



RIDAA
Repositorio Institucional
Digital de Acceso Abierto de la
Universidad Nacional de Quilmes



Universidad
Nacional
de Quilmes

Del Cogliano, Manuel Eugenio

Estudio del bacteriófago implicado en la expresión de la toxina Shiga



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Argentina.
Atribución - No Comercial 2.5
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.5/ar/>

Documento descargado de RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes de la Universidad Nacional de Quilmes

Cita recomendada:

Del Cogliano, M. E. (2020). Estudio del bacteriófago implicado en la expresión de la toxina Shiga. (Tesis de doctorado). Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Argentina. Disponible en RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes
<http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/1912>

Puede encontrar éste y otros documentos en: <https://ridaa.unq.edu.ar>

Estudio del bacteriófago implicado en la expresión de la toxina Shiga

TESIS DOCTORAL

Manuel Eugenio Del Cogliano

delcoglianom@gmail.com

Resumen

El Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) se define por la aparición simultánea de anemia hemolítica, trombocitopenia e insuficiencia renal aguda. Esto conduce a la lesión patológica denominada microangiopatía trombótica, que afecta principalmente al riñón, así como a otros órganos.

La principal causa de SUH son las infecciones con *Escherichia coli* productoras de toxina Shiga (STEC).

Argentina presenta la mayor incidencia a nivel mundial y, además, es la principal causa de falla renal aguda en la infancia y la segunda causa de trasplante renal en la adolescencia. 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. La expresión de toxina Shiga (Stx) por parte de las células huésped, fue reportada *in vitro* e *in vivo* por nuestro grupo de trabajo. Teniendo en cuenta estos reportes, la capacidad del bacteriófago de generar progenie e infectar bacterias susceptibles en el intestino, la incapacidad de desarrollar SUH de cepas mutadas en el mecanismo de escisión del bacteriófago y la evidencia bibliográfica sobre la capacidad de ciertos bacteriófagos de ser internalizados en células eucariotas, es que nos planteamos los siguientes objetivos: evaluar al bacteriófago como nuevo target terapéutico, evaluar la relevancia de la expresión de toxina Stx por parte de las células huésped y entender los mecanismos implicados en la internalización del bacteriófago 933W en células eucariotas.

Como los genes que codifican las dos subunidades de Stx se encuentran en genomas de bacteriófagos, se decidió evaluar el rol de la inducción de bacteriófagos en el desarrollo del SUH en ausencia del background genómico de la *E. coli* O157:H7, cepa patógena más relevante a nivel mundial. Los ratones se inocularon con una cepa de *E. coli* no patógena que llevaba el bacteriófago lisogénico 933W productor de toxina Stx (C600:933W), y se indujo la escisión del bacteriófago mediante el uso de antibióticos. Observamos que los ratones desarrollaron parámetros fisiológicos típicos de infección con *E. coli* patógena,

mostrando que el bacteriófago es suficiente para el desarrollo del SUH. Esto nos permite contar con un nuevo modelo de ratón para evaluar los enfoques terapéuticos centrados en el bacteriófago como nuevo *target*.

Con el objetivo de lograr neutralizar la capacidad infectiva del bacteriófago se testearon 2 compuestos: péptidos catiónicos e hidróxido de bismuto.

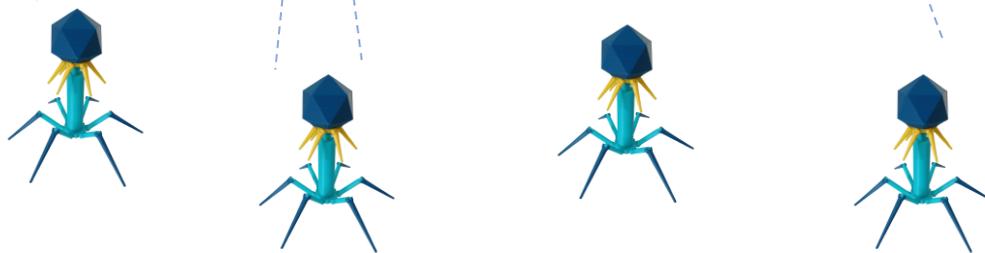
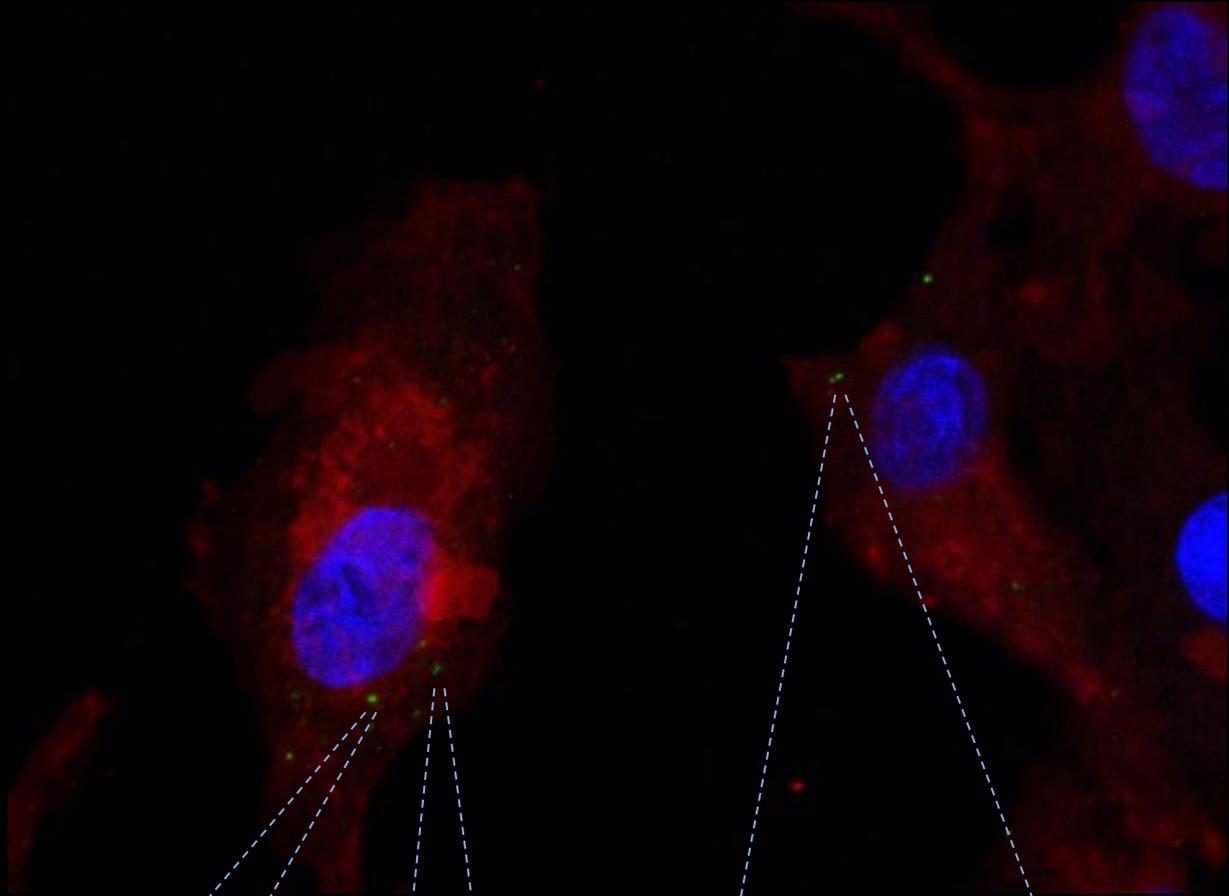
Hemos informado previamente la inactivación de bacteriófagos que codifican Stx luego del tratamiento con quitosan.

Los péptidos antimicrobianos catiónicos (cAMPs) son secuencias aminoácidas lineales cortas, con una carga neta positiva, que muestran actividad bactericida o bacteriostática contra una amplia gama de especies bacterianas. Para evaluar si las propiedades catiónicas son responsables de la inactivación de bacteriófagos, se probaron siete péptidos catiónicos con actividad antimicrobiana como agentes antibacteriofágicos y un péptido catiónico de secuencia aleatoria sin actividad antimicrobiana como control.

El uso del hidróxido de bismuto, un compuesto con efectos inhibitorios sobre cepas STEC y capaz de inactivar la toxina Stx, se estudió *in vitro* e *in vivo*. Mediante el uso de microscopía confocal y FACS, se comprobó la capacidad de internalización del bacteriófago en células eucariotas.

Teniendo en cuenta los resultados previos con hidróxido de bismuto y la bibliografía presente que informa del uso de motivos RGD, se evaluó la capacidad neutralizante de los mismos en un entorno eucariota.

ESTUDIO DEL BACTERIÓFAGO IMPLICADO EN LA EXPRESIÓN DE LA TOXINA SHIGA



Autor: Manuel Eugenio Del Cogliano

Dirección: Dra. Leticia Verónica Bentancor

Co-Dirección: Dr. Pablo Daniel Ghiringhelli

Índice

ÍNDICE	1
AGRADECIMIENTOS.....	7
ABREVIATURAS.....	9
RESUMEN	11
OBJETIVOS.....	15
Objetivo general	16
Objetivos específicos.....	16
INTRODUCCIÓN	17
Síndrome Urémico Hemolítico (SUH).....	18
Transmisión, reservorio y fuentes de contagio.....	20
SUH en Argentina.....	23
Fisiopatología y cuadro clínico.....	30
Tratamientos.....	32
Nuevos enfoques terapéuticos.....	32
Prevención.....	36
<i>Escherichia coli</i> Enterohemorrágicas (EHEC).....	38
<i>Escherichia coli</i> productoras de toxina Stx (STEC).....	38
Pruebas de laboratorio para las infecciones por STEC.....	39
Utilidad de medios de cultivo y estrategias.....	41
Factores de virulencia.....	46
Translocación desde el intestino.....	49
Efectos inflamatorios de la toxina Stx y lipopolisacáridos en el intestino.....	52
Toxicidad.....	52
Otros factores de virulencia.....	53
Reconocimiento eucariótico, <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> , de los promotores de Stx.....	55

Bacteriófago 933W	56
Bacteriófago lambda e internalización en células eucariotas	58
Bacteriófago como nuevo <i>target</i> terapéutico	60
Quitosan	61
Hidróxido de Bismuto.....	62
Péptidos catiónicos antimicrobianos (cAMPs)	62
Bacteriófagos en el cuerpo humano (Bacteriofagoma)	63
Interacción con el sistema inmune	64
MATERIALES Y MÉTODOS.....	67
Cepas bacterianas y líneas celulares.....	68
PCR.....	69
qPCR para la cuantificación del bacteriófago	70
Extracción de ADN	71
Geles de agarosa.....	71
Secuenciación Sanger de muestras.....	71
Plásmidos.....	72
Preparación de bacterias competentes	72
Inmunización de ratones	73
ELISA.....	74
Evaluación de IgG.....	74
Inducción y purificación de bacteriófagos (colchón de sacarosa)	75
Inducción y purificación de bacteriófagos (cloruro de cesio y diálisis)	76
Precipitación con polietilenglicol (PEG8000)	76
Purificación de bacteriófagos por gradiente de CsCl	76
Titulación	77
Estudio de la estabilidad de los bacteriófagos	78
Marcación del bacteriófago 933W.....	78
Procedimientos de PCR estándar.....	78

qPCR	79
Preparación de curvas estándar	79
Cuantificación por qPCR	80
Marcación para Citometría de flujo	81
Internalización del bacteriófago (mediante el uso de anticuerpos)	81
Internalización del bacteriófago (mediante Sybr Gold)	82
Integrinas.....	83
Neutralización de la entrada del bacteriófago	83
Hidróxido de Bismuto.....	84
Motivos RGD.....	84
Microscopía Confocal.....	84
Modelo animal.....	85
Preparación de cepas e inóculos	86
Curva de crecimiento bacteriano.....	86
Histología.....	86
Inmunohistología	87
Análisis de micrografías.....	88
Estudio del efecto neutralizante del Hidróxido de Bismuto <i>in vivo</i>	89
Estudio <i>in vivo</i> (2 dosis de bismuto).....	89
Estudio <i>in vivo</i> (3 dosis de Bismuto).....	89
Generación de mutante $\Delta pr1:933W$	90
Péptidos catiónicos (cAMPs)	94
Actividad Anti-Bacteriófago.....	95
Potencial Z	96
Dispersión dinámica de la luz	96
Análisis estadístico	97
Hidróxido de Bismuto.....	97
RESULTADOS.....	99

Estabilidad de los bacteriófagos	100
Desarrollo de anticuerpos anti-bacteriófago GFP en ratones	101
Evaluación de la respuesta inmune humoral sistémica mediante ELISA	101
Bacteriófago como target terapéutico.....	102
Péptidos anti-microbianos.....	102
Hidróxido de Bismuto.....	107
Construcción del bacteriófago 933W mutado en el promotor pr1 (C600:933W:pr1).....	108
Curvas de crecimiento de cepas <i>E. coli</i> C600, <i>E. coli</i> C600:933W y <i>E. coli</i> C600:933W:pr1	112
Optimización de la dosis a ser utilizada <i>in vivo</i>	113
Relevancia del bacteriófago 933W en el desarrollo del Síndrome Urémico Hemolítico	115
Los ratones infectados con <i>E. coli</i> C600:933W y <i>E. coli</i> C600:933W:pr1 murieron a las 72 horas post- infección	115
Histología de riñón e intestino de ratones infectados con <i>E. coli</i> C600:933W, C600:933W:pr1 y C600.....	117
Detección de Stx2 en cerebro	120
Detección de bacteriófago 933W en cerebro.....	120
El bacteriófago 933W aumentó la expresión de GFAP en astrocitos.....	123
El bacteriófago 933W produjo daño neuronal	125
Estudio de la capacidad anti-bacteriofágica del Hidróxido de Bismuto <i>in vivo</i>	127
Estudio de sobrevida (2 dosis)	127
Estudio de sobrevida (3 dosis)	132
Histología de riñón	137
Análisis <i>in silico</i> de la <i>tail fiber</i> protein del bacteriófago 933W.....	139
Análisis de la presencia de integrinas en células eucariotas	140
Ensayo de adhesión e internalización	141
Mediante Marcación con anticuerpos	141
Mediante marcación del bacteriófago 933W con Sybr Gold.....	143
Ensayos de microscopia confocal	146
Estudio de la actividad anti-bacteriofágica en cultivo celular	148

Hidróxido de Bismuto.....	148
Internalización del bacteriófago 933W mediante unión a Integrinas.....	149
DISCUSIÓN	153
BIBLIOGRAFÍA	165
TRABAJOS PUBLICADOS	191

Agradecimientos

A mi amada familia, por sus palabras de aliento y consejos, que me llenaron de fuerzas para seguir adelante, sin ellos no lo habría logrado. A mis amigos y amigas. Gracias a ellos, que estuvieron siempre para escucharme, para compartir momentos de alegría y tristeza. Por los cientos de asados, y algun que otro vino y/o cerveza. A mis compañeros y compañeras de laboratorio (ahora amigos y amigas), por hacer del lugar de trabajo una segunda casa, de la cual, a veces, no dan ganas de irse aunque sean las 9 de la noche. A mi directora, leti, gracias por el aguante, por enseñarme tantas cosas y bancarme tantas otras. Gracias por confiar en mí, por hacerme mejor en mi profesión durante estos 5 años.

Abreviaturas

ADN	ácido desoxirribonucleico
BD	bidestilada
CsCl	cloruro de cesio
DO	densidad óptica
EHEC	<i>E. coli</i> enterohemorrágica
ER	retículo endoplasmático
Gb ₃	globotriaosilceramida
GFP	<i>green fluorescence protein</i>
Ig	inmunoglobulina
IRA	insuficiencia renal aguda
LB	Luria-Bertani
LPS	lipopolisacáridos
MALT	tejido linfoide asociado a las mucosas
Mo	monocitos
NK	<i>natural killer</i>
ON	<i>overnight</i>
Pb	pares de bases
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PEG	polietilenglicol
PMN	neutrófilos polimorfonucleares
rpm	revoluciones por minuto
RSR	respuesta de estrés ribotóxico
SFB	suero fetal bovino
SN	sobrenadante
STEC	<i>E. coli</i> productoras de toxina Stx
Stx	Toxina Shiga
SUH	Síndrome Urémico Hemolítico
TAE	Tris-Acetato-EDTA
TNG	trans-Golgi

Resumen

El Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) se define por la aparición simultánea de anemia hemolítica, trombocitopenia e insuficiencia renal aguda. Esto conduce a la lesión patológica denominada microangiopatía trombótica, que afecta principalmente al riñón, así como a otros órganos.

La principal causa de SUH son las infecciones con *Escherichia coli* productoras de toxina Shiga (STEC).

Argentina presenta la mayor incidencia a nivel mundial y, además, es la principal causa de falla renal aguda en la infancia y la segunda causa de trasplante renal en la adolescencia. 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.

La expresión de toxina Shiga (Stx) por parte de las células huésped, fue reportada *in vitro* e *in vivo* por nuestro grupo de trabajo. Teniendo en cuenta estos reportes, la capacidad del bacteriófago de generar progenie e infectar bacterias susceptibles en el intestino, la incapacidad de desarrollar SUH de cepas mutadas en el mecanismo de escisión del bacteriófago y la evidencia bibliográfica sobre la capacidad de ciertos bacteriófagos de ser internalizados en células eucariotas, es que nos planteamos los siguientes objetivos: evaluar al bacteriófago como nuevo target terapéutico, evaluar la relevancia de la expresión de toxina Stx por parte de las células huésped y entender los mecanismos implicados en la internalización del bacteriófago 933W en células eucariotas.

Como los genes que codifican las dos subunidades de Stx se encuentran en genomas de bacteriófagos, se decidió evaluar el rol de la inducción de bacteriófagos en el desarrollo del SUH en ausencia del background genómico de la *E. coli* O157:H7, cepa patogénica más relevante a nivel mundial. Los ratones se inocularon con una cepa de *E. coli* no patógena que llevaba el bacteriófago lisogénico 933W productor de toxina Stx (C600:933W), y se indujo la escisión del bacteriófago mediante el uso de antibióticos. Observamos que los ratones

desarrollaron parámetros fisiológicos típicos de infección con *E. coli* patogénica, mostrando que el bacteriófago es suficiente para el desarrollo del SUH. Esto nos permite contar con un nuevo modelo de ratón para evaluar los enfoques terapéuticos centrados en el bacteriófago como nuevo *target*.

Con el objetivo de lograr neutralizar la capacidad infectiva del bacteriófago se testaron 2 compuestos: péptidos catiónicos e hidróxido de bismuto.

Hemos informado previamente la inactivación de bacteriófagos que codifican Stx luego del tratamiento con quitosan.

Los péptidos antimicrobianos catiónicos (cAMPs) son secuencias aminoácidas lineales cortas, con una carga neta positiva, que muestran actividad bactericida o bacteriostática contra una amplia gama de especies bacterianas. Para evaluar si las propiedades catiónicas son responsables de la inactivación de bacteriófagos, se probaron siete péptidos catiónicos con actividad antimicrobiana como agentes antibacteriofágicos y un péptido catiónico de secuencia aleatoria sin actividad antimicrobiana como control.

El uso del hidróxido de bismuto, un compuesto con efectos inhibitorios sobre cepas STEC y capaz de inactivar la toxina Stx, se estudió *in vitro* e *in vivo*. Mediante el uso de microscopía confocal y FACS, se comprobó la capacidad de internalización del bacteriófago en células eucariotas.

