una zona endémica para Síndrome Urémico Hemolítico (SUH), afectando principalmente a niños menores de 5 años. Las cepas de *E. coli* productor de toxina Shiga (STEC), principalmente *E. coli* O157:H7, fueron identificadas como el principal agente etiológico. El objetivo de este trabajo fue conocer la prevalencia y características feno genotípicas de STEC en muestras de diarreas agudas sanguinolentas (DAS), procedentes de las zonas sanitarias 1, 3, 4 y 5 de la provincia de La Pampa durante el periodo 2015-2021 en niños menores de 10 años. A nivel genotípico se buscó determinar la presencia de los genes *stx1*, *stx2* y *rfbO157* y su evolución a SUH. Se consideraron todas las muestras de materia fecal que presentaron sangre de observación microscópica y/o macroscópica más la anamnesis clínica para considerar a la muestra como una DAS. La siembra primaria se realizó en Agar Eosina Azul de Metileno (EMB), Agar McConkey-Sorbitol (SMAC), Caldo Tripticasa Soya (CTS) y Cefixime Telurito Soya (CTS-CT), incubando 24 hs y 6 hs a 35-37°C, respectivamente. Repicando estos dos últimos en SMAC y agar cromogénico para EHEC O157 durante 18 h a 35-37 °C. Se estudiaron las colonias incoloras que desarrollaron en

SMAC y las colonias color malva del medio cromogénico, sospechosas de EHEC; tipificando a través de pruebas bioquímicas evaluándose también la fermentación de sorbitol (SOR) y la actividad de B- glucuronidasa (GLU). Se procedió al análisis genético (PCR múltiple) tomando como muestra la zona de crecimiento confluyente. Para el análisis de PCR se utilizaron *primers* descritos en Pollard *et al* que amplifican regiones de los genes *stx1* y *stx2* y del gen *rfb* correspondiente al LPS O157. En el periodo 2015-2021 se seleccionaron 2218 coprocultivos, de los cuales el 31,47%(698/2218) fueron clasificados como DAS. La prevalencia de STEC en DAS fue del 3,58 % (25/698), siendo positivas por PCR para al menos uno de los genes buscados, *predominando* en este análisis la detección de *stx2*. De un total de 25 aislamientos de STEC, 3 pacientes evolucionaron a SUH. Estos datos resaltan la importancia de la vigilancia epidemiológica de los casos de DAS asociados a STEC y la incorporación de nuevas técnicas de biología molecular para la detección de distintos factores de virulencia de EHEC.

EVALUACIÓN DIAGNÓSTICA DE LA APLICACIÓN DEL ELISA INDIRECTO BASADO EN GLICOPROTEÍNAS, PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS SÉRICOS EN PACIENTES CON SÍNDROME URÉMICO HEMOLÍTICO

SCHESI CF, MAIZTEGUI C, ZOLEZZI G, BASCHKIER A, DEZA N, MANFREDI E, MASSA R, CARBONARI CC, MILIWEBSKY E, CHINEN I. Servicio Fisiopatogenia, Departamento de Bacteriología, INEI-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán" cschesi@anlis.gob.ar

Escherichia coli productor de toxina Shiga (STEC) es un patógeno asociado a casos esporádicos y brotes de diarrea, colitis hemorrágica y Síndrome Urémico Hemolítico (SUH). El diagnóstico definitivo de la infección por STEC se realiza a partir de la materia fecal (MF) mediante el cultivo y detección de los genes *stx1*, *stx2* y *rfbO157* por PCR. La limitación de este método radica en la dificultad de detectar el patógeno a medida que la enfermedad progresa. Por esta razón, el empleo del Glyco-iELISA para la detección de anticuerpos anti-lipopolisacárido (LPS), resulta una herramienta clave para el diagnóstico temprano y para el monitoreo del estadio de la enfermedad a través de la detección de las inmunoglobulinas involucradas en cada fase. Con el propósito de verificar el desempeño de la técnica comercial de Glyco-iELISA, en el Laboratorio Nacional de Referencia se realizó un análisis retrospectivo de los resultados obtenidos de pacientes con SUH durante el período 2020-2021. El kit utilizado fue *E. coli* Glyco iELISA Chemlis® (Chemtest Argentina S.A.), enzimoimmunoensayo indirecto en fase sólida sensibilizada con glicoproteína recombinante purificada para la detección de anticuerpos IgM/IgG específicos contra el polisacárido O del LPS de *E. coli* (O157, O145, O121 y O103) en las muestras de suero del paciente. Se estudiaron un total de 326 sueros, de los cuales, 260 fueron positivos (a-O157 n=165, a-O145 n=71, a-O121 n=13 y a-O103 n=11), 61 negativos y 5 indeterminados. La detección simultánea de IgM/IgG se observa con mayor frecuencia (74%), y en menor proporción la detección de IgG (20%) e IgM (6%). Los sueros positivos para uno o ambos anticuerpos (n=260) pudieron ser confirmados por aislamiento de STEC en 61/154 casos. Respecto del 1,5% de los indeterminados, se observó que la reactividad oscilaba entre 10-40%; sueros que fueron procesados luego de 1-7 días del inicio de los síntomas, no pudiéndose confirmar mediante otro ensayo en muestras sucesivas ni otras estrategias diagnósticas por la falta de muestras. Del total de los 61 casos con sueros negativos, 15 fueron STEC+ en MF. Por otra parte, se evaluó el comportamiento de las IgM/IgG mediante el análisis del porcentaje de reactividad, teniendo en cuenta la cantidad de días transcurridos desde la fecha de inicio de síntomas hasta la fecha de toma de muestra. Se observó un comportamiento general donde en la etapa inicial se eleva la fracción IgM por hasta 20 días aproximadamente, con reactividades altas. La IgG permanece hasta 40 días observándose en forma simultánea un descenso paulatino de IgM. Sin embargo, esto es muy variable en cada individuo lo que hace difícil establecer un período definido en que se produce el cambio de isotipo. En conclusión, mediante Glyco-iELISA se pudo determinar la infección por O157 (63.46%) en mayor proporción, seguida por O145 (27.31%), O121 (5%) y O103 (4.23%). Dada su alta sensibilidad y especificidad resulta imprescindible sumar esta técnica para fortalecer el diagnóstico temprano, ya que optimiza los tiempos en la emisión de resultados y facilita el diagnóstico en aquellos casos donde se ve disminuida la posibilidad de aislamiento.

CAPACIDAD NEUTRALIZANTE DE NANOPARTÍCULAS DE SOLUPLUS® ASOCIADAS A IgG ESPECÍFICAS SOBRE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE LA TOXINA SHIGA TIPO 2

GIRÓN D¹, GOMEZ F¹, AMARAL MM¹, CHIAPETTA D², MORETTON M², IBARRA C¹, SACERDOTI F¹.

1. Laboratorio de Fisiopatogenia, Departamento de Fisiología, Instituto de Fisiología y Biofísica Bernardo Houssay (IFIBIO Houssay-CONICET), Facultad de Medicina, UBA. 2. Cátedra de Tecnología Farmacéutica I, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA. cgiron@fmed.uba.ar

El Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) típico es una enfermedad pediátrica causada por infecciones de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga (STEC). La toxina Shiga tipo 2 (Stx2) es el principal factor de virulencia de STEC, es responsable de desencadenar SUH y tiene una potente capacidad citotóxica en células renales epiteliales. Actualmente no existe consenso para la aplicación clínica de una terapia preventiva específica para el SUH. Esto abre la necesidad de desarrollar nuevas estrategias

que sean seguras, efectivas y de bajo costo que permitan combatir esta enfermedad. En este contexto proponemos que las nanopartículas (NP) acopladas a un componente con utilidad terapéutica como los anticuerpos, pueden ser una buena herramienta como tratamiento preventivo ya que facilitan la biodisponibilidad, aumentan su solubilidad y reducen la degradación sistémica del componente bioactivo. El principal objetivo de este proyecto fue desarrollar y caracterizar NP con el polímero anfílico Soluplus® acopladas a IgG purificadas de calostro bovino hiperinmune contra Stx2 (NP-IgG-Stx2) o con IgG de calostro bovino no inmune (NP-IgG-Ctrl) y evaluar su capacidad neutralizante de Stx2. Para ello, se evaluó la morfología y el tamaño hidrodinámico de las NP acopladas a IgG mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) y la técnica de dispersión de luz dinámica (DLS) respectivamente. Luego se evaluó la toxicidad de las NP y la capacidad neutralizante de las NP-IgG-Stx2 o NP-IgG-Ctrl frente a Stx2 sobre células Vero. Para evaluar la posible internalización celular, las NP y NP-IgG-Stx2 se ensamblaron con el compuesto fluorescente curcumina, se expusieron sobre células Vero por 24 y 48 hs y se observó la internalización en microscopio de fluorescencia. Los análisis de TEM mostraron una morfología circular en las NP con un diámetro aproximado de 100 nm, cuyo tamaño y morfología se conservaron luego de su asociación con las IgG. Mediante la técnica de DLS se observó un radio hidrodinámico similar entre las NP y las NP-IgG-Stx2 ($70,2 \pm 1,5$ nm y $70,4 \pm 0,2$ nm, respectivamente) demostrando un buen acople entre ambas moléculas. Las NP no mostraron citotoxicidad a ninguna de las diluciones utilizadas sobre las células Vero. Por otra parte, se observó una buena capacidad neutralizante de las NP-IgG Stx2 sobre Stx2 y dicho efecto se observó de manera dosis dependiente analizado por ANOVA de dos vías ($p < 0.05$). No se observaron diferencias estadísticas significativas en la protección de la viabilidad celular entre el tratamiento de las células con IgG-Stx2 y NP-IgG Stx2 revelado con resazurina. Finalmente, los ensayos de internalización revelaron la presencia de NP y NP-IgG-Stx2 en el citoplasma de las células vero desde las 24 hs. Estos resultados abren la perspectiva de proponer a las NP-IgG-Stx2 como una herramienta terapéutica eficaz, que debido a sus propiedades de biopreservación y aumento de la biodisponibilidad del componente bioactivo *in vivo* podrían mejorar la neutralización de Stx2 y prevenir el desarrollo de SUH.

EL FÁRMACO ELIGLUSTAT COMO UNA ALTERNATIVA TERAPÉUTICA PARA PREVENIR LA ACCIÓN CITOTÓXICA DE LA TOXINA SHIGA TIPO 2

GÓMEZ FD¹, REPETTI J², PRESTA A¹, BALESTRACCI A³, IBARRA C¹, SACERDOTI F¹, AMARAL MM¹.

1. Laboratorio de Fisiopatogenia, Instituto de Fisiología y Biofísica B. Houssay (IFIBIO Houssay), Facultad de Medicina, UBA.
2. Laboratorio de Biología de la Reproducción. Instituto de Fisiología y Biofísica B. Houssay (IFIBIO Houssay), Facultad de Medicina, UBA. 3. Unidad de Nefrología, Hospital General de Niños "Pedro Elizalde". gomezfernandod@gmail.com

En Argentina, el Síndrome Urémico Hemolítico asociado a infecciones por *E. coli* productora de toxina Shiga (Stx) es la principal causa de lesión renal aguda en la edad pediátrica. Stx2 se une al receptor globotriaosilceramida (Gb3) y daña las células endoteliales de la microvasculatura renal humana (HGEC). Dado que aún no existen terapias específicas para el SUH, los objetivos de este trabajo fueron: 1) Estudiar la acción de Eliglustat (EG), inhibidor de la síntesis del receptor Gb3, para prevenir la citotoxicidad de Stx2 en cultivos primarios de HGEC. Para ello, las HGEC se pre trataron con EG (0,5-25 μ M) a distintos tiempos (2-48 hs). Se analizó: la viabilidad celular por incorporación de rojo neutro y el % de células necróticas y apoptóticas mediante marcación con Anexina-V/Ioduro de Propidio y citometría de flujo. También, las HGEC se pretrataron durante 30 minutos con tetraetilamonio (TEA: 100 μ M), un inhibidor de la acuaporina 1, o durante 24 hs con EG (10 μ M), posteriormente se incubaron por 40 minutos adicionales con Stx2 (50 ng/ml) en medio hipoosmótico (HYPO) o isosmótico (ISO). A continuación, se evaluó el volumen celular mediante microscopía óptica y por medición del área celular con el software Image J. 2) Analizar en un modelo *in vivo* la capacidad de EG para evitar los efectos de la intoxicación con Stx2. Para ello, se utilizaron ratones BALB/c al momento del destete (17-21 días) que fueron pretratados durante 3 días con una dosis diaria de EG (0,6 mg/g de peso corporal, por vía intraperitoneal (i.p.)). Luego de 5 días, se inocularon por vía i.p. con una dosis subletal de Stx2 (0,1 ng/g) o con PBS. Se analizó: el peso corporal, la ingesta de comida y la histología renal por tinción de PAS. Los resultados indicaron que la máxima protección de la viabilidad de HGEC por EG se obtuvo con el pretratamiento de 24 hs y con 5 μ M EG (EG 24 hs: $100,0 \pm 2,6\%$ vs Stx2: $49,0 \pm 7,9\%$, $n = 5$, $p < 0,05$). Además, EG (1 μ M, 24 hs) previno en un 86% la necrosis inducida por Stx2. Stx2 y el medio HYPO aumentaron significativamente el volumen celular de las HGEC respecto al medio ISO (Control) (Stx2: 60 %; HYPO: 79 % $n = 3$, $p < 0,05$). Pero, este efecto fue casi totalmente evitado por el TEA (Stx2+TEA: 86%; HYPO+TEA: 83%; $n = 3$, $p < 0,05$) Y el EG (EG+Stx2: 87%, $n = 3$, $p < 0,05$). Los ratones del grupo Stx2, 3 días post inoculación, exhibieron una marcada pérdida del peso corporal respecto al control, a diferencia de los ratones EG+Stx2 que aumentaron de peso (EG + Stx2: $0,81 \pm 0,29$ g vs Stx2: $-0,65 \pm 0,05$ g, $n = 3$, $p < 0,05$). El grupo Stx2 exhibió una importante necrosis tubular (44,5%) respecto al grupo control, sin embargo, el grupo pretratado con EG presentó una necrosis significativamente menor respecto a Stx2 (EG + Stx2: 15% vs Stx2: 44,5%). Estos resultados demuestran que el EG podría evitar el daño en la microvasculatura renal y reducir los síntomas de la enfermedad causados por Stx2.

SESIÓN DE POSTERS

AVANCES EN EL CONOCIMIENTO DE ASPECTOS CLÍNICOS / EPIDEMIOLOGÍA: VIGILANCIA Y DIAGNÓSTICO/DETECCIÓN DE STEC EN ARGENTINA

COORDINADORES:

JIMENA GENTILUOMO

División Higiene y Seguridad Alimentaria y Ambiental, Laboratorio de Alimentos Stamboulian, Buenos Aires, Argentina.
jpgentiluomo@gmail.com.

FEDERICO OCHOA

Instituto de Fisiología y Biofísica (IFIBIO-CONICET), Departamento de Ciencias Fisiológicas, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires. oxhoaf@gmail.com

DESARROLLO DE NUEVOS TEST RÁPIDOS PARA LA DETECCIÓN SEROLÓGICA

LANDIVAR SM¹, MELLI L², BASCHKIER A³ MILIWEBSKY E³, ZOLEZZI G³, CHINEN I³, COMERCI DJ¹, UGALDE JE¹, CIOCCHINI AE¹

1. Instituto de Investigaciones Biotecnológicas IIBIO (CONICET-UNSAM). 2. CHEMTEST S. A. 3. Servicio de Fisiopatología, INEI-ANLIS-Malbrán. slandivar@iibintech.com.ar

La infección por *Escherichia coli* productora de toxina Shiga (STEC) es la principal causa de síndrome urémico hemolítico (SUH) típico. El serogrupo STEC de mayor prevalencia asociado a casos esporádicos y brotes de diarrea sanguinolenta (DS) y SUH en diferentes partes del mundo es *E. coli* O157:H7, seguido de los serogrupos O145, O121, O103, O111, O45 y O26. En la actualidad, la asociación de la infección por STEC con el SUH se realiza a través del aislamiento y caracterización de la bacteria y la detección de la toxina Shiga (Stx). Además, se ha demostrado que la incorporación de pruebas serológicas en el algoritmo diagnóstico aumenta significativamente la capacidad de asociación del SUH-STEC. Previamente, en nuestro laboratorio se desarrolló una familia de kits de ELISA comerciales para la detección de anticuerpos específicos contra los serogrupos de mayor prevalencia de STEC en muestras de suero. Los mismos se basan en la utilización de glicoproteínas recombinantes que poseen el polisacárido O del lipopolisacárido (LPS) correspondiente unido a un carrier proteico. Estos antígenos son serogrupo específicos y evitan los falsos positivos por epítopes presentes en el lípido A-core del LPS y compartidos por otras bacterias Gram negativas. En los últimos años los sistemas inmunocromatográficos (lateral flow immunoassay, LFIA) tomaron gran relevancia como pruebas para el diagnóstico rápido y en el lugar de diferentes enfermedades infecciosas. En este trabajo, se desarrollaron test rápidos inmunocromatográficos para la detección de anticuerpos IgM específicos anti-polisacárido O157 (LFIA-O157) y anti polisacárido O145 (LFIA-O145) utilizando como antígeno las glicoproteínas recombinantes AcrA-O157 y AcrA-O145, respectivamente. La validación se realizó con 114 muestras de suero de pacientes pediátricos con diagnóstico de SUH o DS asociado a STEC confirmado por aislamiento de la bacteria, y muestras de suero de pacientes del mismo grupo etario con otras patologías no relacionadas (muestras negativas). La sensibilidad y especificidad para el LFIA-O157 fue de 96% y 93% y para el LFIA-O145 de 100% y 82%, respectivamente. Con el objetivo de completar la evaluación de desempeño, se realizó un ensayo simple-ciego retrospectivo que incluyó un panel de 106 muestras de suero provenientes de pacientes con SUH y/o DS con aislamiento de STEC y/o detección de Stx y pacientes con SUH y/o DS sin aislamiento de STEC ni detección de Stx. En este análisis se obtuvieron valores de sensibilidad y especificidad consistentes con los obtenidos en la validación interna del prototipo. Por otra parte, mediante el análisis de sueros de pacientes con información de los días post-inicio de los síntomas, se logró detectar el 100% de los casos positivos luego de los 3 días de iniciados los síntomas y hasta el 70% de los casos positivos antes de los 3 días. Consideramos que las pruebas inmunocromatográficas desarrollados para la detección de anticuerpos específicos anti-polisacárido O157 (LFIA-O157) y anti-polisacárido O145 (LFIA-O145) permiten la asociación de SUH/DS a la infección por *E. coli* en forma rápida y temprana, y podrían convertirse en una herramienta eficaz para evitar retrasos en el tratamiento de soporte o la aplicación de un tratamiento específico.

DISEÑO RACIONAL DE FÁRMACOS CON POTENCIAL ACTIVIDAD ANTI-TOXINA SHIGA TIPO 2 (STX2) MEDIANTE HERRAMIENTAS IN SILICO

GIOIA D, CASAL JJ, TORIANO R.

Instituto de Fisiología y Biofísica Bernardo Houssay, UBA-CONICET. gioiadaiana@gmail.com

El síndrome urémico hemolítico (SUH) post-entérico, es una enfermedad causada por la *Escherichia coli* enterohemorrágica productora de toxina Shiga (STEC) que no cuenta, hasta el momento, con un tratamiento específico, a pesar de la existencia de diferentes compuestos, que resultaron ineficaces en modelos in vivo, así como de anticuerpos anti-Stx, que no están disponibles para la terapia en humanos. La dinámica molecular (DM) y el acoplamiento molecular (AM) son herramientas *in silico* que

hacen posible el diseño de compuestos simples para cumplir determinada actividad biológica. El objetivo de este trabajo es la obtención de moléculas simples con actividad anti-Stx2, que actúan bloqueando el sitio activo y puedan ser transformadas en fármacos. Para ello utilizamos una estación de trabajo computacional de alto rendimiento y los siguientes programas de código abierto: Autodock Vina, DataWarrior, KNIME y Gromacs. Realizamos el AM de sendos complejos entre Stx2 (subunidad A1) y 18765 moléculas con propiedades de fármacos, provenientes de la base de drogas Maybridge (18630) y de una base de drogas disponibles (135). Del AM se obtienen dos resultados: un ranking determinado por la energía libre de unión del complejo y la estructura tridimensional de la conformación más estable del complejo. Seleccionamos 16 complejos no-tóxicos que dividimos en 3 grupos: los que cumplen con las reglas de “droga líder” (3); los que tienen una ruta de síntesis conocida de disponibilidad accesible (7); y los de mayor valor en energía de unión del complejo ($-\Delta G$) (6). Como control negativo se analizó un cuarto grupo, un complejo con una molécula “señuelo”, cuya ΔG da cuenta de un complejo inestable con el sitio activo, aunque podría unirse a otros sitios de la proteína, que no son de interés para el objetivo del trabajo. Con estos 17 complejos llevamos a cabo las DMs y estudiamos los siguientes descriptores: el RMSD, que da idea de la estabilidad, el número de puentes de hidrógeno, que da idea de los mecanismos de interacción, y un cálculo más ajustado de ΔG . El siguiente paso fue realizar un nuevo AM, refinando las condiciones iniciales. La DM de todos los complejos alcanzó estabilidad a partir de los 10ns. La ΔG -calculada con el método MM/PBSA- del candidato más favorable con el sitio activo de Stx2 fue de $(-116,1 \pm 2.8)$ kJ/mol para la base datos Maybridge y de (-40.1 ± 9.8) kJ/mol para la base de datos de compuestos disponibles, que son valores mayores que la del complejo Stx2-ligando natural (adenina). Los resultados están expresados como valor medio \pm SD a lo largo de cada DM. En conclusión, a partir del cribado virtual de más de 18000 moléculas, pudimos seleccionar un primer grupo de 16 candidatos de los cuales 3 tienen características prometedoras para profundizar los análisis a partir de DMs más largas y apuntar a experimentos de inhibición *in vitro*. Además, el diseño del flujo de trabajo, resultó adecuado para discriminar los compuestos descritos como no-inhibidores en el AM, cuyas DMs revelaron no tener afinidad por el sitio activo.

¿ES LA PEGILACIÓN LA SOLUCIÓN AL USO DEL ANTICUERPO RECOMBINANTE FABC11: STX2 PARA NEUTRALIZAR LA TOXINA SHIGA *IN VIVO*?

HENRIQUE IM¹, SACERDOTI F², AMARAL MM², PALERMO M³, IBARRA C², LUZ D¹, PIAZZA RMF¹

1. Laboratório de Bacteriologia, Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brasil. 2. Laboratorio de Fisiopatogenia, Instituto de Fisiología y Biofísica B. Houssay (IFIBIO Houssay), Facultad de Medicina, UBA. 3. Instituto de Medicina Experimental (IMEX), Academia Nacional de Medicina. izabella.henrique@esib.butantan.gov.br

Los anticuerpos se utilizan como herramientas terapéuticas en la clínica desde hace varias décadas. Actualmente, no existe un consenso sobre el tratamiento para la intoxicación por toxina Shiga (Stx) y la utilización de anticuerpos para ello tiene una perspectiva interesante para investigar. En este sentido, la administración de IgG completa puede impedir la llegada de este biofármaco a los tejidos y causar efectos adversos por la porción cristalizable (Fc). La utilización del fragmento Fab sólo resuelve estos efectos, pero en contraparte, reduce significativamente la vida media del producto biofarmacéutico en el cuerpo de aproximadamente 7-21 días a 0,3-1 hs. Previamente demostramos que FabC11:Stx2, generado por la tecnología phage display neutralizó el efecto de las toxinas (Stx1 y Stx2), e inhibió hasta en un 100% la citotoxicidad en células epiteliales y endoteliales renales. Sin embargo, en estudios *in vivo*, protegió a los ratones sólo cuando se coincubó con Stx2. La hipótesis que planteamos es que aumentar la vida media del fragmento permite potenciar su acción *in vivo*. Para ello proponemos mejorar las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de la molécula a través de la pegilación, que confiere, además, una mejora en la hidrodinámica, un aumento en la estabilidad y una disminución en la inmunogenicidad. En el presente estudio, se seleccionó el diseño de pegilación por lisinas y cisteínas disponibles para la unión Fab-PEG. El análisis *in silico* de Fab por el software Pymol, mostró la presencia de una sola cisteína libre para la conjugación. La reacción específica del sitio se realizó con PEG maleimida de 20 y 40 kDa en proporción 1:15 (Fab:PEG) y se redujo con tris (2-carboxietil)fosfina (TCEP) en proporción 1:20 (Fab:TCEP) y se purificó FabC11:Stx2-PEG por cromatografía de exclusión molecular. Dado que la conjugación proporciona una disminución en el rendimiento final del bioproducto y ya que este fragmento de anticuerpo recombinante se produce en *E. coli* BL21, en el presente trabajo propusimos optimizar el cultivo bacteriano para mejorar su obtención. Para ello, se cultivaron las bacterias variando los siguientes parámetros: composición nutricional [(medios de cultivo 2YT, caldo lisogénico (LB) y caldo Terrific (TB)], fuentes de carbono (glucosa y glicerol) y temperatura post-inducción (25°C y 37°C). Se observó una mayor tendencia a la multiplicación celular en el medio TB y a 25°C en relación al 2YT y que el uso de fuentes mixtas de carbono (glicerol y glucosa) es similar a las pruebas que usan solo glucosa a 25°C. Por SDS /PAGE se observó un componente de masa molecular relativa de 150 kDa referente al FabC11:Stx2-PEG y la reactividad de esta molécula contra Stx2 fue similar al Fab nativo evaluado por ELISA. En este trabajo se seleccionó el diseño de pegilación específico del sitio, se optimizaron los parámetros de crecimiento bacteriano y los resultados preliminares de los análisis *in vitro* mostraron buena reactividad de FabC11:Stx2-PEG contra Stx. Proponemos que FabC11:Stx2-PEG puede ser una buena herramienta y un futuro tratamiento para la neutralización de la toxina Shiga *in vivo*.

EVALUACIÓN Y PREDICCIÓN DE DAÑO RENAL EN PACIENTE RECUPERADO

CARBALLO D¹, PRESTA A¹, ROMERO R², PORPORATO M², ISERN E², IBARRA C¹, OCHOA F^{1,3}, ZOTTA E^{1,3}.

1. Laboratorio de Fisiopatogenia, IFIBIO-Houssay, Facultad de Medicina, UBA. 2. Servicio de Nefrología Pediátrica, Hospital Nacional "Prof. Alejandro Posadas". 3. Dpto Cs Biológicas, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA. dcarballo@fmed.uba.ar

En Argentina, la causa más común de lesión renal aguda en niños menores de 5 años es el Síndrome Urémico Hemolítico (SUH). Se caracteriza por la tríada de anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia y falla renal. Es causado por serotipos particulares de *Escherichia coli* que producen significativas cantidades de toxinas Shiga (Stx1 y Stx2). Actualmente, nuestro país presenta el registro más alto en todo el mundo, con aproximadamente 350 casos nuevos declarados anualmente. Representa también la segunda causa de insuficiencia renal crónica. Del total de niños afectados, el 55% resuelve sin secuelas, el 5% no recupera la función renal normal y persiste con distintos grados de proteinuria y/o hipertensión arterial y el 35% restante evoluciona a la cronicidad después de intervalos variables de tiempo. El grado de daño renal en el período agudo condiciona la evolución a mediano y largo plazo. N-GAL es una glicoproteína producida por los granulocitos neutrófilos (PMN), riñones, pulmones, hígado, que se libera en situaciones de daño celular o inflamación. Actualmente, el N-GAL se considera un marcador específico de injuria renal aguda temprana subclínica por su sensibilidad respecto a los parámetros bioquímicos clásicos de disfunción renal (Urea, Creatinina). La podocituria se manifiesta antes del aumento de la creatinina en sangre o albúmina en orina y se la utiliza como diagnóstico precoz de falla renal en nefropatías proteinúricas genéticas. Teniendo en cuenta que el SUH ocurre principalmente en niños sanos menores de 5 años y que el mecanismo patogénico incluye una fuerte respuesta inflamatoria, que potencia el daño endotelial específico inducido por Stx, el objetivo del presente trabajo fue evaluar los niveles de N-GAL sérico al momento del diagnóstico de SUH, y la podocituria en la orina de controles posteriores a la resolución del SUH. El estudio contó con la aprobación de los Comité de Ética del Hospital Posadas y los adultos responsables firmaron el Consentimiento Informado. Se presenta el caso de una niña de 25 meses de edad con diagnóstico de SUH hospitalizada el 3 de diciembre de 2019 con vómitos y diarrea sanguinolenta de una semana de evolución. Al ingreso presenta un Hto = 24,2%, Hb = 8,4 g/dL, LDH = 3147 UI/L, Creatinina = 7,0 mg/dL, Urea = 2,14 g/L, AU = 13,7 mg/dL, PMN = 10.500/uL. Se decide implementar asistencia respiratoria mecánica por 3 días, diálisis durante 7 días y transfusión sanguínea. El N-GAL medido a las 24 hs del ingreso (ELISA, Bioporto, Dinamarca) fue de 774,6 ng/mL (valor control menor de 100 ng/mL). La paciente presentó resolución del SUH y fue dada de alta 23 días después. En el control de evolución de la enfermedad realizado del 16 de febrero de 2022 presentó parámetros fisiológicos normales pero el examen de orina mostró la presencia de podocitos detectados por inmunofluorescencia. Estos resultados indican que los valores de N-GAL fueron predictivos de una lesión renal en fase aguda que podría evolucionar a injuria renal evidenciada por la podocituria aún cuando los parámetros clásicos de laboratorio permanecen en rangos de normalidad. El seguimiento del paciente determinará la evolución clínica.

DIAGNÓSTICO MOLECULAR Y SEROLÓGICO DE *ESCHERICHIA COLI* PRODUCTOR DE TOXINA SHIGA ASOCIADO A SUH EN LA PROVINCIA DE CÓRDOBA (2020-2022)

MANASSERO NC, SIAREZ V, TORRES C, SOSA MP, CASTRO G, BORDA M, GUIGNARD S, FRANCISSETTI V.

Laboratorio Central de la Provincia de Córdoba. bacteriolabcentral@gmail.com

Escherichia coli productor de toxina Shiga (STEC) es un patógeno de transmisión alimentaria que provoca casos esporádicos y brotes de diarrea, diarrea sanguinolenta y Síndrome Urémico Hemolítico (SUH), una enfermedad potencialmente mortal caracterizada por anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia e insuficiencia renal aguda. La Argentina presenta la mayor incidencia a nivel mundial de SUH en menores de 5 años, con una tasa de mortalidad del 2-5 %. El SUH es la primera causa en pediatría de falla renal aguda, la segunda de insuficiencia renal crónica y provoca el 20% de los trasplantes renales en niños y adolescentes. El diagnóstico de laboratorio de infecciones por STEC se basa en la detección de: 1) genes que codifican para las toxinas Shiga (Stx) mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en materia fecal (MF), 2) la toxina libre en MF y/o 3) anticuerpos contra el lipopolisacárido (LPS) de las cepas STEC. Objetivos: Determinar la prevalencia de infección por STEC en muestras biológicas de casos con diagnóstico clínico de SUH mediante técnicas moleculares y serológicas. Materiales y métodos: Durante el período enero 2020- febrero 2022, se recibieron en el Laboratorio Central de la Provincia de Córdoba 63 muestras de MF o hisopado rectal (HR) y 60 sueros correspondientes a 66 casos de SUH. Las MF e HR se sembraron en medios McConkey sorbitol y cromogénico. Los cultivos con desarrollo bacteriano se sometieron a extracción automatizada de ácidos nucleicos y luego a tamizaje por PCR Real Time para la detección de los genes stx1, stx2, eae y rfbO157, según algoritmo vigente. Las muestras de suero se procesaron por la técnica de glyco i-ELISA. Resultados: De los 66 casos estudiados, 38 (57 %) fueron varones y 28 (42 %) mujeres. El 91% correspondió a menores de 5 años (rango etario: 3 meses a 11 años). En 35 casos (53 %) pudo establecerse infección por STEC mediante PCR, en 46 por detección de anticuerpos (70%), y en 54 casos por la combinación de ambos criterios (82%). De 10 aislamientos obtenidos de MFHR, 7 fueron del serogrupo O157 (70%), 2 de O145 (20%) y 1 de

O121 (10%). Todas las cepas portaban el gen *stx2* y el gen *eae*. Se detectaron anticuerpos antiLPS O157 en 33/60 casos, O145 en 11/54, y O121 en 2/57. La combinación de PCR y serología permitió asociar la infección con el serogrupo O157 en el 53% del total de casos estudiados. En nuestra provincia el serogrupo de STEC prevalente fue O157, seguido de O145 y O121, coincidente con los reportes nacionales. Es importante destacar que a detección de Stx en MF-HR por métodos moleculares combinada con la detección de anticuerpos, incrementa la performance diagnóstica, especialmente en casos sin aislamiento bacteriano, sin desarrollo de los cultivos de MF-HR o resultados negativos de PCR.

BÚSQUEDA ACTIVA DE *E. COLI* PRODUCTOR DE TOXINA SHIGA (STEC) EN UN HOSPITAL PEDIÁTRICO: EXPERIENCIA DE 1 AÑO

MACEK V¹, MACCARI L¹, CONTIN P¹, AVENDAÑO P¹, MASSA R², BASCHKIER A², CARBONARI C², SCHEI C², MILIWEBSKY E², CHINEN I².

1. Servicio de Laboratorio, Hospital Materno Infantil de San Isidro. 2. Servicio de Fisiopatogenia, Instituto Malbrán. veromacek@gmail.com

En la Argentina, el agente etiológico más comúnmente asociado a Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) es *Escherichia coli* productor de toxina Shiga (STEC), siendo O157:H7 el serotipo más frecuente, aunque se han descrito otros serotipos asociados a enfermedad severa. Dada la alta incidencia en nuestro país vemos importante desde el Hospital Materno Infantil de San Isidro (HMISI) reforzar desde los sitios de diagnóstico temprano, la vigilancia de STEC, así como la de *E. coli* diarregénico (DEC) para monitorear la aparición de nuevos patotipos. El objetivo del trabajo es analizar la epidemiología local de STEC en los casos de SUH, diarreas sanguinolentas (DS) y diarreas (D) mediante el análisis de los casos atendidos en nuestra Institución. Se realizó la búsqueda de *E. coli* O157 utilizando medio cromogénico CHROMagarO157 en todas las muestras de materia fecal remitidas al laboratorio para cultivo, tanto de pacientes ambulatorios que consultaron por diarrea, así como pacientes internados en Sala y Terapia Intensiva Pediátrica por síntomas compatibles con SUH. Las colonias sospechosas (color lila) fueron derivadas al Servicio Fisiopatogenia (FP) del INEI-ANLIS Malbrán para confirmar la identificación. A su vez, fueron derivadas todas las muestras de materia fecal de pacientes con diarrea sanguinolenta (macro/microscópica) y SUH para búsqueda de STEC según algoritmo diagnóstico del Servicio FP. Se excluyeron las muestras con aislamiento microbiológico de otros enteropatógenos (*Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*). Resultados: Entre febrero de 2021 y febrero de 2022 se procesaron 55 muestras de materia fecal con sangre macro/microscópica. De los 38 casos las muestras de materia fecal y/o cepas sospechosas fueron derivadas al Servicio de FP, correspondientes a SUH (n=4), DS (n=28) y D (n=6). Del total de las muestras, 3 correspondientes a casos de SUH resultaron positivas para STEC O157:H7 *stx2a/stx2c/eae/ehx* (n=1), STEC no O157 *stx1/stx2/eae/ehx* (n=1) y STEC no-O157 *stx2/eae/ehx* (n=1); este último caso con serología positiva para O145. En el cuarto caso de SUH se confirmó la infección mediante la detección de anticuerpos a-O157 por Glyco-iELISA. Respecto a las DE, un caso resultó STEC O145 *stx2a/eae/ehx*, y 2 casos de DS resultaron con señal positiva para *stx2*. En 6 muestras negativas para STEC, se detectó señal positiva para las categorías de DEC, detectando los genes *ipaH* (DS, n=3), *aggR* (DS, n=1), y *aac* (D, n=1). Conclusiones: En los últimos años se reforzó la vigilancia de STEC en el HMISI, logrando establecer la asociación a la infección por STEC en 4 casos de SUH y 1 caso de DS. Los métodos tradicionales (cultivo) acompañados de técnicas de biología molecular permiten hacer un screening de STEC, agilizando la toma de conducta sobre el paciente, siendo importante la posterior confirmación diagnóstica. Según la experiencia en nuestro laboratorio, la sensibilidad del cultivo fue inferior a los métodos moleculares. De esta manera se complementa el diagnóstico oportuno asistencial con el diagnóstico referencial, contribuyendo a su vez al estudio de la epidemiología regional.

ANÁLISIS DE LOS CRITERIOS DE INFECCIÓN POR STEC EN CASOS DE SUH ATÍPICO

MILIWEBSKY E¹, EXENI R², CARBONARI CC¹, DEZA N¹, ZOLEZZI G¹, BASCHKIER A¹, MASSA R¹, SCHEI C¹, MANFREDI E¹, CHINEN I¹.

1. Servicio Fisiopatogenia. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán". 2. Hospital del Niño de San Justo "Prof. Ramón Exeni". Buenos Aires. emiliwebsky@gmail.com

El síndrome urémico hemolítico (SUH) es una entidad clínica y anatomopatológica caracterizada por presentar microangiopatía trombótica (MAT), insuficiencia renal aguda y manifestaciones multisistémicas. Tradicionalmente, el SUH post-enterico se ha clasificado como (D+) o sin diarrea (D-); con SUH D+ generalmente asociado con *Escherichia coli* productor de toxina Shiga (STEC). Las recomendaciones recientes clasifican el SUH como típico (t-SUH) o infeccioso; y atípico (a-SUH) no infeccioso con etiología por alteración de las vías del complemento. La diferenciación entre SUH típico y atípico implica un gran dilema para el cuerpo médico porque debe evaluar rápidamente la condición clínica del paciente y solicitar los estudios específicos para decidir el tratamiento a aplicar. Mientras que para el t-SUH (STEC+) el tratamiento es de sostén (diálisis y/o transfusiones), para el a-SUH puede requerir intervenciones como el suministro de infusión de plasma fresco (terapia que se aplica para reemplazar las proteínas inhibitoras del complemento defectuosas), o de la medicación con "Eculizumab" (anticuerpo monoclonal inhibidor

del factor C5 del complemento). El objetivo de este trabajo es mostrar el análisis de los resultados de los criterios de infección por STEC (Aislamiento de STEC, determinación de anticuerpos anti-LPS O157-O145-O121-O103 y Stx libre en materia fecal) en los casos clasificados como a-SUH, cuyas muestras fueron recibidas en el Laboratorio de Referencia Nacional (LRN), durante el período 2018-2022. Se analizaron en forma retrospectiva los resultados obtenidos del procesamiento de las muestras por los tres criterios diagnósticos en el LRN, correspondientes a 8 casos con diagnóstico de aSUH, junto con los datos clínicos (síntomas/laboratorio/tratamiento). Todos los casos resultaron ser negativos para los criterios diagnósticos de infección por STEC excepto uno que fue anti-LPSO157+. Seis de los 8 casos diagnosticados inicialmente como aSUH fueron de tipo infeccioso y presentaron diarrea: Síndrome inflamatorio multisistémico pediátrico post-COVID (PIMS; n=2), shock séptico positivo por *Salmonella* y *Candida* (1), neumonía por *Pseudomona* y *Klebsiella* (1), neumonía por Neumococo (1), y anemia con anticuerpos anti-LPSO157+ (1). Solo dos casos de aSUH fueron diagnosticados clínicamente como MAT post-parto y MAT por alteración de las vías del complemento. Como conclusión/discusión podemos decir: a) Los casos de a-SUH aunque no presenten diarrea es necesario sumar los criterios de infección por STEC al conjunto de pruebas para lograr una mejor definición del diagnóstico. b) Los casos de SUH infeccioso pueden no ser secundarios solo a la infección por STEC y no se considerarían como a-SUH. Asimismo, en el marco de la pandemia se describieron casos con presentación de (PIMS), que fueron recibidos con diagnóstico de a-SUH. c) Teniendo en cuenta que el resultado de STEC (-) define con otras pruebas el tratamiento para a-SUH, es importante que se analicen las muestras en forma oportuna ya que la probabilidad de detección de STEC o anticuerpos anti-LPS disminuye después de 7 días post diarrea.

FORTALECIMIENTO DEL ALGORITMO PARA EL DIAGNÓSTICO OPORTUNO DE *ESCHERICHIA COLI* PRODUCTOR DE TOXINA SHIGA INCORPORANDO PCR-RT MÚLTIPLE

MASSA R, MILIWEBSKY E, ZOLEZZI G, CARBONARI CC, DEZA N, SCHESI C, BASCHKIER A, MANFREDI E, CHINEN I.

Servicio Fisiopatogenia. ANLIS-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán", Buenos Aires. rmassa@anlis.gob.ar

El diagnóstico oportuno de la infección por *Escherichia coli* productor de toxina Shiga (STEC) requiere de un método rápido, sensible y práctico para su detección. La técnica de PCR en tiempo real (PCR-RT) utilizando sondas de hidrólisis ha demostrado ser de utilidad para su aplicación en diferentes campos del diagnóstico. En la actualidad existen numerosos kits comerciales de PCR-RT en general cerrados, que detectan en forma separada las toxinas, serogrupos y otros factores de virulencia. El objetivo de este trabajo fue poner a punto y validar una metodología in house de PCR-RT múltiple (mPCR-RT) para la detección simultánea de *stx1/stx2/rfbO157*, y evaluar su desempeño en la mejora del diagnóstico de STEC en la etapa de tamizaje. La mPCR-RT se realiza en 20 µl de volumen final de reacción conteniendo: HotstartTaq polimerasa master mix RT-PCR (Roche) 2x, 2 µl de ADN templado, un par de primers para ambas toxinas (1µM) y las sondas (0.2 µM) para *stx1/stx2* (Norma ISO/TS 13136); primers (0.25 µM) (Thuy Duong et al. 2020) y sonda corregida (0.1 µM) para *rfbO157*. La obtención del ADN templado se realizó por calentamiento (100°C) de una suspensión en buffer TE/Tritón (1%) de la zona de crecimiento confluyente del cultivo en agar MacConkey Sorbitol. Condiciones de amplificación: 95°C/ 10 min, 45 ciclos de 95°C/15 seg y 60°C/60 seg, y un ciclo de enfriamiento 37°C/120 seg. El resultado de amplificación se expresa como cycle threshold (Ct), que se mide al superar el umbral de 0.05. Para la validación analítica fueron analizadas 25 cepas STEC y 21 cepas no STEC, y el ensayo fue 100% sensible y 100% específico para la detección de *stx1/stx2/rfbO157*. La eficiencia en la reacción múltiple fue de 2.01 para *stx1* y *stx2* y de 1.97 para *rfbO157*; y el rango fue de Ct11-Ct36 para 10⁸-10⁰ UFC/ml, respectivamente. En la verificación del desempeño se incluyeron 79 primocultivos, que mostraron 100% de sensibilidad y especificidad diagnóstica. Se consideraron los siguientes criterios de interpretación para la evaluación de los resultados obtenidos: análisis de los valores de Ct; evaluación de las curvas de amplificación; e información epidemiológica/diagnóstica del paciente que acompañe a la muestra. Si bien no ha sido establecido un punto de corte, en general los valores de Ct<30 presentan un alto porcentaje de aislamiento. Mientras que los Ct>30 presentan dificultad para el aislamiento, requiriendo la corroboración por otra metodología y el análisis de información accesoria. Para evaluar la mejora en el diagnóstico de STEC, se incorporó mPCR-RT al algoritmo diagnóstico como tamizaje inicial, y se analizaron 38 casos en tiempo real. Se obtuvieron 13/38 casos *stx+*, en comparación con lo obtenido por la técnica de mPCR convencional (n=9); resultados corroborados mediante otra mPCR-RT validada (Thuy Duong et al., 2020). Según estos resultados preliminares, esta herramienta aumenta un 44% la positividad diagnóstica. A través de instancias de capacitación, los protocolos están siendo transferidos a la Red de laboratorios para su implementación a nivel local. Esta metodología demostró ser sumamente sensible, aportando una mejora sustancial al diagnóstico oportuno de STEC.

SINDROME URÉMICO HEMOLÍTICO. EXPERIENCIA EN UN HOSPITAL PEDIÁTRICO DE LA CIUDAD DE SANTA FE

DEGIOVANNI G¹, ZURBRIGGEN L¹, HERGUI B¹, BORETTO J¹, ARO C¹; CASTAÑEIRA M².

1. Sección Microbiología Hospital de Niños Dr. Orlando Alassia. 2. Sección Biología Molecular Hospital de Niños Dr. Orlando Alassia. gabidegiovanni@hotmail.com

El síndrome urémico hemolítico (SUH) es una enfermedad de comienzo agudo con anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia y daño renal que se presenta generalmente a continuación de un episodio de diarrea con o sin sangre, principalmente en lactantes y niños en la primera infancia. Es el responsable del 20% de los trasplantes renales en niños y adolescentes. Además, puede afectar otros órganos como el sistema nervioso central, pulmones, páncreas y corazón. En Argentina, el agente etiológico más comúnmente asociado al SUH es un patógeno zoonótico transmitido por los alimentos y el agua: la bacteria *Escherichia coli* productora de la toxina Shiga (STEC), cuyo serotipo más frecuente es O157:H7, aunque hay más de 100 serotipos que poseen un potencial patogénico similar. La habilidad de las cepas STEC para causar enfermedad está relacionada con su capacidad para secretar Stx1, Stx2 y sus variantes, responsables del daño del endotelio vascular. Objetivos: Conocer la epidemiología local del SUH y su frecuencia en los distintos grupos etarios. Determinar el porcentaje de casos de SUH diagnosticados clínicamente y por laboratorio. Materiales y Métodos: El estudio es retrospectivo, transversal y descriptivo. Se analizaron las historias clínicas de pacientes hospitalizados en el Hospital de Niños Dr. Orlando Alassia con diagnóstico de SUH en un período de 2 años (2020- 2021). Resultados: De un total de 19 pacientes analizados con diagnóstico de SUH, se pudo establecer la infección en 15 pacientes, no ocurriendo lo mismo en 4 de ellos. Los serotipos prevalentes fueron 7/15 O157, 5/15 O145, 1/15 O121 y 1/15 O103. Un solo aislamiento no pudo ser clasificado. Por técnicas de Tamizaje Multiplex PCR fueron caracterizados 5/15 aislamientos, mientras que por la detección de Antígenos en suero (Glyco iElisa) fueron clasificados 10/15 aislamientos. Por ambas metodologías: 5/15. Solo en 2/15 muestras se obtuvo rescate microbiológico aún con el empleo de medios selectivos, diferenciales y cromogénicos. La prevalencia de SUH en el rango 0 a 1 año fue de 20%, del 27% en los rangos tanto de 1 a 2 años como de 2 a 3 años y del 13% en los rangos de 3 a 4 años y de 4 a 5 años. Solo un bajo porcentaje de pacientes con diagnóstico clínico de SUH no pudieron ser confirmados por pruebas de laboratorio, lo que habla de un buen criterio diagnóstico del equipo de salud. Las técnicas moleculares y serológicas permiten detectar la infección por STEC cuando no hubo rescate microbiológico, lo que muestra una alta sensibilidad y especificidad de las metodologías empleadas. La escasa recuperación del patógeno puede deberse al tiempo transcurrido entre el inicio de la diarrea y la toma de muestra, al tratamiento antibiótico previo, o a la deficiente conservación y transporte de la misma. El grupo etario más afectado es el de niños de 1 a 3 años.

MESA REDONDA

LA VIDA DESPUÉS DEL SUH

COORDINADORA:

PAULA JANSEN

Asociación Lucha Contra el Síndrome Urémico Hemolítico (LUSUH). paulajansen69@gmail.com

PARTICIPANTES:

ASOCIACIÓN LUSUH: **FLORENCIA SUOTO Y MATÍAS LORES ARNAIZ**

ASOCIACIÓN APRESUH: **SEBASTIÁN CARACCILO**

ASOCIACIÓN "EN MEMORIA DE LUZ DUGO MEDINA": **CHABI MEDINA**

Los representantes de LUSUH, APRESUH y "En Memoria de Luz Dugo Medina" comparten sus historias de vida en vivo y en directo. Estas Asociaciones no gubernamentales sin fines de lucro están formadas por padres y familiares de chicos que han padecido la enfermedad. En el caso de LUSUH también la integran profesionales de la salud especializados en la problemática del SUH. Esta enfermedad afecta principalmente a chicos y en muchos casos deja secuelas irreversibles, por lo cual tanto los pacientes como sus familias ven afectada su cotidianidad. La idea de la charla es acercar un panorama general de lo que implica la enfermedad, sus consecuencias a corto, mediano y largo plazo para el niño y su familia. El SUH, en muchos casos, implica un periodo agudo muy grave generando traumas y consecuencias psicológicas en todos los involucrados, sumado a que la mayoría de los chicos salen con daños renales, situación que les implica hacer una dieta específica, hiposódica y baja en proteína que modifica radicalmente su día a día. A diferencia de otras enfermedades, el SUH no empieza y termina, se extiende a lo largo de toda la vida con controles clínicos, dieta, y, según los casos, diálisis hasta trasplante renal. Por eso las Asociaciones tienen un protagonismo tan importante, porque funcionan de contención y ayuda a todo ese nuevo mundo que se presenta después del SUH. Como se ve, son muchos los factores que implica la enfermedad, por eso espontáneamente se han formado distintas Asociaciones para abordar conjuntamente la complejidad del SUH. Queremos hacer llegar nuestras historias para poder transformar

el dolor en recursos para la comunidad. Nos parece muy importante encontrar un sentido a todo lo vivido, tanto por los chicos que padecieron SUH como por las familias que los acompañaron. En esta ocasión contamos por primera vez con historias en primera persona, los mismos chicos que padecieron la enfermedad hoy tienen voz propia. Nos parece muy importante poder escuchar sus vivencias para poder pensar juntos qué cosas mejorar, cambiar o agregar a la lucha de tantos años. LuSUH y todas las organizaciones no gubernamentales (ONGs) similares que se formaron en el país tienen el objetivo principal de informar a la comunidad para prevenir el SUH. Sabemos que las políticas de prevención a nivel nacional no son suficientes y Argentina sigue siendo el país que más casos tiene en el mundo. LuSUH y todas las Asociaciones hermanas también funcionan como organismos de difusión, haciendo campañas y proyectos para prevenir la enfermedad cumpliendo, en parte, lo que el estado no hace. El SUH es una enfermedad que puede prevenirse. Y si bien, desde que se creó la Asociación LuSUH en el 2005, se ha avanzado en un montón de cosas, todavía hay muchos chicos que contraen SUH, que quedan con secuelas de por vida, y lamentablemente también hay chicos que mueren por SUH. Por eso seguiremos trabajando incansablemente hasta erradicar totalmente el SUH de la Argentina. Ese es nuestro sueño, que ningún otro chico contraiga el SUH.

MESA REDONDA

LATIN AMERICA COALITION FOR ESCHERICHIA COLI RESEARCH (LACER)

COORDINADOR: MARIANO LARZABAL

Instituto de Agrobiotecnología y Biología Molecular (IABIMO INTA-CONICET). larzabal.mariano@inta.gob.ar

USO DE ANTICUERPOS RECOMBINANTES CONTRA LA TOXINA SHIGA PARA EL TRATAMIENTO DEL SÍNDROME URÉMICO HEMOLÍTICO

ROXANE MARIA FONTES PIAZZA

Laboratório de Bacteriologia, Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brasil. roxane.piazza@butantan.gov.br

La infección por bacterias productoras de toxina Shiga (Stx) desencadena una patología que se inicia con una diarrea que puede ser autolimitada y que, en algunos casos, puede evolucionar a diarrea sanguinolenta, colitis hemorrágica y a Síndrome Urémico Hemolítico (SUH), en aproximadamente el 15% de las infecciones. El desarrollo de SUH ocurre aproximadamente siete días después del inicio de los síntomas gastrointestinales y cuatro días después del inicio de la diarrea sanguinolenta. Las estrategias de intervención para bloquear a Stx, como terapia primaria para prevenir directamente el desarrollo del SUH, pueden aplicarse en ese período. En este sentido, los anticuerpos son moléculas interesantes por su elevada capacidad para reconocer y unirse a un antígeno, además de mediar la interacción con otras células y moléculas del sistema inmune. Los anticuerpos recombinantes (rAbs) tienen numerosas ventajas prácticas sobre los anticuerpos producidos en animales, como el control de la selección de anticuerpos, el formato, el sistema de producción y el almacenamiento. Además, los rAbs pueden diseñarse para tener una especificidad única o múltiples, diferentes formatos, además de poder ser producidos ilimitadamente y almacenados de forma segura. Antes de que cualquier molécula terapéutica pueda convertirse en biofármaco, incluidos los anticuerpos, debe pasar por varias etapas de prueba para garantizar que el compuesto final sea seguro y eficiente para la administración humana. Estas pruebas consisten en establecer la farmacología y bioquímica de la molécula de interés a través de varios ensayos *in vitro* e *in vivo*, para evaluar su seguridad. En este sentido, nuestro grupo generó dos fragmentos Fab anti-Stx2 mediante la presentación en fagos y utilizando la biblioteca F de anticuerpos sintéticos humanos, los cuales fueron expresados en sistemas bacterianos. Estos fragmentos Fab son completamente humanos, lo que disminuye la posibilidad de una reacción antigénica contra ellos. El FabF8:Stx2 mostró especificidad sólo para Stx2 y protegió a las células endoteliales glomerulares humanas (HGEC) de la citotoxicidad de Stx2 (83%), evitó las alteraciones morfológicas (90%) y la apoptosis (93%). Esta protección se obtuvo en condiciones de pre-incubación de las HGEC con los FabF8:Stx2 durante 1 h y fue mayor a la obtenida con la co-incubación (FabF8:Stx2 +Stx2 en simultáneo). Además, este fragmento fue capaz de neutralizar los efectos citotóxicos de las toxinas secretadas por cepas de *E. coli* productoras de Stx que albergan diferentes subtipos de genes *stx*. Por otro lado, FabC11:Stx2, mostró afinidad por la subunidad B (epítopes YTKYNDTFTT y GKIEFSKYNEDDTF) y reacción cruzada con Stx1. También, en condiciones de pre-incubación y co-incubación, FabC11:Stx2 protegió tanto a HGEC como a las células epiteliales tubulares proximales humanas (HK-2) de la citotoxicidad y evitó las alteraciones morfológicas causadas por Stx2. Esta protección fue mayor en las células HK-2 y tuvo un comportamiento dosis dependiente. Además, los FabC11:Stx2 previnieron la muerte y el daño renal en ratones cuando Stx2 se administró luego de la pre-incubación con este anticuerpo. Esta capacidad de neutralización de Stx2 parece implicar el bloqueo del sitio de unión a su receptor, evitando la translocación de la subunidad A en las células diana. Nuestros resultados indican que los Fab recombinantes son moléculas prometedoras para ser utilizadas como terapéutica contra la intoxicación por Stx2.

¿CUÁL ES EL PAPEL DEL SISTEMA DE SECRECIÓN TIPO VI (T6SS) EN LA PATOGÉNESIS DE EHEC?

FERNANDO NAVARRO GARCÍA

Departamento de Biología Celular, CINVESTAV. Ciudad de México, México. enavarro@cinvestav.mx

EHEC y EAEC/STEC son patógenos que causan enfermedades diarreicas, así como el síndrome urémico hemolítico, especialmente en niños menores de 5 años. La patogénesis de EHEC está relacionada a la producción de la toxina Shiga, que causa daño directo a las células intestinales, y al T3SS, que es usado para translocar efectores a la célula y provocar las lesiones características de adherencia y eliminación (A/E). Aunque la mayoría de los estudios se enfocan en estos dos factores de virulencia, evidencias recientes muestran que el T6SS juega un papel importante durante la enfermedad. Mutantes en el T6SS son incapaces de establecerse en el nicho intestinal y provocar la enfermedad, mientras que el T6SS también se ha asociado a cepas EHEC con capacidad de causar síndrome urémico hemolítico severo (SUH). Adicionalmente, la dosis baja infectiva de EHEC sugiere que la bacteria tiene una ventaja competitiva sobre otras bacterias de la microbiota en el tracto intestinal. A pesar de que estos tres indicios sugieren la importancia del T6SS, se desconoce si el T6SS en EHEC participa durante la competencia bacteriana y/o patogénica, mediante la translocación de efectores a las células intestinales. Por tanto, es necesario entender cómo impacta el T6SS en el establecimiento, el desarrollo y la resolución de la enfermedad. Así, tendríamos nuevos blancos moleculares para combatir estas enfermedades. Recientemente, mediante el uso de análisis bioinformáticos, identificamos los genes centrales del T6SS y comparamos sus diferencias entre los dos genomas publicados para la cepa EDL933 de EHEC O157:H7, así como con otros genomas O157:H7. A diferencia de otros efectores T6SS típicos que se encuentran en *E. coli*, identificamos que hay genes de la familia *rhs* en EHEC, que quizás actúan como efectores T6SS. Los análisis in-silico y PCR de las diferencias entre los genes *rhs* en dos genomas existentes nos permitieron determinar que el genoma publicado más recientemente es más confiable para estudiar los genes *rhs*. El análisis de la estructura tridimensional putativa de las proteínas *Rhs*, así como los motivos que se encuentran en su extremo C-terminal, nos permitió predecir sus posibles funciones. Un análisis filogenético mostró que los genes *rhs* huérfanos están más estrechamente relacionados entre sí que los genes *rhs* pertenecientes a las islas *vgrG* y que se dividen en tres clados. Los análisis de los genes *rhs* para identificar proteínas putativas de inmunidad mostraron que cada gen tiene un ORF pequeño asociado (129-609-nt), que podrían servir para la inmunidad ya que tenían varios motivos de interacción y homología estructural con proteínas de inmunidad conocidas. Nuestros hallazgos resaltan la relevancia de T6SS en EHEC, así como la posible función de los efectores *Rhs* de EHEC durante la patogénesis y la competencia bacteriana, y la identificación de nuevos efectores para T6SS utilizando un enfoque estructural. Varias estrategias para revelar el papel de T6SS en la patogénesis de EHEC serán discutidas.

STEC EN PARAGUAY: UNA PANORÁMICA DE LA EPIDEMIOLOGÍA

ROSA GUILLÉN

Departamento de Microbiología, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Asunción, Paraguay. rmgullenf@gmail.com

Escherichia coli productora de toxina Shiga es un patógeno ubicuo en distintos ambientes causante de enfermedades transmitidas por alimentos, que incluyen a cuadros graves como el síndrome urémico hemolítico. El estudio del reservorio por excelencia de este patógeno, el ganado bovino, ha mostrado niveles elevados de portación de STEC que varían del 85% al 79% de animales de establecimientos de diferentes departamentos del Paraguay, con un predominio de aislamientos LEE negativos y correspondientes a serogrupos NO-O157. El análisis de éstos por métodos moleculares no ha detectado a los serogrupos componentes del grupo de riesgo denominado "Big Six". La búsqueda de otras islas de patogenicidad en estos aislados LEE negativos mostró niveles de portación variables entre 40% al 6% de la isla de patogenicidad LAA, que incluye al gen *hes*. La portación de *eae* en los aislados STEC provenientes de ganado bovino varió entre un 1% al 15% según diferentes establecimientos ganaderos. Si bien los datos de aislamientos a partir de humanos son escasos con reportes puntuales de identificación molecular de sus toxinas en heces de niños con diarrea en baja frecuencia, casos de síndrome urémico hemolítico y al estudio de campo pulsado de 29 aislamientos STEC sin datos epidemiológicos asociados, se pudo mostrar que la contaminación con STEC de productos alimenticios como la carne molida en mercados populares de Gran Asunción es elevada y persistente en el tiempo, con deficientes medidas de auditorías sanitarias implementadas para su control. Desde el punto de vista del ambiente, un trabajo ha mostrado la detección de STEC en aguas superficiales de arroyos pertenecientes a la cuenca del Río Paraguay y que desembocan en barrios marginales de la capital, señalando un posible riesgo de exposición para los pobladores de la zona. La capacidad de formación de biofilm es muy frecuente en los aislamientos STEC provenientes de ganado bovino y de carnicerías de Paraguay, siendo éstos en muchos casos categorizados como fuertes formadores de biofilm. Algunos extractos de plantas nativas de Paraguay han demostrado tener una excelente actividad inhibitoria y removedora del biofilm, incluyendo a extractos de las especies: *Sidastrum paniculatum* y *Ocotea diospyrifolia* que lograron inhibir entre el 93% al 100% la formación de biofilm

en diversos aislados STEC provenientes de ganado bovino. Se han identificado como metabolitos secundarios mayoritarios a la Moupunamida, el ácido coutárico y el ácido caftárico en el caso de *Sidastrum paniculatum* y la dicentrina, la glaucina y la norisoboldina en el extracto de *Ocotea diospyrifolia*. Estas especies de plantas nativas son sujeto de próximos estudios con el objetivo de purificar los compuestos y determinar a aquel o aquellos con potencial uso como inhibidor del biofilm generado por STEC.

AVANCES EN EL CONOCIMIENTO DE LAS CEPAS STEC AISLADAS DE SERES HUMANOS Y ANIMALES EN URUGUAY

GUSTAVO VARELA

Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. gvarela@higiene.edu.uy

El Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) asociado a *Escherichia coli* productor de toxina Shiga (STEC) integra el conjunto de las microangiopatías trombóticas, definido por la presencia de la tríada trombocitopenia, anemia hemolítica mecánica con esquistocitosis y daño orgánico isquémico. En Uruguay ocurrirían entre 10 y 15 casos de SUH por año en niños menores de 15 años, tasa de 0,4-0,6 casos por 100.000 habitantes, de 2,1/100.000 menores de 15 años y de 4,2/100.000 menores de 5 años. Predominan los serogrupos no-O157. El objetivo es comunicar los últimos resultados sobre las características de las cepas STEC aisladas de seres humanos y animales. Desde 2017 a la fecha procesamos muestras de heces de 14 niños con diagnóstico SUH post-entérico, 12 usuarios de servicios de Salud privados. En 8 hubo desarrollo bacteriano y solo en 3 recuperamos STEC de los serogrupos O26 (*stx1/2, eae*), O111 (*stx1/2, eae*) y O145 (*stx2, eae, ehxA*); hubo un caso con zona de descarga positiva para *stx2* otro con ensayo FilmArray GI positivo para *stx2*. También recuperamos una cepa O157:H7 (*stx2, eae*) de un niño con diarrea sanguinolenta. El cultivo O145 fue resistente para ampicilina. Recientemente caracterizamos 39 de cepas O157:H7 recuperadas previamente de alimentos de origen animal. Todas portadoras del gen *eae/γ1*, con una similitud $\geq 80\%$ en XbaI-PFGE. 2 portaban solo *stx1*, 17 *stx2* y 20 ambos genes. La distribución de las variantes fue: 19 *stx1a*; 5 *stx2a*, 10 *stx2c* y 22 *stx2a* y c. Solo 2 correspondieron al clado 8, ambas del ST11, con similitud del 97%. Una cepa mostró resistencia para ampicilina, gentamicina y trimetoprim-sulfametoxazol. La mayor ocupación de sitios ocurrió en selC (39 de 39), seguida de pheV (30 de 39) y muy baja ocupación para pheU (2 de 39). También analizamos 39 cepas STEC recuperadas en un estudio para conocer la prevalencia de genes *stx* y STEC en canales bovinas. Las muestras se tomaron en 37 frigoríficos de 14 departamentos. Las cepas se distribuyeron en 20 serotipos diferentes, las de los serotipos O22:H8 (5), O130:H11 (6), O174:H21 (2) y O174:H28 (3) representaron el 41 % del conjunto. La distribución de genotipos *stx* fue: *stx1* solo, 6; *stx2* solo 17, y ambos genes 16. En cuanto a las variantes la distribución fue la siguiente: *stx1a* 19 cepas; *stx1d* 4 cepas; *stx2a*, 14, *stx2b*, 2; *stx2c*, 10 y *stx2d*. Dos resultaron *eae* positivas y correspondieron a los serotipos O157:H7 y O182:H25. Ninguna fue portadora del gen *aggR*. La distribución de acuerdo a los grupos de riesgo FAO fue: nivel 1, ninguna; nivel 2, 18%; nivel 3, 2%; nivel 4, 3% y nivel 5, 77%. Ninguna cepa fue resistente para los antibióticos ensayados. Se mantiene la tendencia del predominio de las cepas STEC no-O157 en los casos de SUH a pesar de la presencia de otros serogrupos en alimentos animales. Para O157:H7 esto podría deberse a que solo una minoría correspondería al clado 8 y para las no-O157 a que únicamente el 18% se ubican en el nivel de riesgo 2 de FAO.

Día 2: 21 DE ABRIL DE 2022

CONFERENCIA PLENARIA

CONTRIBUCIÓN DE LOS MODELOS ANIMALES A LA COMPRESIÓN DE LA PATOGÉNESIS DEL SÍNDROME URÉMICO HEMOLÍTICO (SUH)

MARINA PALERMO

Laboratorio de Patogénesis e Inmunología de Procesos Infecciosos, Instituto de Medicina Experimental (IMEX)-CONICET Academia Nacional de Medicina. mspalermo@hematologia.anm.edu.ar

El Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) post-diarreico, asociado a las infecciones por *Escherichia coli* productor de toxina Shiga (Stx) (STEC), es una enfermedad vascular que afecta principalmente a niños menores de 5 años, y se caracteriza por anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia e insuficiencia renal aguda. Después de la ingestión, las bacterias STEC colonizan el intestino y producen Stx que se transloca a través del epitelio intestinal. Una vez que Stx ingresa en el torrente sanguíneo, puede interactuar con las células endoteliales, epiteliales (fundamentalmente renales) y los leucocitos. La inflamación intestinal puede favorecer el daño epitelial y el posterior paso de Stx a la circulación sistémica. El daño vascular provocado por Stx promueve no solo la liberación de trombina y el aumento de la concentración de fibrina, sino también la producción de citoquinas y quimiocinas por las células endoteliales. La evidencia surgida de modelos animales y de los pacientes apoyan firmemente que varias células inmunes podrían participar en la fisiopatología del SUH: neutrófilos, a través de la liberación de proteasas y especies reactivas del oxígeno; monocitos/macrófagos mediante la secreción de citocinas y quimiocinas. Además, el hallazgo de altos niveles de factor Bb y C5b-9 soluble (sC5b-9) en plasma, sugiere la activación de la ruta alternativa del complemento. Los modelos murinos por inoculación endovenosa de Stx2 nos permitieron demostrar que las células del sistema inmune innato, los neutrófilos, los monocitos y las células NK, participan activamente en el mecanismo patogénico de la Stx. Sin embargo, existe un amplio rango de presentaciones clínicas secundarias a las infecciones con STEC, desde diarreas acuosas, sanguinolentas y solo un 10-15% evolucionan a la forma severa, sistémica de SUH. Por lo tanto, nuestra hipótesis de trabajo ha sido que la respuesta inmune temprana, secundaria a la infección por STEC durante la etapa prodrómica, cumple un papel central en definir la evolución del cuadro. Recientemente, hemos comenzado el estudio de la fase prodrómica o gastrointestinal, que precede al pasaje de la toxina al torrente sanguíneo. Para esto hemos desarrollado el modelo murino por administración oral de las bacterias STEC en ratones de las cepas BALB/c y C57BL a la edad del destete. Pudimos demostrar que los animales BALB/c muestran una evolución benigna frente a la infección, mientras que los animales de la cepa C57 fallecen al cabo de 3-4 días por disfunción renal secundaria a la Stx. Demostramos que los ratones BALB/c montan una rápida y eficiente respuesta inmune específica, mediada por anticuerpos, que no reduce la carga microbiana, pero sí el daño inducido por dichas bacterias. Incluso, las bacterias patógenas eliminadas por los animales BALB/c en la materia fecal tiene menor capacidad infectiva, reduciendo los contagios por transmisión horizontal. Como conclusión, podemos decir que el mecanismo patogénico del SUH incluye una fuerte respuesta inflamatoria, que potencia el daño endotelial específico inducido por la Stx. Paralelamente la respuesta específica ejerce una activa protección, fundamentalmente a través de la producción de anticuerpos específicos, que se monta durante la etapa prodrómica.

MESA REDONDA

PATOGÉNESIS DEL SUH Y RESPUESTA DEL HOSPEDADOR

COORDINADORA: CRISTINA IBARRA

Instituto de Fisiología y Biofísica (IFIBIO-Houssay-CONICET), Departamento de Ciencias Fisiológicas, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires. ibarra@fmed.uba.ar

ACCIÓN DE LA TOXINA SHIGA Y SUBTILASA EN DIFERENTES MODELOS IN VITRO DE CÉLULAS RENALES HUMANAS

MARÍA MARTA AMARAL

Instituto de Fisiología y Biofísica (IFIBIO-CONICET), Departamento de Ciencias Fisiológicas, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires. mmamaral74@gmail.com

Escherichia coli productor de toxina Shiga (STEC) es capaz de producir complicaciones sistémicas como el Síndrome Urémico Hemolítico (SUH). La toxina Shiga (Stx), tipo 1 (Stx1) y/o tipo 2 (Stx2), es el principal factor de virulencia de STEC y es responsable del desarrollo del SUH. Este hecho se debe a la acción de Stx sobre distintos órganos blanco, principalmente riñón y cerebro, cuyas células son altamente sensibles a la toxina por expresar niveles elevados del receptor globotriaosilceramida (Gb3). Además,

varias cepas de STEC no O157 producen la citotoxina Subtilasa (SubAB), que puede contribuir a la fisiopatogenia del SUH. En Argentina, el SUH tiene la mayor incidencia en el mundo y es la primera causa de lesión renal aguda en niños. Para comparar los efectos citotóxicos de SubAB y Stx2, desarrollamos cultivos primarios de células endoteliales glomerulares humanas (HGEC) y caracterizamos a las HGEC como células endoteliales mediante la expresión del factor von Willebrand y de la molécula de adhesión endotelio/plaqueta (PECAM-1). También, corroboramos que las HGEC expresaban el receptor Gb3. Stx2 y SubAB disminuyeron la viabilidad de HGEC, causaron edema intracelular y desadherencia. En este sentido, la apoptosis sería uno de los mecanismos por los cuales SubAB causó la muerte de HGEC. Por lo tanto, esta citotoxina emergente podría cooperar con el desarrollo del daño endotelial característico de la patogénesis del SUH. Por otro lado, para analizar cómo contribuye la comunicación entre el epitelio del túbulo proximal y el endotelio de la microvasculatura renal al daño tisular observado en los pacientes con SUH, desarrollamos y caracterizamos un modelo *in vitro* de comunicación endotelio-epitelio renal a partir de cocultivos, en los cuales las células epiteliales (HK-2) y endoteliales (HGEC) renales humanas se encuentran en estrecha proximidad. En condiciones basales, los cocultivos HGEC/HK-2 exhibieron una mayor resistencia eléctrica y una menor permeabilidad al agua que los monocultivos HGEC. La disminución de la viabilidad celular causada por Stx2 y SubAB sobre los monocultivos de HGEC y HK-2 se vio atenuada en los cocultivos. Además, a tiempos cortos como 20-30 min, Stx2 y SubAB inhibieron el flujo neto de agua (J_w) a través de los monocultivos HGEC y HK-2 pero no tuvieron efectos sobre el J_w a través de los cocultivos. También, en los cocultivos sin tratar, se detectó una concentración menor de IL-6 e IL-8 respecto a los monocultivos HGEC y mayor a los monocultivos HK-2. Sin embargo, Stx2, SubAB y Stx2+SubAB aumentaron la secreción de IL-6, IL-8 y TNF- α . Además, las toxinas no tuvieron efectos en los monocultivos HK-2 sobre la secreción de citoquinas, pero Stx2, SubAB y Stx2+SubAB causaron un aumento muy significativo en la secreción de IL-6, IL-8 y TNF- α por el compartimento epitelial (HK-2) del cocultivo. Este efecto, en parte se debió, a la capacidad de los factores solubles liberados por HGEC para estimular la producción de citoquinas en las células HK-2. En conclusión, la comunicación endotelio-epitelio modula las respuestas inflamatorias causadas por Stx2 y SubAB en las células renales y puede contribuir a los eventos tempranos del daño renal agudo.