Teniendo en cuenta los resultados previos con hidróxido de bismuto y la bibliografía presente que informa del uso de motivos RGD, se evaluó la capacidad neutralizante de los mismos en un entorno eucariota.

Objetivos

Objetivo general

Estudiar el rol del bacteriófago 933W en el desarrollo del SUH.

Objetivos específicos

- 1) Estudiar la entrada del bacteriófago a la célula eucariota
- 2) Estudiar estrategias terapéuticas *in vitro* e *in vivo* contra el bacteriófago.

Introducción

Síndrome Urémico Hemolítico (SUH)

El Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) es una enfermedad que se caracteriza por insuficiencia renal, anemia hemolítica, trombocitopenia y defectos de la coagulación, como consecuencia de una microangiopatía de localización renal predominante, pero que puede afectar también otros parénquimas, como sistema nervioso central y/o gastrointestinal (Cuellar Garzón *et al.*, 2006).

Este síndrome fue descrito por primera vez por Gasser y Col en Suiza, en 1955 (Morano *et al.* 2004; Avendaño *et al.* 1997) y en Argentina los primeros casos fueron estudiados por el Dr. Carlos Gianantonio a partir de 1964 (Rivero *et al.*, 2004). Su trascendencia clínica se fundamenta en constituir la causa más frecuente de insuficiencia renal aguda (IRA) (Morano *et al.*, 2004; Avendaño *et al.*, 1997; Rivero *et al.*, 2004; Nelson *et al.*, 1998; Fayad *et al.*, 2001).

La bacteria *Escherichia coli* productora de toxina Stx (Stx) (STEC) se describió por primera vez, hace unos 40 años, como *E. coli* productora de toxina vero (VTEC), debido al efecto citotóxico sobre células Vero (Konowalchuk *et al.*, 1977). Por su capacidad de producir toxina Stx, STEC puede causar dolor abdominal, diarrea sanguinolenta y baja fiebre. También puede derivar en enfermedades más graves como la colitis hemorrágica y el SUH. En el caso de la colitis, la enfermedad puede progresar a colitis gangrenosa, peritonitis y sepsis (Canpolat, 2015). En el SUH, puede producir anemia hemolítica, púrpura trombótica trombocitopenica (PTT), falla renal e incluso la muerte (Nguyen and Sperandio, 2012).

E. coli O157:H7 es el serotipo más comúnmente asociado a SUH, causando brotes epidémicos en muchos países. Sin embargo, la incidencia de STEC no-O157 está viéndose incrementada en los últimos años, principalmente los serotipos O26, O45, O103, O111, O121 y O145, conocidos como “*The top 6*” (Iman-Eini *et al.*, 2013).

Un estudio publicado en 2014, que evaluó la incidencia global de infecciones y muertes por STEC, estimó que estas infecciones causan más de 2.8 millones de enfermedades agudas al año, lo que lleva a 3.890 casos de SUH, 270 casos de enfermedad renal en etapa terminal y 230 muertes (Majowicz *et al.*, 2014).

Los aislados de *E. coli* O157:H7, asociados a la enfermedad, se caracterizan por la presencia de un conjunto específico de genes de virulencia, incluidos los codificantes para las toxinas Shiga (*stx1*, *stx2*), intimina (*eae*) y hemolisina (*ehxA*) (Karmali, 2004).

Respecto de la etiología pueden darse las siguientes formas:

(a) Forma Típica o Infecciosa

La forma típica del SUH es de carácter infeccioso y epidémico, precedida generalmente por diarrea hemorrágica. Se presenta principalmente en niños entre 0 y 5 años, aunque pueden ser mayores también.

Los agentes etiológicos del SUH típico son cepas de *Escherichia coli* productoras de toxina Stx (STEC). La cepa O157:H7 es la de mayor relevancia epidemiológica, aunque existen muchas otras también capaces de causar la enfermedad (O26, O111, O113, O121, O145, O104, etc.) (Karmali *et al.*, 1985).

(b) Forma Atípica o no infecciosa

Las formas atípicas del SUH pueden manifestarse con signos neurológicos transitorios, secundarios a la agregación plaquetaria, y la obstrucción de la microcirculación del cerebro, pero sin diarrea (Remuzzi and Ruggenti, 1995, 1998). Esta forma puede tener múltiples orígenes:

- i. **hereditarias**: autosómica dominante-recesiva, errores del metabolismo de B12, deficiencia del Factor H, deficiencia de prostaciclina, deficiencia de ADAMTS 13.
- ii. **por drogas**: mitomicina, contraceptivos, cocaína, ciclosporina A, quinina, etc.
- iii. **post-transplante**: riñón, hígado, intestino, médula ósea.
- iv. **Otros**: post-parto, cáncer, o hipertensión maligna.

Transmisión, reservorio y fuentes de contagio

El desarrollo del SUH está asociado a la ingesta de carnes, vegetales o bebidas contaminadas con STEC.

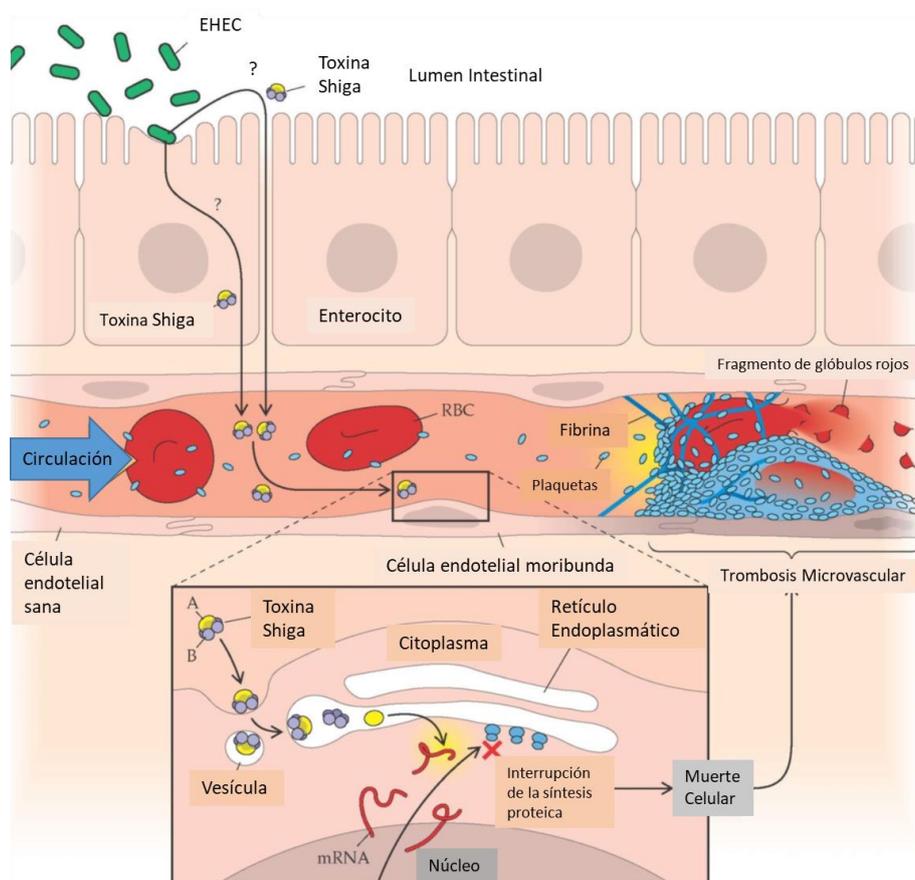
El ganado bovino es el principal reservorio y el consumo de carne contaminada con la materia fecal de los animales durante el faenado, es la forma predominante de contraer la infección (Paton and Patton *et al.*, 1998).

La exposición por contacto directo con animales o con sus heces en zoológicos y granjas es una importante vía de exposición a STEC. Se estima que el contacto con animales constituye el 8% de las enfermedades por STEC no O157 y el 6% por STEC O157:H7 en los Estados Unidos (Hale *et al.*, 2012). Un estudio realizado en Escocia mostró que las heces de ganado pueden contener de 100 a más de 10^6 unidades formadoras de colonia (UFC) de STEC O157:H7 por gramo (Chase-Topping *et al.*, 2007). Se ha demostrado que STEC sobrevive en suelos durante varios meses y al menos tres semanas en heces de animales de granja, incluidas las de ganado vacuno y porcino (Strachan *et al.*, 2006; Williams *et al.*, 2008).

En Estados Unidos, se estima que las enfermedades por STEC O157:H7 son, en un 68% debido a alimentos contaminados y que, en el caso de las cepas STEC no-O157 las mismas se elevan a un 82% (Scallan *et al.*, 2011). La carne puede contaminarse a través del contacto con heces durante el sacrificio o el procesamiento, mientras que las hortalizas pueden contaminarse mediante el uso de estiércol como abono o a través de agua de riego contaminada (Solomon *et al.*, 2002).

En cuanto a la transmisión persona-persona (fecal-oral, manos contaminadas) se le atribuye la causa del contagio en un 19 % de los casos de brotes con STEC O157:H7 (Snedeker *et al.*, 2009).

La bacteria presente en los alimentos contaminados coloniza el intestino a nivel del colon y se produce la inducción del bacteriófago con consecuente producción de toxina Stx, que luego de atravesar la barrera intestinal entra a la circulación sistémica, alcanzando al órgano blanco, en donde interactúa con su receptor específico globotriaosilceramida (Gb₃) para internalizarse e inhibir la síntesis proteica. En el riñón, la toxina causa destrucción de las células epiteliales tubulares y del endotelio glomerular (Kaneko *et al.*, 2001). Durante este proceso se expone el subendotelio, se activa la cascada de coagulación, se liberan factores de agregación plaquetaria y mediadores inflamatorios. Como consecuencia, hay obstrucción de la microvasculatura que genera focos de daño por isquemia dando lugar a la insuficiencia renal aguda, fragmentación mecánica de glóbulos rojos (anemia hemolítica), y la activación y consumo de plaquetas que llevan a la trombocitopenia (Remuzzi and Ruggenti, 1998).



Esquema 1. Patogénesis de la infección por *E. coli* enterohemorrágica. Adaptado de "SUH-JORNADAS-EPIDEMIOLOGIA-2015".

En cuanto a la progresión del SUH, existe un período de 3 a 4 días, desde la infección con STEC, hasta la aparición de síntomas como dolor abdominal, fiebre y diarrea. Típicamente, este tipo de infecciones ocasiona entre 1 y 3 días de diarrea no sanguinolenta, que transcurrido ese tiempo se torna en colitis hemorrágica. Esta evolución ocurre aproximadamente en el 90% de los pacientes (Tarr *et al.*, 2005). Entre el 30 y el 60% de los casos transcurre con vómitos, y se detecta fiebre, aunque leve, en menos del 30% de los pacientes. La duración media de la diarrea es de 7 días, luego el cuadro clínico empeora, desarrollándose SUH aproximadamente en el 15% de los casos, el resto evoluciona hacia una resolución espontánea del proceso (Tarr *et al.*, 2005). La eliminación del microorganismo una vez resuelto el proceso, por parte de los individuos asintomáticos, puede contribuir a la diseminación de la infección al colectivo, mediante la transmisión de persona a persona, si bien el período de mayor riesgo de transmisión es la fase de diarrea aguda (Figura 1).

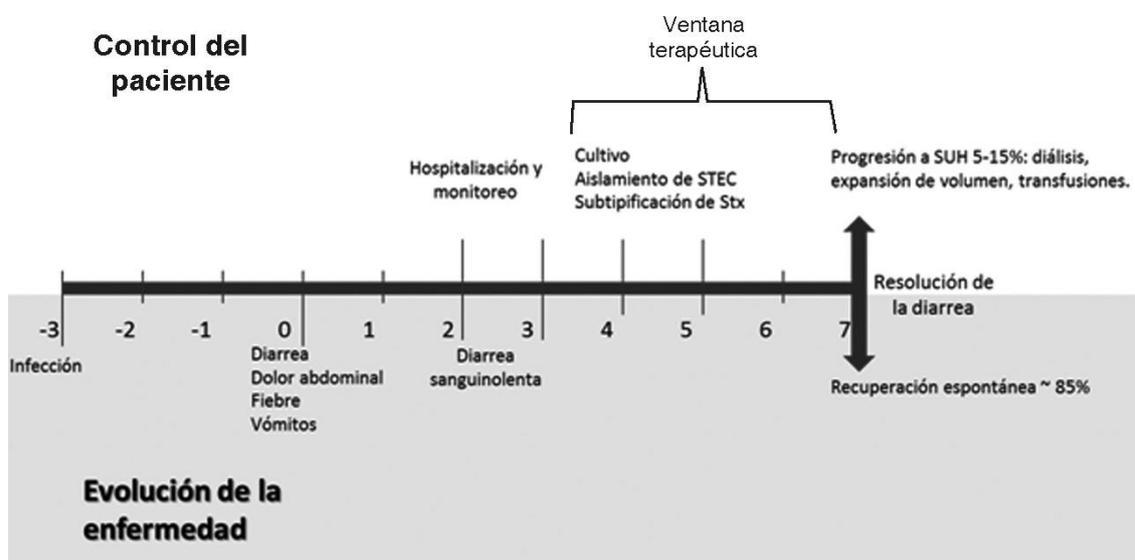


Figura 1. Progresión de la infección por *Escherichia coli* productora de toxina Shiga en niños. Fuente: Artículo especial: desarrollo de un producto anti-toxina Stx para la prevención del Síndrome Urémico Hemolítico. (Hiriart *et al.*, 2018).

SUH en Argentina

En Argentina, el SUH es endémico y se reportan aproximadamente 400 casos nuevos por año. Entre 2010 y 2014, la incidencia ha sido relativamente estable, alrededor de 1 caso por cada 100.000 habitantes totales y de 8 a 10 casos por cada 100.000 niños menores de 5 años (Ministerio de Salud, 2015).

De acuerdo con lo notificado hasta el 21/10/2019, se notificaron 234 casos de SUH. Este número es menor a la mediana y al promedio de casos para el mismo período de los últimos 5 años 2014-2018 (273 y 286 respectivamente). La incidencia acumulada hasta el último censo del 2019 es de 0,52 casos cada 100.000 habitantes (Figura 2). De los 234 casos notificados, 187 (80%) correspondieron a menores de 5 años. En este grupo de edad la mediana de casos notificados para el periodo 2014-2018 fue de 213 casos. La incidencia acumulada en el año 2019 hasta el 21/10 para menores de 5 años fue de 5,02 casos cada 100.000 menores de 5 años. (Figura 3).

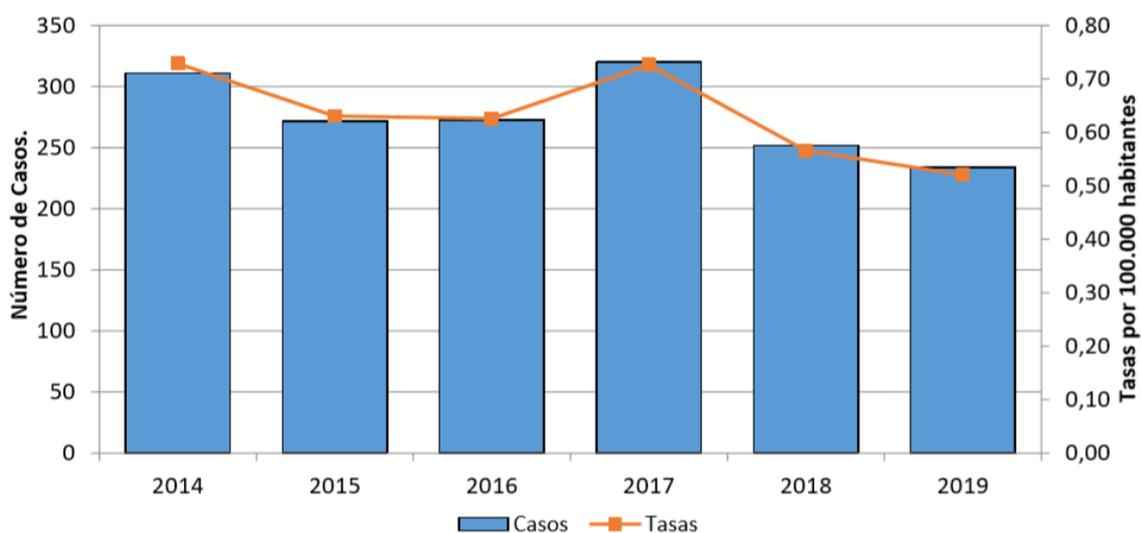


Figura 2. Casos y tasas de SUH (cada 100.000 habitantes totales). Argentina. Años 2014-2019 (hasta el 21/10). Fuente: Sistema Nacional de Vigilancia de la Salud (SNVS C2-SIVILA-UCSUH) y SNVS2.0

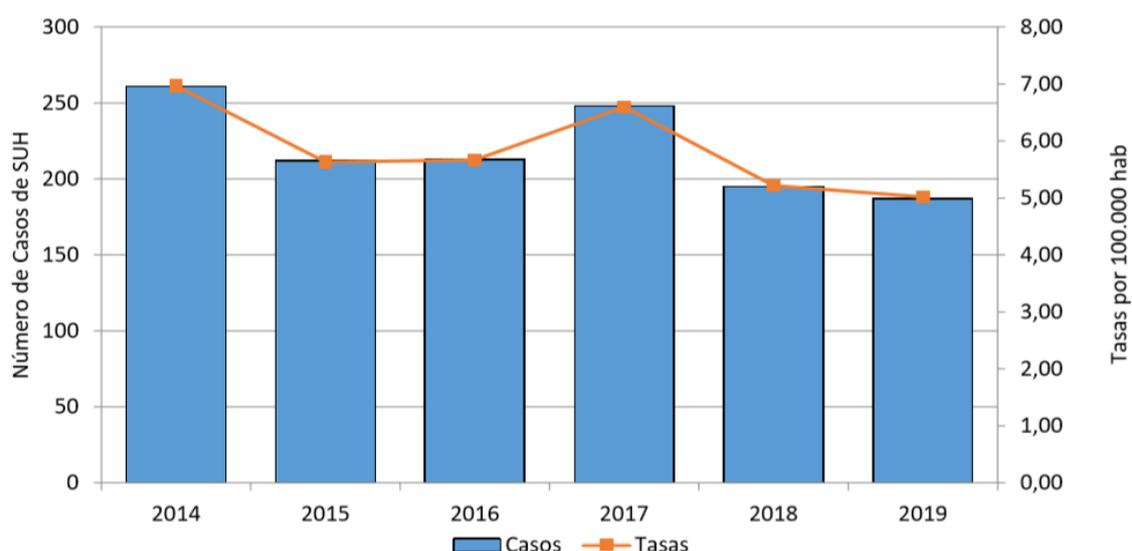


Figura 3. Casos y tasas notificados de SUH en menores de 5 años. Argentina. Años 2014-2019 (hasta el 21/10). Fuente: Sistema Nacional de Vigilancia de la Salud (SNVS C2-SIVILA-UCSUH) y SNVS2.0

El SUH es la causa principal de insuficiencia renal aguda en niños y la segunda causa de insuficiencia renal crónica (Rivas *et al.*, 2006). *E. coli* O157:H7 es el serotipo dominante asociado con casos esporádicos y brotes en diferentes regiones del mundo (Banatvala *et al.*, 2001; Pennington, 2010, Rangel *et al.*, 2005). Argentina tiene la mayor incidencia a nivel mundial y el serotipo más frecuente es O157:H7, que representa el 60% de los casos (Torres *et al.*, 2016; Torres *et al.*, 2010). Aproximadamente entre el 20 y el 30% de los pacientes con SUH sufren secuelas graves, como insuficiencia renal crónica, que requieren diálisis o trasplante (Exeni *et al.*, 2006).