INFLUENCIA DE LA INFECCIÓN BACTERIANA Y DERIVADOS DEL MUCUS INTESTINAL SOBRE LA ENDOCITOSIS, CITOTOXICIDAD Y TRANSLOCACIÓN DE LA TOXINA SHIGA TIPO 2

CRISTINA IBARRA

Instituto de Fisiología y Biofísica (IFIBIO-Houssay-CONICET), Departamento de Ciencias Fisiológicas, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires. ibarra@fmed.uba.ar

Escherichia coli productor de toxina Shiga (STEC) es un patógeno transmitido por alimentos, responsable de causar el Síndrome urémico hemolítico (SUH). STEC O157:H7 es el serotipo más frecuentemente asociado a SUH por la expresión de la toxina Shiga (Stx) que liberada por STEC después de colonizar y adherirse al epitelio colónico, atraviesa la barrera epitelial y causa daños en diferentes órganos blancos, principalmente riñón y cerebro. Stx subtipo 2a son prevalentes en cepas de STEC altamente virulentas. El riesgo de desarrollar SUH, después de la infección por STEC, depende de factores relacionados a STEC, al huésped y al medio ambiente. Si bien, del 10 al 15% de los casos registrados de infecciones por STEC progresan a SUH, las causas de esta susceptibilidad aún no están esclarecidas. Recientes avances en la caracterización de las señales específicas de la microbiota intestinal demuestran que los microorganismos que la componen pueden intervenir de una manera directa en la protección de las infecciones por STEC y de manera indirecta, en el mantenimiento de la barrera intestinal y la estimulación de la inmunidad innata y adaptativa. Sin embargo, algunos de los componentes de la microbiota intestinal pueden promover la infección por STEC al estimular la capacidad de adhesión bacteriana a la mucosa intestinal y la expresión de factores de virulencia. Para aportar conocimientos sobre los mecanismos a través de los cuales la microbiota ejerce su influencia beneficiosa o perjudicial nos propusimos caracterizar los mecanismos de patogenicidad de STEC O157:H7 sobre modelos de células epiteliales colónicas humanas y la modulación por metabolitos asociados a la actividad mucolítica de la microbiota comensal. Nuestros resultados demuestran que la infección por STEC O157:H7 de monocapas de la línea celular HCT-8 usadas como modelo de barrera intestinal humana, produce un aumento de la citotoxicidad de Stx2a por distintos mecanismos involucrados en la endocitosis. También observamos un aumento de la translocación de Stx2 por ambas vías: transcelular y paracelular cuando las células HCT-8 se cultivaron sobre soporte permeable (Millicells). Los mecanismos independientes de dinamina y dependientes de Gb3 son los mayoritariamente implicados en la endocitosis y translocación de Stx2, aunque la endocitosis dependiente de dinamina y la macropinocitosis fueron más relevantes en la presencia bacteriana. Cuando evaluamos la influencia de monosacáridos derivados de la actividad mucolítica de la microbiota comensal sobre la virulencia de STEC O157:H7 encontramos que la producción y translocación de Stx2a fue modulada por derivados de mucus independientemente de la proliferación y adhesión bacteriana. En este contexto experimental, los estudios aportan nuevo conocimiento acerca de la interacción huésped-microbiota-patógeno como moduladores del pasaje transcelular de Stx2. La identificación de entornos favorables intestinales para la infección de STEC y la expresión de Stx2 podría explicar el desarrollo diferencial del SUH.

PARTICIPACIÓN DE TLR4 EN EL SÍNDROME URÉMICO HEMOLÍTICO POR *ESCHERICHIA COLI* PRODUCTOR DE TOXINA SHIGA

VICTORIA BOCANEGRA

IMBECU, Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza. mvbocanegra@gmail.com

El síndrome urémico hemolítico (SUH) es una enfermedad endémica causada por *Escherichia coli* productora de toxina Shiga (Stx-STEC), caracterizada por anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia e injuria renal aguda. Argentina es el país con mayor incidencia mundial (10 a 12 casos cada 100.000 niños menores de 5 años), siendo un problema crítico de salud pública ya que constituye la primera causa de injuria renal aguda y la segunda de insuficiencia renal crónica y trasplante renal infantil. El desencadenante del proceso microangiopático es el daño de la célula endotelial en respuesta, en parte, a la respuesta inflamatoria de Stx y/o lipopolisacárido (LPS) de *E.coli*. El reconocimiento de LPS a través de TLR4 por parte de las células inmunes innatas es vital para la defensa del huésped contra las bacterias Gram-negativas. Inicialmente, estudiamos la expresión en superficie de TLR4 en neutrófilos y monocitos y su capacidad para modular la liberación de citoquinas inflamatorias en sangre periférica de pacientes luego de 1, 3 y 10 días del inicio del SUH. Al estudiar la población de neutrófilos, observamos un aumento de la expresión de TLR4 y de citoquinas proinflamatorias en plasma de pacientes al inicio de la enfermedad, lo cual disminuyó al día 10 de seguimiento. Dado que el complejo TLR4-LPS se internaliza rápidamente y la señalización inflamatoria inducida por TLR se modifica, estudiamos posteriormente la participación de la proteína Rab7b, pequeña GTPasa involucrada en el tráfico y la degradación lisosomal, en la regulación negativa de TLR4 en monocitos de pacientes con SUH. Por citometría de flujo, observamos un aumento en la expresión de superficie de TLR4 en monocitos CD14+ de pacientes a los días 1 y 4 posteriores al desarrollo del SUH. Asimismo, determinamos un aumento de citocinas intracelulares proinflamatorias, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) e interleucina 6 (IL-6) en el mismo período de tiempo. En contraste, a los 10 días de la enfermedad, la expresión de TLR4 superficial y de los niveles de TNF α disminuyeron hasta alcanzar valores cercanos al control. Es probable que el incremento de expresión de TLR4 en superficie por citometría de flujo pueda demostrar el reciclaje del receptor en un paso previo a la degradación proteolítica; y/o, puede ser posible que el estímulo sostenido del patógeno pueda generar la síntesis de novo. Cuando avanza la enfermedad, la expresión de superficie de TLR4 disminuye, así como la respuesta inflamatoria de citoquinas intracelulares de monocitos. Demostramos por inmunofluorescencia confocal la colocalización del incremento de TLR4 / Rab7b intracelular en monocitos de pacientes con SHU en el día 1 y máxima colocalización al día 4 y disminución al día 10, consecuente con lo observado por citometría de flujo. La colocalización de TLR4 y Rab7b nos permite sugerir la participación de Rab7b en el control de la vía endocítica de TLR4 en monocitos y la consecuente modulación de la respuesta inflamatoria en el seguimiento temprano de SUH.

EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA Y ANTIINFLAMATORIA EN PACIENTES CON SÍNDROME URÉMICO HEMOLÍTICO

MARÍA VICTORIA RAMOS

Laboratorio de Patogénesis e Inmunología de Procesos Infecciosos. IMEX (CONICET), Academia Nacional de Medicina. toresani7@hotmail.com

El Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) es una enfermedad caracterizada por anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia y daño renal agudo. Su forma típica se encuentra ligada a infecciones causadas por bacterias enterohemorrágicas del género *Escherichia coli* productoras de toxina Shiga (Stx) y si bien la toxina es esencial para el desarrollo del SUH, se ha demostrado a lo largo de los años que la participación de la respuesta inflamatoria contribuye al daño endotelial siendo necesaria para que el síndrome progrese. En línea con esto, nuestro grupo ha demostrado que los leucocitos circulantes de pacientes con SUH durante el periodo agudo presentan alteraciones tanto fenotípicas como funcionales. En particular, los pacientes presentan un marcado aumento en el número de polimorfonucleares neutrófilos (PMN) en sangre periférica, acompañado de una capacidad de respuesta disminuida, por lo cual se consideran "agotados" y exhaustos. Esto podría sugerir que estas células sufrieron un proceso previo de activación muy marcado, tras el cual se encuentran con una función disminuida. Contrariamente a los PMN que poseen vida media corta, los monocitos al ser activados se diferencian hacia diferentes fenotipos que poseen funciones específicas. En los pacientes con SUH, los monocitos circulantes presentan cambios que sugieren un estadio inflamatorio con mayor capacidad citotóxica. Ambos parámetros, el nivel de agotamiento de los PMN y el perfil inflamatorio de los monocitos, se correlacionan con la severidad del cuadro de SUH. Posteriormente a la activación de la respuesta inflamatoria, suelen gatillar mecanismos antiinflamatorios que permiten limitar los posibles efectos dañinos de dicha respuesta. En el caso del SUH, los trabajos que evalúan la posible implicancia de mediadores antiinflamatorios son escasos. Entre las moléculas antiinflamatorias, se encuentra la interleucina-10 (IL-10), citoquina producida por monocitos y macrófagos entre otros, y que interviene en la regulación in vivo de la inflamación. La IL-10 ha sido estudiada en numerosas patologías a causa de sus efectos pleiotrópicos

y, en ocasiones, contradictorios. Se ha observado que las diferencias interindividuales con relación a los niveles de IL-10 se encuentran ligadas frecuentemente a variaciones genéticas, en particular a un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) ubicado en el promotor de la citoquina. Este SNP denominado -1082 (A/G) se destaca por la regulación de la expresión de IL-10 y por asociarse a numerosas enfermedades. Recientemente, nuestro grupo observó que los pacientes con SUH presentan mayores niveles circulantes de IL-10 aunque acompañado de una menor producción in vitro por parte de células mononucleares de esta citoquina. En paralelo, observamos que aquellos pacientes con mayor severidad renal poseen un enriquecimiento en el polimorfismo más productor de IL-10. De esta manera, se ha avanzado en demostrar que la respuesta inflamatoria y antiinflamatoria acompañan el transcurso del SUH. El conocimiento detallado de los mecanismos patogénicos contribuye a la caracterización más profunda de la enfermedad, permitiendo así plantear posibles estrategias terapéuticas con el fin de bloquear o modular la severidad de la enfermedad.

COMUNICACIONES ORALES

PATOGÉNESIS DEL SUH Y RESPUESTA DEL HOSPEDADOR

COORDINADORES:

CLAUDIA SILBERSTEIN

Instituto de Fisiología y Biofísica Bernardo Houssay (IFIBIO-Houssay). Facultad de Medicina, UBA. csilber@fmed.uba.ar

ANALÍA TREVANI

Instituto de Medicina Experimental- CONICET- Academia Nacional de Medicina. analiatrevani@gmail.com

LOS NEUTRÓFILOS HUMANOS LIBERAN VESÍCULAS EXTRACELULARES EN RESPUESTA A LA TOXINA SHIGA 2

SHIROMIZU CM¹, KEITELMAN IA¹, GOMEZ, FD³, VEREERTBRUGGHEN A¹, VERA AGUILAR D¹, PEREZ PS⁴, ROSATO M¹, RAMOS MV¹, JANCIC C^{1,2}, FUENTES F¹, GALLETI J¹, AMARAL, MM³, PALERMO M¹, SABBIONE F^{1*}, TREVANI, A^{1,2*}.

1. IMEX, Academia Nacional de Medicina. 2. Dpto de Microbiología, Parasitología e Inmunología, Facultad de Medicina, UBA. 3. Laboratorio de Fisiopatología, IFIBIO Houssay CONICET, FMED-UBA. 4. INBIRS, Facultad de Medicina, UBA-CONICET.

*Ambas autoras contribuyeron por igual. maiumi.shiromizu@gmail.com

La bacteria *Escherichia coli* productora de toxina Shiga (Stx)(STEC) es un patógeno entérico no invasivo que coloniza el intestino, donde libera la Stx que se transloca a circulación y puede producir Síndrome Urémico Hemolítico (SUH). Los neutrófilos (PMN) son reclutados al intestino tras la infección por STEC, siendo la neutrofilia un evento típico en el SUH y factor de mal pronóstico. Estudios previos sugieren que la Stx podría ser transportada hasta órganos blanco como el riñón en vesículas extracelulares (VE) generadas por las células del sistema inmune. El objetivo de este trabajo fue determinar si los PMN producen VE en respuesta a la Stx2 (VE-Stx), si las mismas contienen la Stx y su impacto sobre la viabilidad y la capacidad de producir citoquinas por células del endotelio glomerular humano (HGEC). Para ello, aislamos PMN humanos de sangre periférica de donadores sanos por gradiente de Ficoll-Triyosom, sedimentación en Dextrán y lisis hipotónica. Además, cultivamos HGEC obtenidas bajo consentimiento informado, de pacientes pediátricos sometidos a nefrectomías realizadas por uropatías segmentarias o tumor en uno de los polos. Los PMN fueron incubados con 100 ng/ml Stx2 purificada (Tuffs Medical Center), Stx2 inactivada por calor (Stx Ø) o vehículo (C) por 4 h para luego aislar las VE generadas mediante centrifugación diferencial. Mediante microscopía confocal (n=4) y a través de la detección del marcador CD63 por Western Blot (n=6), comprobamos que los PMN producen VE tanto en la condición control como en respuesta a la Stx2. Mediante un ensayo de viabilidad empleando la línea celular VERO sensible a la acción tóxica de la Stx, comprobamos que las VE-Stx transportan Stx2 ya que disminuyeron significativamente la viabilidad de dichas células en comparación con las VE-StxØ y VE-C (n=10; p<0.05). Además, el tratamiento de las VE-Stx con Proteínasa K previo a su adición al cultivo de células VERO no disminuyó significativamente la mortalidad de las mismas, sugiriendo que la Stx2 se localiza principalmente en el lumen de las VE-Stx (n=3). Con el objeto de determinar el impacto de las VE-Stx sobre HGEC, co incubamos a las VE-Stx por 16 hs con HGEC, luego recuperamos los sobrenadantes y mediante ELISA determinamos que las VE-Stx pero no las VE-StxØ ni VE-C redujeron la secreción de Interleuquina-6 (IL-6) e Interleuquina-8 (IL-8) mediada por las HGEC (n=5; p<0.05). En ensayos adicionales, mediante interpolación en una curva estándar de mortalidad realizada con distintas concentraciones de Stx sobre las células VERO, determinamos que las VE-Stx ejercieron un efecto tóxico comparable a 0.05 ng/ml, sugiriendo que muy bajas concentraciones de toxina en las VE son capaces de modular la respuesta funcional de las HGEC. En ensayos preliminares (n=2) observamos que la co incubación de HGEC por 16 hs con VE-Stx pero no con VE-StxØ o VE-C incrementó la adherencia de neutrófilos a las mismas. En conjunto, estos resultados sugieren que los PMN podrían contribuir a la diseminación sistémica de la Stx mediante la liberación de la misma en VE. Además, aportan evidencia preliminar de que las VE-Stx podrían modular la respuesta funcional del endotelio glomerular.

EFFECTOS DE LA TOXINA SHIGA TIPO 2 EN RATAS PREÑADAS Y NO PREÑADAS

FISCHER SIGEL LK, SÁNCHEZ DS, SACERDOTI F, PRESTA A, ZOTTA E, SILBERSTEIN C.

Instituto de Fisiología y Biofísica Bernardo Houssay (IFIBIO-Houssay). Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires. kfischersigel@gmail.com

Estudios previos demostraron que la inyección intraperitoneal (ip) de una dosis subletal de toxina Shiga tipo 2 (Stx2) en ratas preñadas, al octavo día de la gestación (8 dg), produce daño renal y aborto. Se ha reportado que los riñones maternos desarrollan adaptaciones fisiológicas que podrían protegerlos frente a un daño renal. Los túbulos renales poseen una alta capacidad de regeneración luego de un daño moderado. Por lo tanto, nuestro objetivo fue estudiar los efectos de Stx2 sobre el daño renal y la regeneración del epitelio tubular renal de ratas preñadas y su comparación con ratas no preñadas. Para ello, ratas hembras Sprague-Dawley no preñadas, y ratas preñadas al 8 dg, se inyectaron ip con 0,5 ng de Stx2/g de peso corporal (NPS y PS) o diluyente (NPC y PC). Se registró diariamente el peso, la ingesta de alimento y agua. A 4, 8 y 30 días post-inyección (dpi), las ratas se colocaron en jaulas metabólicas durante las 24 hs previas a la eutanasia. Se obtuvieron muestras de sangre y orina para determinar el flujo urinario (Uv), la concentración de creatinina y urea y la osmolaridad. Se calculó el clearance de creatinina (Ccreat) y el TC de agua libre (TC). Los riñones fueron procesados para estudios histopatológicos y de la expresión de Ki67, marcador de proliferación, y vimentina, marcador mesenquimal, por inmunofluorescencia indirecta. Los resultados en ratas NPS y PS mostraron una disminución de la ingesta de alimento y peso corporal en comparación con sus controles ($p < 0,05$). Las ratas PS recuperaron la ingesta de alimentos y el peso corporal a partir de los 5 dpi, mientras que las NPS se recuperaron a los 14 dpi. A 4 dpi, las ratas NPS y PS aumentaron la creatinemia y disminuyeron el Ccreat respecto a sus controles ($p < 0,05$), pero, solo las NPS presentaron aumento de la uremia y alteración en la capacidad de concentrar la orina, evidenciada por el aumento del Uv y la ingesta de agua y por la disminución de la osmolaridad urinaria y del TC con respecto a ratas NPC ($p < 0,05$). El aumento del Uv también se observó en ratas NPS luego de 16hs de privación de agua. A 8 dpi, a diferencia de las PS, las ratas NPS mantuvieron la creatinemia alta. A 30 dpi, ningún grupo presentó alteraciones de los parámetros estudiados. A 4dpi, las ratas NPS y PS mostraron leve necrosis en la corteza renal y un aumento de la expresión de Ki67 y vimentina en las células tubulares de la médula renal con respecto a sus controles ($p < 0,01$). En conclusión, las ratas PS sufrieron menor lesión renal que las NPS y se recuperaron más rápido. Por otra parte, la expresión de Ki67 y vimentina sugieren la reparación del epitelio tubular renal tras un daño moderado causado por Stx2 en ambos grupos. Los cambios hemodinámicos durante la gestación podrían proteger al riñón materno de los efectos de Stx2, provocando un daño menor que en ratas no preñadas, el cual podría revertirse mediante la proliferación y regeneración de los epitelios renales.

IMPORTANCIA DE LA RESPUESTA HUMORAL EN INTESTINO PARA DEFINIR LA EVOLUCION DE INFECCIONES CON *ESCHERICHIA COLI* PRODUCTOR DE TOXINA SHIGA

BERNAL AM¹, SOSA FN¹, ERREA A², RAMOS MV¹, FERNÁNDEZ-BRANDO RJ¹, VERMEULEN M¹, RUMBO M², PALERMO MS¹.

1. Instituto de Medicina Experimental- CONICET- Academia Nacional de Medicina. 2. Instituto de Estudios Inmunológicos y Fisiopatológicos-CONICET, UNLa Plata. alanmbernal@gmail.com

La respuesta humoral en mucosa intestinal frente a patógenos como *E. coli* productor de toxina Shiga (STEC) es crucial para definir la evolución a formas autolimitadas o a complicaciones sistémicas. Previamente demostramos que ante un mismo inóculo de STEC O157:H7 (dosis letal) los ratones de la cepa C57BL/6 mueren a las 96 horas post infección (p.i.) mientras que los ratones BALB/c sobreviven presentando una rápida producción de anticuerpos anti-STE (72 horas p.i.) en materia fecal. Al ser deplecionados de linfocitos B, carecen de estos anticuerpos y se observa mortalidad a partir de las 72 horas p.i. El objetivo del presente trabajo fue caracterizar la presencia y funcionalidad de los anticuerpos anti-STE en mucosa intestinal producidos durante una infección natural en ambas cepas de ratón. Materiales y métodos: Se infectaron ratones de ambas cepas ($n=5$) con una dosis subletal de STEC O157:H7 y a los 15 días p.i. se tomaron muestras de sangre y materia fecal (MF) para analizar el título de anticuerpos anti-Stx2, anti-STE y anti-flagelina H7 (FH7) por ELISA. Para caracterizar la funcionalidad de los anticuerpos en la mucosa intestinal, se llevaron a cabo ensayos de opsonización in vitro incubando IgA anti-STE recuperada de MF con bacterias STEC O157:H7 por 30 minutos y posterior análisis por citometría de flujo utilizando un anticuerpo anti-IgA de ratón acoplado a FITC. Por otro lado, se analizó la capacidad neutralizante de los anticuerpos anti-FH7 mediante inhibición de la activación de TLR-5 mediada por la FH7 en la línea celular reportera Caco-2 CCL20:luc. La capacidad neutralizante de los anticuerpos anti-FH7 fue expresada como unidades arbitrarias de luminiscencia (UAL), expresadas como porcentaje. Los análisis estadísticos llevados a cabo fueron ANOVA, t test paramétrico de Student o t test no paramétrico, según correspondiera. Resultados: Luego de 15 días p.i., se observaron títulos de anticuerpos IgA anti-STE y anti-FH7 en MF mayores en la cepa BALB/c en comparación con la cepa C57BL/6 (IgA anti-STE BALB/c vs C57BL/6: 38 ± 52 vs 3.2 ± 6.4 , $*p < 0.05$; IgA anti-FH7 BALB/c vs C57BL/6: 22 ± 24 vs 0 ± 0 , $**p < 0.01$). No se observaron títulos de IgG anti-Stx2 en suero en ninguna de las dos cepas. Los anticuerpos anti-STE presentes

en MF de los ratones BALB/c infectados fueron capaces de opsonizar bacterias STEC O157:H7 (% bacterias-IgA + infectados vs controles (n=3): $79.06 \pm 1.31\%$ vs $4.26 \pm 2.04\%$; **** $p < 0.0001$). Por otro lado, una dilución 1/10 de los anticuerpos anti-FH7 inhibió la actividad proinflamatoria de FH7 (UAL sin anticuerpo (%): 100 ± 8.2 ; con anticuerpo no específico: 118.5 ± 15.6 ; con anticuerpo anti FH7: 53 ± 11.8). Concluimos que durante una infección con bacterias STEC O157:H7, la cepa C57BL/6 no es capaz de producir anticuerpos anti-STECS ni anti-FH7, a diferencia de los ratones BALB/c que montan una respuesta inmune humoral local y específica en mucosa intestinal con capacidad de reconocer a las STEC y bloquear los efectos proinflamatorios TLR-5 dependientes. Esta respuesta sería clave para definir el curso de una infección gastrointestinal con bacterias STEC.

EVALUACION DE LIPOCALINA ASOCIADA A NEUTROFILOS (N-GAL) COMO FACTOR PRONÓSTICO DE SEVERIDAD RENAL EN NIÑOS CON SÍNDROME URÉMICO HEMOLÍTICO

CARBALLO D¹, FIORENTINO G², EXENI R³, SANTIAGO A³, ROMERO R⁴, PORPORATO M⁴, ISERN E⁴, COROMINAS A⁵, PALEMO M^{2*}, OCHOA F^{1,6}, ZOTTA, E^{1,6}, IBARRA C^{1*}.

1. Laboratorio de Fisiopatogenia, IFIBIO-Houssay, Facultad de Medicina, UBA. 2. Laboratorio de Patogénesis e Inmunología de Procesos Infecciosos, IMEX, Academia Nacional de Medicina. 3. Servicio de Nefrología, Hospital de Niños "Ramón A Exeni", San Justo. 4. Servicio de Nefrología Pediátrica, Hospital Nacional "Prof. Alejandro Posadas". 5. Servicio de Bioquímica, Hospital Nacional "Prof. Alejandro Posadas". 6. Dpto Cs Biológicas, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA. daniela.carballo.dc@gmail.com

El SUH típico, asociado a las infecciones por *E. coli* productor de toxina Shiga (STEC), tiene como blancos patogénicos principales: riñón, intestino y sistema nervioso central. Actualmente se monitorea la función renal en el momento agudo para introducir los tratamientos sintomáticos. El grado de daño renal en el período agudo condiciona la evolución a mediano y largo plazo. El 30 % de los casos presentan secuelas renales de distinta gravedad. N-GAL es una glicoproteína producida por los granulocitos neutrófilos (PMN), riñones, pulmones, hígado, etc, que se libera en situaciones de daño celular o inflamación. En los últimos años se ha propuesto a N-GAL como marcador específico de daño renal tanto para situaciones agudas como crónicas por su sensibilidad respecto a los parámetros bioquímicos clásicos de disfunción renal (Urea, Creatinina). El N-GAL es capaz de detectar la injuria renal aguda temprana subclínica y sus consecuencias adversas en pacientes que se encuentran en estado muy grave. Teniendo en cuenta que el SUH ocurre principalmente en niños sanos menores de 5 años, y que el mecanismo patogénico incluye una fuerte respuesta inflamatoria, que potencia el daño endotelial específico inducido por Stx, el objetivo del presente trabajo fue evaluar los niveles de N-GAL sérico al momento del diagnóstico de SUH, como factor pronóstico de compromiso renal. El estudio que contó con la aprobación de los Comité de Ética de ambos hospitales y los adultos responsables firmaron el Consentimiento Informado, incluyó niños con SUH típico atendidos en el Hospital Nacional Posadas (n=6) y en el Hospital de Niños RA Exeni de San Justo (n=9), entre 2018-2020. Todos cumplieron con al menos algunos de los criterios clínicos y/o bioquímicos para diagnóstico de SUH: anemia hemolítica microangiopática con esquistocitos, trombocitopenia (plaquetas $< 150 \times 10^9/L$ y valores anormales de creatinina sérica ($>0,7$ mg/dL, menores de 5 años). Los sueros de niños que concurren al hospital por enfermedades no relacionadas con daño renal ni infecciones se usaron como controles (C)(n=4). Los valores de N-GAL se obtuvieron mediante el uso de un kit comercial de ELISA (BIOPORTO, Dinamarca) evaluándose en paralelo sueros controles y de pacientes con diagnóstico de SUH. Los sueros correspondieron al momento del diagnóstico mostraron los siguientes parámetros bioquímicos [mediana (rango intercuartil)]: creatinina=2,6 (0,4-6,6) mg/dL; Ácido úrico = 13,4 (4,8-15,9) mg/dL; PMN = 6,9 (1,7-35,1) $\times 10^3/uL$; Hto = 26 (17-42)%; Hb = 10,5 (5,6-13,6) g/dL, LDH = 2499 (402-4247) UI/L. Los pacientes presentaron diferencias en los días de anuria (desde 0 a 24 días). Los valores de N-GAL en los pacientes con SUH fueron significativamente mayores que los controles: SUH = 285,2 (71,5-1177,6)* ng/mL; (C)=47 (11,2-95,8)* ng/mL; * $p=0,001$, Mann Whitney. Se analizó la existencia de correlación entre los valores de N-GAL, los parámetros bioquímicos y días de anuria, como principal criterio asociado a severidad renal durante el período agudo basado en la clasificación del Dr. Giannantonio. Se encontró correlación positiva entre N-GAL y días de anuria ($r = 0.6318$, $P = 0.0138$, Spearman). Estos resultados indican que los valores de N-GAL sérica podrían ser un factor pronóstico de daño renal en los niños con diagnóstico de SUH.

MESA REDONDA

PATOGENICIDAD BACTERIANA: ASPECTOS MOLECULARES, FACTORES DE VIRULENCIA (PARTE I)

COORDINADORA: NORA LÍA PADOLA

Laboratorio de Inmunoquímica y Biotecnología. Facultad de Ciencias Veterinarias. CIVETAN-UNCPBA. nlpadola@vet.unicen.edu.ar

ANÁLISIS GENÓMICO DE LOS FACTORES Y DETERMINANTES DE VIRULENCIA DE STEC Y DEC AISLADOS DE HUMANOS Y ALIMENTOS, EN ARGENTINA

CLAUDIA CAROLINA CARBONARI

Servicio de Fisiopatología, INEI-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán". ccarbonari@anlis.gob.ar

La Secuenciación de Genoma Completo (SGC) es una metodología de avanzada, de alta resolución, que brinda información valiosa para su aplicación al estudio y vigilancia de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga (STEC) y *Escherichia coli* diarregénico (DEC). El objetivo del presente trabajo es profundizar el conocimiento sobre los genes de virulencia característicos y accesorios de STEC y DEC utilizando SGC. Se seleccionaron 225 secuencias (101 STEC O157:H7, 2 O157:H16, 43 STEC no-O157 y 79 EAEC/EAEC-stx) de la Base de Datos de Genomas del Laboratorio Nacional de Referencia para realizar el análisis. La SGC se realizó utilizando Qiacube (Qiagen) para la extracción de ADN y la plataforma MiSeq (Illumina) con lecturas de 2x250 pb, siguiendo los protocolos de laboratorio del CDC/TRAKR-FDA. El flujograma de análisis incluyó varias etapas. Control de calidad utilizando FastQC. Identificación mediante Kraken. Caracterización de genes de virulencia, resistencia, y MLST mediante ARIBA/srst2, Virulencefinder, y Resfinder. Para el ensamblaje, anotación de las secuencias, y análisis del pangenoma se utilizaron, Unicycler, Prokka y Roary, respectivamente. Los resultados por SGC, de los genes que se utilizan para el diagnóstico de rutina *stx/eae/ehxA* presentaron buena correlación con los obtenidos mediante cultivo-PCR. Respecto a los serotipos y secuenciotipos (ST), se obtuvieron: 101 O157:H7 (ST11/11*/7816/7825/8343/novel*); 2 O157:H16 (ST10); 3 O103:H19 (ST1967/17); 2 O112:H19 (ST5296); 2 O121:H19 (ST655); 11 O145:H28 (ST32); 9 O26:H11 (ST21/1573), entre otros; pudiendo resolverse además los serotipos de 7 cepas que habían sido definidas como ONT por serología. Analizando las cepas STEC *eae*-positivo la mayoría presentan genes del sistema de secreción tipo III (*espA/espB/tir*), así como también *tccP* y otros genes efectores no codificados en LEE (*nleA/nleB/nleC*), que participan del proceso de *attaching and effacement*. El gen *efa1*, (factor de adherencia EHEC) se detectó en todas las cepas *eae+* excepto en O145, mientras que *toxB* fue variable. Otros genes codificados en pO157 como *espP* fueron hallados en todas las cepas, y *katP* solo en O145 y O26. Además, el gen *celB* (endonucleasa) que participa del metabolismo se detectó en O121 y O8, y el gen *ireA* (sideróforo) solo en O128. El gen *iss*, de supervivencia sérica, fue encontrado en todas las cepas. Los genes *astA* (enterotoxina estable al calor-O145/O157/O26/O121) y *lpfA* (O26/O121) también fueron identificados. En 9,1% (9/101) STEC O157 se detectaron los siguientes genes *aadA*, *drfA*, *sul2*, *tetA*, *blaTEM*, *blaCTX-M-14* y *fosA7*. Respecto del análisis de EAEC destacan los genes *agg3C*, *agg5A* (fimbrias), *aaiC* (proteína dispersina), *sigA*, *aap*, *aat*, *astA*, *iss*, *capU* considerados de virulencia y los genes *qnrB*, *blaTEM*, *blaOXA*, *drfA*, *aadA*, *strA*, *sul* y *tetA* de resistencia. El 95,5% (21/22) EAEC-stx O59:H19/ST1136/*agg4A* y presentaron perfiles similares a EAEC. Cada uno de estos genes contribuye a definir el potencial patógeno de las cepas STEC, EAEC y EAEC-stx, y la SGC nos permitió obtener perfiles de virulencia más completos a los estudiados habitualmente. Ampliar el conocimiento sobre las características y dinámica de los patógenos de interés aporta una mayor comprensión de la situación epidemiológica para dar respuestas a problemáticas en Salud Pública a nivel nacional y global.

FACTORES DE VIRULENCIA, ISLAS DE PATOGENICIDAD EN STEC DE DIFERENTES ORÍGENES

ROCÍO COLELLO

Facultad Ciencias Veterinarias-CIVETAN-UNCPBA. rocioc@vet.unicen.edu.ar

Escherichia coli productor de toxina Shiga (STEC) es un patógeno que ocasiona enfermedades graves como colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico (SUH). Las cepas STEC constituyen un grupo heterogéneo en relación a los mecanismos que utilizan para colonizar el intestino. Un subgrupo de ellas, presenta una isla de patogenicidad denominada Locus de borrado del enterocito o LEE, que codifica factores que les permite adherirse a los enterocitos (STEC LEE-positiva). Otro subgrupo carece de este locus (STEC LEE-negativa) y sin embargo, ha sido asociado a enfermedad severa en humanos. El mecanismo de colonización de este conjunto de cepas no está dilucidado, aunque, en recientes hallazgos se ha descrito una nueva isla de patogenicidad denominada Locus de adherencia y autoagregación (LAA) presente en este subgrupo bacteriano, representando nuevos desafíos para el diagnóstico de STEC. Por otra parte, se ha identificado un nuevo antígeno de membrana externa que está presente exclusivamente en este grupo bacteriano, al que se denominó Hes (*Haemagglutinin from Shiga toxin-producing E. coli*), donde el gen *hes* está localizado en LAA. Esta isla está compuesta por 80 genes, y organizada en 4 módulos, pudiendo

presentarse en algunos serotipos STEC LEE-negativas en forma completa (los 4 módulos) como incompleta (< a 4 módulos), debido a que sus módulos se pueden movilizar independientemente por transferencia genética horizontal. A su vez, mediante estudios de genómica se demostró que las cepas que poseen la isla LAA completa son aisladas de casos de SUH, demostrando que la portación de LAA está asociada con la patogenicidad de las cepas. La adquisición de esta isla es probablemente un evento evolutivo nuevo, el cual contribuye a la emergencia de este grupo de patógenos. Además de *hes*, dentro de LAA se codifican otros genes que participan en adhesión, autoagregación y formación de biofilm, tales como *iha*, una nueva variante de la serinproteasa autotransportadora de Enterobacteriaceae (SPATE), llamada LAA sintetizadora de SPATE (*lesP*), *pagC*, *tpsA* que codifica para sistemas de secreción en las bacterias gram-negativas y participan en fenotipos virulentos y *agn43* y/o *cah*. La adquisición de esta isla es probablemente un evento evolutivo nuevo, el cual contribuye a la emergencia de este grupo de patógenos. Notablemente los resultados obtenidos en nuestro laboratorio sugieren que, existe una alta prevalencia de LAA en cepas de diferentes orígenes (bovinos de distintos sistemas productivos: feedlot, pastoreo y tambo y alimentos) y diferentes regiones (Argentina, Chile y Paraguay), a su vez, que en ausencia de LEE, LAA puede ser uno de los mecanismos de adherencia al intestino humano y estaría involucrada en la adherencia celular la formación de biofilm, en donde podrían participar los genes *hes*, *iha*, *agn43* y otros factores de virulencia sintetizados por LAA.

DE O22:H8 AL UNIVERSO STEC: CONEXIÓN ENTRE LA ADQUISICIÓN DE ELEMENTOS GENÉTICOS MÓVILES Y LA PATOGENICIDAD

WANDERSON MARQUES DA SILVA

Instituto de Agrobiotecnología y Biología Molecular (IABIMO INTA-CONICET). marques.wanderson@inta.gob.ar

Escherichia coli productora de toxina Shiga (STEC) es un patógeno transmitido por alimentos capaz de causar enfermedades en humanos. En un estudio previo, nuestro grupo demostró que un aislado de STEC perteneciente al serotipo O22:H8 (cepa 154) puede interferir con la colonización *in vivo* de STEC O157:H7. Usando la secuenciación del genoma completo y la comparación genómica, predijimos un subconjunto de genes (1,096 genes) adquiridos por la cepa O22:H8 154 a través de la transferencia horizontal de genes que podría ser responsable del fenotipo descrito previamente por nuestro grupo. Entre ellos se identificaron genes relacionados con la patogénesis de Non-LEE STEC como *hes*, procesos metabólicos específicos, resistencia a antibióticos y genes que codifican para el T6SS-1 que está relacionado con la competencia interbacteriana. Además, nuestro estudio *in silico* mostró que esta cepa alberga los genes que codifican para *stx1c* y *stx2dact*, siendo esta última una variante inducible por mucus. Los resultados obtenidos en este estudio permiten conocer la plasticidad genómica de STEC y la importancia de las islas genómicas en la adaptación y patogenia de este patógeno.

IMPORTANCIA DEL FAGO -STX2 EN LA PATOGENESIS DEL SUH

LETICIA BENTANCOR

Instituto de Estudios para el Desarrollo Productivo y la Innovación, Universidad Nacional de José C. Paz (IDEPI-UNPAZ). lvbentancor@gmail.com

El Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) presenta un grave problema de salud pública, principalmente en Argentina, siendo el país con mayor cantidad de casos registrados (13/100.000 niños menores de 5 años). Las infecciones con *Escherichia coli* productora de toxina Shiga (Stx) (STEC) causan colitis hemorrágica y en algunos casos, puede derivar en el desarrollo de SUH. La toxina Shiga es el agente causal indispensable para el desarrollo del SUH y dicha toxina se encuentra codificada en el genoma del bacteriófago lisogénico (933W) presente en el genoma de *E. coli* O157:H7. Aunque la diálisis peritoneal ha reducido significativamente la mortalidad, aún no existen terapias preventivas, ni tratamientos específicos, que posibiliten controlar el nivel de daño renal.

El objetivo principal de nuestro trabajo es evaluar el rol del bacteriófago 933W en el desarrollo del SUH y su potencial como principal blanco terapéutico para poder desarrollar futuros tratamientos específicos.

Comprendiendo el rol del bacteriófago en el desarrollo de SUH, se podría pensar en una terapia contra el bacteriófago combinado con anticuerpos neutralizantes de la toxina Stx2 con el fin de evitar que la toxina que entra en circulación llegue al órgano blanco y de esta manera, evitar que se desarrolle SUH. Esta opción debería ir acompañada de métodos de diagnósticos tempranos y certeros, un alerta clínico para detectar diarreas infantiles y de encontrar factores de riesgo que sugieran la evolución a SUH.

MESA REDONDA

PATOGENICIDAD BACTERIANA: ASPECTOS MOLECULARES, FACTORES DE VIRULENCIA (PARTE II)

COORDINADORA: **ANALÍA ETCHEVERRÍA**

Laboratorio de Inmunoquímica y Biotecnología, Facultad de Ciencias Veterinarias. CIVETAN-UNCPBA. analiain@vet.unicen.edu.ar

DIVERSIDAD EN LA VIRULENCIA DE AISLAMIENTOS STEC LOCALES

ALEJANDRA KRÜGER

Laboratorio de Inmunoquímica y Biotecnología. Facultad de Ciencias Veterinarias. CIVETAN-UNCPBA. akruger@vet.unicen.edu.ar

El ganado bovino es el principal reservorio de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga (STEC). Por ello, desde el Lab. de Inmunoquímica y Biotecnología de la Facultad de Cs. Veterinarias (UNCPBA) hemos planteado como uno de nuestros objetivos caracterizar las cepas STEC presentes en bovinos, su ambiente y los alimentos cárnicos de nuestra región. La estrategia de búsqueda y aislamiento se centra en la detección de los genes codificantes de la toxina Shiga (*stx*) y nos ha permitido ir formando una colección de cepas de diversos serotipos. El estudio de los principales genes de virulencia con técnicas de tipificación molecular de una colección inicial de 186 cepas aisladas de bovinos y carne ya indicó variabilidad en presencia/ausencia y en subtipos de los genes: *stx*, *eae* y *saa*. Si bien se detectaron diferentes subtipos *stx* y combinaciones, la mayoría de las cepas presentaba un solo subtipo *stx* en su genoma y más del 40% portaba *stx2a*. Posteriores estudios de la colección más ampliada, y centrados en cepas seleccionadas por serotipos, también demostraron variabilidad en genes asociados a colonización, supervivencia y virulencia. Por ejemplo, el análisis de 34 cepas O113:H21 aisladas de bovinos y alimentos cárnicos evidenció diferencias entre cepas, principalmente en los subtipos de *stx* y *saa* y en la presencia/ausencia de *cdt-V*. La mayoría de este grupo (91%) portaban *stx2a* como único subtipo o en combinación con otros. Un estudio de 29 aislamientos O26:H11 obtenidos de bovinos, alimentos, ambiente y pacientes con diarrea identificó tres grupos principales en función de los genes evaluados. Los dos grupos mayoritarios estaban formados por cepas *stx1a*-positivas y *stx2a*-positivas, respectivamente. A su vez, los genes *toxB*, *espl*, y *katP* se distribuyeron de manera diferencial entre esos grupos. Diversos trabajos sugieren que tanto el subtipo como la cantidad de toxina Shiga producida influyen en la virulencia de STEC. En particular, *Stx2a* es el subtipo asociado a mayor severidad de enfermedad. La producción de toxina Shiga está codificada y regulada por bacteriófagos. En un estudio de 29 cepas *stx2a*-positivas de los serogrupos O26, O91, O145 y O157 aisladas de bovinos y humanos observamos que la mayoría de las cepas portaban fagos inducibles y expresaban *stx2a*. Sin embargo, los niveles de expresión de *stx2a* y de producción de fagos *Stx2a* fueron heterogéneos. Los análisis estadísticos identificaron una mayor expresión de *stx2a* en la respuesta a la inducción con mitomicina C en las cepas obtenidas de ganado que en las de humanos, así como un mayor incremento en la producción de fagos en cepas *stx2a* vs cepas *stx2a/stx2c*-positivas. Actualmente, estamos realizando estudios de análisis de genes y genomas de fagos *Stx* que indican variabilidad también a estos niveles. En conclusión, los distintos estudios realizados sobre factores asociados a virulencia reflejan un abanico de combinaciones en la población de las cepas STEC locales y destacan el rol de los elementos genéticos móviles, como plásmidos y fagos *Stx*, en dicha variabilidad.

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE STEC AISLADAS DE CASOS CLÍNICOS Y RESERVORIOS EN NEUQUÉN

DR. LUIS PIANCIOLA

Laboratorio Central, Subsecretaría de Salud. Ministerio de Salud de Neuquén. luispianciola@yahoo.com.ar

Neuquén forma parte del grupo de provincias con mayor incidencia de SUH en el país. En 2021 tuvo una tasa de 1.5 casos cada 100.000 habitantes que duplica la media nacional. Más del 75% de los casos se relacionan con *Escherichia coli* O157:H7. En un trabajo de nuestro grupo publicado en 2014, caracterizamos una colección de 70 aislamientos de STEC O157:H7 aisladas en la provincia. El 78.7% de las cepas presentaban el genotipo *stx2a+stx2c*, el 91.4% pertenecían al clado 8 hipervirulento, el 100% de las cepas tenían los factores putativos de virulencia ECSP_3620 (norV) y ECSP_0242. El genotipo *q933+q21* del gen codificante del antiterminador Q se detectó en el 81.4% de las cepas. Demostramos la circulación casi excluyente en nuestra provincia de cepas de STEC O157:H7 del clado 8 hipervirulento que poseen factores de virulencia y reguladores de la expresión de genes *stx* en valores muy superiores a lo informado hasta ese momento. Estos factores podrían estar relacionados con la alta incidencia de SUH en nuestra provincia. En otro trabajo publicado en 2016 analizamos si los aislamientos de STEC O157:H7 del resto de país tenían características similares y si esto tenía relación con las cepas que colonizan el ganado. Estudiamos 226 aislamientos clínicos de STEC O157:H7 y 54 provenientes de ganado bovino, en ambos casos las colecciones representaban distintas regiones de la Argentina. El 100% de los aislamientos humanos pertenecían al linaje I/II de LSPA-6, relacionado a casos severos en humanos. En el ganado, el 94.1% fueron de linaje I/II. No se detectaron cepas de linaje II, característico del ganado. El genotipo *stx2a+stx2c* estuvo presente en el 76.1% y 55.5% de las cepas humanas y bovinas, respectivamente. Pertenecieron al clado 8 hipervirulento el 87.6% de las cepas clínicas y el 59.3% de las bovinas. Todos los aislamientos clínicos y el 92.5% de

los bovinos tenían ECSP_3620 (norV). El ECSP_0242 estuvo presente en el 99.1% y 90.7% de los aislamientos clínicos y bovinos, respectivamente. El genotipo *q933+q21* del antiterminador Q se detectó en el 82.3% y 59.3% de las cepas humanas y bovinas, respectivamente. De esta forma se confirma la circulación en toda la Argentina de cepas con características similares a las detectadas previamente en Neuquén. Estas particulares cepas clínicas del país se relacionan con las cepas colonizantes del ganado argentino, muy distintas a todas las bovinas informadas previamente en la bibliografía mundial. Estudios posteriores en diversos tipos de ganado de la provincia nos mostraron datos similares a los del país y nos permitieron detectar, en un caso puntual, una probable relación de contaminación del medio ambiente con un caso clínico. Trabajos previos nos habían permitido demostrar la diseminación por agua y la supervivencia en medio ambiente de cepas de STEC O157:H7 de clado 8, aunque en ambientes ecológicos distintos a los de nuestra provincia. Actualmente estamos abocados a analizar la probable diseminación de STEC en el medio ambiente neuquino relacionada a los sistemas artificiales de irrigación y, especialmente, la influencia del viento patagónico en la misma.

GENÓMICA DE FAGOS STX

PAULA LUCCESI

Laboratorio de Inmunoquímica y Biotecnología. Facultad de Ciencias Veterinarias. CIVETAN-UNCPBA. paulaluc@vet.unicen.edu.ar

El principal factor de virulencia de STEC está codificado en el genoma de fagos que se encuentran integrados en el cromosoma de la bacteria, los que reciben en consecuencia el nombre de fagos (o profagos) Stx. El operón que codifica a las 2 subunidades de la toxina Shiga está ubicado en la región tardía del genoma fágico, y su expresión, así como generalmente también su secreción, se encuentran asociadas a la inducción del ciclo lítico de los fagos. Estos fagos juegan también un rol importante en la diseminación de los genes *stx* y, en consecuencia, en la emergencia de nuevas cepas STEC. Se consideran de tipo lamboide dado que presentan algunos genes homólogos a los del bacteriófago lambda, pero poseen una cantidad importante de genes diferentes, de la mayoría de los cuales se desconoce su función. Los fagos Stx presentan diversidad en cuanto a morfología y al tamaño y composición de su genoma. Existe también variabilidad en los subtipos de toxina, siendo Stx2a el que está asociado a la mayoría de los casos de SUH. Nuestro grupo de investigación evaluó la producción de este subtipo de toxina y de viriones fágicos por parte de cepas STEC de diferentes serogrupos aisladas de bovinos, medio ambiente, alimentos y pacientes de nuestro país, buscando relacionar los niveles de producción de toxina y fagos con algunas características genéticas de éstos. Evaluamos por PCR la presencia de ciertos alelos del antiterminador Q, que se encuentra río arriba del operón de Stx y encontramos que en aquellas cepas que no portaban ninguno de estos alelos, no aumentó la producción de Stx2a ni de partículas fágicas bajo condiciones inductoras del ciclo lítico (incluso algunas no produjeron viriones en ninguna condición). La mayoría de las cepas, por el contrario, portaban el alelo *q933* y evidenciaron aumentos en la expresión de *stx2a* como también en la producción de fagos Stx2a en condiciones que inducen el ciclo lítico. Una de las cepas STEC evaluadas correspondió al primer aislamiento de STEC O145:H- que se realizó en nuestro país. Esta cepa produjo altos niveles de toxina Stx2a y de inducción de los fagos, por lo cual nos interesó comenzar por la caracterización genética del fago portador de este subtipo presente en dicha cepa. Observamos diferencias con el fago 933W (de referencia como fago Stx2a) en la región reguladora temprana y, notablemente, una alta identidad de secuencia con fagos Stx2a de cepas O157:H7 aisladas de pacientes en otros países. En resultados recientes en cuanto a comparaciones entre genomas de otros fagos Stx2a de cepas O145 aisladas de bovinos, medio ambiente y pacientes de nuestro país observamos variabilidad en algunas regiones así como similitud entre algunos fagos de diferentes orígenes (bovino/paciente). Consideramos que es importante conocer las características de los fagos de cepas STEC nativas para aportar información para identificar regiones de su genoma asociadas a una mayor virulencia y evaluar el riesgo que representan las diversas STEC encontradas en reservorios y alimentos.

ESTUDIO DEL SEROTIPO O174 EN LA INCIDENCIA DE SUH EN ARGENTINA

CECILIA CUNDON

Cátedra de Microbiología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires. ccundon@fvet.uba.ar

Escherichia coli shigatoxigénico (STEC) es el principal agente etiológico del síndrome urémico hemolítico (SUH). Dentro del grupo STEC no-O157, el serogrupo O174 se destaca como problemático en Argentina. Es el quinto en prevalencia y no es considerado por estándares europeos o americanos en la vigilancia de alimentos; sin embargo este se ha asociado con casos de SUH, bacteriemia y síndrome de muerte súbita infantil. Para contribuir a la comprensión de la epidemiología del SUH y de las infecciones por STEC en Argentina, el objetivo fue estudiar el perfil de virulencia y la relación clonal y filogenética de una cohorte de cepas STEC O174. Se seleccionaron 30 aislamientos STEC O174:H21 y 11 O174:H28 de distintas fuentes, origen y años. Se subtipificó la toxina Shiga y se evaluó la codificación de factores de virulencia adicionales (cuatro toxinas, seis adhesinas, tres adhesinas fimbriales y dos enzimas). Al analizar las 30 cepas pertenecientes al serotipo O174:H21; se identificaron

dos genotipos: stx2c (93,33%; 28/30) y stx2a (6,66%; 2/30). En las cepas pertenecientes al serotipo O174:H28, se identificaron los genotipos: stx2a (63,64%; 7/11) y stx2c (9,09%; 1/11), stx2a/stx2c (18,8%; 2/11) y stx1a/stx2a (9,09%; 1/11). Los factores de virulencia adicionales se presentaron con diferente frecuencia: afaC (41/41), lpfO113 (39/41), iha (36/41) ecpA (22/41) y saa (13/41), ehxA (13/41), subA (12/41), espP (7/41) y cdtV (1/41). La relación clonal determinada mediante PFGE en 34 de las cepas fue del 64,01% de similitud. Se identificaron 29 patrones de corte con la enzima de restricción XbaI y se observaron 3 grupos de cepas con 100% de similitud (clusters I, II y III). Sólo las cepas incluidas en el cluster II se obtuvieron durante el mismo procedimiento de muestreo y compartieron el mismo perfil de virulencia; sin embargo las cepas de los clusters I y III diferían en sus perfiles de virulencia. La relación filogenética se determinó mediante MLST utilizando la base de datos EcMLST. Las cepas STEC O174:H28, presentaron un perfil ST160 CG21 compartido con 6 aislamientos presentes en la base de datos internacional y las O174:H21 un perfil ST89 CG34 compartido con 38 aislamientos del mismo sitio. Para evaluar la relación filogenética con otras cepas STEC se utilizaron tres técnicas de agrupamiento: goeBURST, Máxima Parsimonia (MP) y Máxima Verosimilitud (MV). Mediante goeBURST, se determinó que el ST89 se establece como un subgrupo fundador. Los dos ST (ST89 y ST160) de las cepas bajo estudio no muestran relación estrecha. A su vez, tampoco muestran relación con los ST a los cuales pertenecen los aislamientos correspondientes a los seropatovares A y B. Sin embargo mediante el análisis con MP y MV, se demuestra un origen común de las cepas STEC O174:H21 con las cepas STEC O91:H21 el cual se ha asociado a infecciones severas. La heterogeneidad en los perfiles de virulencia, la escasa similitud clonal y el origen común con cepas asociadas a enfermedades graves plantea la necesidad de continuar profundizando en el estudio, tanto genotípico como fenotípico, de un patógeno emergente de importancia en la salud pública.

COMUNICACIONES ORALES

PATOGENICIDAD BACTERIANA: ASPECTOS MOLECULARES, FACTORES DE VIRULENCIA (PARTE I Y II)

COORDINADORES:

ROMINA FERNANDEZ BRANDO

Instituto de Medicina Experimental (IMEX-CONICET), Academia Nacional de Medicina, fernandezbrandoromina@gmail.com

Nahuel Riviere

Instituto de Agrobiotecnología y Biología Molecular (IABIMO)-INTA/CONICET. riviere.nahuel@inta.gob.ar

ESTUDIO DE LOS FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS A LA EXCRECIÓN DE ESCHERICHIA COLI O157:H7 EN BOVINOS

RHADES LC, LARZÁBAL M, BENTANCOR A, SABIO Y GARCÍA J, BABINEC FJ, CATALDI A, AMIGO N, BALDONE VN, URQUIZA L, DELICIA PJ, FORT MC.

Unidad experimental INTA Anguil, La Pampa, Argentina. rhades.luis@inta.gob.ar

Los bovinos son reservorios primarios de *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) O157:H7, responsable del síndrome urémico hemolítico (SUH), que afecta en forma endémica en la Argentina, a niños menores de 6 años de edad, por la producción de las toxinas Shiga (stx), la stx1 y la stx2 en el intestino, que actúan sobre riñones, cerebro y otros órganos. En este estudio se siguieron 118 terneros, encerrados en 36 corrales, (tres a cuatro por corral), distribuidos en 18 corrales de livianos, con 128 kg de promedio; y 18 de pesados, con 197 kg de promedio, en un establecimiento ganadero de la provincia de La Pampa, Argentina. Los animales se sometieron a tres fases de engorde (recría: marzo-junio de 2014, pastoreo: julio-noviembre, terminación: diciembre 2014-abril 2015), con una dieta energética con distintos niveles de proteína bruta (PB); recría 9 – 13 – 18 % PB, pastoreo 9 % PB y terminación 9,5 – 13 % PB. Durante un año se hicieron hisopados mensuales de la mucosa recto anal (HMRA), para identificar a los excretores de EHEC O157:H7 y sus genes de virulencia, las que se caracterizaron por PCR Multiplex. Se encontró una prevalencia que varió desde 0.84% en julio hasta 15.25% en noviembre de 2014. Todas las cepas de *E. coli* O157:H7 aisladas portaban eae, mientras que 11 %, 33 % y 56 % contenían stx1, stx2 y stx1/ stx2, respectivamente. Se encontró stx1 solo durante la recría y stx2 se mantuvo constante a lo largo del ensayo. Detectamos una presencia significativa de stx1/stx2 durante el pastoreo. Se buscó relacionar la influencia de posibles factores predisponentes para la excreción de *E. coli* O157:H7 y la presencia de sus genes de virulencia, como el peso, la dieta, la época del año; y el efecto de las precipitaciones y las temperaturas; encontrándose que, durante la terminación los animales livianos excretaron significativamente mayor cantidad de *E. coli* O157:H7 que los pesados, mientras que la relación de la excreción de *E. coli* O157:H7 entre las 3 fases del engorde y el nivel de PB de la dieta, no mostró diferencias. Cuando se analizó el comportamiento estacional de la excreción, se observó que la prevalencia de *E. coli* O157:H7 disminuye durante el otoño, es muy baja en invierno y particularmente alta en la primavera, volviendo a disminuir durante el verano. Cuando se analizaron las variables climáticas, se encontró que los coeficientes para la lluvia y la temperatura media fueron positivos, indicando que, si aumentan las precipitaciones y/o la temperatura media en primavera, aumentó la excreción de *E. coli* O157:H7 y la presencia de los genes que expresan stx1-stx2.

IDENTIFICACIÓN RÁPIDA DE *ESCHERICHIA COLI* STEC O157:H7 UTILIZANDO ESPECTROMETRÍA DE MASAS MEDIANTE DETECCIÓN DE BIOMARCADORES ESPECÍFICOS Y MACHINE LEARNING

MANFREDI E¹, ROCCA MF², ZINTGRAFF F J³, MILIWEBSKY E¹, CHINEN I¹.

1. Servicio Fisiopatogenia, INAE-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán". 2. Servicio Bacteriología Especial, INAE-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán". 3. Servicio de Bacteriología Clínica. INAE-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán". emanfredi@anlis.gob.ar

Escherichia coli productor de toxina Shiga (STEC) está asociado a casos esporádicos o brotes de diarrea, colitis hemorrágica (CH) y síndrome urémico hemolítico (SUH). Si bien hay más de 150 serotipos que comparten el mismo potencial patogénico, O157:H7 es el principal asociado a enfermedad severa. Existen además, otras categorías de *E. coli* diarregénico como *E. coli* enteropatogénico (EPEC), enterotoxigénico (ETEC), enteroagregativo (EAEC) y enteroinvasivo (EIEC), los cuales deben considerarse para el diagnóstico diferencial. En los últimos años, la tecnología de espectrometría de masas basada en la desorción/ionización láser asistida por una matriz, acoplada a un analizador de tiempo de vuelo (MALDI-TOF MS) se emplea para la identificación de patógenos en muchos laboratorios de microbiología clínica. El objetivo de este trabajo fue discriminar *E. coli* O157/Stx+ de otras *E. coli*, de manera rápida y confiable aplicando MALDI TOF mediante softwares para la búsqueda manual de picos Biomarcadores (Flex Analysis) y análisis proteómico por análisis de picos y clasificación en grupos/clases [ClinProTools; mediante el uso de algoritmos: GA/k (red neuronal genético optimizado) y QC (un clasificador rápido)]. Para un análisis de evaluación inicial, se emplearon espectros de 60 cepas caracterizadas por métodos de referencia de cuatro tipos de *E. coli*: 15 EPEC, 15 ETEC, 20 STEC no-O157 y 10 STEC O157:H7. A continuación, se desafiaron otras 142 cepas completamente caracterizadas: 65 O157H7, 13 O157 no tox, 17 STEC no-O157, 11 ETEC, 12 EPEC, 15 EAEC, 7 EIEC, y 2 *E. coli* sin factores de virulencia. Se observó una gran similitud proteómica de STEC O157 (clase1) respecto del resto de las *E. coli* (clase2). Con el análisis realizado con la combinación de ambos algoritmos del modelo matemático, se obtuvieron resultados con alta sensibilidad (95.4%) y especificidad (98.7%). Al realizar el análisis manual de picos biomarcadores se hallaron 10 picos característicos diferenciales, de los cuales 9 (3017DA, 3083DA, 3595DA, 3770DA, 4012DA, 4939DA, 5238DA, 6037DA, 6169DA) corresponden al patotipo STEC O157:H7 y un pico (9060DA) solo presente en otras *E. coli*. Asimismo, se pudo observar que la ausencia del pico 9060Da, sumado a la detección de al menos uno de los otros nueve picos descritos confirma la identificación de cepas STEC O157:H7. La sensibilidad y especificidad fueron del 96.9% y 100%, respectivamente. La combinación del modelo matemático con el manual mejora aún más la sensibilidad, lográndose clasificar en forma correcta el 98.5% del total de los aislamientos. Si bien el enfoque basado en presencia/ausencia de picos, es un método manual que requiere un mayor tiempo de análisis, presentó excelentes valores de desempeño, y las diferencias de sensibilidad y especificidad con el modelo matemático no fueron estadísticamente significativas. Por lo tanto, dada la simplicidad de la detección de picos biomarcadores, el nivel alcanzado de discriminación, sumado a la disponibilidad del software Flex Analysis en los equipos incorporados a la red de diagnóstico asistencial de SUH/diarreas, se podría utilizar esta metodología como tamizaje de aislamientos sospechosos de STEC O157 para su posterior envío al Centro de Referencia para su completa caracterización.

ANÁLISIS PARCIAL DE LA RELACIÓN DEL REGULADOR fur CON PROCESOS QUE CONTRIBUYEN A LA PATOGENESIS DE *ESCHERICHIA COLI* O157:H7

IANNELLI DN, LARZABAL M, CATALDI A, MARQUES DA SILVA W

Instituto de Agrobiotecnología y Biología Molecular (IABIMO INTA-CONICET) danielaniannelli@gmail.com

Escherichia coli enterohemorrágica (EHEC) O157:H7 es un patógeno zoonótico capaz de causar diarrea severa y síndrome urémico hemolítico (SUH) en humanos. Estudios han demostrado que la expresión de estos factores de virulencia y procesos involucrados en la patogénesis de *E. coli* O157:H7 está directamente relacionada a diferentes estímulos ambientales (temperatura, cationes, pH y osmolaridad) y nutricionales. Ferric uptake regulator (fur) es un regulador transcripcional bacteriano involucrado en la regulación de la adquisición y metabolismo del hierro. Además de eso, fur regula directa o indirectamente genes relacionados a diferentes procesos biológicos. Estudios han demostrado que tanto Fur como el hierro juegan un rol importante en la fisiología y patogénesis de diferentes bacterias. Con respecto a *E. coli* O157:H7 todavía hay poco conocimiento de la asociación del fur con su patogénesis. Por lo tanto, el presente trabajo tiene como objetivo evaluar el rol de fur en los procesos que están involucrados con la patofisiología de *E. coli* O157:H7. Para llevar a cabo este estudio primero se generó una cepa de *E. coli* O157:H7 (Rafaela II) defectiva para el gen fur utilizando el sistema lambda red. Luego se evaluó el perfil de crecimiento de las cepas Rafaela II (wt) y mutante Δfur en medio de cultivo Luria bertani (LB) ante distintas biodisponibilidades de hierro, utilizando diferentes concentraciones (200 μM , 250 μM y 300 μM) del quelante de hierro 2,2'-Bipyridyl (BPD) para limitar la disponibilidad de este metal en el medio de cultivo. En este ensayo se observó una disminución del perfil de crecimiento de la cepa Δfur tanto en la condición control (LB) y ante la limitación de la disponibilidad del hierro en el cultivo con relación a la cepa wt. Posteriormente, en un ensayo de supervivencia en macrófagos murinos (RAW264.7), se observó luego

de 2 y 24 hs una diferencia significativa entre la cepa wt y mutante, mostrando un mayor UFC/ml en wt que en Δfur . A su vez, se realizó un ensayo de resistencia a el estrés ácido en medio LB con un pH de 5 y 2, donde se observó un decrecimiento de la supervivencia en un 5% a pH 5 y un 15% a pH 2 de Δfur ante wt. Estos resultados preliminares muestran que el *fur* es requerido para el correcto crecimiento de *E. coli* O157:H7 principalmente en condiciones limitadas de hierro, y para resistir la acción de macrófagos. Además, estos resultados sugieren que el gen *fur* podría estar participando de mecanismos directos o indirectos en la regulación de genes necesarios para la supervivencia de *E. coli* O157:H7 dentro de los macrófagos.

EVALUACIÓN DE LA PERSISTENCIA Y VIABILIDAD DE CEPAS DE ESCHERICHIA COLI PRODUCTORA DE TOXINA SHIGA EN ARENA

DE LA CUESTA R¹, SANIN M, KÜHN J, BENTANCOR A, BLANCO CRIVELLI X.

Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Veterinarias, Cátedra de Microbiología. xblancocrivelli@fvet.uba.ar

Escherichia coli productora de toxina Shiga (STEC) es el agente etiológico más frecuentemente asociado al síndrome urémico hemolítico, enfermedad endémica en Argentina que afecta principalmente a niños menores a 5 años. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la persistencia y viabilidad de cepas STEC con impacto en salud en matrices de arena sometidas a calor y desecación. Se utilizaron recipientes de vidrio con tapa cribada y filtro en los que se colocaron 10 gr. de la arena. Los mismos fueron esterilizados mediante autoclavado y se determinó sequedad por peso constante en 3 días consecutivos. Cada frasco fue inoculado con 10 ml de una suspensión bacteriana en fase log equivalente a 1 McFarland en agua. Se utilizaron las cepas STEC O157:H7, O145:NM, O121:H19, O111:H8, O26:H11, O174:H28 y *E. coli* NCTC12900 como control negativo. Los inóculos se determinaron mediante cuenta viable (CV). Los ensayos se mantuvieron en ambiente controlado a 37 °C. La mezcla arena:suspensión bacteriana fue evaluada diariamente, determinándose su deshidratación mediante pesaje, y la viabilidad y curva de muerte de los microorganismos por CV. Además, se observó la morfología de las colonias, se realizaron pruebas bioquímicas clásicas y tinción de Gram. Cuando ya no se detectó crecimiento en placa, se realizó una suspensión de 2 g/10 ml SF y 200 μ l de la misma se inocularon en caldo tripteína soja e incubaron a 37 °C ON. Se evaluó desarrollo por turbidez y en caso de que lo hubiese se consideró viable no cultivable (VNC). La viabilidad de VNC se evaluó diariamente. El estudio de cada cepa se realizó por triplicado. Los resultados de curvas de muerte y persistencia en la matriz variaron según el serotipo en estudio. La curva de muerte de STEC O157:H7 presentó una concentración <100 UFC/ml entre los días 6 y 10 pos-inoculación, luego muere. El serotipo O145:NM presentó curva de muerte hasta el día 18 y permaneció hasta el día 42 pos-inoculación como VNC. La cepa STEC O174:H28 presentó una concentración menor o igual a 100 UFC/ml entre los días 6 y 15, persistiendo luego en la matriz como VNC hasta el día 63 pos-inoculación. El serotipo O111:H8 presentó una curva de muerte de sólo 3 días y no se registraron microorganismos VNC. Los serotipos O121:H19 y O26:H11 presentaron curvas de muerte cortas de 4 días persistiendo en la matriz como VNC por 79 y 9 días respectivamente. En NCTC 12900 se observó curva de muerte hasta el día 5, permaneciendo como VNC hasta el día 44 pos-inoculación. Las bacterias VNC constituyen una subpoblación bacteriana que surge frente a condiciones de estrés. La presencia de STEC en la arena, incluso en bajas dosis, cobra importancia debido a que la dosis infectiva del patógeno es muy baja. Los resultados obtenidos permiten considerar el riesgo que constituye la arena seca como fuente de infección de STEC, siendo necesario considerar el ambiente, en particular los areneros, en la dinámica epidemiológica de las infecciones por estos patógenos.

SESIÓN DE POSTERS

PATOGÉNESIS DEL SUH Y RESPUESTA DEL HOSPEDADOR/PATOGENICIDAD BACTERIANA: ASPECTOS MOLECULARES. FACTORES DE VIRULENCIA

COORDINADORAS:

MARIANA PICHEL, INMUOVA S. A.

mpichel@inmunova.com

MARÍA PAULA MORENO MOCHI

Instituto de Microbiología "Luis C. Verna". Fac. de Bioqca, Qca y Fcia. Universidad Nacional de Tucumán, paumorenomochi@hotmail.com

CARACTERIZACIÓN DEL DOMINIO C-TERMINAL DE LA ACETIL-O-ESTERASA CODIFICADA EN FAGOS STX2A

PASCAL SB, LÓPEZ LJR, LUCCHESI P, KRÜGER A.

Centro de Investigación Veterinaria de Tandil (CIVETAN, CONICET-CIC-UNCPBA), Facultad de Cs Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, Tandil. spascal@vet.unicen.edu.ar

La toxina Shiga (Stx) está codificada por profagos que regulan su producción, siendo el subtipo 2a de la toxina el más

asociado al desarrollo de casos graves de síndrome urémico hemolítico. Los análisis genómicos de los profagos Stx muestran una considerable variabilidad genética y un alto porcentaje de genes con funciones desconocidas. Se destaca el gen nanS-p por su tamaño y localización aguas abajo del operón stx e inmediatamente aguas arriba de los genes que median la lisis bacteriana. Este gen nanS-p codifica para una sialato O-acetiltransferasa, la cual presenta un dominio catalítico (SASA) homólogo a la esterasa bacteriana de *E. coli* (NanS) con actividad frente a los ácidos siálicos. Sin embargo, NanS-p posee además un dominio N-terminal (DUF1737) y otro C-terminal, de los cuales no se determinó aún su función específica. Un estudio reciente de la estructura molecular de NanS-p proveniente del fago Φ24 (proteína vb_24B_21), reveló que el dominio C-terminal adopta un plegamiento jelly-roll, encontrado en varias familias de proteínas que reconocen diversas estructuras de carbohidratos. Dado que en estudios previos en fagos Stx2a identificamos variabilidad de secuencias de nanS-p, tanto en el sitio catalítico como en los dominios terminales, el objetivo de este trabajo fue analizar la región codificante del dominio C-terminal de secuencias nanS-p de fagos y profagos del subtipo Stx2a en relación a las características descritas en la proteína vb_24B_21 del fago Φ24. Se incluyeron en el análisis 19 secuencias diferentes de NanS-p (representativas de 40 secuencias obtenidas de genomas de fagos y profagos depositados en el GenBank que no presentaban secuencias de inserción en el extremo C-terminal). Por medio de los softwares MEGA 10 y BLASTp, se determinó el dominio C-terminal de cada una de las secuencias, utilizando como referencia el correspondiente de NanS-p (645 aa) del fago 933W y luego se realizó la comparación con el de la proteína vb_24B_21 del fago Φ24 (región 423-645 aa). Todas las secuencias excepto 3 presentan alta similitud con este dominio. Notablemente, 4 fueron idénticas y las restantes presentaron de 1 a 4 aa diferentes. Se observó que 2 posiciones de la secuencia concentraban gran parte de las variaciones y, por otra parte, los 4 aminoácidos con residuos aromáticos (Y510, Y515, Y540, F611) identificados en el propuesto sitio de unión a carbohidratos del dominio C terminal de la proteína vb_24B_21 estaban conservados. Los resultados del análisis destacan un alto grado de similitud del dominio C-terminal entre gran parte de las NanS-p codificadas en fagos y profagos Stx2a y refuerzan la sugerencia del rol de asistencia del dominio C-terminal a la función esterasa de NanS-p. Sin embargo, se requieren más estudios para determinar la actividad específica de este dominio presente NanS-p.

IDENTIFICACIÓN DE UN SISTEMA DE SECRECIÓN DE TIPO 6 ANTIBACTERIANO Y CARACTERIZACIÓN BIOINFORMÁTICA DE POTENCIALES EFECTORES EN *Escherichia coli* PRODUCTORA DE TOXINA SHIGA

RIVIERE NA, MARQUEZ DA SILVA W, CATALDI A, LARZABAL M.