Por otra parte, el riesgo de mortalidad es del 2 al 6 % durante el período agudo, dependiendo de factores tales como la oportunidad de diagnóstico y la precocidad del tratamiento de la insuficiencia renal. Otro órgano comúnmente afectado es el páncreas (Gordjani *et al.*, 1997). Además, puede ocasionar daños en el sistema nervioso central (Gordjani *et al.*, 1997). Los síntomas de daño neurológico severo en el comienzo de la enfermedad anuncian un mal pronóstico. Algunos pacientes experimentan letargia, dolor de cabeza intenso, convulsiones y encefalopatía (Tesh *et al.*, 1991).

Existen diferencias en la severidad de la enfermedad debida a distintos brotes de STEC O157 ocurridos en el mundo. Estas diferencias podrían deberse a la diversidad genética de la bacteria. Para evaluar la hipótesis anterior, Manning y colaboradores estudiaron la diversidad genética y la variación de virulencia en una colección de más de 500 aislamientos clínicos de *E. coli* O157 (Manning *et al.*, 2018).

Evaluaron 96 Polimorfismos de Nucleótido Único (SNP) ubicados en 83 genes de estas cepas de *E. coli* O157. Este estudio permitió agrupar los aislamientos en 39 genotipos de SNP (SG). El análisis filogenético de estos SG los agrupó en 9 clados. El análisis de los datos epidemiológicos mostró una alta asociación entre cepas del clado 8 y el SUH. También los pacientes infectados con estas cepas tendían a ser más jóvenes que aquellos infectados con cepas de otros clados. Por otra parte, el estudio de las variantes de toxina Stx mostró que la mayoría de las cepas del clado 8 tenían el genotipo stx2a-stx2c. Estos resultados muestran que una subpoblación más virulenta de STEC O157 está incrementando su participación en la carga total de enfermedad asociada a infecciones por este patógeno y confirman la hipótesis de que las cepas de STEC O157 del clado 8 han adquirido recientemente algunos factores que incrementaron su virulencia y su capacidad de causar patologías severas. Por esta razón las cepas de este clado se conocen como O157 híper virulentas.

Las clasificaciones de los grupos filogenéticos (A, B1, B2, C, D, E y F), linaje (I, II, I / II) y clado (1–9) se utilizan actualmente para analizar la evolución de las *E. coli* O157:H7 entre diferentes hospedadores (humanos y animales) y diferentes países. En Argentina se encontró que prevalecen las cepas híper virulentas STEC O157:H7 del clado 8, en contraste con otros países donde prevalece el 7 (Segura *et al.*, 2018).

Epidemiología

El SUH ocurre en mayor grado en los meses más cálidos, entre septiembre y marzo (Figura 4) para el hemisferio sur, que coinciden con un mayor aislamiento de STEC a partir de ganado bovino, pero existen casos esporádicos durante todo el año.

La variación de la incidencia en distintos países, y aún en distintas regiones de un mismo país, puede estar relacionada con los métodos de procesamiento y los hábitos de consumo de la carne, propios de cada región (Figura 4).

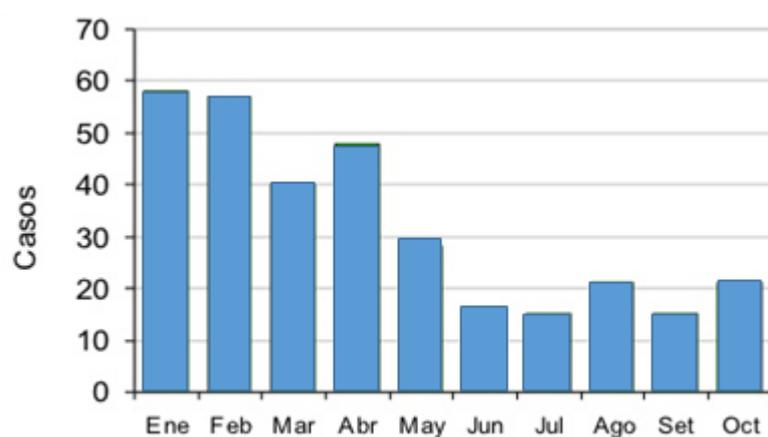


Figura 4. Incidencia estacional de SUH. Año 2019. Fuentes: Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (INEI) ANLIS, Malbrán y Ministerio de Salud de la Nación Argentina.

Con respecto a la distribución según edad, los grupos de edad más afectados continúan siendo los menores de 5 años, en especial de 2 a 4, aunque se registran casos en niños mayores y adolescentes (Figura 5).

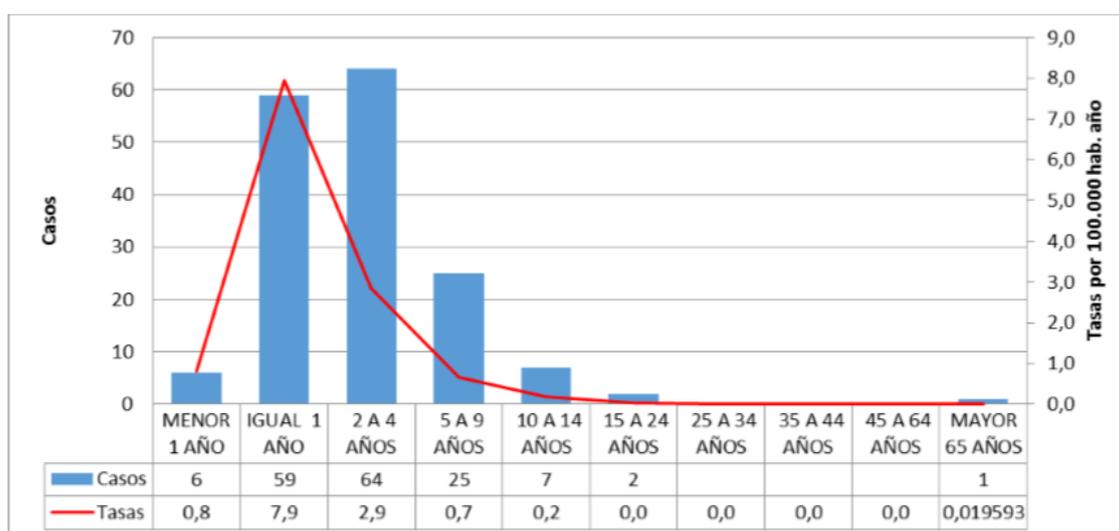


Figura 5. Incidencia del SUH en función a la edad de los pacientes. Año 2019. Fuentes: Sistema Nacional de Vigilancia de la Salud (SNVS C2-SIVILA-UCSUH) y SNVS2.0.

En las notificaciones hasta el momento hay un ligero predominio de casos del sexo femenino (Figura 6).

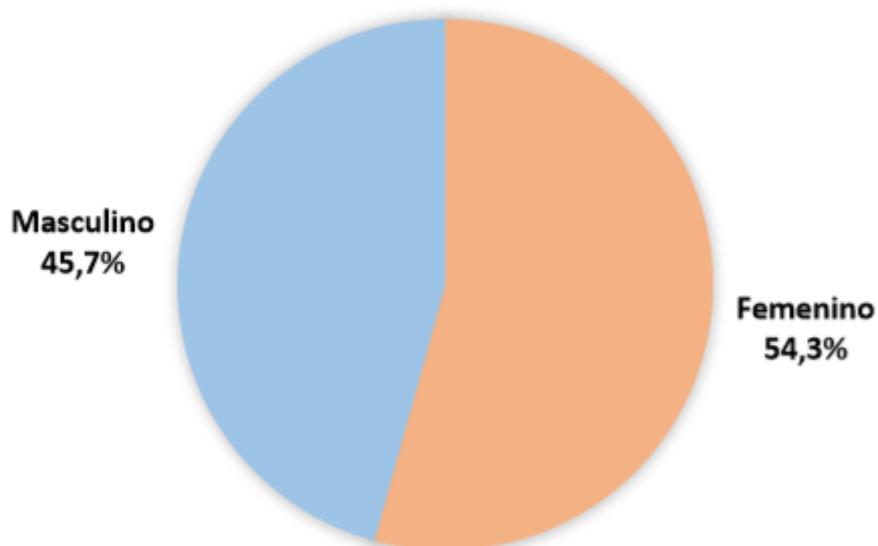


Figura 6. Distribución porcentual de casos de SUH según sexo. Argentina, 2019, hasta 29/4. Fuente: Sistema Nacional de Vigilancia de la Salud (SNVS C2-SIVILA-UCSUH) y SNVS2.0.

Las Regiones Sur y NEA registran más casos en lo que va de 2019 respecto del promedio y la mediana de los últimos 5 años para el mismo período, mientras que, en el Centro, Cuyo y NOA los casos 2019 son inferiores tanto al promedio como a la mediana de los últimos años para el mismo período. En cuanto al análisis por provincia, si bien en la mayoría de las jurisdicciones se observa un número de casos inferior a la mediana de los últimos 5 años, 5 provincias registran más casos según el mismo indicador (Chaco, Entre Ríos, Mendoza, Río Negro y Tucumán).

Fisiopatogénesis

Es probable que la diarrea sanguinolenta sea producto de la acción tóxica directa de Stx sobre la vasculatura de la mucosa y sobre los enterocitos (Burger *et al.*, 2012). Se ha demostrado en conejos, que la toxina Stx tiene efectos enterotóxicos directos sobre las vellosidades de células epiteliales que tienen Gb₃.

De todas formas, aún no se ha detectado la presencia de Gb₃ en el epitelio intestinal humano (Miyamoto *et al.*, 2006; Schuller *et al.*, 2004). Dado que las bacterias STEC no invaden las células epiteliales, es decir que colonizan pero permanecen en el lumen intestinal, la toxina Stx producida pasa a la circulación por diversos mecanismos para llegar al tejido endotelial y epitelial susceptible. El mecanismo por el cual la toxina pasa a la sangre no ha sido demostrado *in vivo*, pero todos los estudios realizados *in vitro* con el uso de líneas epiteliales polarizadas de intestino humano han demostrado lo siguiente:

(i) Stx1 cruza la barrera epitelial polarizada (CaCo2A y T84), sin alterar la estructura de la monocapa y sin perder su actividad biológica. Este mecanismo es dependiente de energía, requiere de los microtúbulos, y el pasaje es transcelular (Acheson *et al.*, 1996).

(ii) Stx2 posee un mecanismo de pasaje distinto al de Stx1, aunque tampoco altera la integridad del epitelio polarizado, no requiere de los microtúbulos. Además, el pasaje de Stx2 es menos eficiente que el de Stx1, aunque la sensibilidad a la

toxina de las células endoteliales intestinales y glomerulares es significativamente mayor para Stx2 que para Stx1 (Hurley *et al.*, 1999).

(iii) La infección por STEC también depende de la interacción entre el huésped y la bacteria. En este sentido, la respuesta inmune tiene un papel determinante en el desarrollo de la enfermedad. La toxina Stx2 induce la síntesis de IL-8 en la submucosa *in vitro*, induciendo el reclutamiento, activación y migración de neutrófilos al intestino (Thorpe *et al.*, 1999). El proceso migratorio y la activación de estas células estarían causando la desestabilización o ruptura de la integridad del epitelio y por lo tanto aumentando la absorción de Stx con la subsiguiente iniciación de las complicaciones sistémicas características del SUH (Thorpe *et al.*, 2001).

Una vez que la Stx2 cruza el epitelio intestinal, entra al torrente sanguíneo desde donde se traslada hacia los órganos blanco que poseen el receptor específico. Se cree que debido a la presencia de Gb₃ en el riñón humano, y a la compleja estructura de la microvasculatura, es allí donde se produce la mayor cantidad de daño en los distintos tipos celulares (Paton and Paton *et al.*, 1998). De todas formas esta es una enfermedad sistémica, y otros órganos pueden ser afectados ya sea por la presencia de Gb₃ o como consecuencia del desbalance general ocasionado por la toxina. Las complicaciones neurológicas son las más serias dentro de las extrarrenales y extraintestinales causadas por Stx. El examen histopatológico de los tejidos de pacientes sugiere que la Stx daña a las células endoteliales en forma directa. Por otra parte, las células endoteliales de la microvasculatura del cerebro humano son relativamente resistentes a los efectos de la Stx2 pura (Ramegowda *et al.*, 1999), pero el pretratamiento con TNF- α , aumenta la sensibilidad a la toxina mediante el aumento de la expresión de Gb₃ en el endotelio (Eisenhauer *et al.*, 2001).

Fisiopatología y cuadro clínico

El período del pródromo se caracteriza por las manifestaciones gastrointestinales como la diarrea, que en la forma típica sufren aproximadamente el 90% de los pacientes. Primero aparece la diarrea acuosa que más tarde cambia a sanguinolenta (74-95% de los pacientes), junto a los otros síntomas característicos del pródromo que son el dolor abdominal, la distensión, los vómitos, y menos comunes la invaginación intestinal, el infarto colónico, el prolapso rectal, entre otros (Rivas *et al.*, 2006). Luego de un período variable (3 a 5 días), la diarrea desaparece y se desarrolla el cuadro clínico completo de insuficiencia renal aguda (IRA), trombocitopenia y anemia hemolítica (Exeni *et al.*, 1994).

Trombocitopenia

La trombocitopenia ocurre por el consumo de plaquetas en microtrombos luego de su activación. En consecuencia, las plaquetas circulantes poseen bajo contenido de β -trombomodulina, se degranulan y no pueden agregarse. Se infiere que las plaquetas han sufrido un proceso de activación previa a la degranulación porque el plasma de pacientes con SUH induce la agregación de plaquetas normales. Además, se ha observado que este plasma posee altos niveles de factores inductores de la agregación. Las plaquetas poseen un tipo de receptor glicolípídico, que actúa como receptor de la toxina Stx (Karpman *et al.*, 2001). Sin embargo, existe una controversia respecto de la acción directa de la toxina Stx sobre las plaquetas, dado que la toxina Stx pura no puede agregar plaquetas en un agregómetro *in vitro* en forma directa (Dran *et al.*, 2002).

Es posible que el consumo de plaquetas en el SUH pueda estar asociado con un efecto indirecto debido al daño sobre la pared vascular que causa la toxina Stx y que expone al subendotelio, liberando por lo tanto factores que inducen la adhesión y la agregación plaquetaria (factor von Willebrand y fibrinógeno). A su

vez, al agregarse, las plaquetas disparan reacciones de coagulación local formando pequeños trombos (Proulx *et al.*, 2001; Proesmans, 2001).

Anemia Hemolítica

La causa de anemia hemolítica, se cree que se debe a la fragmentación de los glóbulos rojos ocasionada por la ruptura mecánica que sufren al pasar por la microvasculatura dañada y obstruida por los trombos de plaquetas (Proulx *et al.*, 2001). Las células endoteliales de la microvasculatura expresan grandes cantidades de Gb₃, entonces una vez que la toxina Stx accede a ellas, las daña exponiendo al subendotelio y liberando factores de coagulación que inducen la agregación y activación plaquetaria. Estas plaquetas a su vez colaboran con la liberación de factores de coagulación induciendo la formación de trombos y la deposición de fibrina ocluyendo a los pequeños vasos (Proesmans, 2001). Otras lesiones de la membrana del glóbulo rojo ocurren por peroxidación lipídica (daño por oxidación de los fosfolípidos de la membrana plasmática). Por otra parte, la oclusión es agravada por el daño que ejerce la toxina Stx sobre el epitelio renal (Tarr *et al.*, 2005).

Insuficiencia Renal Aguda (IRA)

La IRA se presenta en el 100% de los casos, en diversos grados. La mayoría de los niños que presenta IRA muy severa tienen en general períodos de oligoanuria (disminución en la producción de orina) prolongados en los primeros días de la enfermedad. También se observa hematuria (presencia de sangre en orina) en el 100% de los casos y el grado de proteinuria es variable. Además pueden detectarse manifestaciones de daño tubular proximal, y alteraciones en las concentraciones de metabolitos excretados en orina (glucosuria, hiperaminoaciduria, bicarbonaturia) o presentes en la sangre como la hiperpotasemia, hiponatremia, hipocalcemia y acidosis metabólica. El filtrado glomerular sufre un deterioro rápido y la concentración de urea en sangre y de

creatinina se elevan rápidamente. Muchos niños superan los 400 mg/% de uremia (valor normal: 20-60 mg/%) con valores de creatinina superiores a 7 mg/% (valor normal: 0,7 mg/%) (Exeni *et al.*, 1994).

Tratamientos

No existe a la fecha un tratamiento específico para el SUH. Los pacientes afectados reciben una terapia de sostén de diálisis peritoneal. Los antibióticos son contraindicados en infecciones por STEC (Tarr *et al.*, 2005; Wong *et al.*, 2012). A niveles antimicrobianos por encima de los requeridos para inhibir la replicación bacteriana, varios antibióticos tales como mitomicina C y quinolonas, incluyendo ciprofloxacina, producen daño en el ADN y por lo tanto se induce la respuesta SOS con el efecto secundario no deseado de desencadenar simultáneamente la producción de bacteriófagos y expresión del gen *stx* (Hauswaldt *et al.*, 2013; Bielaszewska. *et al.*, 2012).

Tampoco se recomienda el uso de agentes anti-inflamatorios no esteroides porque pueden disminuir el flujo sanguíneo del riñón (Murray *et al.*, 1993). A través de estos efectos antibióticos puede aumentar el riesgo de desarrollo del SUH (Tarr *et al.*, 2005). En otro estudio se informó, en cambio, que los antibióticos tales como meropenem, azitromicina, rifaximina, y tigeciclina no influyeron en la inducción del bacteriófago y los niveles de toxina Stx, en la cepa O104: H4 *in vitro* (Bielaszewska *et al.*, 2012).

Nuevos enfoques terapéuticos

Independientemente de la importancia de las infecciones por EHEC/STEC en humanos, no existe una vacuna disponible o una terapia eficaz contra estos patógenos. La mayoría de los estudios regionales realizados entre 2016 y 2018 incluyeron una proteína quimérica previamente novedosa desarrollada por Mejías y colaboradores (Mejias *et al.*, 2013; Mejias *et al.*, 2014), que comprende un monómero de la subunidad Stx2B fusionada con el extremo N de un monómero de

Brucella lumazine sintasa (BLS; BLS-Stx2B). Esta quimera se desarrolló para aumentar la inmunogenicidad de Stx2B y, como tal, los epítomos conformacionales en Stx2B se estabilizan. Los estudios en ratones demostraron que la quimera BLS-Stx2B es un inmunógeno eficiente induciendo títulos elevados de anticuerpos contra Stx2, variantes de Stx2 y Stx1 (el 100% de los ratones vacunados con BLS-Stx2B y el 33% de los ratones vacunados con Stx2B sobrevivieron al desafío con dosis letal de toxina Stx) (Mejías *et al.*, 2013; Mejías *et al.*, 2014).

Sacerdoti y *colaboradores* demostraron que las ratas hembra inmunizadas con BLS-Stx2B, antes del embarazo, desarrollaron títulos altos de anticuerpos neutralizantes (100% de sobrevida) IgG contra Stx2B y estaban totalmente protegidas del aborto después de desafiarlas con una dosis subletal de Stx2 (Sacerdoti *et al.*, 2016). Además, el estudio describió la transferencia pasiva de anticuerpos de las madres a su descendencia, porque encontraron anticuerpos específicos anti-Stx2B IgG en los sueros de las crías en el momento del destete. Además, estos anticuerpos confirieron protección total contra una dosis letal de Stx2 a todas las crías que fueron amamantadas por las madres inmunizadas.