Instituto de Agrobiotecnología y Biología Molecular(IABIMO)-INTA/CONICET. riviere.nahuel@inta.gob.ar

Escherichia coli productoras de toxina Shiga (STEC) son patógenos intestinales transmitidos por alimentos que pueden causar síndrome urémico hemolítico (SUH) en humanos, siendo *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) O157:H7 el serotipo más frecuente asociado con SUH. La cepa STEC O22:H8 (nombrada cepa 154) es un serotipo aislado de ganado bovino en Argentina. Estudios preliminares demostraron que el ganado bovino colonizado por la cepa STEC O22:H8 154 impidió la colonización de EHEC O157:H7 en la juntura recto-anal bovina. Uno de los mecanismos de virulencia más versátiles involucrado en la entrega de efectores es el sistema de secreción de tipo 6 (SST6). El SST6 1 transloca efectores antibacterianos con actividades citotóxicas durante la competencia inter bacteriana en bacterias Gram negativas. Se realizó la secuenciación completa del genoma de la cepa STEC O22:H8 154 con la tecnología PacBio y se analizaron las secuencias con la plataforma Bastion. 6 para predecir potenciales efectores del SST6. Se utilizaron las bases de datos pfam y Batch Web CD Search-tool para la identificación de dominios catalíticos de los genes candidatos y los servidores Phyre 2 y HHPRED para obtener una predicción de la estructura 3D de las secuencias proteicas. Se determinó mediante ensayos de competencia in vitro la actividad bactericida de la cepa STEC O22:H8 154. Para ello se hicieron co-cultivos de la cepa STEC O22:H8 154 (predador) con O157:H7 (pCRISPR Kmr) (presa) ó DH5-α (pCRISPR Kmr) (presa) en distintas proporciones de predador: presa (0,5:1, 1:1 y 3:1). Las mezclas fueron crecidas en LB agar por 16 hs a 37°C, luego lavadas con PBS para hacer diluciones seriadas y finalmente se sembraron en LB agar conteniendo kanamicina (50 µg/ml) seleccionando de esta manera las cepas presas resistentes a kanamicina. Los ensayos fueron realizados por triplicado y para la significancia estadística (p<0,0001) se implementó ANOVA de dos vías. El análisis del genoma de STEC O22:H8 154 reveló la presencia de dos operones completos del SST6 (SST6 1 y SST6 2) y múltiples islas de patogenicidad que contienen potenciales efectores Rhs del SST6 con diferentes actividades catalíticas asociadas a su extremo C-terminal: nucleasas, proteasas, deaminasas y metalopeptidasas. En los ensayos de competencia in vitro pudimos determinar de manera significativa la actividad bactericida de la cepa STEC O22:H8 154 (predador) contra EHEC O157:H7 (presa) y DH5-α (presa) en todas las proporciones predador: presa estudiadas. Los resultados obtenidos nos permiten inferir que la presencia de dos operones completos del SST6 (SST6 1 y SST6 2) y varias islas de patogenicidad conteniendo potenciales efectores Rhs con diferentes actividades citotóxicas en la cepa STEC O22:H8 (154) podrían otorgarle una ventaja adaptativa en la competencia interbacteriana.

PREVALENCIA DE CEPAS ESCHERICHIA COLI DIARREOGÉNICAS EN OVINOS DE TIERRA DEL FUEGO

SANIN M, BLANCO CRIVELLI X, CUNDON C, BENTANCOR A.

Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Veterinarias, Cátedra de Microbiología. msanin@fvet.uba.ar

Escherichia coli Shigatoxigénica (STEC) es un patógeno de importancia en salud pública ya que es responsable no solo de generar cuadros de diarrea, sino también del síndrome urémico hemolítico (SUH). A su vez existen otros patovares de *E. coli* asociados a diarreas agudas (DA) que a veces no son tenidos en cuenta: *E. coli* enteropatogénica (EPEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) y *E. coli* enterotoxigénica (ETEC). En Argentina, Tierra del Fuego (TDF) es una de las provincias con mayor tasa de notificación de diarreas agudas. TDF presenta un modelo epidemiológico diferente respecto al resto del país y esto es debido a varios factores: clima, distribución geográfica y su mercado muy cerrado, siendo este último de gran importancia debido a que la importación de animales en pie es mínima y esporádica. Se sabe que *E. coli* es un habitante normal en el intestino del hombre y animales de sangre caliente por lo cual, los objetivos del trabajo fueron: i-Determinar la prevalencia de los patovares de *E. coli* diarreogénicas en muestras de ovinos nativos de Tierra del Fuego que ingresan a playa de faena en los mataderos de Ushuaia y Río Grande. ii-Determinar el grado de contaminación de los patovares de *E. coli* diarreogénicas en carcasas ovinas. Se analizaron 162 precultivos provenientes de hisopados rectales ovinos y 178 provenientes de esponjados de carcasas ovinas mediante PCR en busca de los genes marcadores: *eae*, *aggR*, *aaiC*, *invE*, *est* y *elt*. Nuestros estudios previos determinaron la prevalencia de STEC del 35,8% (58/162) en hisopados rectales y de 6,17% (11/178) en esponjados de carcasas. De las muestras provenientes de hisopados rectales 17/162 codificaron *eae+*, 2/162 *aaiC+* siendo una de ellas además *aggR+/aaiC+*, no se detectaron los genes *est*, *elt* e *invE*. En el caso de las muestras provenientes de esponjados de carcasas se determinó que 8/178 codificaron *eae+*, 1/178 *aggR+/aaiC-*, 2/178 *invE+*, no detectándose los genes *est* y *elt*. En los casos positivos las muestras fueron caracterizadas como sospechosas no llegando aún a la etapa de aislamiento. Hasta el momento se determinó que el patovar EPEC es el más prevalente en ambos tipos de muestreos, siendo del 10.5% en el caso de hisopados y de 4.5% en el caso de esponjados. El resto de los patovares presentaron entre 0-1% de prevalencia. En base a los resultados obtenidos en este estudio podemos considerar que se produce una disminución considerable en la contaminación de las carcasas respecto al animal en pie, durante la faena, siendo el patovar más prevalente EPEC, no habiendo disparidad entre los otros. Sin embargo, aun con esta diferencia, su aislamiento en playa de faena indica un riesgo potencial de contaminación en la cadena de la granja a la mesa, la cual puede provocar cuadros de diarreas agudas en niños, las cuales pueden derivar en la muerte de los mismos. Una futura comparación entre las cepas recolectadas y la Base nacional de datos nos permitirá inferir el rol clínico que estos aislamientos pudieran tener en la salud.

ANÁLISIS DE CEPAS DE ESCHERICHIA COLI ENTEROPATÓGENO Y SHIGATOXIGÉNICO PROVENIENTES DE BOVINOS DE TIERRA DEL FUEGO

BONINO MP, SANIN M, BLANCO CRIVELLI X, BENTANCOR A.

Universidad de Buenos Aires, Facultad de Cs. Veterinarias, Cátedra de Microbiología. mpazbonino@fvet.uba.ar

Escherichia coli shigatoxigénico (STEC) y *E. coli* enteropatógeno (EPEC) son patovares de impacto en la niñez. La patogenia de STEC incluye cuadros asintomáticos, de diarrea leve y severa, síndrome urémico hemolítico (SUH), y en ocasiones la muerte del paciente. Se ha documentado como principal reservorio al bovino. EPEC es productor de diarreas, constituye la segunda causa de muerte en niños menores a 5 años. En Tierra del Fuego (TDF), la tasa de SUH y diarreas es elevada. TDF no cuenta con estudios de portadores ni reservorios de STEC ni EPEC. El objetivo de este estudio fue determinar la prevalencia de STEC y EPEC en bovinos de TDF destinados a faena. Se realizó un estudio epidemiológico transversal observacional. El muestreo fue dirigido por accesibilidad en las playas de faena existentes (Ushuaia y Río Grande). Para cada animal se tomó una muestra por hisopado rectal. Para la detección de cepas STEC O157 se realizó pre enriquecimiento en CTS-CT, con posterior separación inmunomagnética seguido de siembra en agar Mac Conkey Sorbitol. Para EPEC y STEC no-O157 se pre enriqueció en CTS y sembró en agar Mac Conkey. Se realizó PCR múltiple de *stx2*, *stx1*, *rfbO157* y PCR *eae*. Los aislamientos fueron caracterizados bioquímicamente, serotificados, y se determinó el subtipo de Stx (Scheutz y col., 2012; Tyler y col., 1991) y la presencia de factores de virulencia adicionales (*saa*, *ehxA*, *bfpA*). Se analizaron 194 muestras de bovinos de TDF. Se detectó STEC en 15% de las muestras y EPEC en el 5%. Las cepas aisladas se identificaron como *E. coli*. Los tipos de toxina detectados fueron 92,6 % (25/27) *stx2* sólo (16/25) o en combinación con *stx1* (9/25), mientras que 7,4% (2/27) presentó únicamente *stx1*. Los subtipos prevalentes fueron *stx2c* (10/27) seguido por *stx1a/stx2hb* (4/27). El 14,8% de las cepas (4/27) presentó por lo menos algún subtipo de toxina no tipificable (*stxNT*). El gen *saa* no fue detectado y 16/28 portaban el gen *ehxA*. No se detectaron cepas STEC O157. Las cepas STEC aisladas pertenecieron a los siguientes serotipos: O1:H21 (1/27); O6:H34 (1/27); O113:H21 (1/27); O130:H11 (1/27); O130:H- (1/27); O171:H2 (1/27); O174:H28 (1/27); O178:H19 (5/27); O179:H8 (1/27); O185:H7 (6/27); O185:H19 (7/27); O187:H7 (1/27). Se aisló una cepa aEPEC (*eae+*, *bfpA-*) que perteneció al serotipo O152:H25. Pocos estudios

permiten comparar patovares STEC y EPEC de muestras de bovinos. La relación STEC/EPEC fue 3/1. En los perfiles genéticos identificados no se observó la presencia conjunta de factores de virulencia de EPEC y STEC. El impacto de los aislamientos stxNT deberá ser analizado mediante secuenciación y pruebas funcionales. Los serotipos aislados fueron reportados previamente en Argentina, destacándose el serogrupo O174, considerado patógeno emergente y asociado a SUH. Si bien TDF se destaca por altas prevalencias de SUH y diarreas agudas, la detección STEC-EPEC fue menor a la descrita para el resto del país. Teniendo en cuenta la dinámica epidemiológica de la región debe considerarse si las cepas aisladas codifican factores de virulencia adicionales, o si otros criterios de riesgo inciden en las elevadas tasas de diarreas y SUH.

EL SISTEMA DE SECRECIÓN DE TIPO 6 PERMITE LA SUPERVIVENCIA DE *ESCHERICHIA COLI* O157:H7 EN MACRÓFAGOS MURINOS

RIVIERE NA, MARQUES DA SILVA W, CATALDI A, LARZÁBAL M.

Instituto de Agrobiotecnología y Biología Molecular (IABIMO)-INTA/CONICET. riviere.nahuel@inta.gob.ar

El sistema de secreción de tipo 6 (SST6) se ha propagado ampliamente en bacterias Gram negativas como *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) O157:H7. Este sistema de secreción atraviesa la doble membrana bacteriana permitiendo que los factores de virulencia se translocan directamente desde el citoplasma de la bacteria hacia la célula blanco. El SST6 posee 13 componentes esenciales conservados, entre ellos se encuentra la proteína TssB (componente de la cola retráctil). Durante la infección, EHEC O157:H7 coloniza regiones intestinales asociadas a los folículos donde se encuentran componentes del sistema inmune innato, principalmente macrófagos. Estos macrófagos fagocitan las bacterias EHEC O157:H7 adheridas al epitelio e inducen la producción y liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS) para eliminarlas. Estudios recientes demostraron que EHEC es capaz de sobrevivir y de replicar dentro de los macrófagos luego de 24 hs de ser fagocitada.

El objetivo de este trabajo consistió en evaluar si el SST6 de la cepa EHEC O157:H7 permite la supervivencia intracelular en macrófagos murinos. Para ello se obtuvo una cepa EHEC O157:H7 mutante para el gen *tssB* por la metodología de edición génica CRISPR/Cas9. Se realizaron ensayos de supervivencia donde se infectaron monocapas de macrófagos murinos (RAW 264.7) con las cepas EHEC O157:H7 salvaje y Δ tssB (MOI 100). Luego de 30 minutos de infección, los macrófagos fueron lavados tres veces con PBS y posteriormente fue agregado medio DMEM fresco conteniendo 100 μ g/ml del antibiótico gentamicina para eliminar las bacterias no fagocitadas. La placa se incubó durante 2 y 24 hs a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO₂. Luego los macrófagos fueron lisados con una solución de SDS al 0.025% para liberar las bacterias internalizadas y mediante recuento de UFC a las 2 y 24 hs post infección se calculó el porcentaje de sobrevida. Los ensayos se realizaron por triplicado y para la significancia estadística ($p < 0,05$) se implementó el test T no pareado. Se pudo demostrar que no hay diferencias significativas entre la cantidad inicial de EHEC O157:H7 salvaje y Δ tssB fagocitadas a las 2 hs de incubación. Sin embargo, se observó una diferencia significativa al cuantificar un 86 % menos de sobrevida de bacterias mutantes para el SST6 en comparación con la cepa salvaje. La obtención de la cepa EHEC O157:H7 Δ tssB por la metodología de edición génica CRISPR/Cas9 nos permitió evaluar la relación entre el SST6 y la sobrevida de la bacteria en macrófagos sugiriendo que la sobrevida de EHEC O157:H7 en el macrófago es dependiente de un SST6 funcional.

DIARREA VS SUH EN PACIENTES INFECTADOS CON *E. COLI* PRODUCTOR DE TOXINA SHIGA (STEC). CARACTERIZACIÓN DE LA MICROBITA INTESTINAL

JURE MA¹, PONCE ALONSO M², CERRUDO LÓPEZ, V², DEL CAMPO MORENO R², MILIWEBSKY E³, CHINEN I³.

1. Laboratorio de Bacteriología Certificado, Cátedra de Bacteriología, Instituto de Microbiología Luis Verna, Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, Universidad Nacional de Tucumán, Tucumán. Argentina. 2. Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (Hospital Universitario Ramón y Cajal), Madrid. España. 3. Laboratorio Nacional de Referencia para SUH e infecciones por STEC. Servicio Fisiopatogenia /INEI-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán", Buenos Aires, Argentina. magejure@gmail.com

Escherichia coli productor de toxina Shiga (STEC) es un patógeno transmitido por alimentos, capaz de producir diarrea y complicaciones extraintestinales conocidas como Síndrome Urémico Hemolítico (SUH). Además, del potencial de virulencia de este patógeno, existen diferentes determinantes del organismo huésped: edad, dieta, predisposición genética; los que en conjunto con la microbiota intestinal (MI) humana podrían interferir en la habilidad de STEC de colonizar eficientemente el tracto gastrointestinal y favorece o no la progresión a enfermedad severa. La secuenciación masiva ha permitido profundizar acerca de la composición y funcionalidad de las comunidades que constituyen el microbioma intestinal humano, se ha demostrado que ciertas especies pertenecientes al género *Bifidobacterium* y otras productoras de butirato, pertenecientes al orden Clostridiales, presentan efectos beneficiosos para la salud y su disminución se asocia a ciertos desórdenes clínicos,

como a la colonización y proliferación de microorganismos patógenos. Nuestro objetivo fue comparar la MI de niños argentinos infectados por STEC que habían desarrollado Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) con los que solo habían presentado diarrea. Se recogieron 69 muestras de heces diarreicas de pacientes infectados por STEC, de los cuales 49 desarrollaron SUH y 20 sólo presentaron diarrea con sangre. También se analizaron 2 individuos control colonizados y sin sintomatología. Se extrajo el ADN total de las heces y se determinó la composición bacteriana mediante amplificación y secuenciación masiva de las regiones V3-V4 (16S ADNr) utilizando la plataforma MiSeq (Illumina). El análisis bioinformático se realizó con QIIME2, y la abundancia diferencial se evaluó mediante el análisis discriminante lineal del tamaño del efecto (LEfSe). Tras realizar el filtrado de calidad y la asignación taxonómica mediante SILVA, las 71 muestras rindieron un total de 5,289,912 lecturas pertenecientes a 2575 amplicon sequence variants (ASVs). Los índices de alpha diversidad Shannon y Faith-PD fueron comparables en los 3 grupos (diarrea, SUH y control colonizado), por lo que no es necesario una destrucción del ecosistema intestinal para que ocurra la infección. El análisis estadístico de la beta-diversidad demostró que los controles sanos tenían menor abundancia de *E. coli*/*Shigella*, mientras que lo que diferenció el grupo de diarrea respecto de SUH fue la mayor proporción de *Bifidobacterium*, *Erysipelotrichaceae*, *Rombustia*, *Dorea*, *Lactococcus*, *Dysgonomonas*, y *Fusicanibacter*. Podemos concluir que la infección por *E. coli* productora de toxina Shiga no requiere una desestructuración previa de la MI, pero existe una variación en la composición bacteriana en personas que desarrollan SUH respecto de las que solo tienen diarrea, siendo *Bifidobacterium* el género con mayor significancia estadística por su menor abundancia en SUH. Mediante estas aproximaciones experimentales podremos avanzar por primera vez en el conocimiento en esta cohorte de pacientes, acerca de la correlación de la infección por STEC con la MI en niños argentinos.

COMPARACIÓN GENÓMICA DE CEPAS DE *ESCHERICHIA COLI* PRODUCTORA DE TOXINA SHIGA O157:H7 DE DISTINTOS ORÍGENES

COLELLO R¹, DEL CANTO F², GONZÁLEZ J¹, VÉLEZ MV¹, SPARO M³, ETCHEVERRÍA A¹, PADOLA NL¹.

1. Laboratorio de Inmunoquímica y Biotecnología, Centro de Investigación Veterinaria de Tandil (CIVETAN), CONICET, CICIPBA, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNCPBA, Tandil. 2. Programa de Microbiología y Micología, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. 3. Laboratorio de Microbiología Clínica, Hospital Ramón Santamarina, Tandil. rocioc@vet.unicen.edu.ar

Escherichia coli productor de toxina Shiga (STEC) es un patógeno que ocasiona enfermedades graves como colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico (SUH). STEC O157:H7 es el principal serotipo asociado a enfermedad humana en el mundo. Se ha observado una amplia variabilidad en cuanto a la presentación clínica de pacientes con infecciones por O157:H7. Los estudios de comparación genómica junto con la evaluación de genes que codifican factores de virulencia representan herramientas útiles para analizar la diversidad genética de STEC O157:H7. El objetivo de este estudio fue analizar y comparar genomas de STEC O157:H7 aisladas de medias reses bovinas y de un caso de SUH, y estudiar la relación entre estos aislamientos y los recolectados de bases de datos. Se analizaron secuencias genómicas de 2 cepas STEC O157:H7 aisladas en el mismo periodo. Una cepa fue aislada de medias reses bovinas y la otra cepa fue aislada de un caso de SUH. El paciente fue atendido en un hospital público de la provincia de Buenos Aires, Argentina. Se secuenció el ADN genómico utilizando la plataforma Illumina MiSeq y se utilizaron herramientas bioinformáticas para el análisis y comparación de cada genoma, tales como VirulenceFinder, RAST, BLAST, ORFfinder, Clustal Omega, Ugene y se caracterizaron los aislamientos mediante Multilocus Sequence Typing (MLST), con el esquema de Achtman, y mediante un análisis filogenético basado en SNP del core genoma, utilizando kSNP 3.1. En el genoma de la cepa aislada de media res bovina se encontraron los genes *stx2a*, *astA*, *eae*, *ehxA*, *espAB*, *DFJP*, *gad*, *iha*, *iss*, *katP*, *nleABC*, *ompT*, *tccP*, *terC*, *tir*, *toxB*. En la cepa aislada del caso de SUH se encontró la presencia de *stx2a+stx2d+stx2c*, *astA*, *chuA*, *eae*, *ehxA*, *espAB*, *DFJP*, *gad*, *iha*, *iss*, *katP*, *nleABC*, *ompT*, *terC*, *tir* y *toxB*. Ambas cepas pertenecían al filogrupo E y al clado 8. En relación al alelo *tir* 255 ambas cepas presentaron el alelo T. Los aislamientos fueron asignados al ST internacional ST11 pero no se agruparon en el mismo clúster de acuerdo al análisis filogenético. No se observó clonalidad con otros 31 aislamientos STEC O157:H7 descargados de bases de datos. Los resultados obtenidos nos permiten observar que ambos aislamientos STEC O157:H7 pertenecen al filogrupo *E. coli*, clado 8 hipervirulento y portadores del alelo *tir* 255 T >AT, consideradas por su perfil como cepas con una incrementada virulencia. A su vez, pudimos observar que las cepas no son clonales, lo que está en línea con recientes estudios que han demostrado que el genoma de STEC puede ser influenciado por el lugar de aislamiento, por la plasticidad genómica, y por la adquisición de factores de virulencia, lo que permitiría la evolución de una población STEC

en una región definida. La presencia en los alimentos de cepas O157:H7 con características similares a las cepas que causan enfermedades en humanos podría explicar en parte la alta incidencia de SUH en Argentina.

AVANCES EN SECUENCIACIÓN DE GENOMA COMPLETO PARA LA VIGILANCIA DE *ESCHERICHIA COLI* PRODUCTOR DE TOXINA SHIGA EN ARGENTINA

CARBONARI CC¹, ZOLEZZI G¹, MILIWEBSKY E¹, DEZA N¹, CAMPOS J², POKLEPOVICH T², MANFREDI E¹, BASCHKIER A¹, GULONE L¹, GHIGLIONE B¹, RIVAS M¹, CHINEN I¹.

1. Servicio Fisiopatogenia. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán". 2. Unidad de Genómica y Bioinformática. ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán". ccarbonari@anlis.gob.ar

La Secuenciación de Genoma Completo (SGC) es una metodología innovadora que revolucionó las ciencias biomédicas. Su aplicación al diagnóstico y vigilancia de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga (STEC) representa un aporte contundente y un desafío para su implementación en la rutina. El objetivo del presente trabajo es describir los avances en la implementación de SGC en el Laboratorio Nacional de Referencia (LNR), y los aportes al diagnóstico, caracterización, investigación de brotes y vigilancia de STEC. Se comenzó aplicando la SGC en el marco del Proyecto Piloto Genome-Trakr OMS-FDA, lográndose la capacidad instalada para laboratorio y análisis informático. La SGC se realizó utilizando Qiacube (Qiagen) para la extracción de ADN y la plataforma MiSeq (Illumina) con lecturas de 2x250pb, siguiendo los protocolos de Genome-Trakr/NCBI para el monitoreo global (NCBI-PRJNA282762). El flujograma de análisis incluye: FastQC (calidad), Kraken (Identificación), Unicycler (ensamblaje), Prokka (anotación), Lyveset (relación filogenética), Roary (análisis de Pangenome), ARIBA/srst2 (virulencia/resistencia), MLST (Secuenciotipo), iPCRess (PCR in silico). Etapa 1– Validación: se analizaron 94 cepas STEC O157 (n=73), no-O157 (n=21, O145:H28, O121:H19, O103:H2, O26:H19, O91:NM, O8:H19, O113:H19 y O22:H) y cepas del nuevo patotipo EAEC-stx (n=20; O59:H19; ONT:H4). Los resultados-SGC del análisis de los genes utilizados para el diagnóstico stx/eae/ehxA correlacionaron en un 95%, 99% y 98% con los obtenidos por la metodología tradicional; y en un 85%, para serotipos y subtipos-stx. Respecto de la relación clonal, el árbol de SNP mostró estrecha similitud entre las cepas de brotes (<5 SNP de diferencia). Además, 62% de las cepas O157 fueron del clado 8 por PCR in silico (Riordan, 2008). Etapa 2–Desafío: 6/8 cepas ONT pudieron ser serotipificadas (genes *O*: wzm, wxt, wzx, wzy / genes *H*: fliC, flkA, fflA, flmA, flnA) mediante SGC como O8:H19, O15:H26, O163:H19, O171:H2, O174:H21, y se detectó un serogrupo "novel". Una cepa O157 stx-negativa y una cepa stx-NT por PCR (Scheutz, 2012) pudieron ser identificadas mediante SGC como stx-negativa y stx2a, respectivamente. Etapa 3–Implementación para el diagnóstico en tiempo real (1 semana): Del total de 59 muestras procesadas, se obtuvieron los siguientes serotipos/secuenciotipos: 38 O157:H7 (ST11/8343/novel), O157:H16 (ST10); 1 O103:H19 (ST1967); 1 O121:H19 (ST655); 1 O128:H2 (ST25); 4 O145:HNT (ST32); 1 O165:H25 (ST119); 8 O26:H11 (ST32/ST21/ST1573); 1 O91:H21 (ST2458); 4 ONT:HNT. Solo dos cepas O157:H7 presentaron los genes blaCTX-M-14 y fosA7. Las cepas pudieron ser caracterizadas para eae/ehxA y subtipos-stx. Adicionalmente, fue posible detectar otros genes como nleA, nleB y nleC, tccP, tir, astA, cdtB, efa1, espA/B/F/L/J/P, iha, ireA, iss, lpfA, subA que contribuyen a definir el potencial patogénico. Actualmente, se cuenta con una base de datos de SGC nacional (n=240). Como conclusión, SGC permitió resolver resultados de difícil definición por métodos tradicionales y brindó información, poco accesible por otros métodos, del contenido genómico. El aporte de SGC es contundente ya que es una técnica poderosa y de alta resolución, que en un solo ensayo, permite obtener los resultados en corto tiempo para el diagnóstico y la vigilancia en tiempo real, pudiendo dar respuestas a problemáticas de Salud Pública a nivel nacional y global.

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL RIESGO PARA HUMANOS DE CEPAS DE *ESCHERICHIA COLI* PRODUCTORAS DE TOXINA SHIGA RECUPERADAS DE CANALES BOVINAS

MUSSIO P¹, ULTRA S¹, TRUJILLO L², VÁZQUEZ, S³, NAVARRO A⁴, LEOTTA G⁵, BURGHI JM⁶, XAVIER MP⁶, MÉNDEZ C⁷, MASSA F⁸, ROVIRA P⁹, MAQUIEIRA AM¹, MARTÍNEZ I¹⁰, LUZARDO S¹¹, VARELA G³

1. Laboratorio Tecnológico del Uruguay, Departamento de Microbiología, Montevideo, Uruguay. 2. Universidad de la República, Acuicultura

y Patología de Organismos Acuáticos, Facultad de Veterinaria, Montevideo, Uruguay. 3. Universidad de la República, Bacteriología y Virología, Facultad de Medicina, Montevideo, Uruguay. 4. Universidad Autónoma de México, Salud Pública, Medicina, DF México, México. 5. Instituto de Genética Veterinaria "Ing. Fernando N. Dulout" (UNLP-CONICET), Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP. 6. Instituto Nacional de Carnes, Gerencia de Contralor, Montevideo, Uruguay. 7. Ex integrante del Instituto Nacional de Carnes, Gerencia de Contralor, Rincón 545, 11000, Montevideo, Uruguay. 8. Universidad de la República, Instituto de Estadística, Facultad de Ciencias Económicas y de Administración, Montevideo, Uruguay. 9. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria / INIA Treinta y Tres, Uruguay. 10. Latitud, Fundación LATU, Montevideo, Uruguay. 11. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria / INIA Tacuarembó, Ruta 5 km. 386, Tacuarembó, Uruguay. paumussio@gmail.com

Las cepas de *Escherichia coli* productoras de toxina Shiga (STEC) son un grupo heterogéneo de bacterias que incluye una variedad de serotipos asociados con enfermedades en seres humanos. Sin embargo, el potencial de patogenicidad de estas cepas es altamente complejo y requiere múltiples factores de virulencia para causar una enfermedad grave (diarrea sanguinolenta, síndrome urémico hemolítico (SUH)). La habilidad de estas bacterias para causar enfermedad se ha relacionado clásicamente con su capacidad para producir distintas variantes de toxina Shiga (Stx), responsables de la inhibición de la síntesis proteica. Las variantes de Stx se clasifican en dos grupos y diez variantes: Stx1 (a,c,d) y Stx2 (a,b,c,d,e,f,g). Entre estas, Stx1a, Stx2a, Stx2c y Stx2d están vinculadas a casos de enfermedad grave. Se ha postulado que, sin la adherencia de las células bacterianas al epitelio intestinal, la sola producción de Stx se considera insuficiente para que STEC cause infecciones graves. El principal factor de adherencia es la intimina codificada por el gen *eae* que se ubica en una isla de patogenicidad denominada LEE. Sin embargo, existen reporte de casos de enfermedad grave causadas por STEC LEE-negativas. Es así que también resulta interesante evaluar la presencia de genes vinculados a otros mecanismos de adherencia: *aggR*, *aaiC*, *saa*, *sab*, *paa*, *efa1*, *ompA*, *lpfA*, *toxB*, así como la isla LAA utilizando al gen *hes* como marcador. A modo de establecer un criterio para categorizar el riesgo potencial de enfermedad grave asociada con STEC en alimentos, y poder brindar a los gestores una herramienta de guía para el control, la FAO/OMS propone 5 niveles de riesgo (siendo 1 el mayor riesgo) basados en la combinación de genes de virulencia. El objetivo fue identificar y caracterizar 39 cepas de STEC aisladas de canales bovinas de Uruguay y evaluar su potencial patogenicidad categorizándolas por el criterio de la FAO/OMS, buscando factores de virulencia que podrían ser de interés. Se analizaron mediante serotipificación; PCR para *stx1*, *stx2*, *eae*, identificación bioquímica y ensayos de susceptibilidad antimicrobiana. Posteriormente, se realizó WGS que permitió confirmar serogrupos, estudiar la presencia de otros genes de virulencia, de resistencia y subtipos de *stx*. Solo 2 cepas resultaron *eae* positivas (O157:H7 y O182:H25), *stx1a*{18}, *stx1d*{4}, *stx2a*{14}, *stx2b*{2}, *stx2c*{10} y *stx2d*{7}. La distribución en los grupos de riesgo indicados fue la siguiente: N1{0}; N2{7}; N3{1}; N4{1}; N5{30}. La prevalencia de los factores de virulencia adicionales fue: *aggR*{0}, *aaiC*{0}, *saa*{18}, *sab*{8}, *paa*{0}, *efa1*{1}, *ompA*{39}, *lpfA*{39}, *toxB*{0} y *hes*{18}. Todos los aislados contienen algún gen que podría contribuir a la adherencia de las células bacterianas al epitelio intestinal del huésped. Ninguna cepa presentó resistencia para los antibióticos ensayados. Se detectó la presencia de una amplia variedad de serotipos, algunos vinculados a casos clínicos y otros previamente aislados de ganado y carne en la región. Si bien el riesgo de la presencia de STEC en alimentos puede ser mejor predicho al estudiar los genes de virulencia, existen complejidades asociadas a la interacción con el huésped que no permiten proporcionar una asociación definitiva entre una STEC y el desarrollo de SUH.

DETECCIÓN DE *ESCHERICHIA COLI* PRODUCTOR DE TOXINA SHIGA EN SISTEMAS ACUÁTICOS PAMPEANOS

NUOZZI G¹, MILIWEBSKY E², CHINEN I², CARBONARI C², DEZA N², MANFREDI E², MASSA R², BIANCHELLI J³, LATORRE D¹, SAGUA M^{1,4}, SCHIAFFINO MR^{1,4}.

1. Departamento de Ciencias Básicas y Experimentales, UNNOBA. 2. Servicio Fisiopatogenia, INEI-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán". 3. Instituto de Investigación en Biomedicina de Buenos Aires (IBiBA), Partner Institute of the Max Planck Society, Bs As, Argentina. 4. Centro de Investigaciones y Transferencia del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires, CITNOBA UNNOBA-UNSA, CONICET. gnuozzi@comunidad.unnoba.edu.ar

Dentro de los grupos bacterianos atípicos de los sistemas acuáticos, los patógenos fecales son los más preocupantes en cuanto a la protección de la salud humana, existiendo estrecha relación entre éstos y las descargas urbanas, cloacales y ganaderas sin tratar. Las enfermedades relacionadas con el agua representan una de las causas principales de morbi-mortalidad en el mundo; se estiman >1,5 millones de muertes/año asociadas a diarreas, principalmente en países en desarrollo. Se ha observado que gran variedad de microorganismos patógenos puede ser transmitida a los humanos mediante el uso de aguas recreativas naturales contaminadas. Dada la importancia de *Escherichia coli* productor de toxina-Shiga (STEC) en Argentina es esencial profundizar el relevamiento en medio ambiente y asimismo, monitorear otras categorías de *E. coli* diarreigénico (DEC) teniendo en cuenta la posible evolución de estos patógenos y otras cepas *E. coli* a nuevos patotipos híbridos de impacto en salud. Se estudiaron dos ríos pampeanos que reciben descargas urbano-industriales: el río Salado, en el tramo que discurre cercano a la ciudad de Junín (90.000 habitantes) y el río Rojas, en el tramo ubicado en la ciudad homónima (23.000 habitantes). Los ríos fueron muestreados en cuatro sitios y en simultáneo en otoño / invierno / primavera / verano (2021). En ambos, el sitio 1 (S1) corresponde al punto aguas arriba de la ciudad, el sitio 2 (S2) a la altura de la zona urbana, y los sitios 3 (S3) y 4 (S4), aguas abajo de cada localidad. En cada sitio y fecha de muestreo se midieron distintas variables físicas y químicas in situ con sensores de campo (pH, conductividad, temperatura, sólidos disueltos totales, oxígeno disuelto, nivel hídrico y turbidez) y nutrientes disueltos (amonio y fósforo), sulfatos, cloruros, demanda química O₂ y clorofila-a/fitoplanctónica mediante técnicas espectrofotométricas. Se cuantificaron coliformes totales, termotolerantes (CTER) y *E. coli* por el método NMP. Los 541 tubos positivos para *E. coli* fueron sembrados en agar MacConkey para su posterior identificación mediante 3 PCR-múltiples: PCR *stx1/stx2/rfbO157*, PCR *eae/lt/stp/sth*, PCR *aggR/ipaH*. La abundancia de CTER y *E. coli*, correlacionaron positivamente con las

concentraciones de amonio en ambos ríos ($r > 0.57$, $p < 0.05$, $n = 16$), sugiriendo su relación con descargas cloacales. En el 20% de las muestras tomadas en cada río, los niveles de *E. coli* superaron los valores guía para uso recreativo moderadamente frecuente (> 293 NMP/100mL). Del total de las muestras, 11 fueron DEC+, pudiéndose detectar STEC-*stx1/stx2* en S1-río Rojas y STEC-*stx2* en S1-río Salado, sugiriendo un impacto de las actividades ganaderas. Asimismo, EAEC (S2; $n = 2$) fue aislado en el río Rojas; y EAEC (S2; $n = 3$), EPEC (S1; $n = 3$), y ETEC (S4; $n = 1$) en el río Salado. Además, en diferentes sitios del río Rojas y del río Salado se obtuvieron resultados positivos para *aggR*, *lt*, *st*, *stx2*, *rfbO157*, *eae* mediante PCR, sin aislamiento. El hallazgo de STEC/DEC es sumamente importante en cursos de agua superficiales y permanentes incluyendo espacios de uso recreativo. Estos resultados preliminares plantean la necesidad de implementar medidas de protección, manejo y mitigación, así como también efectivizar el monitoreo de STEC/DEC y las condiciones físico-químicas, de nuestros valiosos recursos acuáticos.

CARACTERIZACIÓN DE STEC O8, UN SEROGRUPO EMERGENTE

VÉLEZ MV, COLELLO R, ETCHEVERRÍA A, PADOLA NL.

Laboratorio de Inmunoquímica y Biotecnología, Centro de Investigación Veterinaria de Tandil (CIVETAN), CONICET, CICPBA, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNCPBA, Tandil, Argentina. mvictoriavelez@vet.unicen.edu.ar

Escherichia coli productor de toxina Shiga (STEC) es un patógeno emergente transmitido por alimentos, causante de enfermedades como colitis hemorrágica (CH) y Síndrome Urémico Hemolítico (SUH). Las toxinas Shiga, Stx1 y Stx2, han sido reconocidas como las responsables de los daños ocasionados por STEC. Sin embargo, se conoce que para que STEC pueda producir daño deben adherirse al huésped, siendo clave el mecanismo mediante el cual se adhieren a las células epiteliales. El locus LEE es una isla de patogenicidad que participa en la adherencia de STEC. No obstante, existen cepas que carecen de dicho locus (LEE-negativas) pero han sido responsables de enfermedad en humanos y su mecanismo de adherencia al huésped aún no ha sido dilucidado completamente. Uno de los serogrupos STEC detectados que carecen de LEE y son responsables de enfermedades en el hombre es el serogrupo O8. En diversos trabajos se han estudiado una variedad de genes que podrían participar en la patogenia de cepas LEE-negativas, como *ehxA*, *saa*, *hes*, *iha*, *lesp*, *pagC*, *tpsA* y *agn43*. Alguno de los cuales forman parte de una nueva isla de patogenicidad, LAA. El objetivo de este trabajo fue detectar la presencia de estos genes en cepas pertenecientes al serogrupo STEC O8. Para ello se seleccionaron un total de 13 cepas O8 provenientes de bovinos tambos y alimentos, de las cuales 11 eran H19, 1 H16 y otra H20. Las cepas fueron caracterizadas por PCR para detectar los genes mencionados anteriormente. Los resultados demostraron que el 30% de las cepas portaban *stx1*, mientras que el 84% portaban *stx2*. El 76,9% de las cepas portan el gen *agn43*. El 69,2% portan el gen *ehxA*. El 23% portan *tpsA* y *saa*. El 7,6% portan el gen *iha*, *lesp*, y *pagC*. Ninguna cepa porta el gen *hes*. Se detectaron diez perfiles de virulencia diferentes. Estudios previos han demostrado que el gen *agn43* ha sido reactivo a sueros de pacientes con SUH lo que da indicio de su síntesis durante el desarrollo de enfermedad. En este estudio pudimos observar la variabilidad intraserotipo de genes presentes en STEC O8. Cabe destacar la importancia en la implementación de nuevas herramientas de detección de serotipos de STEC no incorporados en los protocolos de detección para lograr un diagnóstico rápido frente a cepas potencialmente patógenas no incluidas dentro de los protocolos de detección.

Día 3: 22 de Abril de 2022

CONFERENCIA PLENARIA

STEC Y CARNE BOVINA: UNA DÉCADA DE DESAFÍOS

GERARDO LEOTTA

Instituto de Genética Veterinaria (IGEVET-CONICET), Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.
gerardo.leotta@gmail.com

Se analizan estudios de STEC en la cadena de producción de la carne bovina bajo un concepto holístico y multidisciplinario en el período 2010-2022. 1) Carnicerías. Se lanzó el Programa Carnicerías Saludables en conjunto con la Municipalidad de Berisso. Se demostraron mejoras en el 56% de las carnicerías. El programa fue transferido en conjunto con el Instituto de Promoción de la Carne Vacuna Argentina (IPCVA) a más de 200 municipios de 17 jurisdicciones provinciales, a Paraguay y Uruguay. 2) Frigoríficos exportadores. En 2012, la Unión Europea, sin normativa específica ni evidencias científicas, comenzó a rechazar contenedores de carne refrigerada provenientes de Argentina debido a la detección de genes stx. Se conformó el grupo de trabajo STEC-IPCVA para reducir la presencia de STEC y stx en frigoríficos exportadores. Se adquirió capacidad analítica con el Centro de Referencia para *E. coli* en la UE y se transfirió esta capacidad a los laboratorios de plantas frigoríficas. Se realizó el monitoreo de STEC en 8 frigoríficos y solo el 0,03% de las muestras fueron positivas a STEC con riesgo potencial de causar enfermedad severa. Para reducir STEC fue necesario complementar los planes de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (HACCP) con intervenciones. Se validaron 9 intervenciones químicas y físicas, entre las que se destacó el ácido láctico y el agua caliente. También se evaluaron otras posibles intervenciones en condiciones experimentales. La irradiación permitió reducir STEC en 5 órdenes logarítmicos. Fue posible reducir la presencia de STEC en frigoríficos exportadores. 3) Frigoríficos provinciales. Estos frigoríficos no se encuentran bajo la Normativa Federal (SENASA). No tienen HACCP. En ocasiones no cuentan con agua potable ni agua caliente. Se realizaron pruebas piloto en las provincias de Tucumán y Buenos Aires. Con base en los resultados se elaboraron planes de mejora y adecuación para reducir el riesgo de contaminación. 4) Impacto en la salud pública. Se realizaron evaluaciones de riesgo de enfermar de SUH por consumo de carne bovina. La probabilidad de enfermar por consumo de cortes cárnicos, carne molida y hamburguesas fue $<10^{-15}$, 5.4×10^{-8} y 3.5×10^{-8} , respectivamente. Se demostró que el 10% de los casos de SUH reportados en Argentina se deberían al consumo de carne. Posteriormente se realizó una evaluación de riesgo de SUH por consumo de carne producida en Argentina y consumida en Israel. El riesgo de enfermar de SUH en Israel por consumir cortes fue $<10^{-15}$ y por consumo de carne picada 8.6×10^{-10} . Con frecuencia se asume la asociación del SUH con el consumo de carne bovina. En los últimos años se demostró que el 90% de los casos de SUH reportados en Argentina no estarían asociados al consumo de carne. La endemidad del SUH en nuestro país es un problema multifactorial. Para reducir su impacto es necesario continuar trabajando sobre la cadena de carne bovina (especialmente consumo nacional), analizar otras cadenas alimentarias y otras vías de transmisión, entre ellas la transmisión persona-persona. Inclusive considerar el rol del hombre como potencial reservorio de STEC.

MESA REDONDA

STEC Y LA CADENA ALIMENTARIA

COORDINADORA: LUCIA GALLI

Instituto de Genética Veterinaria "Ing. Fernando N. Dulout" (IGEVET-CONICET), Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata. luciagalli@hotmail.com

EVALUACIÓN CUANTITATIVA DE RIESGO DE SÍNDROME URÉMICO HEMOLÍTICO POR CONSUMO DE CARNE BOVINA ARGENTINA

VICTORIA BRUSA

Instituto de Genética Veterinaria "Ing. Fernando N. Dulout" (IGEVET-CONICET), Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata. toibrusa@hotmail.com

El objetivo fue realizar una evaluación cuantitativa del riesgo de SUH en niños menores de 15 años asociado con el consumo de carne bovina contaminada con STEC en dos sistemas de frigoríficos (con y sin HACCP-STEC) en Argentina. La probabilidad media de enfermedad, SUH y muerte por consumo de cortes cárnicos fue $<10^{-15}$, esperándose 0 casos de SUH por año. Por consumo de hamburguesas comerciales, la probabilidad media de enfermar, SUH y morir fue $5,8 \times 10^{-7}$, $3,5 \times 10^{-8}$ y $4,2 \times 10^{-9}$, respectivamente, esperándose 4 casos de SUH y 0 muertes por año. Por consumo de carne picada la probabilidad media de

enfermar, SUH y morir fue $9,0 \times 10^7$, $5,4 \times 10^8$ y $6,4 \times 10^9$. Se esperarían 28 casos de SUH y 2 muertes por año. El número de casos anuales estimados de SUH (32) por consumo de carne equivale a 10,0% del total de casos en Argentina por año. Es necesario trabajar a lo largo de la cadena agroindustrial bovina con el objetivo de promover un único estándar sanitario basado en la implementación de HACCP considerando a STEC como un peligro.

CONTROL DE STEC EN ALIMENTOS, PASADO, PRESENTE Y FUTURO. LA EXPERIENCIA EN CIUDAD DE BUENOS AIRES

SERGIO EPSZTEYN

Dirección General de Higiene y Seguridad Alimentaria, Agencia Gubernamental de Control, Gobierno de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires (DGHySA/AGG, GCBA). sergalep@gmail.com

La relación epidemiológica entre STEC y SUH y el modo de transmisión principal de este grupo de microorganismos a través del alimento fue establecida a partir de la década de 1980, a partir del fuerte impacto mediático que generaron los brotes registrados en USA vinculados al consumo de hamburguesas en restaurantes de comida rápida. En nuestro país, existen registros de SUH desde el principio de los años 60, y ya desde esa época se la consideraba una endemia. Desde el año 2000 se decide incluir al SUH entre las enfermedades de denuncia obligatoria y al Sistema epidemiológico de vigilancia, por su impacto sobre el Sistema Nacional de Salud, y podría ubicarse en ese contexto temporal, la decisión de búsqueda de *Escherichia coli* O157:H7, identificada como el único agente responsable, en muestras de alimento. Desde entonces, en Ciudad de Buenos Aires se han diseñado estrategias de control, se han producido hallazgos que determinaron la introducción de criterios microbiológicos para STEC en el Código Alimentario Argentino, avances científicos, cambios de metodologías, nuevos brotes a nivel mundial, avance en el conocimiento sobre los serogrupos STEC responsables de la transmisión del SUH, cambios en las normativas, todo esto con el propósito de controlar la propagación de la enfermedad, que serán comentados y analizados.

EVALUACIÓN INTEGRAL E IMPLEMENTACIÓN DE ACCIONES DE MEJORA EN FRIGORÍFICOS PROVINCIALES DE BUENOS AIRES PARA REDUCIR LA EXPOSICIÓN A STEC

MAGDALENA COSTA

Instituto de Genética Veterinaria "Ing. Fernando N. Dulout" (IGEVET-CONICET), Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata. magdacosta989@gmail.com

El proceso de faena juega un rol fundamental en el bienestar animal, la calidad de la carne, la seguridad y la salud pública a través de la cadena de producción de carne. En este estudio, se realizaron evaluaciones integrales, implementación de acciones de mejora y verificación de impacto en tres frigoríficos de la provincia de Buenos Aires, Argentina. El riesgo se cuantificó en una escala de 1 a 100 y se clasificó en alto (1 a 40), moderado (41 a 70) y bajo (71 a 100). Se tomaron muestras (carcasa, n = 252; medio ambiente, n = 252; carne de cabeza, n = 21; agua de lavado y enfriamiento de vísceras, n = 105) durante el período de estudio de tres años (2016-2018), para la detección y aislamiento de STEC O157:H7 y no O157. También se analizaron muestras de medias reses para recuento de microorganismos mesófilos aerobios, coliformes y *Escherichia coli*. Se tomaron 145 muestras de agua, de las cuales, el 59,3% eran no potables. Después de la implementación de acciones de mejora (edilicias, procesos, sistemas de potabilización de agua y capacitación), el riesgo de contaminación se redujo de alto a moderado en los tres frigoríficos. El recuento de microorganismos indicadores disminuyó en dos frigoríficos y también se observó una reducción en la presencia de patógenos. En la etapa de verificación, el 82,2% de las muestras de agua eran potables. Se detectaron clones circulantes de STEC O157:H7 y no-O157, demostrando la presencia de contaminación cruzada entre los productos entre sí y con el ambiente, destacando la importancia de la aplicación correcta de los POES. Este es el primer paso dentro de un proceso de cambios. Sin embargo, es fundamental que la autoridad sanitaria continúe trabajando, para que el riesgo de contaminación en cualquier día o momento de trabajo sea bajo.

PROGRAMA CARNICERÍAS SALUDABLES-EXPERIENCIA EN BOCAS DE EXPENDIO MINORISTAS DE LA PROVINCIA DE TUCUMÁN

MARÍA ÁNGELA JURE

Cátedra de Bacteriología. Instituto de Microbiología Luis C. Verna. Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, Universidad Nacional de Tucumán. magejure@gmail.com

En la provincia de Tucumán el expendio de carne picada y productos derivados a nivel minorista se realiza principalmente en carnicerías. No rigen controles sobre el estado higiénico-sanitario de los locales ni respecto a la calidad microbiológica de productos cárnicos. Esta situación nos llevó a implementar por primera vez en la provincia, en los municipios de San Miguel y

Tafí Viejo, el programa Carnicerías Saludables (IPCVA-CONICET). Este programa, tiene como objetivo mejorar la calidad higiénico-sanitaria de las carnicerías y la calidad microbiológica del producto comercializado. En esta línea de investigación aplicada, con transferencia al medio, nos propusimos conocer el estado sanitario de las carnicerías participantes, determinar la prevalencia de patógenos transmitidos por alimentos como *E. coli* productor de toxina Shiga (STEC) O157 y no O157 y *Salmonella* sp., y evaluar su virulencia y relación epidemiológica. Se visitaron los establecimientos participantes y se recolectaron muestras en el marco de convenios, realizados entre la Dirección de Bromatología y los Municipios de San Miguel y Tafí Viejo con la Universidad Nacional de Tucumán (UNT). Este estudio se llevó a cabo en tres etapas: I) Evaluación del status sanitario, II) Implementación de acciones de mejora, III) Verificación del éxito de las mejoras implementadas. Se preparó una planificación estructurada para evaluar las prácticas de higiene y saneamiento de las carnicerías participantes. Los trabajadores de las carnicerías se capacitaron en un período comprendido entre las etapas de evaluación y verificación y recibieron: 1- los resultados de la primera etapa de evaluación, 2- una guía que incluye las normas nacionales, provinciales y locales sobre venta de carne y 3- recomendaciones sobre buenas prácticas de manufactura (BPM) y procedimientos operativos estándar de saneamiento (POES). En consumidores la estrategia se basó en capacitación a manipuladores (encuestas, talleres) y a maestras y niños de jardines infantiles mediante material didáctico cedido por una ONG. El programa fue transferido a más de 100 carnicerías y se cumplió exitosamente. Se compararon los resultados de las etapas I y III evaluando las diferencias significativas mediante análisis estadísticos. Evaluando el riesgo edilicio como parte del estatus sanitario, verificamos un incremento en el porcentaje de carnicerías con riesgo bajo. Los resultados microbiológicos de productos cárnicos y muestras ambientales, demostraron una disminución en el recuento de microorganismos indicadores y en la detección y aislamiento de microorganismos patógenos en la etapa III, reflejando la eficiencia en la implementación de las acciones correctivas entre ambas etapas y la importancia de su constante y continua aplicación. Se logró generar un cambio cualitativo sobre las condiciones higiénico-sanitarias de las carnicerías y sobre el producto comercializado en los municipios que lo implementaron. El desafío es muy grande, aunque como se demostró en Tucumán no es imposible. Para ello es necesario analizar las fortalezas y debilidades de las áreas encargadas de garantizar la seguridad alimentaria en cada distrito, optimizar los recursos disponibles y establecer una política de prevención que perdure en el tiempo. La comunicación de los riesgos asociados al consumo de alimentos constituye la base para garantizar la inocuidad alimentaria.

COMUNICACIONES ORALES

STEC Y LA CADENA AGROALIMENTARIA

COORDINADORAS:

MARIANA AYBAR

Instituto Nacional de Alimentos (INAL-ANMAT). mariana.aybar@anmat.gob.ar.

AYELÉN BAILLO

Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA), CONICET, Tucumán. antobaillo22@gmail.com

CONTAMINACIÓN DE STEC EN EXPENDIO MINORISTA EN DOS ÁREAS CON DIFERENTE RIESGO EPIDEMIOLÓGICO DE LA CIUDAD DE BUENOS AIRES

MAREY E¹, BISSO C¹, BROGLIO A², CUNDON C², CALZETTA RESIO A¹, BENTANCOR A².

1. Cátedra de Tecnología, Protección e Inspección Veterinaria de Alimentos, Facultad de Ciencias Veterinarias, UBA. 2. Cátedra de Microbiología, Facultad de Ciencias Veterinarias, UBA. emarey@fvet.uba.ar

Escherichia coli shigatoxigénica es uno de los agentes causales del síndrome urémico hemolítico (SUH), una ETA asociada al consumo de carne contaminada. En Argentina la enfermedad, endémica, tiene áreas de mayor presentación. En la Ciudad de Buenos Aires se determinó un área de Riesgo Epidemiológico (RE) en base a la georreferenciación de los casos de SUH y un área control (C). Estas áreas sugieren la presencia de factores comunes, que afectan el grupo social de pertenencia. Nuestro objetivo fue identificar si existían diferencias en el grado de contaminación por STEC de carne molida en ambas áreas. Identificamos 137 carnicerías en el área RE y 39 en el área C. Se realizaron muestreos aleatorios con reposición y se obtuvo por compra 271 muestras, de las cuales 170 provenían del área RE y 101 del área C. Para aislamiento de STEC no O157 se suspendió 65 g de muestra en Caldo Trypticasa Soja, se homogeneizó e incubó a 36°C durante 24 horas. Se sembró en Agar MacConkey, se incubó y de la zona de confluencia se realizó tamizaje por PCR para los genes *stx1* y *stx2*. Para aislamiento de STEC O157 se pesaron 65 g de la carne picada en Caldo Tryptona Soja modificado con Casaminoácidos y novobiocina (8mg/l), se homogeneizó e incubó a 42°C/15 a 22 horas. Para aislamiento se realizó separación inmunomagnética específica para O157 se sembró en Agar MacConkey Sorbitol con cefixima–telurito de potasio se incubó a 37°C/20 horas. A partir de las zonas de confluencia, se extrajo ADN para efectuar tamizaje por PCR multiplex para detección de genes *stx1/stx2/rfbO157*. Se aislaron cepas positivas a estos genes y se las caracterizó por sus marcadores *eae/ehxA/saa*. Se utilizó como cepas control ATCC 25922 (negativo) y O157:H7 EDL 933 (*stx1+*,*stx2+*,*eae+*,*ehxA+*) y O91:H21 (*stx1+*,*stx2+*,*ehxA+*,*saa+*). Los resultados del grado de contaminación

fueron analizados estadísticamente mediante test de diferencias de proporciones. En el área RE se detectaron 24,7% (42/170) muestras stx+ y 12,5% (21/170) rfbO157+. En el área C se detectaron 20,8%(21/110) muestras stx+ y 8,9% (9/110) rfbO157+. De las muestras potencialmente positivas se obtuvieron del área RE 26 aislamientos, 4 (15,38%) fueron O157:H7 y 22 (84,61%) STEC no-O157. El perfil de virulencia de las cepas fueron: 26,92% (7/26) stx2; 15,38% (4/26) stx1/stx2/saa/ehxA; 15,38% (4/26) stx2/saa/ehxA; 15,38% (4/26) stx2/eae/ehxA; 11,54% (3/26) stx2/ehxA; 3,85% (1/26) stx1/stx2; 3,85% (1/26) stx1/stx2/eae; 3,85% (1/26) stx1/stx2/saa; 3,85% (1/26) stx1/saa. El perfil de virulencia de las STEC O157:H7 fue: stx2/eae/ehxA. En el área C se obtuvieron 11 aislamientos: todos STEC no-O157. El perfil de virulencia de las cepas fueron: 18,18% (2/11) stx2; 18,18% (2/11) stx1/stx2/saa/ehxA; 27,28% (3/11) stx2/saa/ehxA; 18,18% (2/11) stx2/ehxA; 9,09% (1/11) stx2/saa; 9,09% (1/11) stx2/eae. No se detectaron diferencias en el grado de contaminación, ni en los factores de virulencia prevalentes para las cepas aisladas por área, mediante el test de diferencias de proporciones. Dado que las áreas seleccionadas mantienen diferencias en la incidencia de casos de SUH, esta podría deberse a causas externas al grado de contaminación de la carne picada, o la combinación de un conjunto de variables.

EFFECTO DEL TRATAMIENTO DE ALTAS PRESIONES HIDROSTÁTICAS SOBRE LA INACTIVACIÓN DE *Escherichia coli* O157 EN HAMBURGUESAS. EVALUACIÓN MEDIANTE METODOLOGÍA PMA-QPCR

REY MA^{1,2}, RODRIGUEZ RACCA A^{1,2}, ROSSI RIBEIRO L³, DOS SANTOS CRUZ F³, CAP M^{1,2}, MOZGOVOJ M^{1,2}, CRISTIANINI MV³, VAUDAGNA SR^{1,2}.

Instituto Tecnología de Alimentos. CNIA. INTA Castelar. 2. Instituto de Ciencia y Tecnología de los Sistemas Alimentarios Sustentables (ICyTeSAS) UEDD INTA CONICET. 3. Department of Food Engineering and Technology, School of Food Engineering, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, Brazil. rey.angeles@inta.gov.ar

Las altas presiones hidrostáticas (HPP) son consideradas tratamientos no térmicos de preservación de alimentos. En productos cárnicos se utiliza como tecnología de preservación ya que permite inactivar microorganismos patógenos y alteradores con mínimos efectos sobre el alimento, asegurando la inocuidad. Para determinar la eficacia de estos tratamientos y optimizar los parámetros de tiempo y nivel de presión, se utiliza la metodología tradicional de recuento en placa. Una alternativa es el uso de la metodología PMA-qPCR para cuantificar bacterias viables presentes en el alimento. El PMA (propidium monoazide) es un colorante que se intercala en el ADN de bacterias muertas con su membrana plasmática comprometida. El complejo PMA-ADN así formado inhibe la acción de la polimerasa. De esta forma, la señal obtenida por qPCR sólo es atribuible a células viables remanentes post procesamiento. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la eficacia de los tratamientos de altas presiones sobre hamburguesas de carne vacuna para inactivar *E. coli* O157 utilizando la metodología PMA-qPCR. Para ello se formularon hamburguesas de 30 g cada una, con 4.75% de grasa, 85.25% carne vacuna magra, 2% NaCl y 0.25% Tripolifosfato de sodio. Las mismas, se inocularon con un cóctel de 5 cepas de *E. coli* O157 dentro de bolsas individuales que luego se sellaron. Las hamburguesas envasadas fueron tratadas durante 5 minutos a 400 y 600 MPa, conservando un grupo de hamburguesas sin tratar con HPP como control. Se realizaron homogenatos con agua peptona y de ellos se tomaron alícuotas para recuento en placa y PMA-qPCR. Para la qPCR se utilizó el gen *UidA* como target y se determinaron los límites de detección y de cuantificación. La cuantificación de bacterias viables/vivas se realizó a partir de una curva estándar (UFC/ml). De los recuentos en placa se calcularon valores de letalidad y de injuria para cada tratamiento. Los valores de injuria obtenidos por placa no fueron significativos ($p > 0.05$). Las letalidades obtenidas por placa fueron 1.83 log UFC/mL y 4.71 log UFC/mL para los tratamientos a 400 y 600 MPa, respectivamente. Los valores de letalidad obtenidos por PMA-qPCR fueron de 1.65 y 2.61 log UFC/mL para los tratamientos a 400 MPa y 600 MPa, respectivamente. Las menores letalidades determinadas por PMA-qPCR con respecto al recuento en placa podrían responder a la presencia de bacterias en estado viable no cultivable (VNC) post presurización. Se comprobó que la metodología PMA-qPCR superaría la limitación de la qPCR sola, permitiendo la cuantificación de células viables y VNC. El tratamiento con altas presiones a 600 MPa fue el más efectivo para inactivar *E. coli* O157 en las muestras de hamburguesa.

LA IMPORTANCIA DE LA ENSEÑANZA DE LAS ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS (ETA) Y LAS ZONOSIS COMO POLÍTICA EDUCATIVA

LAMPERT D¹, LEOTTA G², PORRO S³.

1. Departamento de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes/CONICET. 2. Instituto de Genética Veterinaria/CONICET, UNLa Plata. 3. Departamento de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes. damian.lampert@gmail.com

Las ETA y las zoonosis, no están presentes en los diseños curriculares del nivel inicial, primario y secundario. Asimismo, en los planes de estudio de los profesorado de Biología y Química, tampoco se hacen presente. Es importante mencionar que la última reforma curricular de la escuela secundaria se realizó en el 2007, mientras que los profesorado siguen con curriculum de 1999. De un análisis realizado, se encontró que el profesorado suele asociar a las ETA como enfermedades nutricionales

y a las zoonosis, como centros de atención de animal. Este resultado es fundamental para diseñar políticas de formación y actualización del profesorado en materia de inocuidad alimentaria. Estas enfermedades se hacen presentes en los diseños curriculares de la escuela agraria y técnica con orientación en alimentos. Sin embargo, no existe en el mercado editorial, libros de texto que las trabajen. El objetivo de este trabajo es desarrollar propuestas y materiales educativos y resaltar la importancia de trabajar las ETA y las zoonosis en la escuela. Este trabajo forma parte de una tesis doctoral, financiada por el CONICET. En primer lugar se realizó un análisis exploratorio y descriptivo de los diseños curriculares y libros de texto de todas las asignaturas de nivel medio, con el fin de conocer la presencia y el abordaje de la temática. En base a esos resultados, se procedió a realizar diferentes secuencias didácticas para nivel inicial y primario, secundario y terciario de formación docente y evaluar los resultados de su implementación, a partir de una metodología cuasi experimental de pre-test y pos-test con entrevistas y encuestas para valorar el interés/motivación en la temática. Las propuestas se desarrollan desde el enfoque “un mundo, una salud” bajo el paradigma de la Geografía de la Salud, que permite contextualizar a las ETA y las zoonosis en el territorio. Por último, se buscó sistematizar las experiencias y desarrollar materiales educativos de divulgación y de uso escolar, con el fin de que se pueda incorporar la temática en los niveles educativos. Las propuestas desarrolladas no solo lograron incorporar prácticas de prevención y promoción de la salud, sino que fomentó el pensamiento crítico y el estudiantado de todos los niveles indicó que la temática era motivadora, importante y que es una pena que no se trabaje anteriormente. Lo mismo indicó el profesorado que recibió la propuesta; resaltando que es un tema que debería aparecer en las carreras de profesorado. En base a los resultados obtenidos, se desarrollaron 3 libros de texto para escuela secundaria en ciencias sociales y naturales, un libro de divulgación con propuestas educativas para todos los niveles y un libro para pintar orientado a nivel inicial y primario. Estas propuestas llegaron a más de 20 escuelas y varias carreras de profesorado de todo el país. Los resultados obtenidos acerca de la carencia de la temática en los planes de estudio, los resultados estadísticos de las propuestas educativas y el interés y motivación, permiten afianzar la propuesta de incorporar a la educación en inocuidad alimentaria en la escuela y la formación de profesorado.

¿SE MODIFICA LA PERCEPCIÓN DE RIESGO DE SÍNDROME URÉMICO HEMOLÍTICO EN UNA COMUNIDAD DE BUENOS AIRES MEDIANTE INTERVENCIONES EDUCATIVAS?

BROGLIO A^{1,3}, BLANCO CRIVELLI X¹, GRACIANO L², SANIN M¹, BERRA Y^{2,3}, BENTANCOR A¹.

1. Cátedra de Microbiología, Facultad de Ciencias Veterinarias, UBA. 2 Cátedra de Salud Pública, Facultad de Ciencias Veterinarias, UBA. 3. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas. abroglio@fvet.uba.ar

El síndrome urémico hemolítico (SUH) cuyo agente etiológico más frecuente es *Escherichia coli* productor de toxina Shiga, es una enfermedad transmitida por alimentos (ETA) de gran impacto en Argentina. Las intervenciones educativas (IE) son actividades lúdico-didácticas que buscan interpelar a estudiantes con el fin de modificar conductas en su comunidad. Mediante encuestas se pueden analizar conocimientos, actitudes y prácticas diarias (CAP), y permiten evaluar la percepción de riesgo. El objetivo del trabajo fue evidenciar si IE basadas en las cinco claves de inocuidad alimentaria pueden modificar la percepción de riesgo de SUH y otras ETA de habitantes de una comunidad urbano-rural de Buenos Aires. Durante 2016-2019 se realizó 1 IE/año sobre prevención de SUH y Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) en 9 cohortes de colegios públicos del partido de Exaltación de la Cruz e inicialmente se realizaron encuestas CAP a habitantes de dicha comunidad con posterior entrega de material informativo. Se realizaron 240 encuestas, 71 previo a las IE y 169 posterior a ellas. Los resultados se analizaron mediante los programas estadísticos Epiinfo y Statistix. Las diferencias significativas fueron respecto a la clave 1 de inocuidad (actitudes), inicialmente el 8,5% (6/71) de los encuestados utilizaba productos correctos en el lavado de manos durante la manipulación de alimentos, posterior a IE fue del 84% (142/169). Respecto a cocción de alimentos (clave 2), el conocimiento de los riesgos asociados a SUH aumentó [previo a IE 24% (17/71) vs posterior 36% (61/169)]. Considerando el agua segura (clave 3) evaluando el número de encuestados que tienen agua de pozo, el número de quienes analizaron el agua (actitudes) aumento de 11% (2/18) a 32% (21/66), y el conocimiento respecto a la profundidad del pozo de 16% (3/18) a 38% (25/66). En la clave 4 contaminación cruzada (prácticas) disminuyó el uso de recipientes seguros para guardar alimentos y evitar contaminación por derrame en la heladera variando de 73,2% (52/71) a 45% (76/169), y (conocimientos) la asociación entre la vía de contagio fecal-oral de STEC y la importancia del lavado de manos luego de ir al sanitario se mantuvo sin diferencias, pero baja [31% (22/71) vs 33% (57/169)]. Los resultados fueron controversiales y permiten evidenciar algunos puntos críticos a reforzar de esta comunidad. Las deficientes prácticas de manufactura se deberían a malos hábitos y costumbres cotidianas, ocasionados por fallas en la percepción de riesgo. Las IE para implementar las BPM y prevención de ETA se deberían plantear como actividades escolares diarias sostenidas en el tiempo. Las campañas de prevención (limitadas en su impacto) deberían asociar la incorporación de contenidos formales en los planes de estudios y la capacitación de los docentes que los deben ejecutar en aula. Objetivos educativos formales contribuirían a capacitar a todo manipulador de alimentos y prevenir los posibles casos de SUH y ETA por sobre los culturales.

MESA REDONDA

ESTRATEGIAS EXPERIMENTALES DE CONTROL Y PREVENCIÓN

COORDINADOR: ANGEL CATALDI

Instituto de Agrobiotecnología y Biología Molecular (IABIMO INTA-CONICET). cataldi.angeladrian@inta.gob.ar

PÉPTIDOS BLOQUEANTES DEL SST3 DE ESCHERICHIA COLI ENTEROHEMORRÁGICA

MARIANO LARZÁBAL

Laboratorio *Escherichia coli*, Instituto de Agrobiotecnología y Biología Molecular (IABIMO INTA-CONICET).
arzabal.mariano@inta.gob.ar

Escherichia coli enterohemorrágica (EHEC) depende del sistema de secreción de tipo III (SST3) para translocar efectores al hospedador. El SST3 posee una estructura compleja compuesta por más de 20 proteínas que forman un sistema de 'aguja y jeringa'. Existe una alta prevalencia de dominios coiled-coil entre sus proteínas estructurales, translocadoras y efectoras. Los dominios coiled-coil están involucrados en interacciones proteína-proteína permitiendo el ensamblado de complejos multiméricos. Estos dominios presentan una estructura secundaria α -hélice anfipática compuesta por n repeticiones consistentes en siete residuos aminoacídicos (a-b-c-d-e-f-g) n. Los residuos en posiciones a y d son normalmente hidrofóbicos y los restantes aminoácidos (b, c, e, f, y g) son polares. EspA, EspB y EspD son algunas de las proteínas secretoras que componen la parte del translocon del SST3 y que presentan dominios coiled-coil. EspA, es la proteína mayoritaria mientras que EspB y EspD están involucrados en la formación de poros en las membranas de las células epiteliales. Asimismo, se ha demostrado que en la interacción EspA-EspA, EspA-EspB y EspA-EspD implican interacción entre los dominios coiled-coil de los polipéptidos. La translocación de efectores por parte de EHEC resulta en la formación de lesiones características de attaching and effacing (A/E) en el epitelio intestinal. El grupo de trabajo viene desarrollando investigaciones sobre el accionar de péptidos coiled-coil con el objetivo de impedir el desencadenamiento de la acción del SST3 de EHEC, *Escherichia coli* enteropatogénica y *Citrobacter rodentium* (CR). Hemos diseñado y ensayado péptidos seleccionados específicamente a partir de las regiones coiled-coil de las proteínas estructurales, translocadoras y chaperonas del SST3. Los resultados demostraron una inhibición de la secreción y translocación de proteínas del SST3. Esto provocó la total inhibición de la hemólisis de glóbulos rojos y la formación de lesiones de A/E sobre células epiteliales. A su vez, el tratamiento por vía oral de ratones con una combinación de péptidos, previa y durante la infección con CR, previno del daño colónico. Sin embargo, debido a la baja escala y solubilidad y los altos costos de síntesis fue que decidimos tomar a los péptidos como estructuras modelo para el diseño de nuevos compuestos. Para ello, inicialmente realizamos estudios integrales de modelado molecular que nos permitieron observar uniones hidrofóbicas y de puente de hidrógeno entre EspA-péptidos. Esta información nos fue especialmente útil para seleccionar compuestos con una mayor afinidad por el dominio coiled-coil. Por lo tanto, los nuevos agentes ad hoc estarían dirigidos específicamente contra un mecanismo de virulencia, con lo cual no afectarían células eucariotas, bacterias comensales y tampoco ejercerían ninguna presión selectiva para viabilidad, reduciendo así el desarrollo de resistencia a estos agentes como suele ocurrir con los antibióticos convencionales. A su vez, el SST3 se encuentra altamente conservado entre agentes patógenos. Esto sugiere que un inhibidor dirigido contra un componente del SST3 común, podría ser eficaz contra una amplia gama de patógenos Gram negativos. Posiblemente, un inhibidor del SST3 podría impedir o retrasar la infección y de esta manera prevenir la enfermedad por alterar las propiedades de virulencia esenciales dentro de este sistema. En conclusión, este desarrollo podría conducir a nuevas estrategias terapéuticas o profilácticas contra la infección de estos patógenos en la infectología o la prevención del tratamiento.

VACUNAS EXPERIMENTALES CONTRA LA COLONIZACIÓN DE BOVINOS POR EHEC

DANIEL A. VILTE

Instituto de Patología Veterinaria (IPVet, INTA-CONICET). vilte.daniel@inta.gob.ar

Es conocida la importancia de la vacunación de los bovinos como estrategia para reducir la colonización y diseminación ambiental de EHEC. A tal fin, en este modelo animal se han ensayado diferentes composiciones vacunales para lograr tal objetivo. Estos productos difieren, fundamentalmente, aunque no de modo exclusivo, del inmunógeno utilizado. Gran parte de las fórmulas están constituidas por factores de colonización, como por ejemplo los componentes del sistema de secreción de tipo 3, ya sea en forma de extractos o de proteínas recombinantes individuales o quiméricas. También se han utilizado bacterinas de cepas curadas o mutantes, envolturas celulares completas, vesículas de membrana externa, flagelina, toxoides de toxina Shiga, cepas atenuadas de *Salmonella* recombinante y combinaciones de más de uno de estos elementos. En general, con estas vacunas experimentales se logró montar una respuesta significativa a nivel de IgG sérica. Algunas también pudieron generar respuesta IgA e incluso se ha detectado también diferencias a nivel de inmunidad celular. Aunque no todas las vacunas fueron

capaces de lograr la reducción de la colonización o el tiempo de excreción de la bacteria patógena, sirvieron para intentar elucidar cómo podrían actuar los distintos inmunógenos, adyuvantes, vías de inoculación y número de dosis en las respuestas observadas tanto a nivel humoral como celular. Más allá de las 2 fórmulas que han logrado llegar al mercado como producto veterinario, se siguen investigando nuevas alternativas y combinaciones que están ampliando el rango de acción e incluyendo nuevos serotipos además de O157:H7, el más investigado. Esto nos indica que la consideración del tema sigue siendo alta tanto por la importancia económica del ganado bovino como por motivos de salud pública bajo la perspectiva de “Una Salud”.