Posteriormente Mejías y *colaboradores* (Mejías *et al.*, 2016), propusieron que los anticuerpos de camélidos podrían ser adecuados para neutralizar la actividad de Stx2, porque poseen características únicas, como las siguientes:

- Están compuestos solo por cadenas pesadas
- El sitio de unión al antígeno de estos anticuerpos está compuesto por un dominio variable (VHH).
- El VHH puede expresarse como fragmentos recombinantes y exhibir varias características valiosas, tales como: tamaño pequeño (12–16 kDa), alta solubilidad, alta estabilidad intrínseca, fácil adaptación en construcciones pluripotentes (permitiendo estrategias de extensión de vida media), reconocimiento de infrecuente o epítomos ocultos, baja toxicidad y facilidad de fabricación.

Estas propiedades llevan al desarrollo de agentes terapéuticos en los cuales los VHH superan a otros formatos de anticuerpos.

En este estudio, las llamas se inmunizaron con quimeras BLS (*Brucella lumazine synthase*) Stx2B y se seleccionaron los anticuerpos de dominios de camélidos pesados (VHH) específicos de Stx2B. Desarrollaron moléculas bivalentes ((2vb27) 2) y trivalentes ((2vb27) 2-SA), las últimas con afinidad a la albúmina sérica humana y de ratón. Posteriormente, probaron la actividad de neutralización de Stx2 *in vivo* y la capacidad protectora inyectando a los ratones una dosis letal de Stx2 o una infección con STEC. El estudio demostró que ((2vb27) 2-SA) fue más eficaz para proteger *in vivo* contra la toxicidad de Stx2 que (((2vb27) 2)). Además, ((2vb27) 2-SA) protegió al 100 % de los ratones contra la infección letal intragástrica por STEC.

En otro estudio, Hiriart y colaboradores (Hiriart *et al.*, 2018), obtuvieron suero hiperinmune neutralizante equino anti-Stx1 y anti-Stx2 usando las quimeras IMC-Stx1B e IMC-Stx2B (BLS-Stx1B y BLS-Stx2B). Luego, los fragmentos F (ab`) 2 se purificaron y se corroboró su efectividad utilizando ensayos de viabilidad de células Vero. Estas, son células epiteliales de riñón de mono y se utilizan como modelo en ensayos de citotoxicidad con toxinas Stx ya que contienen el receptor Gb3 mediante el cual interacciona y permite su entrada a las células blanco. Mostraron que estos fragmentos fueron seguros, es decir que no generaron efectos secundarios no deseados, y que la dosis máxima utilizada en ratones fue bien tolerada. Cuando se probó con una dosis única y a dosis repetidas, en ratones y conejos, no hubo alteraciones clínicas o subclínicas asociadas con el tratamiento. Además, los ratones se protegieron de la intoxicación por Stx2, incluso cuando los fragmentos F (ab`) 2 se administraron 48 horas después de la toxina Stx. Además, un estudio de reactividad cruzada con tejidos humanos no mostró una unión específica de anticuerpos a los tejidos.

Los resultados se presentaron a la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) para su evaluación, para solicitar la

autorización para un estudio de fase II en pacientes pediátricos y, si tienen éxito, estos fragmentos F (ab')₂ podrían estar disponibles comercialmente para el año 2020.

Siendo el ganado, el principal reservorio de STEC O157:H7, Martorelli y colaboradores estudiaron el efecto de la vacunación con dos (Intimin C280 (IntC280), EspB) o tres antígenos de STEC (IntC280, EspB, BLS-Stx2B) para reducir la carga de STEC en el intestino vacuno (Martorelli *et al.*, 2017).

Los anticuerpos producidos en los sueros de terneros vacunados utilizando ambas combinaciones de antígenos inhibieron la adherencia de O157:H7 a las células epiteliales y neutralizaron la lisis de los glóbulos rojos (Mejias *et al.*, 2013). La respuesta inmune de IgG contra Stx2 fue específica pero más baja en comparación con la obtenida en ratones con quimera BLS-Stx2B (Mejias *et al.*, 2013). Además, estos anticuerpos fueron capaces de neutralizar la citotoxicidad producida por Stx2 en células Vero. Esto mismo se pudo ver utilizando sueros tomados a los 9 y 15 días después de la vacunación. Finalmente, la adición de BLS-Stx2B indujo no solo anticuerpos contra Stx2, sino que también potenció la respuesta de IgG1 a Intimin y EspB.

La respuesta de los anticuerpos anti-O157 dirigidos contra las cadenas laterales de lipopolisacáridos (LPS) indica que estos compuestos deben ser parte de las posibles vacunas contra *E. coli* O157 (DuPont *et al.*, 1987; Szu *et al.*, 2014). Sin embargo, el LPS completo de O157 no se puede usar como inmunógeno debido a varios factores, incluido el efecto tóxico del lípido A (Glucolípido estructural de los lipopolisacáridos); que cuando se elimina, este hace que el LPS sea inmunológicamente débil.

Para superar estas limitaciones, Konadu y colaboradores usaron LPS O157, sin el lípido A, como un inmunógeno acoplado con la subunidad B del Stx1 para producir anticuerpos neutralizantes contra el Stx (Konadu *et al.*, 1993).

Navarro y colaboradores, propusieron otros tipos de inmunógenos, desarrollaron *mimotopes* del lipopolisacárido (LPS) O157 mediante el uso de la tecnología de *phage display* (Navarro *et al.*, 2016). Estos inmunógenos tienen la ventaja de evitar la endotoxicidad del lípido A. Los autores seleccionaron el péptido *mimotopes* SP12 porque era capaz de inducir anticuerpos contra LPS O157 y competían por los sitios de unión en la misma molécula. Pero hasta ahora, se necesitan más estudios para apoyar el uso de este péptido *mimotopes* como un inmunógeno terapéutico alternativo.

Prevención

Un aspecto central en la tarea de la prevención es la educación de la población acerca de los principales mecanismos de transmisión de STEC. En el mundo actual, con los cambios en el estilo de vida, hábitos alimenticios y producción de alimentos en el ámbito industrial, un gran número de personas se alimenta fuera del hogar, por lo cual cada vez están más expuestas a las enfermedades transmitidas por alimentos, entre ellas las infecciones por STEC. En Estados Unidos y Canadá se ha establecido una vigilancia clínica y de laboratorio de las infecciones por STEC, lo cual ha permitido detectar un elevado número de brotes de gastroenteritis asociado al consumo de alimentos contaminados con estos patógenos, al mismo tiempo que ha permitido implementar medidas de control adecuadas.

Un número significativo de estos brotes está asociado al consumo de carne de bovino, molida o picada, que en el caso de procesos industriales como la fabricación de hamburguesas se ha demostrado que puede tener un impacto muy importante. Además se debe considerar que la carne puede contaminarse en el proceso de trituración, ya que esta maquinaria no es sometida a desinfección entre un proceso y otro.

Las medidas preventivas en este caso son:

- ✓ Lavarse bien las manos con agua y jabón después de ir al baño, antes de comer y luego de tocar carne cruda. Cuidar que los chicos también lo hagan.
- ✓ Cocinar bien las carnes, especialmente la carne picada hasta que pierda el color rosado.
- ✓ No usar el mismo cuchillo (o superficies: tablas, mesadas) para cortar otros alimentos con el que se cortó carne cruda, sin antes lavarlos bien con agua y detergente.
- ✓ Las frutas y las verduras crudas deben lavarse cuidadosamente.
- ✓ El agua de uso y consumo debe ser potable.
- ✓ Consumir leche y otros lácteos pasteurizados y bien conservados en frío.
- ✓ Conservar los alimentos, tanto frescos como cocidos en la heladera.
- ✓ No bañar a los chicos en aguas contaminadas.
- ✓ Cuidar que las piletas de natación privada y pública, tengan agua adecuadamente clorada.

Otro aspecto para un control efectivo, es actuar sobre el reservorio. Se puede controlar la contaminación de las carcasas con el contenido intestinal, en el momento del faenado del animal. Estos procedimientos deben estar adecuadamente regulados y deben ser supervisados por las autoridades sanitarias correspondientes. Los animales, especialmente los rumiantes, son reservorio de STEC. El ganado bovino ha sido señalado como el principal reservorio de *E. coli* O157:H7 a partir de 1982, cuando se produce el primer brote de SUH vinculado epidemiológicamente al consumo de hamburguesas. Estudios posteriores demuestran que este microorganismo está presente en el tracto gastrointestinal del ganado en porcentajes variables. También ha sido descrita la transmisión animal-hombre y hombre-hombre, por la ruta fecal-oral, debido a su baja dosis infectiva. Esta dosis infectiva es mucho menor que la de otros patógenos transmitidos por alimentos, incluida *Salmonella*.

***Escherichia coli* Enterohemorrágicas (EHEC)**

Las cepas de *E. coli* comensales y patógenas muestran diversas variantes fenotípicas y genotípicas. *E. coli* ha sido tradicionalmente serotipada basándose en tres tipos de antígenos; somáticos (O), capsular (K) y flagelar (H), y se han identificado más de 700 serotipos de *E. coli* basados en la combinación de antígenos O y H (Nataro and Kaper, 1998). *E. coli* ha evolucionado para crecer en el tracto intestinal de animales de sangre caliente donde las fuentes de carbono/energía están en abundancia y existe una humedad, pH y temperatura idóneos para su desarrollo. Se encuentra colonizando la mucosa del colon de forma natural, donde desarrolla funciones beneficiosas para su huésped. Muchas cepas de *E. coli* son resistentes a cierto grado de pH ácido porque necesitan pasar a través del estómago del animal para llegar al tracto intestinal. Las condiciones intestinales del huésped pueden afectar a la estructura de la población de *E. coli* y a la abundancia relativa de los distintos grupos filogenéticos de *E. coli* dependiendo del huésped y su dieta (Gordon *et al.*, 2013). *E. coli* es excretada con las heces, en individuos sanos, en una concentración de 10^8 – 10^9 unidades formadoras de colonia por gramo de heces (UFC g⁻¹).

***Escherichia coli* productoras de toxina Stx (STEC)**

Las *Escherichia coli* enteropatógenas se clasifican patotípicamente, según los patrones de las manifestaciones observadas durante la infección. Las *E. coli* productoras de toxina Stx (STEC) se suelen clasificar patotípicamente como *E. coli* enterohemorrágica (EHEC). Pero las STEC son el tipo más común de EHEC, por lo que los dos términos son a veces utilizados sinónimamente. Esto debe evitarse, ya que las toxinas Shiga 1 y 2 (Stx1 y Stx2) también pueden ser producidas por cepas con otras características compatibles con *E. coli* enteroagregativas (EAEC).

Las infecciones por STEC causan un espectro de enfermedades, de distinta gravedad, que van desde asintomáticas hasta la colitis hemorrágica y el SUH.

Después de la ingestión de tan solo 100 microorganismos, seguidos por un período de incubación de 3 a 4 días, casi todos los pacientes infectados desarrollan diarrea acuosa acompañada de cólicos abdominales. En el 80 a 90% de los casos analizados en cultivo, la diarrea se vuelve sanguinolenta 2 a 3 días después de la aparición de heces. Esta fase de diarrea hemorrágica dura en promedio 2 a 5 días antes de la resolución sintomática (Smith *et al.*, 2014 y Davis *et al.*, 2013).

Se requiere hospitalización en el 23 a 47 % de los pacientes sintomáticos con diarrea aguda debido a STEC, con una estancia hospitalaria promedio de 6 a 14 días. Se estima que entre el 6 y el 25% de los pacientes con colitis hemorrágica relacionada con STEC desarrollan SUH. La mortalidad es del 3% al 5%.

Pruebas de laboratorio para las infecciones por STEC

Hay varios métodos disponibles para la detección de STEC en el laboratorio clínico. Estos incluyen el uso de medios de cultivo, inmunoensayos para antígenos específicos de STEC y las pruebas moleculares, como las PCRs. Las diferencias entre estas pruebas incluyen aquellas que son relevantes para la mayoría de las pruebas de microbiología clínica: el tiempo, el costo, la sensibilidad y la especificidad. Además, una diferencia importante entre estas pruebas es que algunas de ellas solo detectan STEC O157, mientras que otras detectan todas las STEC. La capacidad de detectar solo STEC O157 o todas las STEC se han discutido y debatido en gran detalle; sin embargo, el consenso general es que la estrategia de prueba debe incluir la detección de todos los STEC, incluso en áreas donde el STEC O157 ha sido el patógeno primario en el pasado (Hermos *et al.*, 2011 y Schindler *et al.*, 2014) (Tabla 1).

Ensayo	Blanco	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Tiempo
Medio Solido				
CHROMagar O104 STEC	Detección de O104: H4 a través de sustrato cromogénico	71,4	99,1	24 h
CHROMagar O157	Detección de O157 STEC a través de sustrato cromogénico	96,3	100	24 h
CHROMagar STEC	Detección de O157 y no-O157 a través de sustrato cromogénico	85	92	24 h
Rainbow Agar O157	Detección de O157 y algunas no-O157 a través de actividad β-glucuronidasa y β-galactosidasa	no determinada	no determinada	24 h
Sorbitol-MacConkey	Detección de O157 a través de la falta de fermentación del sorbitol	98	99	24 h
Inmunoensayos				
BioStar OIA SHIGATOX§	No puede diferenciar Toxinas Shiga	98	99,4	15 min
Duopath Verotoxins Gold Labeled Immunosorbent Assay¶	Toxinas Shiga; puede diferenciar entre 1 y 2	100 (stx1) 99 (stx2)	98 (stx1) 97 (stx2)	20 min
Immunocard STAT EHEC**	Toxinas Shiga; puede diferenciar entre 1 y 2	92	100	20 min
Premier EHEC††	Toxinas Shiga; no puede diferenciar entre 1 y 2	96	100	3,5 h
Shiga Toxin Check	Toxinas Shiga; no puede diferenciar entre 1 y 2	80	98,2	3 h
Shiga Toxin Quick Check	Toxinas Shiga; puede diferenciar entre 1 y 2	85	100	2 h
Detección molecular				
EntericBio real time Gastro Panel I	Multiplex PCR	100	99,8	3 h
FilmArray GI panel	Multiplex PCR basado en Array	100	99,5	3h
Seeplex Diarrhea ACE Detection	Multiplex PCR con tecnología de oligonucleótidos dual priming	100	99,6-100	3h

Ensayo de detección TaqMan in-house STEC	Real-time PCR que detecta stx1 y 2 por separado	100	100	3h
xTag Gastrointestinal Pathogen Panel	Multiplex PCR con hibridación de sondas	93,5-100	98,8-100	3h

Tabla 1. Métodos de detección STEC. Fuente: Front. Microbiol., 12 April 2016. (Parsons *et al.*, 2016).

Utilidad de medios de cultivo y estrategias

Los métodos no basados en medios de cultivo pueden probar la presencia de Stx1 y/o Stx2 mediante la detección de secuencias de ADN específicas o antígenos; sin embargo, solo el aislamiento en cultivo puro de la cepa patógena puede permitir una caracterización fenotípica completa del organismo para propósitos epidemiológicos.

Además, los cultivos pueden aumentar la sensibilidad al enriquecer la población de organismos productores de toxinas, lo que permite su detección en circunstancias difíciles. Los cultivos pueden realizarse en sitios con menos equipamiento y capacitación que los métodos moleculares o serológicos, lo que afecta el costo y el tiempo para el diagnóstico. La detección de STEC por medio de cultivo es necesariamente un proceso de varios pasos. La detección de STEC en heces requiere el uso de medios selectivos y diferenciales. Los medios indicadores aumentan la especificidad y potencialmente aumentan la sensibilidad al introducir indicadores diferenciales para cepas particulares de STEC (Bettelheim *et al.*, 1998; Gill *et al.*, 2014) pero están restringidos por los medios bioquímicos utilizados para causar las reacciones cromogénicas, por lo que es de suma importancia contar con métodos rápidos, para un diagnóstico a tiempo, y evitar el desarrollo del SUH.

Finalmente, se debe realizar al menos un paso de confirmación mediante una prueba inmunológica o molecular para confirmar el diagnóstico; este requisito es forzado por la falta, en la actualidad, de agentes selectivos o diferenciales basados en agar específicos para la toxina Stx. Los medios indicadores también son

relativamente más caros debido a los colorantes y aditivos adicionales requeridos. Un resultado negativo para STEC O157 no descarta la presencia de STEC no O157.

Inmunoensayos para la detección de *Escherichia coli* productora de toxina Stx

Debido a que no se dispone de ningún medio de cultivo para la detección práctica de todos los serotipos de STEC, la identificación de la toxina Stx en heces es un método alternativo para diagnosticar la enfermedad relacionada con STEC. Los primeros inmunoensayos enzimáticos EIA (Enzyme Immuno Assay) desarrollados para Stx identificaron colonias de STEC basadas en la unión de anticuerpos monoclonales a Stx1 y Stx2 inmovilizado en membranas (Perera *et al.*, 1988; Milley y Sekla, 1993). Desde la creación de estos EIA que se requirió el crecimiento de colonias aisladas en un medio sólido, se han desarrollado una serie de ensayos para la detección de toxina Stx directamente de heces o de cultivos de heces enriquecidos.

Uno de los EIA más evaluados y utilizados es el inmunoensayo de micropocillos Premier® EHEC (Meridian Bioscience Inc., Cincinnati, OH, EE. UU.). Varios estudios, que utilizaron cultivos de heces en medios enriquecidos, encontraron que Premier® EHEC demuestra una alta sensibilidad y especificidad (Tabla 1). Premier® EHEC también se ha utilizado para detectar Stx directamente de muestras clínicas sin el uso de pasos de enriquecimiento; un grupo encontró que este enfoque tenía una sensibilidad del 83,9% y una especificidad del 99,8% (Teel *et al.*, 2007).

Otro inmunoensayo de micropocillos que se ha sometido a una evaluación clínica, el ensayo ProSpect™ Shiga Toxin *E. coli* (Remel, Lenexa, KS, EE. UU.), demostró una sensibilidad inferior en comparación con Premier® EHEC (Tabla 1). Además de los EIA de micropocillos, se han desarrollado otros tipos de inmunoensayos para detectar STEC. Uno de estos ensayos es el inmunoensayo óptico BioStar® SHIGATOX (Inverness Medical Professional Diagnostics, Inc., San Diego, CA, EE.

UU.) que detecta Stx por su interacción con anticuerpos anti-Stx en la superficie de una oblea de silicio; esta interacción provoca un aumento en el grosor óptico de la película delgada y produce un cambio de color visible en la oblea. De manera similar, Duopath Verotoxin-test™ (Merck, Darmstadt, Alemania) es un ensayo inmunocromatográfico que emplea anticuerpos anti-Stx inmovilizados en una membrana para unir y detectar Stx. En estudios anteriores, el ensayo BioStar® SHIGATOX mostró un rendimiento superior al Duopath Verotoxin-test™ (Tabla 1). Sin embargo, Duopath Verotoxin-test™ es ventajoso porque distingue entre Stx1 y Stx2 que producen STEC. Premier® EHEC demostró una sensibilidad del 90,5%, similar a la observada en estudios anteriores (Grif *et al.*, 2007; Teel *et al.*, 2007; Hermos *et al.*, 2011), y el ensayo de Shiga Toxin Chek™ tuvo una sensibilidad del 80%, la cual disminuyó al 70% cuando se utilizaron muestras no enriquecidas (Chui *et al.*, 2015).

Hay una gran cantidad de inmunoensayos disponibles para la detección de STEC directamente en heces o en cultivos selectivos de heces. La mayoría de estas pruebas detectan Stx1 y Stx2, como también el antígeno O157.

Pruebas moleculares para STEC

Si bien la detección de Stx es una forma directa de determinar si las muestras clínicas contienen STEC, ha habido mucho interés en los métodos basados en la detección de ácidos nucleicos que revelen la presencia de genes *stx* en las heces.

Se diseñó una PCR convencional dirigida a *stx1* y *stx2* en una sola reacción (Pollard *et al.*, 1990); posteriormente se describió un ensayo similar que podría detectar STEC a partir de ADN aislado de heces (Brian *et al.*, 1992). Desde entonces, se han desarrollado una multitud de ensayos de PCR y varios de ellos utilizan plataformas en tiempo real. Algunas de las ventajas de usar los ensayos de PCR en tiempo real incluyen una excelente sensibilidad y especificidad y la capacidad de diseñar ensayos *multiplex* para detectar y diferenciar entre *stx1* y

stx2, otros genes de virulencia como el gen *intimin*, *eae*, y el gen de la hemolisina, *ehx4*, e incluso otros patógenos gastrointestinales.

El primer ensayo de PCR en tiempo real dirigido a *stx*, en heces clínicas infectadas naturalmente, tuvo una sensibilidad del 100% y una especificidad del 92% (Bélanger *et al.*, 2002). Se han diseñado numerosos ensayos de PCR en tiempo real y, en general, muestran tasas de detección similares con pocos resultados falsos positivos. En comparación con el método de cultivo, como *gold standard*, la sensibilidad de la PCR en tiempo real fue de un 96.4% y la especificidad fue del 97.8% (Gerritzen *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2012). Los ensayos comerciales de PCR en tiempo real, como el GeneDisc® (GeneDisc® Technologies Pall Corporation, NY, EE. UU.) y el sistema BAX® (DuPont Nutrition and Health, Wilmington, DE, EE. UU.) incluyen un panel para la detección rápida de STEC, dirigida a *stx1*, *stx2*, y *eae* u otros genes, seguidos de paneles que se dirigen a los genes específicos de serotipo de la STEC O157 y las seis principales de la STEC no O157. Estos paneles de STEC de PCR en tiempo real exhiben una alta sensibilidad y pueden aplicarse en algoritmos de detección de dos pasos que primero capturan STEC seguido de la detección de los serotipos STEC informados más frecuentemente (Fratamico *et al.*, 2012; Wasilenko *et al.*, 2014). La mayoría de los ensayos de PCR en tiempo real utilizan una serie de sistemas de detección disponibles, incluyendo SYBR *green*, TaqMan®, sondas *beacon*, sondas de transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET), ensayos LUX™ (luz sobre extensión) con cebadores marcados individualmente sin sondas, etc. Además de contribuir a la heterogeneidad de los métodos disponibles, los diferentes ensayos de PCR en tiempo real a menudo apuntan a diferentes regiones dentro de *stx1* y *stx2*, (Chui *et al.*, 2010). También están disponibles numerosos ensayos moleculares multiplex para la detección de múltiples patógenos gastrointestinales. El Panel de Patógenos Gastrointestinales (GPP) xTag® (Luminex Corporation, Austin, TX, EE. UU.) está aprobado por la FDA y Health Canada para la detección de múltiples agentes de gastroenteritis. El GPP emplea una PCR multiplex con un paso de transcriptasa inversa destinado a amplificar el material genético de 15 patógenos o toxinas gastrointestinales:

rotavirus A, adenovirus 40 y 41, norovirus GI y GII, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Campylobacter* spp., toxina A/B de *Clostridium difficile*, STEC, toxina estable y lábil al calor (ST / LT) de *Escherichia coli* Enterotoxinogénica (ETEC), *Escherichia coli* Enterohemorrágica O157 (EHEC), *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio cholerae*, *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* spp. y *Entamoeba histolytica*. Los amplicones generados se hibridan luego con oligonucleótidos unidos a microesferas, que son detectados en el sistema de lectura Luminex 200. En el GPP se incluyen blancos separados para la detección de *E. coli* O157 y STEC no O157. Las múltiples evaluaciones realizadas en diferentes regiones han demostrado altas sensibilidades y especificidades (Tabla 1).

Targets de amplificación

El objetivo más común de las pruebas moleculares para STEC es el propio operón *stx*. Como se describe, existen 2 versiones de *stx*, *stx1* y *stx2*. Además de estas dianas de detección, se usa una diana de control positivo, con frecuencia un gen rRNA o un gen de *housekeeping*, para verificar la detección de *pipeline*. La detección de cada uno de estos *targets* es el mínimo para la detección molecular de STEC. Las pruebas moleculares multiplex permiten la detección de dianas adicionales (patógenos) y la mejora del rendimiento del ensayo mediante la selección de dianas múltiples dentro de un único patógeno (por ejemplo, la detección de *stx1* y *stx2* en STEC). Se pueden elegir *targets* adicionales entre los factores de virulencia más asociados con la enfermedad persistente. El gen de D-glucuronidasa (*uidA*), analizado en el contexto del sorbitol y los agares indicadores, es un *target* frecuente, al igual que el factor de adhesión “*eae*” y la enterolisina “*ehxA/hlyA*”. Una aplicación adicional es la detección de *loci* asociados con una cepa específica de STEC (Paton *et al.*, 1998).

Factores de virulencia

Toxina Stx

Esta toxina Stx es el principal factor de virulencia de STEC, y es la principal responsable del desarrollo del SUH. Todas las toxinas Stx comparten características estructurales y enzimáticas; sin embargo, existen diferencias con respecto a la secuencia, la actividad biológica y la reactividad serológica (Krüger and Lucchesi, 2015). Las toxinas Stx de *E. coli* se clasifican en dos tipos principales: Stx1 y Stx2. Cada grupo comprende varios subtipos, siendo el tipo Stx2 más heterogéneo que el Stx1. La toxina Stx puede clasificarse en: Stx1 (3 subtipos a, c y d) y Stx2 (7 subtipos del a al g) (Scheutz *et al.*, 2012). Es posible correlacionar Stx2a como la toxina más virulenta y la responsable de más casos de SUH producidos. En cambio Stx2e, Stx2f y Stx2g están asociadas a baja patogenicidad en humanos. En un estudio de la potencia de las toxinas Stx purificadas (Fuller *et al.*, 2011) se encontraron diferencias tanto en condiciones *in vitro* como *in vivo*. En particular, Stx2a y Stx2d demostraron ser más potentes que Stx2b, Stx2c y Stx1. Cepas STEC pueden llevar un solo tipo de Stx, ambos o incluso una combinación de diferentes subtipos. Tanto Stx1 como Stx2 son capaces de desarrollar SUH tras una infección, sin embargo Stx2 está más estrechamente relacionado con el desarrollo de SUH (Boerlin *et al.*, 1999).

Tanto Stx1 como Stx2 están codificados en bacteriófagos dentro del cromosoma bacteriano. Los bacteriófagos portadores de la toxina Stx pueden activar su ciclo lítico bajo condiciones de estrés ambiental para la bacteria, llevando a la lisis bacteriana y a la diseminación de los propios bacteriófagos Stx (Neely and Friedman, 1998). Los bacteriófagos Stx se describen en detalle más adelante.

Estructura

La toxina Stx es miembro de la familia de toxinas bacterianas AB5. La subunidad A (StxA) posee actividad N-glicosidasa contra el rRNA 28S del ribosoma 60S en el citosol, lo que resulta en la inhibición de la síntesis de proteínas en células eucariotas y la activación de la cascada de señalización proinflamatoria conocida como la respuesta al estrés ribotóxico (RSR) (Smith *et al.*, 2003). Las cinco subunidades B (StxB) forman un pentámero que se une a los receptores de Gb₃ en la membrana celular (Thompson *et al.*, 2000) (Figura 7).

Función

El ingreso de la toxina a la célula y la distribución hacia diferentes órganos es mediado por tres mecanismos principales:

-Endocitosis: Se da tras la unión entre las subunidades B y el receptor Gb₃, la subunidad A se introduce en el citoplasma mediante invaginación de la membrana celular (Lee *et al.*, 2005).

-Macropinocitosis (MPC): Permite la entrada de Stx cuando el receptor de las membranas (Gb₃) no es expresada por la célula.

-Transcitosis: La toxina es capaz de pasar de un espacio extracelular a otro mediante vesículas. Facilita la propagación de la toxina hacia otras células endoteliales que expresen el receptor Gb₃ (In *et al.*, 2013).

Una vez que Stx se introduce en la célula, la subunidad A de la toxina Stx interacciona con el aparato de Golgi y el retículo endoplasmático. La subunidad A es una RNA-glicosidasa que elimina una adenina del rRNA 28S, inhibiendo así la síntesis de proteínas y causando la muerte celular.

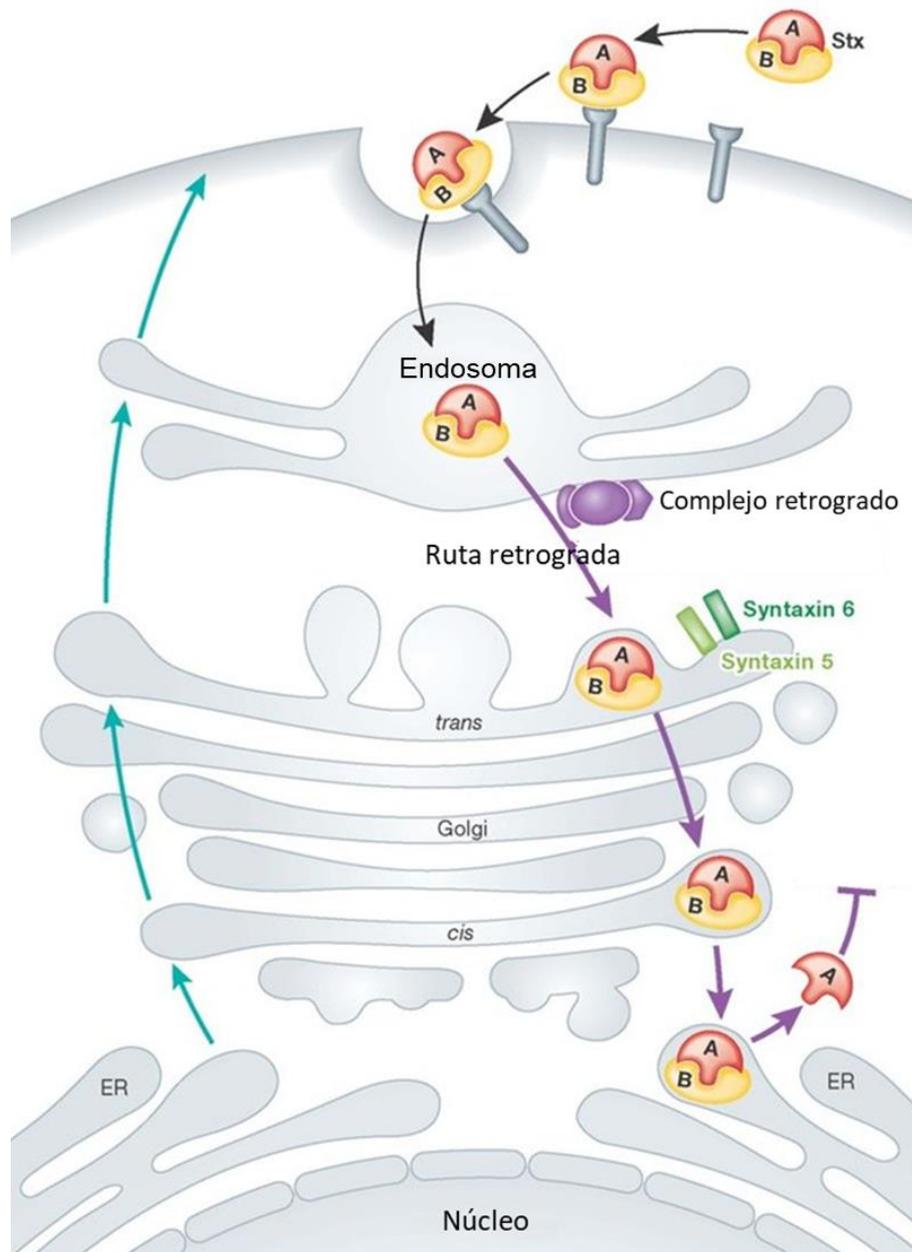


Figura 7. Las dos subunidades (AB) de la toxina Stx ingresan a la célula de mamífero a través de endocitosis, ya sea mediada o no por receptores de Gb₃ (clatrina), y luego se transporta desde el endosoma a la aparato de Golgi utilizando una sección de la vía secretora llamada “vía retrograda” (flechas moradas). La toxina luego llega al retículo endoplásmico (ER) donde se escinde. La subunidad A ingresa al citoplasma y bloquea la síntesis de proteínas en el ribosoma. Modificado de Seaman & Peden (2010).

La toxina Stx puede ejercer sus efectos sobre las células eucariotas por uno de tres mecanismos conocidos. En primer lugar, la inactivación de los ribosomas y la inhibición de la síntesis de proteína citoplasmática puede resultar en la muerte celular (Obrig *et al.*, 1988). En segundo lugar, la generación del ARNr 28S depurinado en los ribosomas, dependiente de Stx, inicia una respuesta de transducción de señales única conocida como la "RSR" que conduce a la activación de citocinas, quimioquinas, u otros factores que dan lugar a numerosos eventos diferentes incluyendo la apoptosis de la célula afectada (Jandhyala *et al.*, 2008). En tercer lugar, la unión al receptor de holotoxina Stx o su subunidad B pueden iniciar una cascada citoplasmática de transducción de señales diferente de la respuesta activada por vía RSR (Wälchli *et al.*, 2009).

Translocación desde el intestino

Las cepas STEC colonizan el epitelio de la mucosa en el colon humano promoviendo la producción y absorción de Stx. Con respecto a la importancia de las adaptaciones de colonización para mejorar la patogenicidad, se ha demostrado en un modelo de ratón para infecciones con STEC, que las cepas recuperadas de las heces son capaces de generar una colonización más generalizada y persistente que la cepa parental (Fernandez-Brando *et al.*, 2012). Estos resultados sugieren que las cepas recuperadas de las heces tienen una mayor capacidad patógena aunque la producción Stx2 fue similar o incluso menor, por el aumento de la colonización y persistencia de la cepa bacteriana. Estos resultados además resaltan la importancia de la adaptación de las bacterias al ambiente intestinal del huésped para el proceso de colonización y desarrollo del SUH en el establecimiento de infecciones por STEC (Fernandez-Brando *et al.*, 2012).

Aunque se ha avanzado mucho en el entendimiento de la compleja y dinámica colonización del colon humano causada por STEC, el mecanismo preciso por el cual Stx contribuye a la patología intestinal no se conoce bien. Como las cepas de STEC son generalmente no invasivas, el desarrollo sistémico del SUH tras el establecimiento de infecciones por STEC es resultado de la absorción sistémica de

Stx y, posiblemente, de otros factores de virulencia en el lumen intestinal. Se demostró que Stx podría cruzar el epitelio intestinal vía transcelular y paracelular (Figura 8).

La transcitosis transcelular vía macropinocitosis independiente de receptores puede representar la vía principal, al menos durante las primeras etapas de la infección (Malyukova *et al.*, 2009), mientras que la vía paracelular puede ser la entrada de Stx durante la inflamación aguda de la mucosa del colon (Besser *et al.*, 1999).

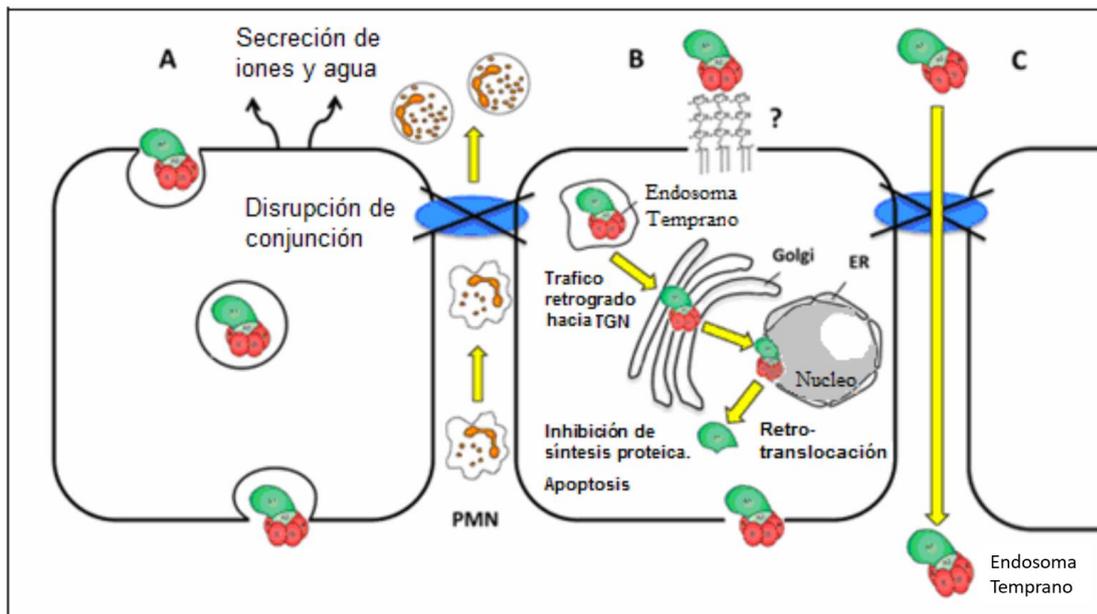


Figura 8. Vías transcelulares y paracelulares de Stx a través del epitelio del colon humano. (A) Macropinocitosis independiente de Gb₃. (B) Translocación Gb₃ dependiente por transporte retrógrado y liberación Stx después de la muerte celular. (C) Transporte paracelular durante la trans migración de neutrófilos (PMN). Esquema adaptado de Ibarra *et al.*, 2013

Aunque la mayoría de los datos relativos al tráfico de Stx y la citotoxicidad se basan en estudios en células que llevan el receptor específico de Stx, el hallazgo de transporte retrógrado de Stx en la línea celular intestinal humana T84 que carece de receptor Gb₃, es de particular interés. En estas células, Stx1 se detectó en los endosomas, la red trans-Golgi (TGN), el retículo endoplasmático (ER), y la membrana nuclear (Philpott *et al.*, 1997). Aunque la escisión de la subunidad StxA

se produce después de 6 horas de incubación, no se observó citotoxicidad incluso en períodos de 24 horas. Por el contrario, en las células Caco-2, una línea celular intestinal humana que expresa receptores Gb₃, Stx1 y Stx2 se transportan al ER, y las subunidades StxA de ambas se activan por escisión dependiente de furina y producen RSR con la inhibición de la síntesis de proteínas y la consiguiente inducción de la apoptosis celular (Schuller *et al.*, 2004).