BACTERIAS LÁCTICAS BIOPROTECTORAS CAPACES DE INHIBIR EHEC EN CARNES Y AMBIENTES. ESTUDIO IN VITRO E IN SITU

SILVINA FADDA

Centro de Referencia de Lactobacilos (CERELA, CONICET), Tucumán. sfadda@cerela.org.ar

El uso de bacterias lácticas (BL) como cultivos bioprotectores contra ciertos patógenos está muy bien documentado. Sin embargo, la eficiencia de BL y sus metabolitos para inhibir *Escherichia coli* enterohemorrágico (ECEH) ha sido poco explorada. Las BL poseen status GRAS (Generalmente Reconocidos como Seguros) por lo que podrían constituir una estrategia real para la industria alimentaria contra ECEH. Este patógeno es capaz de contaminar no solo la matriz alimentaria sino las superficies de procesamiento, debido a su habilidad para formar biopelículas. Teniendo en cuenta la grave amenaza que representa ECEH para la industria de la carne y la salud pública, urge proporcionar soluciones sustentables para limitar y prevenir riesgos. En este contexto, el objetivo de esta línea de investigación fue determinar el potencial de cepas de BL para inhibir ECEH en carne, así como en ambientes de procesamiento y estudiar las bases moleculares que subyacen a la interacción BL-ECEH. En esta exposición se presentan los principales resultados obtenidos hasta el momento. Se analizó la capacidad antagonista de 105 cepas lácticas de origen alimentario. La actividad anti ECEH fue variable y dependiente de cepa. Este efecto demostró no deberse a la acción del ácido, bacteriocina u otro agente soluble producido por las BL. Se estudió la interacción BL-ECEH in vitro (sistema cárnico modelo) e in situ (carne molida y discos de carne) mediante un abordaje fisiológico y proteómico. Los estudios in vitro, demostraron una significativa actividad inhibitoria de *Lactiplantibacillus plantarum* CRL 681 y *Enterococcus mundtii* CRL 35. Esta acción se potenció cuando ambas BL fueron inoculadas simultáneamente, no detectándose células viables del patógeno a las 48 horas. Para el abordaje proteómico se seleccionó *E. mundtii* CRL35. Los resultados confirmaron que el patógeno en desventaja metabólica reprime su metabolismo entrando anticipadamente en fase de muerte. El resultado más efectivo in situ fue la acción bactericida sobre ECEH a las 72 h, en discos de carne envasados bajo vacío inoculados con ambas BL y con el agregado de ácido láctico (0.6%). Se prevén estudios proteómicos de la interacción BL-ECEH en la matriz alimentaria. También se demostró la ausencia de inducción del fago W933, que codifica para Stx1, por efecto de CRL 35, indicando que la BL no promovería la liberación de la toxina al medio, garantizando su uso seguro como cultivo bioprotector. Los estudios en biofilm se llevaron a cabo sobre chips de acero inoxidable evaluando tres estrategias de interacción: competencia, exclusión y desplazamiento; en condiciones tecnológicas. Los resultados mostraron que, en competencia y exclusión, las tres BL seleccionadas lograron reducir el biofilm de ECEH. Mientras que solo *P. pentosaceus* CRL 2145 logró inhibir la población sénil de ECEH mediante desplazamiento. En base a estos resultados se seleccionó esta cepa para los estudios proteómicos posteriores. Este trabajo, es pionero en estudios de interacción entre una BL y ECEH, aplicando un enfoque multidisciplinario. Los resultados obtenidos contribuyen a la tecnología de alimentos cárnicos, proponiendo cultivos lácticos bioprotectores contra ECEH, un patógeno alimentario que demanda soluciones urgentes para nuestro país.

DESARROLLO DE MEDICAMENTOS PREVENTIVOS Y TERAPÉUTICOS PARA EL SÍNDROME URÉMICO HEMOLÍTICO. LECCIONES APRENDIDAS POST-COVID

SANTIAGO SANGUINETTI

Inmunova S.A. ssanguinetti@immunova.com

El síndrome urémico hemolítico (SUH) es una enfermedad huérfana, para la cual no existe hoy tratamiento disponible en el mundo. Dada la magnitud de los problemas sociales y económicos causados por las infecciones por *Escherichia coli* productora de toxina Shiga (STEC), existe una urgente necesidad de terapias específicas que impidan el desarrollo de esta enfermedad. Uno de los mayores desafíos para solucionar el problema, es desarrollar un tratamiento seguro, y que tenga capacidad de neutralizar la actividad de la toxina Shiga (Stx) para bloquear la aparición del SUH en pacientes infectados con STEC. Diseñamos un nuevo inmunógeno para presentar la Subunidad b de Stx en forma eficiente. A partir del mismo, hemos desarrollado un suero hiperinmune con alto título neutralizante contra 8 variantes de Stx, denominado INM004. Hemos finalizado exitosamente los ensayos preclínicos y de Fase 1 para este producto. Durante 2019 se comenzó un ensayo clínico Fase 2/3 destinado a evaluar la eficacia de INM004 para prevenir el desarrollo de SUH en pacientes STEC positivos. El mismo debió ser interrumpido debido

a la pandemia de SARS-CoV-2. Capitalizando los conocimientos obtenidos en el desarrollo de este suero y utilizando la misma plataforma tecnológica, produjimos en tiempo récord un medicamento capaz de disminuir la mortalidad en pacientes COVID-19 severos. Esta experiencia nos sirvió para repensar nuestra estrategia para SUH. En esta presentación mostraremos el diseño de un nuevo ensayo clínico de fase 2 para el tratamiento de STEC-SUH, así como nuestros planes para el desarrollo de una vacuna preventiva.

COMUNICACIONES ORALES

ESTRATEGIAS EXPERIMENTALES DE CONTROL Y PREVENCIÓN

COORDINADORAS:

CAROLINA JANCIC

Instituto de Medicina Experimental (IMEX)-CONICET Academia Nacional de Medicina. cjancic@hotmail.com

FLAVIA SACERDOTI

Instituto de Fisiología y Biofísica Bernardo Houssay (IFIBIO-Houssay). Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires. flasacerdoti@gmail.com

EVALUACIÓN DE CEPAS DE *BACILLUS SPP.* COMO ANTAGONISTAS DE *ESCHERICHIA COLI* PRODUCTOR DE TOXINA SHIGA

BLANCO CRIVELLI X, VELAZQUEZ MA, BENTANCOR A.

1. *Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Veterinarias, Cátedra de Microbiología. xblancocrivelli@fvvet.uba.ar*

Escherichia coli productor de toxina Shiga (STEC) es señalado como etiología asociada al síndrome urémico hemolítico. Los bovinos constituyen el principal reservorio de este patógeno. El objetivo del presente trabajo fue evaluar cepas autóctonas de *Bacillus spp.* como antagonistas de STEC in vitro. Se evaluó la inhibición simultánea mediante desafío de 6 aislamientos autóctonos de *Bacillus spp.* con cultivos puros de cepas STEC de impacto clínico local: O157, O145, O121, O26 y O174, junto a aquellos serogrupos incorporados a la modificación del Código Alimentario Argentino: O111 y O103, como control negativo se utilizó *E. coli* ATCC 25922. Los ensayos se realizaron siguiendo dos protocolos. Protocolo A - Todos los inóculos utilizados en el ensayo se estandarizaron a una concentración equivalente al 0,5 Mc Farland. Cada cepa de *E. coli* se sembró por diseminación, con hisopo en tres direcciones en una placa de Agar Tripteína Soja. (ATS). Posteriormente se sembraron 10 µl de cada cepa de *Bacillus spp.* en estudio sobre el cultivo diseminado. Protocolo B - 10 µl de un cultivo ON de la cepa autóctona de *Bacillus spp.* a evaluar en Caldo Tripteína Soja se inocularon en el centro de una placa de ATS. Posteriormente se sembraron en forma radial, del centro hacia la periferia, a una distancia de 0,5 cm, las cepas de *E. coli*. Para ambos protocolos se evaluó el posible efecto antagonístico durante 7 días del cultivo a 37 °C, a 28 °C y a 12 °C a pH neutro. Posteriormente se evaluó el efecto antagonístico a 37°C a pH ácido (4,5) y básico (8,0). Dichos efectos inhibitorios fueron cuantificados a través de la medición del halo de inhibición, (Protocolo A) y medición de efecto inhibitorio sobre la línea de siembra (Protocolo B), ambos medidos en mm. Cada ensayo se realizó por triplicado. Los resultados mostraron que la temperatura óptima a la que todas las cepas de *Bacillus spp.* ejercieron efecto antagonístico fue a 37 °C, sin embargo, a temperaturas menores tales como 29 °C se detectó efecto inhibitorio en las cepas S45 y S178, e incluso S178 inhibió a 12 °C. Ambas cepas tuvieron efecto inhibitorio en el control negativo, en menor medida para S45. A 37 °C y pH ácido, S45 y S178 tuvieron mayor desarrollo que a pH neutro o básico. S178 desarrolló a pH básico un efecto inhibitorio más evidente, pero sobre un espectro de cepas menor. Para esta cepa a pH ácido y pH neutro no se observaron diferencias respecto a la inhibición. El efecto inhibidor de S178 se diferencia del resto de las cepas autóctonas en que comienza en forma más temprana (a las 48 hs de co-cultivo), mientras que S45 lo hace a las 72 hs y el resto de las cepas recién a las 144 hs. Los resultados obtenidos permiten considerar a la cepa S178 como una estrategia de control pre-faena de STEC en bovinos, siendo necesario profundizar en su evaluación para su implementación.

INHIBICIÓN DE LA FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS EN *Escherichia coli* O157:H7 MEDIANTE EL PEQUEÑO ARN REGULADOR McaS

GONZALES MACHUCA A, SARNACKI SH, QUIROGA C.

Instituto de Investigaciones en Microbiología y Parasitología Médica (IMPAM, UBA-CONICET). Facultad de Medicina. Universidad de Buenos Aires. adrian.gzls@gmail.com

Escherichia coli enterohemorrágica (EHEC) O157:H7 es el principal agente responsable de colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico. Este último es la causa principal de insuficiencia renal aguda y trasplante renal en niños de la Argentina.

EHEC posee diversas adhesinas que intervienen en el proceso de colonización, entre ellas curli, la cual participa en la formación de biopelículas y otros procesos como adherencia celular, invasión y activación del sistema inmune. Curli se encuentra codificada en los operones *csgBAC* y *csgDEFG*, siendo *csgD* su principal regulador. Distintos pequeños ARNs reguladores (srRNA) participan en la regulación post-transcripcional de curli, por ej., McaS, un srRNA Hfq-dependiente que disminuye la expresión de *csgD* que lleva a la inhibición de la producción de curli y la formación de biopelículas. En este trabajo, nos propusimos generar un sistema de expresión de McaS capaz de inhibir la síntesis de curli para establecer las bases de un posible mecanismo terapéutico contra EHEC O157:H7. Para ello, se seleccionaron 6 aislamientos de EHEC O157:H7 (CQ17, CQ144, CQ145, CQ146, CQ147 y CQ148), a los que se les evaluó la expresión del gen de la toxina Shiga *stx2* por RT-PCR. Luego, se determinó su capacidad de síntesis de curli mediante el análisis de las macrocolonias usando rojo congo (0,04 mg/mL) y Coomassie brilliant blue G (0,02 mg/mL) y se cuantificó la adherencia al poliestireno usando cristal violeta (0,01%) a distintas temperaturas (28°C y 37°C) y tiempos de incubación (48 y 120 hs). Se identificó a CQ146 como el único aislamiento de EHEC productor de altos niveles de curli a 28°C tanto a nivel de morfotipo como a nivel de adherencia. No se observó producción de curli a 37°C en ninguno de los aislamientos de EHEC. El análisis de la secuencia de *stx2* de CQ146 reveló que pertenece al subtipo Stx2c, asociado a cuadros clínicos de gravedad. Con el fin de revertir la producción de curli se introdujo el clon pMcaS (CmR), que contiene la secuencia de McaS, en las cepas EHEC CQ146 y CQ147 y en otras bacterias productoras de curli, como ser *E. coli* uropatógena (CQ7), *Salmonella enterica* sv. Enteritidis (ArJEG) de procedencia clínica y en la cepa de referencia *E. coli* MG1655. Luego de 48 hs a 28°C, se observó mediante el análisis de macrocolonias, una inhibición a nivel fenotípico de la síntesis de curli de MG1655, CQ146, CQ7 y ArJEG; y no se observó ninguna reversión a 37°C. La adherencia al poliestireno en cepas portadoras de pMcaS se redujo significativamente a 28°C ($p < 0,05$). Nuestros resultados demuestran que McaS puede reducir eficazmente la formación de biopelículas que permiten el desarrollo de herramientas basadas en sRNAs para atacar genes de virulencia de bacterias patógenas.

BACTERIÓFAGOS PARA CONTROL DE STEC: FRECUENCIA DE AISLAMIENTO A PARTIR DE DISTINTAS MUESTRAS

RODRÍGUEZ VA, JUÁREZ AE, KRÜGER A, LUCCHESI PMA.

Centro de Investigación Veterinaria de Tandil (CIVETAN-CONICET-CIC-UNCPBA), Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, Tandil. varodriguez@vet.unicen.edu.ar

Escherichia coli productora de toxina Shiga (STEC) es un patógeno alimentario emergente a nivel mundial y los bovinos son su principal reservorio. Los bacteriófagos son virus con alta especificidad por su hospedador bacteriano y dependen del mismo para replicarse. En la actualidad, la posibilidad de usar bacteriófagos para reducir la concentración de bacterias patógenas en distintos alimentos ha cobrado un mayor interés. Dado que siguen rutas de diseminación en el medio ambiente similares a las de sus hospedadores, la regla general es buscarlos donde se encuentra el patógeno. Por ello y dentro del objetivo general de aislar bacteriófagos líticos para STEC, en el presente trabajo se evaluó la frecuencia de aislamiento de los mismos a partir de muestras de materia fecal, bebederos y efluentes obtenidas en establecimientos ganaderos, y de muestras de carne picada adquiridas en carnicerías. Se tomaron un total de 37 muestras: 8 provenientes de diferentes carnicerías y 29 provenientes de tres tambos y un establecimiento de recría/engorde. Las muestras se pre-incubaron (individualmente o en pools en el caso de las muestras de materia fecal bovina) ON a 37°C en caldo LB suplementado con CaCl₂. Luego de tratarlas con cloroformo y centrifugarse, los sobrenadantes se ensayaron sobre 9 cepas STEC (serogrupos O103, O145, O157, O26, O111) mediante la técnica de spot test. A partir de las muestras que mostraron efecto lítico, se purificaron los fagos empleando el método de doble capa de agar hasta la obtención de placas de lisis uniformes en cuanto a tamaño y morfología. Los sobrenadantes obtenidos a partir de las muestras de carne picada mostraron efecto lítico sobre las cepas STEC de los serogrupos evaluados, aunque con variabilidad en grado de turbidez. Dos de ellos mostraron un mayor efecto lítico sobre cepas STEC de los serogrupos O145, O157 y O26. A pesar de ello, no pudieron aislarse bacteriófagos debido a que no se pudieron recuperar durante los pasos de purificación o produjeron placas de lisis turbias y consecuentemente fueron descartados. Por otra parte, los sobrenadantes de las muestras obtenidas en establecimientos ganaderos mostraron mayor efecto lítico sobre la totalidad de los serogrupos testeados (al menos un sobrenadante para cada serogrupo). Notablemente, se pudo aislar una gran cantidad de fagos (16) del total de tambos y establecimientos de recría/engorde. Los mismos fueron capaces de formar placas de lisis traslúcidas y en su conjunto tienen efecto sobre todos los serogrupos STEC. A partir del análisis de los resultados se observa que las muestras obtenidas de los establecimientos ganaderos ofrecen una mayor frecuencia de aislamiento de fagos efectivos contra STEC, en comparación a las muestras de origen cárnico de las cuales no se logró aislar ninguno. Consideramos que, además de las características propias de la matriz de cada tipo de muestra, los tratamientos que se llevan a cabo en la industria cárnica con el objetivo de disminuir la carga bacteriana podrían influir en el número de fagos presentes en las muestras de carne picada.

EFFECTO ANTIMICROBIANO DE EXTRACTOS ACUOSOS DE *ORIGANUM VULGARE* (ORÉGANO) FRENTE A *ESCHERICHIA COLI* O157: H7 (STEC)

SALINAS AG^{1,2}, VEGA AE¹, ESCUDERO ME¹

1. Universidad Nacional de San Luis. 2. CONICET. gabo.3333@gmail.com

Escherichia coli productor de toxina Shiga O157:H7 puede producir colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico (SUH) principalmente por el consumo de alimentos contaminados de origen bovino. El serotipo O157:H7 es el principal implicado en manifestaciones clínicas e infecciones humanas. El orégano es una planta aromática de la flora mediterránea que se ha utilizado comúnmente con fines médicos. Estudios previos han reportado actividad antibacteriana de extractos etanólicos y metanólicos así como de aceites esenciales del orégano. En el presente trabajo se caracterizó fenotípicamente y genotípicamente el efecto de extractos acuosos de orégano (EOs) obtenidos por infusión (EOI) y decocción (EOD), sobre células de STEC. Se trabajó con la cepa patrón *E. coli* O157:H7 EDL933 Sor-/βglu-/E-Hly+, biotipo C, productor de Stx1/Stx2, eae+ (STEC) y se evaluó el efecto de los EOs, estableciendo valores de CIM y CBM mediante microdilución en placa según el Instituto de Laboratorios Clínicos de EE. UU. (CLSI). Los cultivos planctónicos y en biofilm de STEC fueron tratados con una concentración sub-CIM (1/2 CIM) de los EOs. Cultivos sin tratar constituyeron los controles de crecimiento. La morfología celular de ambos cultivos fue analizada mediante microscopía óptica y electrónica. El efecto sobre la transcripción de los genes de virulencia *stx1*, *stx2*, *eae* y *ompA*, se realizó mediante la técnica de RT-PCR utilizando el gen control ARNr 16S y se estableció una relación de la intensidad de las bandas (gen de virulencia/gen control) obtenidas en las diferentes condiciones ensayadas (tratadas/no tratadas) utilizando el programa ImageJ. Se determinó el efecto de los EOs sobre la adherencia e invasividad de STEC sobre células Caco-2, siguiendo el protocolo de Doughty y col. (2002). Los valores de CIM fueron de 20 mg/ml, tanto para EOI como para EOD. En cuanto al valor de CBM, fue cuatro veces más alto que el de CIM, ya que tanto EOI como EOD fueron efectivos a concentraciones de 80 mg/ml. Se observó reducción significativa en el recuento celular tanto en los cultivos planctónicos como en biofilm con concentraciones sub-CIM de los EOs. Los cultivos tratados con los EOs presentaron cambios significativos en la morfología celular, observándose formas cocoides además de la pérdida de la estructura y organización del biofilm. EOI disminuyó la transcripción del gen *stx1* en cultivos planctónicos y de los genes *stx2*, *eae* y *ompA* en biofilm, mientras que EOD redujo la expresión de genes *stx1*, *stx2* y *eae* en cultivos planctónicos y de *ompA* en biofilm para STEC. Los tratamientos con EOI y EOD produjeron una disminución de la adhesión celular de STEC a células Caco-2 de un 80 % y 38,5 %, respectivamente. El tratamiento con EOI y EOD sólo permitió la invasión por STEC del 1,11% y 0,04 %, respectivamente, de las células Caco-2 con respecto al control no tratado. El estudio destaca la aplicación de los EOs como tratamiento preventivo sobre alimentos debido a la actividad sobre factores de virulencia sobre STEC. A pesar del grado de inhibición sobre la adherencia e invasión celular, su utilización en pacientes queda sujeta a estudios más profundos.

SESIÓN DE POSTERS

STEC Y LA CADENA AGROALIMENTARIA/ESTRATEGIAS EXPERIMENTALES DE CONTROL Y PREVENCIÓN

COORDINADORAS:

MARÍA JULIA RUIZ

Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral, Universidad Nacional del Litoral, jruij@vet.unicen.edu.ar

MARIANA SANIN

Cátedra de Microbiología, Centro de Estudios Transdisciplinarios de Epidemiología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires. mariana_sanin@hotmail.com

EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD INHIBITORIA DE BACTERIAS LÁCTICAS SOBRE *ESCHERICHIA COLI* ENTEROHEMORRÁGICO EN CARNE Y SUPERFICIES INERTES

BAILLO A¹, CISNEROS L¹, VILLENA J¹, YANTORNO O², FADDA S¹.

1. Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA), CONICET, Tucumán. 2. Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI-CONICET), Facultad de Ciencias Exactas, UNLP, Buenos Aires. abaillo@cerela.org.ar, lcisneros@cerela.org.ar

El uso de bacterias lácticas (BL) como cultivos bioprotectores contra ciertos patógenos está muy bien documentado. Sin embargo, la eficiencia de BL y sus metabolitos para inhibir *E. coli* ha sido poco explorada. La acción bioprotectora de las BL está mediada por distintos mecanismos como la competencia por el sustrato y producción de metabolitos con actividad inhibitoria. Las BL poseen status GRAS (Generalmente Reconocidos como Seguros) por lo que podrían constituir una estrategia real contra *Escherichia coli* enterohemorrágico (EHEC). Este patógeno es capaz de contaminar no solo la matriz alimentaria sino las super-

ficies de procesamiento, debido a su habilidad para formar biopelículas. Teniendo en cuenta la grave amenaza que representa ECEH para la industria de la carne y la salud pública, urge proporcionar soluciones sustentables para limitar y prevenir riesgos. El objetivo de este trabajo fue evaluar la acción bioprotectora de BL contra ECEH, sobre carne y superficies inertes. Se estudió la actividad antagonista de *Lactiplantibacillus* (*L.*) *plantarum* CRL681 y *Enterococcus* (*E.*) *mundtii* CRL35 en carne molida y en discos de carne a 8°C durante 72 hs. Se analizó el agregado de ácido láctico al 0,6 % como una barrera inhibitoria adicional. Además, se estudió la acción de *L. plantarum* CRL 1075, CRL 1482 y *Pediococcus pentosaceus* CRL 2145 contra el biofilm de ECEH sobre chips de 1 cm² de acero inoxidable (AI) luego de 48 hs a 12 °C. Se cuantificó la viabilidad de las bacterias en medios selectivos y el pH (en carne). Se realizó Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) y para los estudios en biofilm también se utilizó Microscopía Confocal. En carne molida, los resultados evidenciaron que *L. plantarum* y *E. mundtii* en forma combinada lograron disminuir 2 unidades logarítmicas el crecimiento de *E. coli*. Mientras que el agregado de ácido láctico potenció el efecto antagonista de las BL inhibiendo ECEH a valores no detectables. En discos de carne sellados al vacío, se observó un efecto bactericida significativo cuando se combinaron ambas cepas lácticas y ácido láctico, no registrándose células viables a las 72 hs. En los ensayos en carne molida se observó un cambio de color de la carne, no así en los discos. La MEB de un corte de carne permitió observar a *E. mundtii* con ECEH en la matriz cárnica. Los resultados obtenidos en chips de AI indicaron que las BL produjeron una reducción de entre 2,8 y 6 unidades log del biofilm de ECEH, siendo *L. plantarum* CRL 1075 y *P. pentosaceus* las más eficientes. Las imágenes de MEB mostraron en el biofilm mixto, las células de ECEH rodeadas por agrupaciones de diplococos (*P. pentosaceus*). Por microscopía confocal se confirmó la reducción de la biomasa del patógeno y la tinción live/dead evidenció la muerte del mismo. Los resultados indican que todas las cepas lácticas estudiadas lograron inhibir significativamente ECEH en las matrices evaluadas. Continúan los estudios orientados a confirmar el uso de estas BL como estrategia biológica Green grade para controlar la incidencia de este patógeno tanto en carne como en ambientes de procesamiento.

FLAGELINA H7 (FH7) COMO COMPONENTE VACUNAL PARA PREVENIR EL SÍNDROME UREMICO HEMOLÍTICO (SUH)

BERNAL AM¹, SOSA FN¹, TODERO MF¹, VEREERTBRUGGHEN A¹, RAMOS MV¹, FERNÁNDEZ-BRANDO RJ¹, VERMEULEN, M¹, RUMBO M², PALERMO MS¹.

1. Instituto de Medicina Experimental- CONICET- Academia Nacional de Medicina. 2. Instituto de Estudios Inmunológicos y Fisiopatológicos-CONICET, UNLa Plata. alanmbernal@gmail.com

Argentina presenta la mayor incidencia mundial de SUH asociado a bacterias *Escherichia coli* productoras de toxina Shiga (Stx; STEC) en niños menores de 5 años. La cepa STEC mayoritariamente asociada al SUH es *E. coli* O157:H7. Dada la importancia de la colonización intestinal de STEC en la patogénesis del SUH y el rol central que juega la respuesta humoral local para prevenir esta primera etapa, el objetivo de este trabajo fue analizar la capacidad de la FH7, monómero estructural del flagelo bacteriano y proteína con alta capacidad inmunogénica, para inducir una respuesta local protectora. Se purificó la FH7 a partir de cepas STEC stx-, para reducir la exposición a la Stx durante el proceso y garantizar la ausencia de este importante factor de virulencia en la formulación. Se inmunizaron ratones BALB/c (n=5) con 3 dosis (10 µg/ratón), sin adyuvante, a intervalos de 10 días por vía intranasal para favorecer una respuesta local en el intestino. La identidad de la proteína purificada se confirmó por *western blot* haciendo uso de un anticuerpo comercial anti-FH7 (abcam). A distintos días post tercera inmunización (dp3i), se tomaron muestras de materia fecal y suero para analizar los niveles de anticuerpos anti FH7 de isotipo IgG y/o IgA por ELISA. Para evaluar la respuesta celular se realizó a los 60 dp3i: 1) un ensayo de hipersensibilidad retardada (DTH) inoculando en la almohadilla plantar derecha de cada ratón 30 µl con 5 µg de FH7 y el mismo volumen de PBS en la izquierda, y se midió la diferencia de hinchazón a 72 hs (Δ mm FH7-PBS). 2) un ensayo de proliferación celular frente a estímulo inespecífico (anti-CD3 10 µg/mL; anti-CD28 5 µg/mL) durante 5 días a partir de linfocitos de bazo de ratones inmunizados y controles (n=3) por tinción con éster de succinimidil-carboxifluoresceína (CFSE) y posterior análisis por citometría de flujo. El análisis estadístico empleado en todos los casos fue un t test de Student. Resultados: se observó una significativa respuesta humoral en materia fecal hasta los 63 dp3i (DO₄₉₂ dilución 1/8 ratones controles vs inmunizados: IgA anti-FH7= 0.009±0.078 vs 0.180±0.107, *p<0.05; IgG anti-FH7= 0.021±0.087 vs 0.627±0.158, ***p<0.001). Al mismo tiempo, se observaron niveles elevados de anticuerpos séricos IgG anti-FH7 (DO₄₉₂ dilución 1/128000 ratones controles vs inmunizados: 0.037±0.035 vs 0.227±0.064; ***p<0.001). Paralelamente, hubo una DTH reactiva en ratones inmunizados vs controles (0.4±0.10 mm vs 0.1±0.05 mm; ***p<0.001) y se observó una proliferación celular significativamente mayor en los ratones inmunizados en comparación con los controles (Intensidad de Fluorescencia Media controles vs inmunizados: 102.1±7.80 vs 69.6±4.43; **p<0.01). Los resultados obtenidos muestran a FH7 como un inmunógeno capaz de desencadenar una fuerte respuesta humoral y celular específica, tanto en la mucosa intestinal como a nivel sistémico, sugiriendo la importancia de incluirlo como potencial componente vacunal para prevenir los efectos sistémicos secundarios a la colonización con cepas *E. coli* O157:H7.

BUTIRATO Y ACETATO REDUCEN LA ADHESIÓN IN VITRO DE STEC EN CONCENTRACIONES QUE NO INHIBEN EL CRECIMIENTO BACTERIANO

FERNÁNDEZ BRANDO R, YEGER V, BERNAL A, SOSA F, RAMOS MV, PALERMO M.

Laboratorio de Patogénesis de Procesos Infecciosos, IMEX-CONICET-Academia Nacional de Medicina
fernandezbrandoromina@gmail.com

Actualmente, no existe una profilaxis efectiva o tratamiento para las infecciones entéricas con *Escherichia coli* productor de toxina Shiga (Stx) (STEC), ya que las terapias convencionales, con antibióticos, agentes antimotilidad, narcóticos y anti-inflamatorios no esteroideos, están relacionadas a un incremento del Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) o las complicaciones neurológicas, fundamentalmente a través del aumento de la producción de Stx. De esta forma, cuando un niño con diarrea tiene un coprocultivo positivo para STEC sólo se puede esperar a la resolución de la infección, siendo impredecible si evolucionará o no a SUH. Los ácidos grasos de cadena corta (AGCC; acetato, butirato y propionato) o su precursor (lactato), han mostrado tanto un efecto inmunomodulador a través de la disminución de la respuesta proinflamatoria de los enterocitos y las células mieloides, como un efecto proliferador en los enterocitos, contribuyendo al mantenimiento de la función de barrera intestinal. El objetivo de este trabajo fue evaluar los efectos de acetato (A), butirato (B) y lactato (L) en la modulación de la patogenicidad de STEC en las concentraciones 1, 10, 50 y 100 mM. Estudiamos la inhibición del crecimiento bacteriano luego de 3 hs de cultivo, la producción de las proteínas del sistema de secreción de tipo tres EspB/D, involucradas en la adhesión a células epiteliales intestinales, por SDS-PAGE, la adhesión bacteriana a células Caco-2 y la producción de Stx por ELISA y toxicidad en células Vero, en presencia de cada compuesto. Los resultados fueron analizados por el test Kruskal Wallis. Observamos que 50 mM de A y B, y 100 mM de los tres compuestos inhibió significativamente el crecimiento bacteriano comparado con el control: 0;1;10;50 y 100 mM ($p < 0,001$). Luego evaluamos si aquellas concentraciones que no inhibieron el crecimiento bacteriano tenían un efecto en la expresión de EspB/D. Aunque no detectamos diferencias en la expresión por SDS-PAGE, observamos un porcentaje de adhesión a células Caco-2 significativamente menor en la presencia de A y B 1 mM comparado con el control ($p < 0,05$), test Kruskal-Wallis. Por último evaluamos la producción de Stx2 en el sobrenadante de cultivo en presencia de 1 y 10 mM de los tres compuestos y no observamos diferencias significativas ($p = 0,1257$). En conclusión, acetato y butirato fueron capaces de reducir la adhesión de STEC a células Caco-2 en concentraciones que no inhiben el crecimiento bacteriano ni inducen la producción de Stx2. Debido a que la colonización intestinal es el primer paso en la patogénesis de STEC, sería interesante evaluar los mecanismos involucrados en la inhibición de la adhesión bacteriana a células epiteliales, tanto como si 1 mM de acetato y butirato tienen efectos inmunomoduladores en el intestino.

ANÁLISIS DE LA ESTABILIDAD DURANTE EL ALMACENAMIENTO DE CALOSTRO BOVINO HIPERINMUNE EN POLVO CONTRA *E. COLI* PRODUCTOR DE TOXINA SHIGA

GARIMANO N¹, DÍAZ VERGARA L², SODERO S², BADIN E², LESPINARD A², GIRÓN REYES D¹, PORPORATTO C², MONTENEGRO M² IBARRA C¹, SACERDOTI F¹.

1. Laboratorio de Fisiopatogenia, Dpto. Cs Fisiológicas, IFIBIO-Houssay, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.
2. Instituto Multidisciplinario de Investigación y Transferencia Agroalimentaria y Biotecnológica (IMITAB-CONICET), UNVilla María, Córdoba. flasacerdoti@gmail.com

Las infecciones por *E. coli* productor de toxina Shiga (STEC) pueden causar diarrea sanguinolenta, colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico (SUH). La toxina Shiga (Stx) es el principal factor de virulencia de STEC responsable de desencadenar el SUH. Previamente demostramos que el calostro hiperinmune proveniente de vacas inmunizadas con Stx tipo 2 (HIC-Stx2), previene la citotoxicidad de Stx2 in vitro y la patogenicidad de STEC O157:H7 in vivo, y que estas propiedades se conservan luego de la obtención del producto pasteurizado y secado por aspersión. El objetivo de este trabajo es determinar si las propiedades fisicoquímicas y biológicas del polvo procesado se preservan durante el almacenamiento a distintas temperaturas. Una vez obtenido el HIC-Stx2, se fraccionó en tubos de polipropileno y se conservó refrigerado en heladera y a temperatura ambiente. Se determinó a tiempo 0, 30, 60 y 90 días los niveles de proteínas totales por la técnica de Biuret, IgG totales y lactoferrina por la técnica de ELISA, lactosa, materia grasa y sólidos totales por espectroscopia NIR, humedad por el método gravimétrico y color con un colorímetro basado en el espacio de color CIELab. Se determinó el recuento en placa de mesófilos totales, coliformes totales y *E. coli* y se analizó la capacidad neutralizante de la actividad citotóxica de Stx2 sobre células Vero. Observamos que la temperatura de almacenamiento no tuvo efecto sobre los parámetros fisicoquímicos y la capacidad neutralizante de HIC-Stx2. Sin embargo, el almacenamiento durante 90 días produjo una reducción en los niveles de IgG totales, lactoferrina, proteínas, materia grasa y lactosa, observándose consumos del 50, 76, 75, 91 y 88 %, respectivamente. La humedad y el color de los polvos no presentaron cambios durante el almacenamiento. Los recuentos de coliformes totales y *E. coli* se mantuvieron por debajo de las 10² UFC/g polvo para todos los tiempos y temperaturas de almacenamiento. Los recuentos de mesófilos totales fueron

inferiores a 10^4 UFC/g (límite establecido por el Código Alimentario Argentino, para calostro) hasta los 60 días de almacenamiento, mientras que a los 90 días se observó un aumento hasta 10^5 y 10^6 UFC/g para los polvos almacenados bajo refrigeración y temperatura ambiente, respectivamente lo que indica que el almacenamiento refrigerado preserva la calidad microbiológica de los polvos hasta 90 días, mientras que a temperatura ambiente lo hace hasta 60 días. La capacidad de neutralización de HIC-Stx2 *in vitro* se conservó a ambas temperaturas de almacenamiento por un período de 90 días ($p > 0.05$, n.s.). Sin embargo, proponemos mejorar la conservación de los parámetros de degradación proteica observados a 90 días mediante el agregado de un estabilizador térmico y antioxidante para asegurar el mantenimiento de la capacidad neutralizante de HIC-Stx2 a largo plazo.

BACTERIÓFAGOS PARA EL CONTROL DE STEC O157: H7

JUÁREZ AE¹, KRÜGER A¹, LUCCHESI P.

Centro de Investigación Veterinaria de Tandil (CIVETAN), Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, Tandil. anajuaraz@vet.unicen.edu.ar

Escherichia coli productora de toxina Shiga (STEC) representa uno de los principales agentes causales de enfermedades transmitidas por alimentos con mayor relevancia en Argentina. El serotipo O157:H7 es el que se aísla con mayor frecuencia, siendo detectado en el 58% de los casos de síndrome urémico hemolítico según el último informe del Ministerio de Salud. Es así que resulta apremiante desarrollar herramientas para el control del mismo. En relación a esto, los fagos, predadores naturales de bacterias, han comenzado a ganar importancia para el biocontrol de bacterias patógenas en la industria alimentaria. Los fagos son reconocidos por su especificidad de hospedador, que generalmente depende de las fibras y/o las espículas de la cola, las cuales determinan el tipo de receptor bacteriano al que podrán unirse. Según estudios previos, es posible mejorar la capacidad de adsorción de los fagos mediante su entrenamiento con el hospedador de interés.