También se ha descrito un movimiento de Stx a través de la barrera intestinal sin daño celular aparente probablemente a través de una ruta transcelular activa, que puede ser incrementado por la transmigración de neutrófilos (PMN) a través del endotelio (Hurley *et al.*, 2001) (Figura 8). En conjunto, estas evidencias sugieren que la citotoxicidad de Stx se asocia con la presencia del receptor Gb₃. Sin embargo, se discute su expresión en la membrana apical de las células epiteliales de la mucosa del colon humano. La existencia (Muthing *et al.*, 2009) y la ausencia de Gb₃ (Schuller *et al.*, 2004) ha sido demostrada por diferentes grupos usando distintas condiciones experimentales.

Además de la liberación de toxina después de la lisis bacteriana, Stx puede liberarse dentro de vesículas de la membrana externa (OMV) durante el crecimiento bacteriano (Kolling *et al.*, 1999; Bielaszewska *et al.*, 2017). El modo de liberación de Stx podría tener un impacto en el mecanismo y la eficiencia de la penetración de la toxina a través de la barrera intestinal, ya que el epitelio intestinal humano no expresa el receptor Gb₃ (Schuller *et al.*, 2004), mientras que las células huésped pueden internalizar las OMVs a través de vías receptor-dependientes e independientes (O'Donoghue *et al.*, 2016). En particular, los estudios han demostrado un mejor transporte de Stx a través de células T84 polarizadas durante la infección por EHEC microaeróbica versus aeróbica (Tran *et al.*, 2014), lo que podría indicar una mayor captación de toxinas a través de OMVs. Alternativamente, los niveles bajos de oxígeno podrían promover la expresión de factores bacterianos que facilitan el transporte de toxinas.

Efectos inflamatorios de la toxina Stx y lipopolisacáridos en el intestino

Además de sus efectos citotóxicos, la toxina Stx es capaz de activar una respuesta inflamatoria en el intestino, en su interacción con las células sanguíneas y después de unirse a las células de los órganos blanco (Karpman *et al.*, 2014).

Estos efectos se producen simultáneamente con los efectos citotóxicos y se asocian con la liberación de una amplia gama de citoquinas proinflamatorias y quimiocinas. Los estudios *in vitro* han demostrado que la toxina Stx puede desencadenar la entrada de neutrófilos en el intestino al inducir la liberación de interleucina (IL)-8 y otras quimiocinas C-X-C (Thorpe *et al.*, 1999; Thorpe *et al.*, 2001; Yamasaki *et al.*, 1999). La interacción con los macrófagos peritoneales también condujo a la liberación de citoquinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) e IL-6 (Tesh *et al.*, 1994). El LPS también puede contribuir a la respuesta inflamatoria en el intestino (Tesh *et al.*, 1994). Los estudios en ratones han mostrado que la respuesta inicial del huésped a lipopolisacáridos (LPS) de *E. coli* O157:H7 es esencial para la eliminación bacteriana del intestino, por lo que los ratones que carecen de una respuesta adecuada a LPS estaban sujetos al desarrollo de una enfermedad más grave (Karpman *et al.*, 1997; Calderon *et al.*, 2008).

Toxicidad

La toxina Stx se une a los neutrófilos, monocitos, plaquetas y glóbulos rojos (Bitzan *et al.*, 1994; Te Loo *et al.*, 2000; Cooling *et al.*, 1998). Estas células sanguíneas son resistentes a los efectos citotóxicos de la toxina, en parte debido a la mínima síntesis de proteínas en las plaquetas y los glóbulos rojos. Las células pueden en cambio activarse y liberar microvesículas (Arvidsson *et al.*, 2015; Ståhl *et al.*, 2011). Los experimentos *in vitro* han demostrado que la toxina Stx induce la liberación de microvesículas de monocitos humanos, plaquetas (Ståhl *et al.*, 2009; Ståhl *et al.*, 2011) y glóbulos rojos (Arvidsson *et al.*, 2015).

La coestimulación con toxina Stx y *E. coli* O157-LPS mejoró la liberación de microvesículas de plaquetas y leucocitos en comparación con cada estimulante por separado (Ståhl *et al.*, 2009). Las microvesículas desprendidas de plaquetas y monocitos transportan factor tisular y fosfatidilserina (Ståhl *et al.*, 2009), así como el complemento C3 y C9 (Ståhl *et al.*, 2011). C5b-9 también se detectó en microvesículas de glóbulos rojos que también expusieron fosfatidilserina después de la estimulación con toxina Stx (Arvidsson *et al.*, 2015). La toxina en sí misma puede incorporarse en las microvesículas derivadas de células sanguíneas que se originan a partir de neutrófilos, monocitos, plaquetas y glóbulos rojos (Ståhl *et al.*, 2015). La toxina se localizó principalmente dentro de las microvesículas y no en su membrana externa (Ståhl *et al.*, 2015). Permaneciendo dentro de las microvesículas, puede transferirse a las células del órgano blanco y ser absorbida después de la endocitosis de toda la microvesícula (Ståhl *et al.*, 2015). En un modelo de ratón de infección por EHEC (Calderon *et al.*, 2008), se demostró que las microvesículas derivadas de células sanguíneas que llevan la toxina Stx son captadas por células endoteliales glomerulares renales y células tubulares (Ståhl *et al.*, 2015). Un aspecto notable de este hallazgo es que, a diferencia del glomérulo humano, las células endoteliales glomerulares de ratón carecen del receptor de la toxina Gb₃ (Psothka *et al.*, 2009). Después de que la toxina se elimina de las células sanguíneas, dentro de las microvesículas, las microvesículas que contienen la toxina pueden ser absorbidas incluso por las células que carecen de Gb₃.

Otros factores de virulencia

Existen en las STEC otros importantes factores de virulencia:

Otras toxinas como la “*cytolethal distending toxin*” (Cdt) o la enterohemolisina (HlyA). La Cdt puede encontrarse en muchas cepas de *E. coli* y está asociada con ciertos tipos de bacteriófagos (dependiendo a partir de que bacteriófago adquirió el gen de la toxina *stx*) (Friedrich *et al.*, 2006). Una vez en la célula, Cdt se activa enzimáticamente produciendo alargamiento de la célula y daño en el ADN. Algunas Cdt son capaces de causar daño en el epitelio y contribuir al SUH. La

HlyA, codificada en el plásmido pO157, lisa los hematíes para permitir la obtención del hierro a partir de los grupos hemo.

- Factores necrotizantes. Estos factores provocan en la célula alargamiento y multinucleación (Orden *et al.*, 1999). Se han descrito 3 tipos de factores necrotizantes, CNF1, CNF2 y CNF3, este último es patógeno en humanos. Las *E. coli* que presentan estos factores se las conocen como NTEC, observándose dichos factores en distintas cepas STEC.

- Autotransportadores. la proteasa multifuncional EspP es la mayormente estudiada en STEC, que inhibe el factor de coagulación V, evitando que se detenga la hemorragia (Brunder *et al.*, 1997).

- STEC LEE positivas. Estas cepas forman lesiones A/E similares a las formadas por EPEC. Numerosas adhesinas son codificadas en la isla de patogenicidad LEE, contribuyendo a la colonización del epitelio y a las superficies de los alimentos. Se ha demostrado que fimbrias tales como la fimbria de unión a la laminina de *E. coli* (ELF) y la fimbria polar larga (Lpf) se unen a la matriz extracelular (Farfan *et al.*, 2011) (Samadder *et al.*, 2009). El pili hemorrágico de *E. coli* (HCP) es un pili de tipo IV encontrado en STEC O157:H7 que forma fibras empaquetadas largas que pueden unirse a las proteínas de la matriz extracelular en las células epiteliales (Xicohtencatl-Cortes *et al.*, 2007).

- Adhesina aglutinante de STEC (Saa). Se encuentra en cepas STEC LEE negativas. No todas las cepas STEC que causan SUH son LEE positivas. Varias cepas LEE negativas han sido aisladas de pacientes con SUH, como los serotipos O91:H21 (Ito *et al.*, 1990), O104:H4 (Frank *et al.*, 2011), y O113:H21 (Paton *et al.*, 1999). Se han identificado varias adhesinas únicas para cepas LEE negativas, la más importante es la adhesina aglutinante de STEC (Saa) que se localiza en la superficie de la membrana externa bacteriana, quedando expuesta a la superficie celular eucariota.

Reconocimiento eucariótico, in vitro e in vivo, de los promotores de Stx

En las cepas STEC identificadas, los genes de la toxina Stx, se encuentran en el genoma de bacteriófagos tipo lambda (Neely *et al.*, 1998). La inducción del bacteriófago es crítica para la expresión del gen de la toxina y para la capacidad de STEC de causar la enfermedad (Tyler *et al.*, 2013). Recientemente se ha demostrado la capacidad de las células eucariotas de reconocer secuencias genéticas como las de los promotores de Stx2, para transcribir y producir de forma activa la toxina (Bentancor *et al.*, 2013a). En este trabajo se evaluó la capacidad de traducir y expresar, de forma activa, la toxina Stx2, por parte de células susceptibles a la misma. Para ello, las células se transfectaron con una construcción plasmídica conteniendo el gen de *stx2* bajo su propio promotor, pStx2, y se observó citotoxicidad, equivalente que a incubar esas células con Stx2 purificada. Estos resultados fueron continuados en estudios *in vivo* (Bentancor *et al.*, 2013b). Ratones Balb/c fueron inoculados con la construcción plasmídica usando el procedimiento de inoculación hidrodinámica. Los ratones que recibieron el plásmido por inoculación hidrodinámica murieron con signos típicos de intoxicación con Stx2 (daño renal, neutrofilia y daño cerebral). La toxina Stx2 fue detectada en cerebro mediante inmunofluorescencia. Por otra parte, ratones inmunizados con la quimera BLS-Stx2B sobrevivieron a la inoculación de pStx2.

Estos resultados demuestran la capacidad de expresión de Stx2 *in vivo* manteniendo una actividad tóxica equivalente a la proteína producida en la bacteria durante la infección (Bentancor *et al.*, 2013b).

Bacteriófago 933W

El bacteriófago 933W es un bacteriófago temperado del tipo lambda inserto en cepas STEC, y el gen que codifica la toxina Stx se encuentra en su genoma (Schmidt *et al.*, 2001). Durante la infección por STEC, se produce la escisión y replicación del bacteriófago y se expresa y libera la toxina Stx. Posteriormente, los bacteriófagos libres pueden infectar otras bacterias susceptibles en el intestino, exacerbando la replicación de bacteriófagos y la expresión de Stx (Shmidt *et al.*, 2001). Tyler y colaboradores han demostrado que las cepas STEC mutantes en el mecanismo de escisión del bacteriófago no inducen enfermedad renal en modelo animal (Tyler *et al.*, 2013)

Inducción de Bacteriófagos codificantes de toxina Stx y producción de Stx

Como se mencionó anteriormente, los genes que codifican para la toxina Stx en STEC se encuentran típicamente en la región de transcripción génica tardía de los bacteriófagos lambdoides integrados (Mizutani *et al.*, 1999; Tyler *et al.*, 2005) y, por lo tanto, se predice que su expresión estará controlada temporalmente por los regulones de los bacteriófagos (Neely y Friedman *et al.*, 1998; Neely y Friedman 1998; Wagner *et al.*, 2002). Los primeros estudios demostraron que los altos niveles de producción y liberación de Stx de la bacteria, *in vitro*, requerían la inducción del bacteriófago (Wagner *et al.*, 2002).

Los inductores de bacteriófagos lambdoides son comúnmente agentes que dañan el ADN o interfieren con la síntesis de ADN, como la luz ultravioleta o la mitomicina C, entre otros. Estos estímulos inductores activan la proteína RecA bacteriana, lo que finalmente lleva a la escisión de la proteína represora principal del bacteriófago, CI, lo que permite la expresión de genes tempranos y medios del bacteriófago. La transcripción tardía del gen, que requiere el antiterminador Q, da como resultado la expresión de muchos genes estructurales del virión y de las

funciones endolíticas S y R, que lisan la bacteria y liberan la progenie fágica (Casjens y Hendrix, 2015) (Figura 9).

La transcripción inicia la cascada reguladora (que se muestra en 9b) que está bloqueada por el enlace del represor CI en los operones OL y OR. La marca del rayo amarillo indica la acción de un agente que provoca la respuesta SOS que conduce a una mayor producción y activación de RecA. La RecA activada facilita la autoescisión del represor. La transcripción de PRM dirige la síntesis de represor en el lisógeno. En ausencia de Q, la transcripción iniciada en PR' termina en el terminador posterior inmediato.

La cascada reguladora comienza con la transcripción iniciada en PL y PR que termina después de la síntesis de un mensajero corto (Figura 9b). Esta transcripción temprana permite la expresión de N, que actúa en los sitios NUT en el ARN para modificar la ARN Polimerasa a una forma que trasciende los terminadores. Q, que luego se expresa, actuando en el sitio qut en el ADN, modifica la transcripción iniciada en PR' a una forma resistente a la terminación que puede transcribir genes río abajo, que incluyen *stx* y *lys*, así como la mayoría de los genes necesarios para la producción de bacteriófagos viables.

Otras vías de señalización que involucran el *quorum sensing* o las respuestas al estrés también se han relacionado con la inducción lisogénica (Hughes *et al.*, 2009; Imamovic *et al.*, 2016). Desafortunadamente, se sabe que los antibióticos comúnmente utilizados para tratar las enfermedades diarreicas en niños y adultos inducen la respuesta SOS. Se ha demostrado que la trimetoprim-sulfametoxazol y la ciprofloxacina aumentan la producción de Stx *in vitro* (Matsushiro *et al.*, 1999), y el tratamiento antibiótico de individuos infectados con EHEC se asocia con un mayor riesgo de SUH (Wong *et al.*, 2000).

Es por esto que, como mencionamos anteriormente, los antibióticos están contraindicados para la infección por STEC por inducir la escisión del bacteriófago y la consecuente expresión de toxina Stx

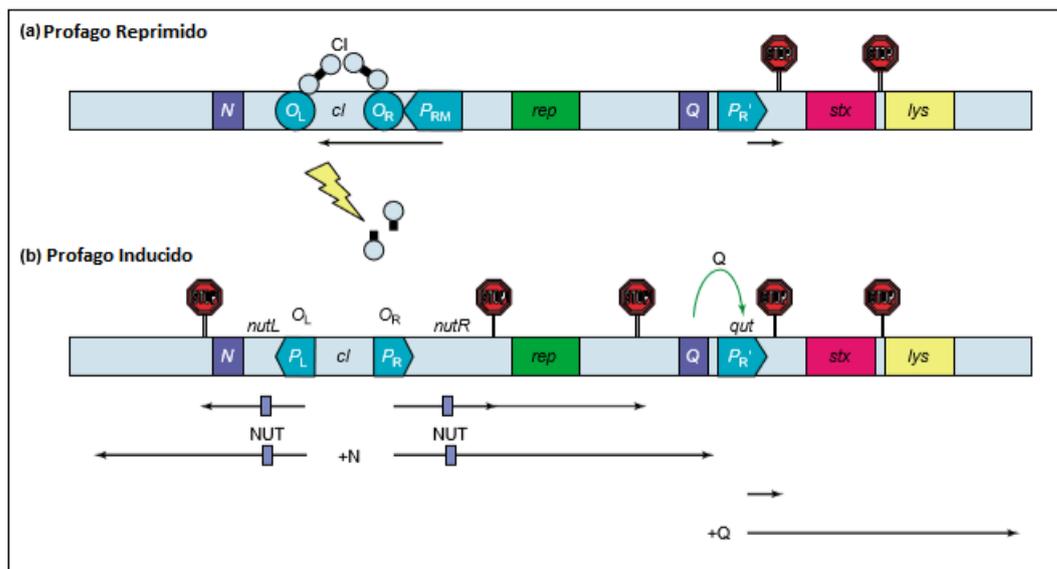


Figura 9. Región reguladora temprana de los bacteriófagos lambdoides que muestra la ubicación de sitios relevantes, genes, interacciones y patrones de transcripción (a) bacteriófago reprimido (b) Probacteriófago inducido. Por debajo se muestran los patrones de transcripción en ausencia y presencia de N y Q. Los genes y la función de sus productos son los siguientes: *cl*, represor; *lys*, lisis; N y Q, transcripción anti-terminador; *rep*, replicación; *stx*, toxina Stx. Las señales reguladoras son las siguientes: *nut* (ADN) y NUT (ARN), sitio para la modificación N del ARN Pol (funciona con varios factores del huésped en el ARN); O, operadores; P, promotores; *qut*, sitio para la modificación Q de ARN Pol; Las señales de stop denota sitios o regiones que contienen terminadores de transcripción. (Waldor, M.K. and Friedman D.I.. 2005).

Bacteriófago lambda e internalización en células eucariotas

En el momento de la inducción de la fase lítica, la progenie viral también es capaz de infectar y transducir *in vivo* e *in vitro* otras bacterias presentes en el intestino (Schmidt *et al.*, 2001). De hecho, los bacteriófagos son capaces de infectar y lisogenizar cepas de laboratorio de *E. coli*, así como cepas de *E. coli* derivadas de intestinos de rumiantes (Gamage *et al.*, 2003; Cornick *et al.*, 2006) y humanos (Figura 10). Las cepas lisogénicas resultantes son capaces de producir toxinas y partículas de bacteriófago infecciosas, facilitando la propagación de genes de la toxina entre las cepas de *E. coli* y otras enterobacterias.

Por otra parte, diferentes líneas de evidencia han demostrado que el bacteriófago lambda es capaz de ser internalizado por células de mamífero, y que los vectores basados en el bacteriófago lambda, que contienen un casete de expresión de genes de mamíferos, son capaces de expresar genes codificados en las células blanco *in vitro* e *in vivo* (Lankes *et al.*, 2007). La capacidad de las partículas del bacteriófago lambda para ser incorporado por células de mamífero *in vivo* depende del proceso de absorción, bacteriofagocítica o no, (posiblemente incluyendo macropinocitosis) y se incrementaría a través de un mecanismo dependiente de anticuerpos mediada por el receptor Fc (Shimada *et al.*, 1999).

Los virus han desarrollado diversas estrategias para atravesar la barrera epitelial y actuar como agentes patógenos. La unión y entrada de los virus es un proceso de múltiples etapas que implica el reconocimiento y unión a la superficie de las células epiteliales usando una variedad de receptores de fijación. Estos mecanismos se han descrito en detalle (Bomsel and Alfsen, 2003). Si las bacterias y los virus pueden translocar a través de la barrera intestinal, se podría esperar que los bacteriófagos también puedan traspasar la pared intestinal. Si la translocación de los bacteriófagos tiene lugar, esto debería llevar a la presencia de bacteriófagos en sangre periférica “fagemia”, un fenómeno que podría tener algunas consecuencias funcionales, especialmente en vista de datos que sugieren que los bacteriófagos pueden ejercer actividades inmunobiológicas (Górski and Weber-Dąbrowska, 2005). Hay varios reportes que describen la presencia de bacteriófagos en sueros utilizados para el cultivo de tejido *in vitro* (Chu *et al.*, 1972; Merrill *et al.*, 1972).

Estudios recientes demostraron la capacidad de diferentes bacteriófagos de ingresar a distintas células eucariotas (Timo *et al.*, 2017; Nguyen *et al.*, 2017). Timo y colaboradores, informaron sobre la unión y la penetración del bacteriófago PK1A2 de *Escherichia coli* en células eucarióticas de neuroblastoma *in vitro*. El bacteriófago interactúa con el ácido polisiálico de la superficie celular, que comparte similitud estructural con el receptor del bacteriófago.

Los virus bacterianos se encuentran entre las entidades biológicas más numerosas dentro del cuerpo humano (Manrique *et al.*, 2016). Estos virus se encuentran dentro de las regiones del cuerpo que, de manera convencional, se han considerado estériles, como la sangre, la linfa y los órganos. Sin embargo, el mecanismo principal que utilizan los virus bacterianos para eludir las capas de células epiteliales y acceder al cuerpo sigue siendo desconocido. Nguyen y colaboradores, utilizaron estudios *in vitro* para demostrar la transcitosis rápida y direccional de diversos bacteriófagos a través de capas de células confluentes que se originan en el intestino, pulmón, hígado, riñón y cerebro.

Bacteriófago como nuevo target terapéutico

La amplificación en la producción de toxina Stx en el intestino se produce por la capacidad de la progenie viral de infectar bacterias susceptibles presentes en la flora comensal (Cornick *et al.*, 2006).

Teniendo en cuenta que cepas de STEC mutantes en el mecanismo de escisión no producen SUH (Tyler *et al.*, 2013), se considera crítico evaluar el rol del bacteriófago en el desarrollo del SUH.

Por otra parte, la búsqueda de compuestos que puedan tener actividad anti-bacteriófago es un recurso importante y alternativo para evaluar una protección activa frente al bacteriófago.

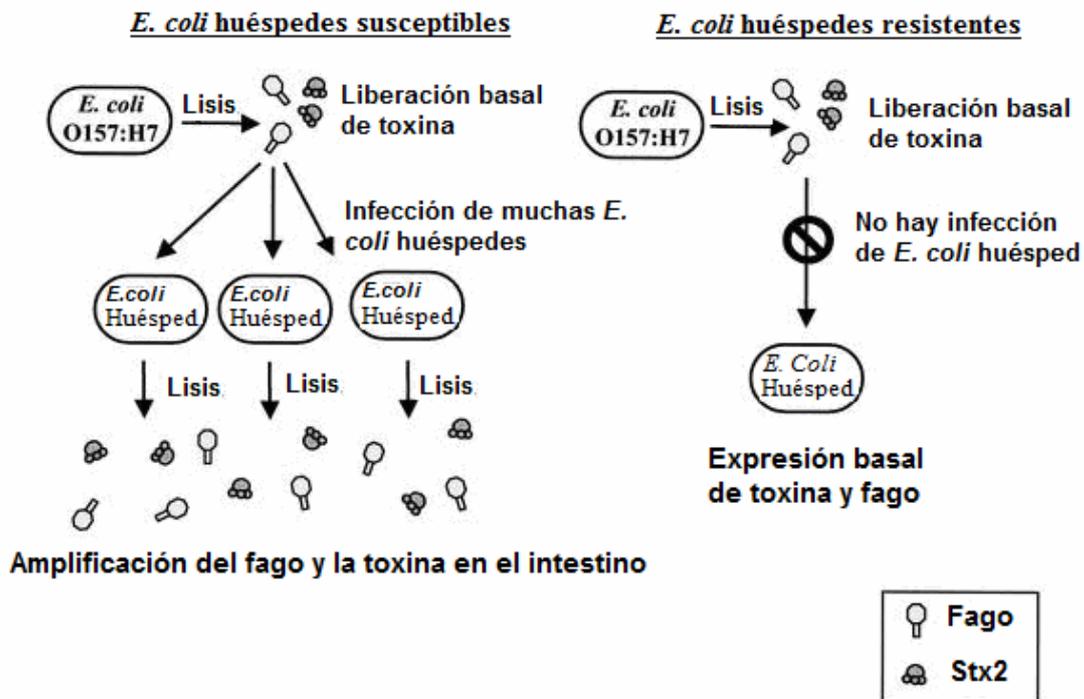


Figura 10. Modelo del efecto de *E. coli* intestinal en la producción de Stx2 por *E. coli* O157:H7. Durante una infección con *E. coli* O157:H7, en el intestino se produce la lisis del patógeno, generándose la liberación de un nivel basal de bacteriófago y la toxina. (Cornick et al., 2006).

Quitosan

El quitosan es un polisacárido lineal compuesto de cadenas distribuidas aleatoriamente de β -(1-4) D-glucosamina (unidades deacetiladas) y N-acetil-D-glucosamina (unidad acetilada). El mismo, presenta gran número de aplicaciones comerciales y biomédicas y está aprobado por la *FDA* (*Food and Drug Administration*) para el uso en humanos. En particular, se ha demostrado una fuerte actividad antimicrobiana de este compuesto contra varios microorganismos (Kong et al., 2010). Más recientemente, se ha demostrado la actividad antibacteriofágica del quitosan frente al bacteriófago c2, el cual infecta cepas de *Lactococcus*- y contra el bacteriófago MS2 con capacidad de infectar cepas de *E. coli*- (Ly-Chatain et al., 2013). Por ello, el quitosan fue evaluado para ver si presentaba actividad antibacteriofago 933W. Se demostró que el quitosan tiene

fuertes efectos antibacteriófagos, tanto en condiciones *in vitro* como *in vivo* (Amorim *et al.*, 2014).

Hidróxido de Bismuto

En Argentina, la crema de Hidróxido de Bismuto con pectina Chobet® (CBCHP) ha sido recetada como un medicamento antidiarreico para uso oral desde hace más de 60 años. Los compuestos de bismuto se han utilizado ampliamente en gastroenterología. En estudios previos en pacientes se encontró absorción de Bismuto en el intestino grueso por debajo del 1% y una concentración teórica de 10,8 mg ml⁻¹ (Kliegman *et al.*, 2008).

Muchos estudios epidemiológicos han confirmado la eficacia de tratamientos con compuestos de bismuto para la prevención de diarrea, en particular por los diversos patotipos de *E. coli*, *Salmonella spp.* y *Shigella spp.* (Steffen *et al.*, 1986; DuPont *et al.*, 1987).

Subils y colaboradores han reportado que el Hidróxido de Bismuto tiene efectos inhibitorios sobre cepas STEC y es capaz de desactivar la toxina Stx (Subils *et al.*, 2014).

La ventaja del uso del Hidróxido de Bismuto es que se encuentra disponible comercialmente y su aplicación terapéutica en pacientes con infecciones con STEC podría ser inmediata, disminuyendo el riesgo de desarrollar Síndrome Urémico Hemolítico.

Péptidos catiónicos antimicrobianos (cAMPs)

Anteriormente, demostramos que el quitosan tiene actividad antibacteriofágica *in vitro* e *in vivo* (Amorim *et al.*, 2014). Debido a que el quitosan es un compuesto catiónico y el mecanismo por el cual es capaz de inactivar al bacteriófago es

desconocido, se buscaron en bibliografía otros agentes catiónicos. Maffía y colaboradores diseñaron un grupo de nuevos péptidos antimicrobianos catiónicos y los evaluaron frente a un amplio panel de aislados bacterianos clínicos de resistencia múltiple (Facone *et al.*, 2014). Cinco de estos péptidos se analizaron previamente y mostraron actividad antimicrobiana en diferentes cepas bacterianas y estructura como hélice alfa en contacto con las membranas lipídicas (P5, P8, P8.1, P2 y P6.2). Los otros dos péptidos probados fueron Omiganan, un cAMP con estructura *Beta-sheet* lineal derivado de indolicidina (compuesto químico heterocíclico que forma el núcleo central de los alcaloides de la indolizidina), que se sometió a ensayos clínicos con actividad contra *S. aureus*; y un péptido de secuencia aleatoria (P. random) con carga catiónica pero sin actividad antimicrobiana (Facone *et al.*, 2014; Hollmann *et al.*, 2016).

Debido a su propiedad catiónica, característica compartida con el quitosán, se analizaron los péptidos antimicrobianos como posibles agentes antibacteriofágicos.

Bacteriófagos en el cuerpo humano (Bacteriofagoma)

Muchos análisis metagenómicos de microbiomas humanos muestran la abundancia de bacteriófagos, que generalmente es mayor que la de los virus eucarióticos. Esto se ha demostrado en el análisis metagenómico de microbiota pulmonar, vaginal, cutánea, oral e intestinal (Breitbart *et al.*, 2003; Oh *et al.*, 2014; Virgin, 2014). Más recientemente, se han encontrado bacteriófagos infecciosos en diferentes muestras clínicas, como líquido ascítico y orina (Brown-Jaque *et al.*, 2016). Se sugirió que podrían alcanzar la cavidad peritoneal después de la translocación desde el intestino (Górski *et al.*, 2006), donde son abundantes.

En animales se encontraron bacteriófagos en suero (Keller y Traub, 1974), lo que confirma su presencia en el torrente sanguíneo. La translocación de bacteriófagos

de la sangre a tejidos fetales de ratón también se ha demostrado en ratones gestantes (Srivastava *et al.*, 2004).

A la luz de estos resultados, y como segundo nivel de estudio, algunos investigadores han analizado únicamente la fracción de viroma de estos microbiomas. Para hacer esto, han ideado métodos que permiten la discriminación de la fracción viral, mientras descartan el ADN libre y bacteriano. Esos estudios han arrojado algunos resultados sorprendentes; muchas partículas virales de hecho llevan secuencias identificadas como ADN bacteriano. El contenido genético compartido se observa al analizar las fracciones de ADN fágico y bacteriano de la misma muestra (Breitbart *et al.*, 2003; Howe *et al.*, 2016), incluidas las secuencias que pertenecen a los sistemas CRISPR-Cas (Dutilh *et al.*, 2014).

Interacción con el sistema inmune

No está claro si los bacteriófagos pueden ser detectados fácilmente por el sistema inmunológico o si interactúan con él. Debido a que el tamaño de las partículas de bacteriófago suelen ser más grande que los virus eucarióticos, la activación del sistema inmunológico puede ocurrir como ocurre con otros virus. El deseo de usar bacteriófagos para tratar infecciones bacterianas ha llevado a explorar las respuestas que los bacteriófagos podrían causar dentro del sistema inmunitario humano.

Poco después del descubrimiento de los bacteriófagos, se observó que se producían anticuerpos contra bacteriófagos en humanos y animales (Jerne, 1952; 1956); y es factible generar antisueros de bacteriófagos mediante la inmunización de humanos o animales con lisados de fagos (Puig *et al.*, 2001; Gorski *et al.*, 2012; Bacon *et al.*, 2017). Los sueros de individuos no inmunizados (humanos o animales) presentan anticuerpos contra bacteriófagos, aunque en niveles bajos; los llamados “anticuerpos naturales”. Por ejemplo, los anticuerpos contra los bacteriófagos T4 están presentes de forma natural en el suero humano (Dabrowska *et al.*, 2014), presumiblemente como consecuencia de la presencia de

bacteriófagos en la microbiota humana (Gorski *et al.*, 2006; Brown-Jaque *et al.*, 2016). Sin embargo, el origen de los anticuerpos naturales, generalmente de clase IgM, con amplia reactividad cruzada y baja afinidad, no está claro en la mayoría de los casos.

El sistema inmunitario innato, en particular por medio de los componentes del sistema reticuloendotelial (RES), podría ser un mecanismo para eliminar los bacteriófagos que circulan en el cuerpo humano (Gorski *et al.*, 2012). A este sistema se le atribuyó la eliminación rápida del bacteriófago lambda (λ) de tipo salvaje previamente administrado del sistema circulatorio en humanos, (Geier *et al.*, 1973). Además, diferentes mutantes del bacteriófago λ podrían inducir diferentes respuestas del huésped. Cuando se usan ciertos mutantes del bacteriófago λ que fueron capaces de eludir la respuesta inmune RES, estos mutantes prevalecieron durante más tiempo en el torrente sanguíneo que el bacteriófago de tipo salvaje (Merril *et al.*, 1996).

Los datos sobre las respuestas celulares anti-bacteriofágicas son muy escasos en comparación con los datos sobre respuestas humorales. Un estudio mostró que la permanencia de los bacteriófagos en la sangre es la misma cuando se comparan ratones inmunocompetentes con aquellos deficientes en las células T, lo que indica que no hay un papel específico de la respuesta de las células T en la inactivación de los bacteriófagos (Srivastava *et al.*, 2004b). Cuando se administran junto con la bacteria huésped, algunos estudios mostraron que los bacteriófagos parecen estimular la fagocitosis bacteriana, y esto se atribuye a cierta "opsonización" de las células bacterianas por los bacteriófagos. Además, los bacteriófagos pueden permanecer activos e infecciosos cuando se adsorben sobre las bacterias en la ingesta de los granulocitos. Por lo tanto, algunos autores han sugerido que durante la fagocitosis, los bacteriófagos continúan lisando las bacterias fagocitadas, ayudando a la actividad de las células fagocíticas. Este proceso está limitado en el tiempo y los bacteriófagos ya no están activos después de completar la fagocitosis (Gorski *et al.*, 2012). A pesar de estas descripciones, no hay evidencia definitiva de

que los bacteriófagos activen la fagocitosis por sí mismos y, hace algunos años, se informó un resultado contrario (Kantoch *et al.*, 1958).

Además, los bacteriófagos purificados tienen efectos antiinflamatorios mediante la supresión de la producción de ROS (especies reactivas de oxígeno) y la inhibición de la actividad de NF- κ B, que afectan la producción de citoquinas (Gorski *et al.*, 2012). A pesar de esta evidencia, debe tenerse en cuenta que se han realizado muchos experimentos con lisados de bacteriófagos, que en muchas ocasiones podrían contener restos de bacterias lisadas por los bacteriófagos (Ej: lipopolisacáridos) o fragmentos de la pared celular bacteriana del huésped adherida a las colas del bacteriófago. Esto hace que sea extremadamente difícil determinar los componentes verdaderamente responsables de la modulación de la respuesta inmune.

Materiales y Métodos

Cepas bacterianas y líneas celulares

- *E. coli* (ATCC 37197), Y1090, utilizada como cepa indicadora en la titulación de los bacteriófagos.
- *E. coli* C600 (ATCC® 23724™).
- *E. coli* 459, conteniendo el plásmido pACYC184 (Genbank X06403) con el gen de resistencia a tetraciclina.
- *E. coli* C600:933W, contiene integrado el genoma del bacteriófago 933W.
- *E. coli* C600:933W:pkd46, cepa C600:933W con el plásmido pkd46 (ver en “Plasmidos”)
- *E. coli* C600:ΔTOX:GFP se obtuvo de la Dra. Weiss, de la Universidad de Cincinnati (Gamage *et al.*, 2003). *E. coli* C600:ΔTOX:GFP es una cepa C600 lisogenizada que contiene el bacteriófago 933W en el que el gen *stx* fue reemplazado por la secuencia *gfp* (Figura 11).

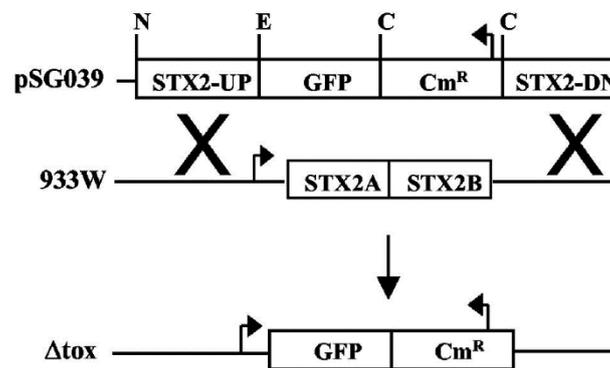


Figura 11. Esquema del bacteriófago GFP. (Gamage *et al.*, 2003)

Dado que esta cepa no produce la toxina Stx, representa una opción segura, lo cual permitió, de manera simple, estudiar distintos parámetros *in vitro* e *in vivo*.

- Cepa *wild type*, *E. coli* O157:H7 (EDL933) conteniendo el bacteriófago codificante para la toxina Stx (Bacteriófago 933W).

Para la titulación de los bacteriófagos se usó como cepa indicadora a *E. coli* Y1090 resistente a ampicilina.

Para crecer las bacterias se utilizó medio LB, Luria-Bertani, (10 g triptona, 5 g extracto de levadura, 10 g NaCl, en 1 litro de agua destilada (dH₂O)), con la adición de antibiótico cuando correspondía, a 37°C y agitación.

En los ensayos de interacción bacteriófago-células eucariotas, se utilizaron células Vero E6 (ATCC® CRL-1586™), MiaPaca2 (ATCC® CRL-1420™) crecidas en medio DMEM (Gibco) con 4.5 g l⁻¹ de glucosa, suplementado con 10 % de Suero Fetal Bovino (Internegocios S.A), 100 U ml⁻¹ de penicilina y 100 µg ml⁻¹ de estreptomicina (Gibco), y mantenidas a 37 °C y 5% CO₂.

Para los ensayos de adhesión e internalización las células fueron sembradas en placas de 4 wells acopladas a portaobjetos (Nunc® Lab-Tek® Chamber Slide™ system), con medio DMEM completo, hasta una confluencia aproximada del 80 %.

PCR

Las reacciones de PCR se realizaron utilizando un sistema GeneAmp PCR 2400 (Perkin-Elmer, PE Applied Biosystems, Barcelona, España).

Para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se utilizó la siguiente mezcla:

Componente	Volumen (µl)
Polimerasa (Dream Taq Green PCR Master Mix, Fermentas®)	12,5
Primer Fw. 30µM	0,5
Primer Rv. 30µM	0,5
H ₂ O bidestilada (H ₂ O bd) estéril	10,5
ADN	1
Volumen final	25

El programa de tiempos y temperaturas fue seleccionado en función de las características de los *primers* y la longitud del fragmento de ADN (30s por cada 500 pares de bases).

Primers:

PfM1:5'GGCGCGTTGTA CTGGATT CGAAC CAGTGACCGATTGCTCAGAAGGCAATTGCTCTGTCCGGT
GGAGTGGTGAATCCGTTAG3'

PrM1:5'GAAGCTGGCTGCGCGGGGTTGAGTCCTCGATGGCGGTCCATTATCTGCATTATGCGTTGTTA
GCTCAGTCAGCCCCATACGATATAAG3'

Pr1mutrev:5'ACAGGTGTTCTTTTGGCTGAAGTAATCAGCACCAGACCCGGCGCAGATGGATCCAAG
GCCCCGAAAAGCGAGCC3'

qPCR para la cuantificación del bacteriófago

Se diseñaron dos *primers* y una sonda TaqMan (situada entre ambos primers) específicos del gen *stx2*. En cuanto al diseño, se buscaron las secuencias de las variantes de cada gen utilizando la base de datos de Pubmed. Estas secuencias se alinearon para conseguir una secuencia consenso con el programa BioEdit. A partir de la secuencia consenso se utilizó el programa *Primer Express* para encontrar el lugar indicado para los *primers* y la sonda, siguiendo las recomendaciones que dicta el fabricante (Life Technologies).

Para las reacciones de qPCR se utilizó de siguiente mezcla.

Componente	Volumen (μ l)		
Mix de <i>primers</i> y sonda Taqman	1	1	1
Enviromental TaqMan® Master Mix 2.0	10	10	10
ADN	9	4	1
H ₂ O bidestilada (H ₂ O bd) estéril	0	5	8
Volumen final	20		

Primers:

Forward: 5'ACGGACAGCAGTTATACCACTCT3'

Reverse: 5'CTGATTTGCATTCCGGAACGT3'

Sonda de unión de surco menor: 5'CCAGCGCTGCGACACG3' con un FAM (6-carboxifluoresceína) reportero y un NFQ (no fluorescente quencher).