Nuestro objetivo fue detectar y aislar fagos efectivos contra STEC O157:H7 a partir de muestras recolectadas de materia fecal bovina, bebederos y efluentes de tambos. Luego de un pre-cultivo de las muestras, se realizó un *screening* del efecto lítico sobre STEC O157:H7 mediante la técnica de *spot test*. Posteriormente, se purificaron los fagos a partir de las muestras positivas, por el método de la doble capa de agar. Se preparó un stock de alto título de cada fago purificado, el cual se utilizó para determinar la presencia/ausencia del gen *stx2* por PCR y evaluar el efecto sobre 3 cepas O157:H7 mediante *spot test*. En uno de los casos, que mostraba una baja producción de placas de lisis sobre una de las cepas, se buscó potenciar el efecto mediante un protocolo de entrenamiento basado en una serie de pasajes consecutivos sobre dicha cepa.

Del total de 29 muestras, 12 tuvieron efecto lítico sobre STEC O157:H7 en el *screening* y permitieron aislar 13 fagos. Con la mayoría de ellos, se obtuvieron placas de lisis al menos sobre 2 de las cepas O157:H7 y resultaron negativos para *stx2*. En el caso del fago enfrentado con una cepa O157:H7 para mejorar su eficiencia se observó que tras 4 pasajes las placas de lisis obtenidas tenían mayor turbidez.

Este estudio permitió aislar un importante número de fagos del ambiente de tambos con actividad lítica contra STEC O157:H7. Si bien los fagos obtenidos no son portadores del gen *stx2*, son necesarios más análisis para garantizar la seguridad de su empleo como agentes de biocontrol. En los casos que se requiera el aumento de la eficiencia de alguno de los fagos, se deberán probar nuevas estrategias, sin embargo, la alta proporción de fagos efectivos que se pudieron aislar asegura una prometedora herramienta para control de STEC O157:H7.

ASLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DEL POTENCIAL ANTAGÓNICO DE *LIGILACTOBACILLUS MURINUS* 26B1 DE TRACTO INTESTINAL DE RATÓN FRENTE A *E. COLI* O103 ENTEROPATÓGENA

SANDOVAL I, PALMA J, LLORENTE A

Laboratorio de Bioconservación, Unidad de Investigación Multidisciplinaria, FES Cuautitlán UNAM. llorente@unam.mx

Escherichia coli enteropatógena (EPEC) es agente causal importante de diarrea infecciosa en niños, también se le ha identificado como responsable de diarrea en conejos, pollos y perros, produce una patología denominada lesión de adherencia y eliminación de las microvellosidades (lesión A/E). El objetivo de este estudio fue aislar *Lactobacillus* spp. de tracto intestinal de ratón, identificarlos con técnicas moleculares y herramientas informáticas, y caracterizar su potencial antagonico con el fin de evaluar su posible uso como probióticos. En el presente trabajo se aisló *Lactobacillus murinus* 26B1 de tracto intestinal de ratón y se caracterizó por técnicas microbiológicas de morfología colonial, tinción de Gram, observación al microscopio óptico y perfil de fermentación de carbohidratos. Se utilizaron técnicas moleculares de PCR con el gen 16S ARNr y tras la purificación de los amplificados, estos fueron secuenciados para su identificación filogenética con herramientas bioinformáticas. Para aprobar su investigación como posible probiótico, se determinó ausencia de actividad hemolítica en agar sangre. Se construyeron las cinéticas de crecimiento de la cepa de *Ligilactobacillus murinus* 26B1 para identificar sus fases de crecimiento y determinar la concentración de proteínas y el perfil electroforético de los sobrenadantes de cultivo en fase logarítmica. Con las células y

estos sobrenadantes en fase logarítmica, se evaluó su actividad antagónica frente a *Escherichia coli* enteropatógena, aislada de conejo (REPEC O103 K2) mediante difusión en agar (Spot on the lawn). En paralelo a la cuantificación de proteínas, se obtuvo el perfil electroforético (SDS-PAGE) y se realizaron zimografías de actividad in situ al co polimerizar células en fase logarítmica de *Escherichia coli* REPEC O103 K2 o *Micrococcus lysodeikticus* ATCC 9648 como control. Se obtuvieron halos de inhibición de 20 ± 1.0 mm, cuando se desafió *E. coli* REPEC O103 K2, con células viables de *L. murinus* 26B1, mediante la técnica de Spot on the lawn. Se caracterizaron los sobrenadantes de cultivo de *L. murinus* 26B1 de fase logarítmica temprana y tardía en su contenido de proteínas (Bradford) (1.49 ± 0.010 a 2.19 ± 0.026 mg/mL respectivamente), seguido del análisis de sus perfiles electroforéticos mediante SDS-PAGE. En los zimogramas con *Escherichia coli* REPEC O103 K2, se identificó una banda de lisis, con masa molecular relativa de 24 ± 0.72 kDa, cuya banda de proteína correspondió a una masa molecular relativa de 25 ± 1.5 kDa, la cual podría corresponder a una sustancia similar a bacteriocina, dada su naturaleza proteica. En los geles control con *M. lysodeikticus* se identificó una banda lítica de alrededor de 109 ± 1.72 kDa, que corresponde con lo citado en la literatura a la presencia de un péptido glicano hidrolasa, dada su naturaleza proteica y su masa molecular relativa. Ambas bandas líticas corresponden a unos de los mecanismos de antagonismo bacteriano más importantes de las bacterias lácticas. Se aislaron y caracterizaron por técnicas microbiológicas e identificados por técnicas moleculares y herramientas bioinformáticas, la cepa de *L. murinus* 26B1 de tracto intestinal de ratón. La ausencia de actividad hemolítica y su significativa actividad inhibitoria frente a *E. coli* enteropatógena permiten reconocer la importancia de encontrar nuevas estrategias para el control de patógenos de interés clínico como *Escherichia coli* REPEC O103 K2 y coloca a *L. murinus*, como un interesante candidato, para su uso en nuevas estrategias en el control de este patógeno emergente.

EVALUACIÓN DEL POTENCIAL PREBIÓTICO DE XILOOLIGOSACÁRIDOS OBTENIDOS A PARTIR DE RESIDUOS AGROINDUSTRIALES

ROMANO CL¹, PISA JH^{1,2}, HERO JS¹, MARTÍNEZ MA^{1,3}.

1. Planta Piloto de Procesos Industriales Microbiológicos (PROIMI-CONICET). 2. Universidad de San Pablo T (USPT) 3. Facultad de Ciencias Exactas (FACET-UNT). biocarlaromano@gmail.com

Los prebióticos son componentes alimentarios, generalmente fibras no digeribles, que favorecen el crecimiento selectivo de microorganismos beneficiosos de la flora intestinal en humanos y animales. Numerosos estudios han demostrado que la proliferación de estas bacterias probióticas no sólo refuerza el sistema inmune del hospedador, sino que también ayudan a prevenir y combatir infecciones causadas por bacterias enteropatógenas, tales como *Escherichia coli* O157:H7, entre otras. El objetivo de este trabajo es evaluar la utilización de moléculas potencialmente prebióticas obtenidas por hidrólisis enzimática de xilanos procedentes de las materias primas secundarias salvado de trigo, bagazo de caña de azúcar y cáscara de arroz. Los xilooligosacáridos (XOS) fueron obtenidos por la acción simultánea de xilanasas recombinantes de *Cohnella* sp. AR92, pertenecientes a las familias GH10 y GH11 (2 UI/mL de cada enzima), utilizando como sustrato xilanos fraccionados de las materias primas mencionadas. Las reacciones enzimáticas se llevaron a cabo en tampón fosfato pH 6, 100 mM durante 8 h a 50 °C. Los XOS fueron recuperados de la fracción soluble por centrifugación y concentrados por liofilización, para ser luego adicionados, en una concentración final de 2 g/L, al medio LAPTG preparado sin fuente de carbono. Los XOS fueron usados de manera individual y mezclados con inulina, con controles de crecimiento con glucosa, inulina y LAPTG sin fuente de carbono. Los microorganismos utilizados fueron *Lactobacillus brevis* D5MZ 269, *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917, *Lactobacillus reuteri* y *Weissella cibaria* 92. Los cultivos se incubaron a 37° C en condiciones estáticas durante 72 hs. Se realizaron mediciones de pH y determinaciones de crecimiento por medidas de DO 600 nm y recuento de colonias en placas con medio sólido. *L. brevis* tuvo un crecimiento satisfactorio en todos los medios evaluados. Los máximos valores de DO (superior a 2) y UFC (superiores a 10^8 UFC/mL) fueron alcanzados en los medios suplementados con la combinación XOS e inulina. En estos medios, se observó una caída de pH de entre 0,8 a 1,3 unidades. *L. plantarum* y *W. cibaria* 92 crecieron de manera similar en los medios suplementados con inulina, glucosa y con la combinación de inulina y XOS, con máximos observados cuando los XOS derivaron de bagazo de caña de azúcar, donde además se registró la mayor caída de pH: 5,27 para *L. plantarum* y 5,75 para *W. cibaria*. *L. reuteri* mostró escaso crecimiento en los medios con XOS, sin acidificar los mismos, mientras que se desarrolló positivamente con glucosa e inulina, indicando que este microorganismo no utilizaría XOS. Los resultados sobre el crecimiento de *L. brevis* D5MZ 269, *L. plantarum* ATCC 14917 y *W. cibaria* 92 utilizando una combinación de inulina y xilooligosacáridos obtenidos de subproductos agroindustriales (principalmente de xilano de bagazo de caña de azúcar), permiten agregar valor a materias primas secundarias como una alternativa promisoriosa y sostenible en la elaboración de alimentos funcionales. La incorporación en las dietas de estos XOS podría contribuir al mejoramiento de la flora intestinal, previniendo la proliferación de bacterias patógenas.

EFFECTO PROTECTOR DEL ELIGLUSTAT FRENTE AL DAÑO CAUSADO POR LA TOXINA SHIGA 2 EN UN MODELO DE SINDROME UREMICO HEMOLITICO

SÁNCHEZ DS, FISCHER SIGEL LK, AMARAL MM, SILBERSTEIN C.

Departamento de Cs. Fisiológicas, Instituto de Fisiología y Biofísica Bernardo Houssay (IFIBIO-HOUSSAY)-CONICET, Facultad de Medicina, UBA. daaisanchez@gmail.com

La toxina Shiga (Stx) producida por *E. coli*, responsable del Síndrome Urémico Hemolítico (SUH), se une al receptor globotriaosilceramida (Gb3) en la superficie de las células renales, causando inhibición de la síntesis de proteínas y apoptosis que conduce a la muerte celular. El fármaco Eliglustat (EG, Sanofi), que inhibe la glucosilceramida sintasa, primer paso de biosíntesis de los glucoesfingolípidos, fue aprobado por la ANMAT para el tratamiento en la enfermedad lisosomal de Gaucher. En estudios recientes realizados en cultivos primarios de células epiteliales tubulares de riñón humano (HRTEC), demostramos que el pretratamiento con EG disminuyó significativamente la expresión del Gb3 y protegió a las células de la apoptosis y la inhibición de la viabilidad, proliferación celular y tubulogénesis, causadas por Stx2 (Sánchez y col, *Pediatric Res* 2021). La protección del EG en los cultivos de HRTEC fue significativamente más eficiente que la de otros inhibidores de Gb3 estudiados previamente. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto protector del tratamiento oral con el fármaco EG frente al daño causado por Stx2 en un modelo de SUH en ratas. Ratas Sprague-Dawley macho juveniles recibieron tratamiento oral diario con o sin EG (15 mg/día), desde 48 horas previas a la inyección intraperitoneal (i.p.) con una dosis letal de Stx2 pura (5 ng/g de peso) o diluyente, seguido de 48 hs de tratamiento post-inyección. Se midió el peso, la ingesta de agua y alimento diariamente y la sobrevivencia de las ratas. A las 48 hs post-inyección, se recolectó la orina de 24 hs, se midieron el flujo urinario y los niveles de creatinina en suero y orina. Se procesaron los tejidos renales y se evaluó la histopatología en cortes histológicos teñidos con PAS. La inyección i.p. con Stx2 causó una disminución significativa del peso y la ingesta de agua y alimento y provocó la mortalidad de las ratas entre las 72-96 hs posteriores (n=9). A las 72 hs post-inyección se observó un aumento sérico de creatinina (Creat: $22,8 \pm 2,9$ mg/L) y una disminución del clearance de creatinina (Cl_{creat} : $0,11 \pm 0,07$ ml/min) con respecto a las ratas controles (Creat: $8,6 \pm 1,1$ mg/L, Cl_{creat} : $0,38 \pm 0,1$ ml/min, n=6, p<0,01) que evidenció la lesión renal. El 100% de las ratas tratadas con EG sobrevivió al efecto de Stx2, sin disminuir significativamente el peso. El pretratamiento oral con EG redujo significativamente el daño renal (Creat: $13,9 \pm 1,2$ mg/L, Cl_{creat} : $0,21 \pm 0,04$ ml/min), con disminución de la necrosis y de la dilatación tubular renal causadas por Stx2. El flujo urinario no presentó diferencias significativas entre los grupos. Las ratas tratadas solo con EG mostraron valores similares a las ratas controles sin tratamiento en todos los parámetros estudiados. En conclusión, el pretratamiento con EG previno la mortalidad y protegió del daño renal ocasionado por Stx2 en las ratas. A partir de nuestros resultados, se sugiere que el fármaco EG podría ser usado como estrategia terapéutica para prevenir el daño renal causado por Stx2 en pacientes con SUH.

SENSIBILIDAD DE *Escherichia coli* PRODUCTOR DE TOXINA SHIGA AL GEL DE HIDRÓXIDO DE BISMUTO

VÉLEZ MV¹, GARCÍA MD¹, COLELLO R¹, FERNÁNDEZ D¹, ETCHEVERRÍA AJ¹, GAGUINE S², PADOLA NL¹.

1. Laboratorio de Inmunoquímica y Biotecnología, CIVETAN-CONICET, CICPBA, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNCPBA, Tandil, Argentina. 2. Laboratorio Soubeiran Chobet SRL Buenos Aires, Argentina. mvictoriavelez@vet.unicen.edu.ar

Escherichia coli productor de toxina Shiga (STEC) es el agente productor de enfermedades severas como la colitis hemorrágica (CH) y síndrome urémico hemolítico (SHU) que afecta principalmente a niños. La enfermedad se produce por la ingestión de alimentos y agua contaminados, contacto con el medio ambiente o contacto persona-persona. Diversos serotipos de STEC son responsables de producir la enfermedad, siendo en Argentina, O157:H7 y O145:H-, los más prevalentes en casos humanos. Los bovinos de diferentes sistemas productivos son considerados los principales reservorios de STEC, eliminando este patógeno en sus heces en forma intermitente, siendo ésta, la manera en que puede ingresar a la cadena productiva con el riesgo de contaminar alimentos y llegar de esa manera al consumidor. Todas las herramientas de control que puedan adoptarse para la reducción o eliminación de STEC de distintas fuentes, redundarán en un beneficio para la salud pública. El gel de hidróxido de bismuto es un principio activo farmacéutico con indicación en el tratamiento de la diarrea aguda y cuádruple terapia de erradicación del *Helicobacter pylori*. Si bien no se trata de un antibiótico, sus mecanismos de acción incluyen la inhibición de factores de patogenicidad e inhibición del crecimiento y viabilidad de numerosos patógenos intestinales. El gel está compuesto por una fase continua sólida de hidróxido de bismuto, dispersa en agua. El principio activo presenta un tamaño de partícula en promedio de 19,5 µm, resultando en una superficie específica de contacto de 466,4 m²/l. El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la sensibilidad de dos cepas STEC de diferentes serotipos aisladas de bovinos, frente a distintas diluciones de una suspensión coloidal (gel) de hidróxido de bismuto (40,8 g/l). Se prepararon caldos de LB a los que se les agregó gel de hidróxido de bismuto en distintas proporciones, resultando dos concentraciones diferentes: 4,08g/l y 8,16 g/l. A cada una de estas preparaciones se les agregó, por separado, 10³ ufc/ml de STEC O157:H7, aislada de un bovino de pastoreo, y 103 ufc/ml STEC O145:H-, aislada de un bovino de tambo. Dos caldos LB sin gel de hidróxido de bismuto, inoculados con cada una de las cepas STEC se utilizaron

como controles y se incubaron a 37 °C en agitación. La sensibilidad de las dos cepas utilizadas se determinó mediante el recuento de ufc en placas de LB a diferentes tiempos de incubación. Se pudo observar que en el caso de STEC O157:H7 hubo una disminución significativa en el recuento de ufc respecto al control, en ambas concentraciones de gel de hidróxido de bismuto a las 2 hs de incubación. Para STEC O145:H-, la reducción en el número de ufc se pudo observar solo en la concentración de 8,16 g/l de hidróxido de bismuto a las 2 h de incubación. Estos resultados demuestran que el gel de hidróxido de bismuto, indicado como antidiarreico, podría utilizarse como herramienta útil y segura para ser aplicada en distintas estrategias para reducir la carga bacteriana de STEC, destacando como objetivo final limitar la llegada de estos patógenos al consumidor.

MESA REDONDA

POLÍTICAS DE CONTROL Y PREVENCIÓN

COORDINADORAS:

ALEJANDRA RICCA

EEA AMBA INTA-UNAHUR, Provincia de Buenos Aires. alejandra.ricca@gmail.com

MARCELA BELARDO

CONICET-Instituto Estudios Sociales en Contexto de Desigualdades (IESCODE-UNPaz), Provincia de Buenos. marcelabelardo@yahoo.com.ar

PARTICIPANTES:

ALEJANDRA RICCA

EEA AMBA INTA-UNAHUR, Provincia de Buenos Aires. alejandra.ricca@gmail.com

MARCELA BELARDO

CONICET-Instituto Estudios Sociales en Contexto de Desigualdades (IESCODE-UNPaz), Provincia de Buenos. marcelabelardo@yahoo.com.ar

VALERIA ONTIVEROS

Directora de Industrias y Productos Alimenticios. Dirección Provincial de Fiscalización Agropecuaria, alimentaria y de los Recursos Naturales. Ministerio de Desarrollo Agrario, Provincia de Buenos Aires.

VALERIA ROSSI

Supervisora de salud ambiental, Ministerio de Salud de la provincia de Río Negro.

En Argentina el Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) es una enfermedad endémica que afecta principalmente a niños/as menores de 5 años. La enfermedad fue descubierta en 1964 por el médico argentino Dr. Carlos Giannantonio, y desde entonces ha sido un tema relevante para la investigación básica, clínica y epidemiológica de nuestro país. Se contrae al consumir agua o alimentos contaminados y mal cocidos. La bacteria *Escherichia coli* puede ingresar al organismo a través de las carnes poco cocidas, sobre todo carne picada, verduras crudas, leche o productos lácteos sin pasteurizar, el agua no potable, por contaminación cruzada, y por contagio de persona a persona. Luego de más de 40 años desde su descubrimiento, la enfermedad ingresó a la agenda gubernamental y se colocó como un tema de importancia para la salud pública humana y animal, creándose en 2009 un Programa Nacional de SUH (PNSUH) a cargo de la Dirección de Maternidad e Infancia dependiente del Ministerio de Salud de la Nación, que articulaba diferentes estrategias de control y prevención de la enfermedad que abarcaba desde el fortalecimiento de la vigilancia epidemiológica, las medidas para el control de puntos críticos de la cadena alimentaria (del campo al plato) y las medidas de prevención para la población. Su objetivo principal era conformar un plan integral, multidisciplinario e interministerial para disminuir la incidencia de la enfermedad. Pero el programa nunca se implementó. En el 2015 la comunidad científica organizada y las asociaciones civiles logran una nueva versión del programa originando la Unidad de Trabajo Intersectorial (UTI) impulsado por el Ministerio de Salud de la Nación con el argumento de que ese formato permitiría un mejor abordaje de la enfermedad entre distintas áreas del propio ministerio, así como entre otros ministerios. Una vez más quedó sin implementación. A partir de estos antecedentes la mesa redonda "Políticas públicas de control y prevención del SUH" expondrá diferentes estrategias que se desarrollan en los territorios a nivel local y provincial, sus avances y las dificultades en su articulación. La mesa tiene como objetivo fomentar la articulación de una red nacional de investigadores/as en salud, profesionales de la salud y ONGs con el fin último de re-impulsar un programa nacional integral para el control y prevención del SUH y las enfermedades de transmisión alimentaria (ETA).

Resumen de Cierre de Presentaciones

DR. ANGEL CATALDI

Instituto de Agrobiotecnología y Biología Molecular (IABIMO INTA-CONICET). cataldi.angeladrian@inta.gob.ar

ARCHIVOS LATINOAMERICANOS DE NEFROLOGÍA PEDIÁTRICA

REGLAMENTO DE PUBLICACIONES

Archivos Latinoamericanos de Nefrología Pediátrica es la publicación oficial de la **Asociación Latinoamericana de Nefrología Pediátrica (ALANEPE)**.

Acepta para su publicación Artículos Originales en español, portugués e inglés. Artículos de Investigación Clínica o Experimental, Medicina Social, Salud Pública y Bioética relacionados con la Nefrología Pediátrica.

ALANEPE se reserva todos los derechos sobre los manuscritos presentados.

Las decisiones editoriales finales son tomadas por el Comité Editorial, y la responsabilidad final corresponde al Director Editor de la Revista. Se reservan el derecho de rechazar artículos por razones éticas técnicas o científicas, así como sugerir modificaciones.

El manuscrito debe ser presentado por medios electrónicos, a doble espacio, Fuente 12, MS Word o equivalente

Cada presentación debe ser enviada con un **consentimiento de autoría y divulgación de potencial conflicto de interés**, forma que se puede encontrar en la página de ALANEPE y el consentimiento del Comité de Ética correspondiente y debe ser enviado por correo electrónico a: raexeni@gmail.com

LA PUBLICACIÓN MÚLTIPLE

El Comité Internacional de Revistas Médicas (Grupo de Vancouver) aprobó una declaración de la publicación múltiple en mayo de 1983, como una guía para los autores y editores.

Publicaciones Múltiples son aquellas que se centran en la misma información, el contenido y el análisis, aunque su edición y presentación pueden ser diferentes. Las publicaciones múltiples pueden

ser paralelas o repetidas; **publicación paralela** es que se produjo para los lectores cuya lengua principal es diferente de la publicación primaria, y por lo tanto no tendrían acceso a la publicación primaria; esto también se llama la **publicación bilingüe**.

Esta clasificación incluye publicaciones secundarias dirigidas a médicos que no utilizan habitualmente métodos de indexación en su metodología actualización periódica. **Repetido o publicación duplicada** se refiere a la publicación múltiple para los lectores que son compartidos por fuentes primarias y secundarias y, posiblemente, utilizan métodos de indexación similares.

La política Editorial respecto a publicaciones múltiples es la siguiente:

Publicación en paralelo se acepta si:

- Los editores de ambas revistas se les informa, y el editor de la segunda revista tiene una reproducción de la primera versión;
- La prioridad de la primera publicación se respeta en un intervalo de al menos 2 semanas;
- El contenido de la segunda versión está escrita para un grupo diferente de lectores; en otras palabras, se trata de una simple traducción de la primera de la que a veces una versión condensada será suficiente;
- La segunda versión refleja fielmente la información y de la interpretación de la en primer lugar;
- Una nota al pie en la primera página de la segunda versión informa a los lectores y agencias de documentación que el trabajo fue editado y se publica para un público paralelo, utilizando la misma información. La primera página de la nota debe dar referencia suficiente y adecuada a la primera versión,
- En el curriculum vitae y los informes de productividad, las publicaciones paralelas se debe indicar de manera inequívoca.

La revista no acepta repetida o duplicada.

Archivos Latinoamericanos de Nefrología Pediátrica se adhiere a los principios definidos por el Consejo de Editores Científicos (CSE) disponible en http://www.councilscienceeditors.org/services/draft_approved.cfm.

Todos los manuscritos recibidos son revisados por dos expertos que pertenecen a una institución diferente a la que se originó el manuscrito. Los originales serán devueltos al autor para incorporar las sugerencias de los revisores. Los autores tienen 45 días para presentar la versión corregida. En caso de un conflicto de intereses entre autores y expertos, se debe agregar una nota a la sección de “Comentarios del Editor”. Esta información se mantendrá confidencial.

CUESTIONES ESPECÍFICAS

Las contribuciones se clasifican de la siguiente manera:

1. Editoriales

Los editoriales son ensayos breves que expresan el punto de vista del autor sobre un tema de Nefrología Pediátrica o sobre una publicación de investigación o revisión publicada en la misma edición. En general, son solicitados por el Comité Editorial a un autor o grupo de autores que se especializan en un tema.

Su contenido puede estar relacionado con un tema de puesta al día, o puede presentar el punto de vista de la Revista con respecto a un tema, sino que también podría referirse a las políticas editoriales, en cuyo caso, será firmada por los responsables de la editorial.

La longitud máxima recomendada es de 5 páginas de texto, con 10 o menos referencias bibliográficas; no hay tablas o figuras, y tampoco Resumen.

2. Caso Clínico

El objetivo de la publicación de casos clínicos es informar y educar sobre aspectos específicos no descritas de una condición clínica específica o síndrome, para presentar un caso ilustrativo de una condición de baja prevalencia, o para informar de aspectos poco conocidos o de reciente desarrollo en los procedimientos de diagnóstico o terapéuticos.

La estructura debe ser similar a un artículo original y denominado “Casos Clínicos”. Debe incluir una introducción, objetivos, Caso Clínico en detalle, y una conclusión.

La longitud máxima recomendada es de 5 páginas de texto (1.500 palabras), con máximo de 15 referencias bibliográficas, y un número máximo de 2 tablas o figuras.

3. Artículo Original

Los artículos originales informan los resultados de los estudios de investigación en ciencias básicas o clínicas. Debe contener suficiente información para que el lector pueda evaluar los resultados, repetir los experimentos y evaluar los procesos intelectuales que se contienen en el artículo.

Este tipo de manuscrito debe ser muy estructurado. Se debe incluir un Título, Resumen en español/portugués e inglés, Introducción, Pacientes/Materiales y Métodos, Resultados, Discusión, Conclusiones. Esta estructura debe aplicarse también a los resúmenes, que debe ser presentado en español/portugués e inglés. La longitud máxima recomendada es de 3.000 palabras, con 30 o menos referencias bibliográficas, se pueden incluir un número máximo de 4 tablas o figuras.

Los artículos de informes de ensayos clínicos de intervención terapéutica deben estar registrados en uno de los registros de ensayos clínicos recogidos por la Organización Mundial de la Salud y el Comité Internacional de Editores de Revistas Médicas. En la ausencia de un registro latinoamericano, se sugiere que los autores utilicen el registro www.clinicaltrials.gov, de los Institutos Nacionales de Salud (NIH). La identificación debe ser presentada al final del resumen.

Las instrucciones detalladas para las secciones siguen:

3.1. Página de título

Debe contener el nombre de los autores, profesión, especialidad y afiliación institucional.

3.2. Resumen

El resumen debe ser en español/portugués e inglés, y debe contener un resumen de menos de 250

palabras que describen: a) Objetivo, b) Pacientes y métodos, c) Principales resultados en forma cuantitativa si corresponde, y d) las conclusiones.

3.3. Pacientes y métodos

En esta sección se describe claramente la selección de sujetos para el estudio. Métodos, instrumentos y procedimientos se identifican con suficiente precisión para permitir a otros observadores a reproducir los resultados. Al utilizar los métodos establecidos y de uso frecuente, es suficiente con nombrar y citar referencias.

Cuando se publiquen métodos poco conocidos se debe proporcionar una breve descripción. Cuando los métodos son nuevos, o los métodos anteriores se modifican, deben incluirse descripciones precisas, con la justificación de su uso y la explicación de las limitaciones.

Cuando los experimentos se llevan a cabo en seres humanos o animales, es fundamental que se haga una declaración de que el proceso se revisará en función de la Declaración de Helsinki (1975) por una "ad hoc" Comité de Ética de la institución donde se realizó la investigación. El Consentimiento informado es imprescindible debiendo agregarse una copia junto con la carta de aceptación del Comité de Ética.

Todos los fármacos y compuestos químicos deben ser identificados por su nombre genérico, dosis y forma de administración. Siempre que sea posible, los pacientes deben ser identificados mediante números correlativos, no por sus, iniciales, o nombres. El número de sujetos y observaciones debe ser detallado, también el tamaño de la muestra, los métodos estadísticos y el nivel de significación estadística utilizada.

3.4. Resultados

Los resultados deben ser presentados secuencialmente, en concordancia con el texto, tablas y figuras. Los datos pueden ser mostrados en tablas o figuras, pero no ambos. Los resultados no deben ser descritos, así como se muestra en una tabla o figura. El texto sólo debe resumir o resaltar las observaciones más importantes. La presentación de

los resultados obtenidos en esta investigación no se debe mezclar con la discusión del tema.

3.5. Discusión

En esta sección se debe poner de relieve los aspectos nuevos e importantes del sujeto proporcionadas por su investigación y las conclusiones. Los datos de los resultados no deben ser repetidos. La implicancia de los hallazgos deben ser explícitos, sus limitaciones explicadas, y la relación con otros estudios deben ser exploradas en cada estudio e identificadas a través de la respectiva citación.

Las conclusiones deben ser sólidamente respaldadas por datos.

Los estudios que no hayan finalizado por el autor o de otros autores no deben ser utilizados como soporte o puntos de discusión. Nuevas hipótesis pueden ser ofrecidos en su caso, y claramente identificados como tales.

Esta sección termina con conclusiones obtenidas por los autores a partir de la experiencia.

3.6. Agradecimientos

Sólo las personas e instituciones que aportaron importantes contribuciones al trabajo pueden ser acusados.

3.7. Referencias

Las citas deben aparecer en el orden mencionado en el texto, las referencias deben ser identificados en el texto con números arábigos entre paréntesis, colocado al final del párrafo en el que se alude a. Deben ser numeradas Las referencias en cuadros o gráficos deben ser colocadas en el primer lugar en el que el texto alude a la tabla o gráfico correspondiente. Los nombres de las revistas deben abreviarse según la convención Index Medicus. Ninguna referencia se debe dar a las "observaciones no publicadas" ni "comunicación personal", que pueden ser insertadas entre paréntesis en el texto. Los trabajos oficialmente aceptados para publicación pueden ser incluidos; en ese caso, la referencia debe incluir, entre paréntesis, las palabras "en prensa". Los trabajos enviados para su publicación pero no aceptados oficialmente no se pueden añadir a las referencias, pero pueden ser citados en el texto entre paréntesis como "observaciones no publicadas".

El orden para cada cita debe ser la siguiente:

a) Artículos de revistas:

Apellido e inicial del autor (s). Mencione todos los autores cuando sean menores de seis, si tiene más de siete autores, citar los tres primeros, añadiendo 'et.al'.

El título, en su idioma original.

El nombre de la revista o la publicación del artículo debe ser abreviado según la nomenclatura internacional (Index Medicus), año de publicación, volumen, página inicial y final del artículo.

Ejemplo: 16. Guzmán S, Nervi F, Llanos O, et al. Despeje líquido alterada en los pacientes con pancreatitis aguda anterior. Gut. 1985; 26:888-891.

b) Capítulos de libros

Ejemplo: 18. Fine RN, Nissenson AR (2005). La diálisis clínica, cuarta edn. Appleton & Lange, Nueva York, pp 611-651.

c) Referencias electrónicas

3.8. Tablas

Cada tabla debe presentarse en hoja aparte, no en el texto. Los cuadros irán numerados en orden consecutivo, con un breve título. Cuando se requieran notas para aclarar el contenido, deben añadirse a los pies, no en la cabeza de la tabla. Las aclaraciones al pie de la tabla se deben añadir siempre que se utilicen abreviaturas no estándar. Cada tabla debe ser citada en forma consecutiva en el texto.

3.9. Figuras

Las figuras incluyen cualquier tipo de ilustración que no sea tabla (radiografías, electrocardiogramas, gráficos, ecos, etc.). Las reproducciones fotográficas son aceptadas. Las imágenes y tablas deben ser enviados como un archivo en formato .JPG o .TIFF, con una resolución mínima de 300 dpi o superior.

Las letras, números y símbolos deben ser claramente visibles en toda la superficie de la fotografía, y tener el tamaño suficiente para ser legible cuando está reducido para su publicación. Los símbolos, flechas o letras utilizadas para identificar las imágenes en las fotografías de preparaciones microscópicas

deben ser de tamaño y contraste suficiente para ser detectado desde el medio ambiente. Cada figura debe ser citada en el texto de forma consecutiva.

Si una figura se reproduce a partir de material publicado, la fuente debe ser identificada, y el permiso por escrito del autor o editor debe obtenerse para reproducirlo.

3.10. Medidas

Las unidades de medida deben corresponder al Sistema Métrico Decimal (Annals of Internal Medicine 1979; 90:98-99). En español, los decimales se marcan con una coma, y miles y múltiplos de mil están separados por un punto.

3.11. Las reimpresiones

Los artículos deben ser solicitadas por escrito después de recibir la aceptación de la publicación. El costo se paga directamente a la prensa por el autor.

3.12. Autores

Debe enviarse una lista de autores. Se debe incluir sólo aquellos individuos que han participado de manera significativa en la obra publicada, por lo que deben ser responsables de su contenido. Colaboradores son aquellos que han contribuido de manera efectiva en el estudio: a) diseño, b) la recopilación de datos, c) el análisis de datos, d) el análisis estadístico, e) la edición de manuscritos, f) otros (se debe especificar).

Los autores deberán ser profesionales debidamente identificados por su nombre, inicial del segundo nombre y apellido o apellidos. También deben identificar su especialidad y subespecialidad, y el Instituto al que pertenecen. En el caso de los estudiantes, ellos podrán participar como co-autores,

3.13. Agradecimientos y diversas contribuciones

Como apéndice al texto, lo siguiente se debe añadir las siguientes contribuciones: a) reconocidas que no son autoría; b) el reconocimiento de la asistencia técnica; c) el reconocimiento del apoyo material y financiero, y d) las relaciones financieras que puedan constituir un conflicto de intereses.

El apoyo financiero o material de cualquier na-

turalidad debe ser especificado. Si se acepta el papel, todas las demás relaciones financieras que puedan constituir un conflicto de intereses deben ser incluidos como se especifica en la carta adjunta.

4. Up to date

Este tipo de artículo es generalmente solicitado por el Comité Editorial de la Revista. Está escrito por reconocidos expertos en el tema, y contiene una visión general, los aspectos descritos recientemente, la experiencia personal del autor (s), y una propuesta para el futuro clínico y experimental en la zona.

5. Revisiones

Los artículos de revisión se resumen y analizan la información disponible sobre un tema específico sobre la base de una búsqueda cuidadosa de la literatura médica. Dado que los estudios individuales pueden ser afectadas por muchos factores, la combinación de sus resultados puede ser útil para llegar a conclusiones sobre la prevención, el diagnóstico o

el tratamiento de una enfermedad específica.

Deben incluir un resumen estructurado que contiene los principales aspectos examinados, las fuentes de donde se obtuvo la información, la metodología para la búsqueda y selección de artículos utilizados para la revisión.

La longitud máxima recomendada es de 6.000 palabras, con 30 o menos referencias bibliográficas recientes, un número máximo de 4 tablas o figuras se puede incluir.

6. Cartas al Editor

Cartas al Editor son una manera de que los lectores envíen preguntas o críticas de los sobre los artículos publicados. Los informes de investigación y casos breves también pueden ser publicados como cartas al Editor.

Pueden ser no más de 1.000 palabras de extensión, y contener más de cinco referencias. Se debe incluir un título que permita identificarlo.



ASOCIACIÓN LATINOAMERICANA
DE NEFROLOGÍA PEDIÁTRICA

ISSN 1667-4170

ARCHIVOS LATINOAMERICANOS DE
**NEFROLOGÍA
PEDIÁTRICA**

Órgano oficial de la Asociación
Latinoamericana de Nefrología Pediátrica

Miembro de la INTERNATIONAL PEDIATRIC NEPHROLOGY ASSOCIATION (IPNA)