Extracción de ADN

Tras la amplificación, por PCR convencional, del inserto que se quería clonar, se realizó la electroforesis de dicho fragmento de ADN en un gel de agarosa. Luego de revelar el gel, y confirmar la presencia de una sola banda correspondiente al fragmento amplificado (mismo tamaño) se realizó una purificación por producto de PCR mediante el Qiaquick PCR Purification Kit (Qiagen), según instrucciones del fabricante.

El ADN purificado se sembró en gel de agarosa (0.8%) y se tiñó con bromuro de etidio. La concentración del ADN se determinó usando el espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, ThermoFisher Scientific, Wilmington, DE, EE. UU.).

Geles de agarosa

Se preparó una solución de 1,2%, 2%, dependiendo del tamaño del fragmento de ADN, de agarosa en buffer TAE. Esta solución se fundió en microondas y antes de la colocación en las camas, se le agregó bromuro de etidio. Se observó el ADN mediante exposición U.V..

Secuenciación Sanger de muestras

Para la realización de este protocolo de secuenciación se llevaron a cabo los siguientes pasos:

1) Mezcla de ADN (100 ng por 1 kb de ADN molde) con el primer (3,2 - 5 pmoles, siendo μM equivalente a $\text{pmol } \mu\text{l}^{-1}$) en un tubo de PCR.

Primer:

Pr1 rv: 5'CCAGTAACAGGCACAGTACC3'

2) Se dejó el tubo abierto y secó en un termociclador a 80°C hasta la total evaporación de la muestra.

3) Se tapó la muestra desecada y guardó a 4°C hasta su procesamiento

La secuenciación se realizó con el kit de reacción ABI PRISM Big Dye III v.1 Terminator Cycle Sequencing Ready (Perkin Elmer, Applied Biosystems, España) en un analizador de ADN ABI PRISM 3700 (Perkin Elmer, Applied Biosystems, España), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Toda la secuenciación se realizó por duplicado.

Plásmidos

El plásmido pKD46 (Genbank AY048746) se usó para la expresión de las proteínas del sistema lambda red (Datsenko *et al.*, 2000). El plásmido pACYC184 (Genbank X06403) (Hanahan *et al.*, 1983) se usó para obtener el gen de resistencia a la tetraciclina (tet).

Preparación de bacterias competentes

El siguiente paso fue realizar la clonación del inserto en la *E. coli* C600:933W:pkd46.

A partir de un cultivo ON en medio SOB de *E. coli* C600 en fase estacionaria de crecimiento, se realizó una dilución 1:10 en SOB (2% p v⁻¹ triptona bacteriana, 0.5% p v⁻¹ extracto de levadura bacteriana, 10 mmol l⁻¹ NaCl y 2,5 mmol l⁻¹ KCl) más 0,5% de arabinosa y se incubó en agitación a 30°C. Cuando la densidad óptica (DO₆₀₀) alcanzó una absorbancia de 0,3-0,5 se detuvo el crecimiento del cultivo en fase exponencial dejándolo 10 minutos en hielo. Se centrifugó a 3000xg

durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante y se resuspendió en 400 μ l de H₂O bd estéril fría.

Se realizó una centrifugación a 16000xg durante 10 segundos para eliminar el sobrenadante y se volvió a añadir 400 μ l de H₂O bd estéril fría. Este paso de lavado se repitió de 4 a 5 veces.

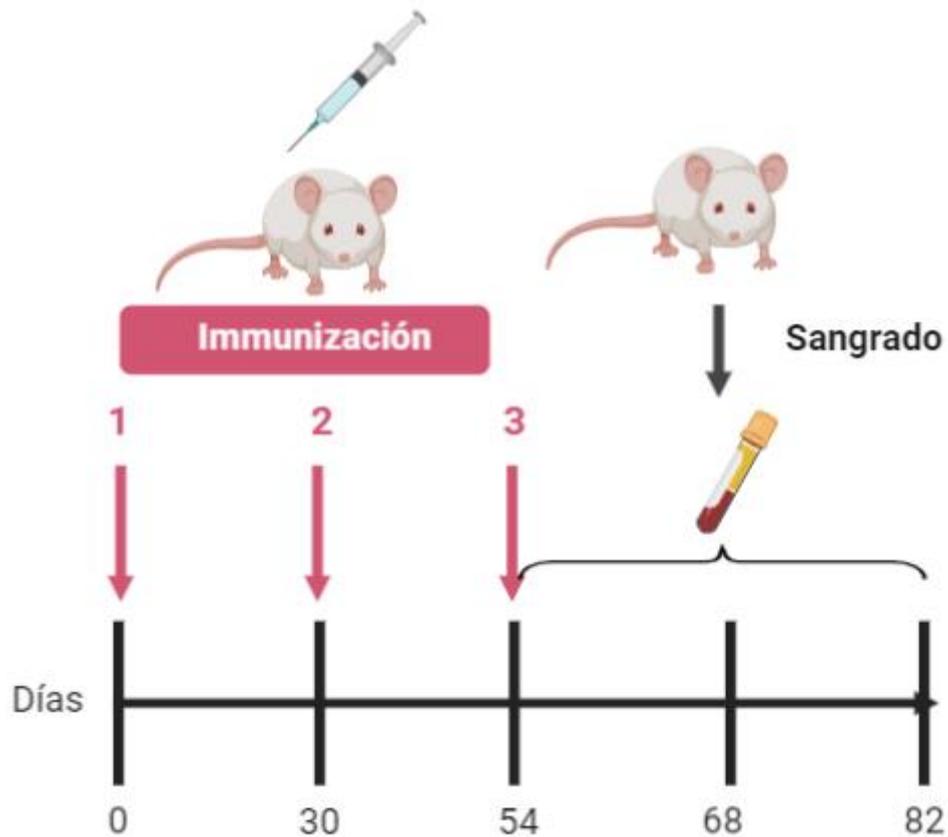
Tras el último lavado se resuspendió el pellet celular en 100 μ l de H₂O bd fría y se añadió el inserto purificado del producto de PCR.

Se introdujo en una cubeta de electroporación fría y se procedió a electroporar (2,5 kV, 25 F, 200 Ω).

Tras la electroporación, se inoculó la mezcla en 5ml de SOC (4,9 ml SOB + 100 μ l Glucosa 1M) que se incubaron a 30°C en estático durante 2 horas. Luego, 100 μ l de mezcla se inoculó en diversas placas de LB Tetra (5 μ g ml⁻¹ tetraciclina) que se incubaron a 30°C durante 18hs. Con los *primers* fw y rv se corroboró la correcta inserción mediante PCR.

Inmunización de ratones

Se inmunizaron 4 ratones BALB/c, por vía intramuscular, con el bacteriófago GFP (50 μ l de bacteriófago GFP (5x10⁶pfu totales) y 50 μ l de adyuvante incompleto de Freund). La inmunización y sangrados se realizaron de acuerdo al Esquema 2. La sangre obtenida se centrifugó a 7000 rpm por 15 minutos a temperatura ambiente para obtener el plasma, el cual se almacenó a -20°C.



Esquema 2. Línea de tiempo de la inmunización y sangrado de los ratones.

ELISA

Evaluación de IgG

El protocolo de ELISA fue adoptado del trabajo de Waddell y colaboradores (Waddell *et al.*, 2009). Se realizó el *coating* con 100 μl de buffer bicarbonato conteniendo 10^7 pfu ml^{-1} . Se incubó 1 h a 37°C . Se usaron *wells* control con 100 μl de buffer bicarbonato. Posteriormente, se lavó tres veces con 200 μl de PBS-Tween 20. El bloqueo se realizó con 200 μl de PBS - 0.1% BSA. Al suero se le hicieron diluciones seriadas al medio en PBS - 0.05% Tween 20-0.1% BSA.

Como control también se usaron las diluciones de suero normal en *wells* con y sin *coating*. Se incubó 1 h a 37°C . Luego de la incubación con los sueros, se lavó tres

veces con 200µl de PBS-0.05% Tween 20. El anticuerpo secundario, de la marca Pierce, anti-ratón conjugado (dilución 1:2000) se incubó en PBS - 0.05% Tween 20-0.1% BSA durante 1 hora a 37°C. Posteriormente se lavó tres veces con 200 µl de PBS - 0.05% Tween 20. Para el revelado se usó sustrato para HRP y se incubó por 10 minutos a 37°C. Pasado este tiempo, la reacción, se detuvo con 100 µl de 0,2 M H₂SO₄. Se midió absorbancia a 450 nm.

Inducción y purificación de bacteriófagos (colchón de sacarosa)

Las cepas lisogenizadas *E. coli* C600:933W, *E. coli* C600:ΔTOX:GFP fueron crecidas en medio (LB) más 10 mM de CaCl₂, cloranfenicol (Sigma) (15 µg ml⁻¹ de concentración final) y sin antibiótico respectivamente, por 16 horas a 37°C con agitación. El cultivo ON se diluyó a DO₆₀₀ = 0,1 en LB más 10 mM de CaCl₂ y antibiótico cuando correspondía.

La inducción se llevó a cabo agregando ciprofloxacina (Ciprax 200, Roemmers) a una concentración final de 40 ng ml⁻¹ (Zhang *et al.*, 2000). Las bacterias se incubaron durante 16 horas a 37°C con agitación y los cultivos se centrifugaron a 3000 xg durante 15 minutos. El sobrenadante que contiene bacteriófagos se purificó mediante ultracentrifugación con colchón de sacarosa al 36%.

El sobrenadante que contenía los bacteriófagos se ultracentrifugó a 100.000 xg (Beckman XL-70, Rotor J-20), a 4°C durante 2 horas con una solución de sacarosa al 36%. El sedimento se resuspendió en 1 ml de PBS, se filtró con filtros de 0,2 µm (MC-PES-02S, Microclar) y se mantuvo a 4°C hasta que se realizó el ensayo de titulación.

Inducción y purificación de bacteriófagos (cloruro de cesio y diálisis)

Para los ensayos de internalización de bacteriófagos en células eucariotas se llevó a cabo otro tipo de protocolo para la inducción y purificación de bacteriófagos, permitiendo obtener *stocks* más limpios para realizar los ensayos de microscopía confocal.

El siguiente paso consistió en la inducción con mitomicina C (Sigma) ($1\mu\text{g ml}^{-1}$ finales) de 75 ml de la dilución del cultivo ON de la cepa lisogenizada, con el bacteriófago de interés, cuando la misma alcanzó una DO_{600} de 0,3-0,5.

A las 16 horas se centrifugó a 3000 xg durante 10 minutos. El sobrenadante (SN) se filtró con filtros de $0,2\mu\text{m}$ (Millex GP $0,22\mu\text{m}$ PES *membrane*).

Precipitación con polietilenglicol (PEG8000)

Al sobrenadante filtrado se le añadió $1\mu\text{g ml}^{-1}$ de DNAsa durante 1 hora a 37°C . Se añadió $0,0584\text{ gr ml}^{-1}$ de NaCl y se incubó en hielo durante 1 hora para precipitar restos celulares. Se centrifugó a 11000 xg durante 10 minutos a 4°C . Al SN se le añadió PEG8000 ($0,1\text{ g ml}^{-1}$ finales), se dejó disolver sin usar vortex y almacenó en heladera ON. El lisado se centrifugó a 11000 xg durante 10 minutos a 4°C . El SN se descartó y se dejó el recipiente invertido sobre papel para descartar restos de líquidos, aproximadamente 5 minutos.

Para resuspender el pellet se utilizaron 2 ml de H_2O bd estéril y almacenó a 4°C .

Purificación de bacteriófagos por gradiente de CsCl

Se añadió 1 g de CsCl a los 2 ml de la suspensión de bacteriófagos y disolvió por agitación en vortex. En un tubo ultra-clear beckman, se añadieron 2 ml de

sacarosa 20% con una micropipeta por las paredes de la pipeta una pipeta Pasteur de vidrio.

Luego se fueron agregando de a 1 ml las soluciones de CsCl empezando por la de menor densidad ($1,3 \text{ g ml}^{-1}$), siguiendo con la de $1,5 \text{ g ml}^{-1}$ y el $1,7 \text{ g ml}^{-1}$.

Se retiró la pipeta Pasteur con cuidado arrastrando sobre las paredes del tubo de centrifuga y se añadió la suspensión de bacteriófagos + CsCl, preparada previamente, sobre las paredes del tubo y cerca del gradiente de $1,3 \text{ g ml}^{-1}$ para no mover el contenido.

Se centrifugó a 80000 xg durante 2 horas a 4°C (ultracentrífuga Beckman, rotor SW41 de ángulo variable).

Una vez finalizada la centrifugación se obtuvo una banda gris-azulada, situada entre las fases $1,3 \text{ g ml}^{-1}$ y $1,5 \text{ g ml}^{-1}$. Se recuperó la banda pinchando con una aguja hipodérmica y dejándola gotear sobre un eppendorf. Se guardó a 4°C

Con una pipeta se vertió la muestra de bacteriófago dentro de la membrana de diálisis y se la cerró con pinzas. Se dejó en agitación durante 1 hora sumergida en tampón de diálisis (Tris $0,1 \text{ M}$, EDTA $0,2 \text{ mM}$, pH 8) dentro de un vaso de precipitado. Por último se descartó el tampón de diálisis y se lo reemplazó por uno nuevo para dejar la muestra en agitación ON.

Titulación

La cepa de *E. coli* Y1090 (ATCC 37197) se cultivó en LB más ampicilina (concentración final de $0,05 \text{ mg ml}^{-1}$) durante la noche a 37°C en agitación a 200 rpm. El cultivo se diluyó 1:100 en LB más ampicilina (concentración final de $0,05 \text{ mg ml}^{-1}$) y se incubó durante 2 horas adicionales a 37°C bajo agitación. Al final de la incubación, se incubó 1ml de la cepa de *E. coli* con $100 \mu\text{l}$ la suspensión de bacteriófagos durante 30 minutos a temperatura ambiente. Al final de esta incubación, se agregaron 3 ml de Top Agar (triptona al 1%; NaCl al 0,5%; Agar al 0,7%) más CaCl_2 (concentración final 10 mM) y se colocaron en placas de agar

LB-Amp. Las placas se incubaron a 37°C y las placas de lisis se contaron después de 24 horas.

Estudio de la estabilidad de los bacteriófagos

Para evaluar la estabilidad de los stocks de bacteriófagos en el tiempo, cada 15 días se realizaron titulaciones mediante conteo de placa de lisis.

Marcación del bacteriófago 933W

A 1 ml de suspensión de bacteriófagos se añadieron 20 µl de Sybr Gold 100x (Invitrogen, USA), se mezcló con vortex e incubó durante 1 hora a 37°C en oscuridad.

Se realizaron 4 lavados con MgSO₄ 10 mM para eliminar restos de Sybr Gold que no se hayan unido a los bacteriófagos. Para esto se utilizaron tubos de filtración Amicon Ultra 4 (Millipore, Estados Unidos). Se añadieron 3 ml de MgSO₄ a la muestra y pasó a una de los tubos. Luego se centrifugó a 1600 xg durante 1 minuto. Estos pasos se repitieron 4 veces hasta obtener un volumen final de 1 ml. Se almacenó a 4°C y oscuridad.

Procedimientos de PCR estándar

Las PCRs se realizaron con un sistema GeneAmp PCR 2400 (Perkin-Elmer, PE Applied Biosystems, Barcelona, España). Se amplificó un fragmento de 378 pb de la subunidad Stx2-A a partir del ADN del bacteriófago 933W utilizando los *primers* UP378/LP378 ya descritos por Muniesa y colaboradores (Muniesa y Jofre 1998).

qPCR

Preparación de curvas estándar

Para la generación de estándares a utilizar en los ensayos de qPCR, se empleó una construcción plasmídica. Un fragmento de 378 pb obtenido por PCR convencional, se clonó con un vector pBAD-TOPO para la inserción de productos de PCR, siguiendo las instrucciones del Fabricante (Invitrogen Corp., Barcelona, España). El constructo fue transformado por electroporación en células competentes.

Se prepararon células competentes para la electroporación a partir de 10-50 ml de cultivos en medio SOB (2% p v⁻¹ triptona bacteriana, 0.5% p v⁻¹ extracto de levadura bacteriana, 10 mmol l⁻¹ NaCl y 2,5 mmol l⁻¹ KCl) y se concentró por centrifugación a 3000 xg durante 5 min. Luego fueron lavados en 2 ml de agua semi congelada bi-destilada. Después de cuatro pasos de lavados, las células se suspendieron en 15–100 µl de agua semi congelada bi-destilada. Las células se mezclaron con la cantidad correspondiente de ADN plasmídico en un tubo frío, de microcentrífuga y se transfirió a una cubeta de electroporación de 0,2 cm (Bio-Rad, Barcelona, España). Las células fueron electroporadas a 2,5 kV con 25 F y 200 Ω de resistencia. Inmediatamente después de la electroporación, 1 ml de medio SOC (2% p v⁻¹ triptona bacteriana, 0,5% p v⁻¹ extracto de levadura, 10 mmol l⁻¹ NaCl y 2,5 mmol l⁻¹ KCl, 10 mmol l⁻¹ MgCl₂ y 20 mmol l⁻¹ glucosa) (Sambrook y Russell 2001) fue agregado a la cubeta. Las células fueron transferidas a un tubo de polipropileno de 17x100 mm y recuperado en Medio SOC durante 1–4 h a 37°C, sin agitación. Las células se concentraron diez veces a partir de un cultivo de 1 ml y se plaqueó en agar LB con Ampicilina (100 lg ml⁻¹). Las colonias fueron seleccionadas por PCR convencional para evaluar la presencia del vector que contiene el inserto. El vector conteniendo el inserto se purificó a partir de colonias positivas con *Qiagen Plásmid Midi kit* (Qiagen Inc., Valencia, CA, EUA). La presencia del inserto en el vector y su orientación fueron evaluados por PCR

convencional y secuenciación, como se describió anteriormente, utilizando los primers UP378/LP378 (Muniesa and Jofre 1998) y pBADf/pBADr (Invitrogen).

El constructo se cuantificó con un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000. El producto de reacción se linearizó por digestión con la endonucleasa de restricción EcoRV (Promega, Madison, WI, USA). El producto fue purificado y cuantificado nuevamente. Para calcular el número de GC de la construcción, se utilizó la siguiente fórmula: (concentración de la construcción/peso molecular) $\times 6,023 \times 10^{23}$ moléculas mol⁻¹ = n° moléculas μl^{-1} (Smith *et al.* 2006).

El peso molecular de la construcción se calcula con la fórmula, longitud del constructo \times masa molecular dsDNA. La longitud del constructo fue de 4504 pb, la masa molecular para dsDNA es 660 Da, por lo que el peso molecular es entonces $2,97 \times 10^6$ g mol⁻¹. La concentración del constructo fue $290,5 \times 10^{-9}$ g μl^{-1} , por lo tanto, el n° de moléculas de constructo por μl calculado fue $5,89 \times 10^{10}$. Como cada molécula de constructo contiene una copia del fragmento *stx*, 1 μl de nuestro stock contenía $5,89 \times 10^{10}$ GC. Diluciones seriadas decimales de este stock ($5,5 \times 10^9$ GC μl^{-1}) fueron realizadas en agua bi-destilada para elaborar la curva estándar para la qPCR. Las diluciones estándar se dividieron en alícuotas y almacenaron a -80° C hasta su uso. Tres réplicas de cada dilución se añadieron a la qPCR.

Cuantificación por qPCR

Un conjunto de *primers* y sondas de Customer TaqMan (Applied Biosystems) fueron diseñados a partir de un fragmento de ADN del *stx* común para todas las variantes de *stx* descritas hasta ahora, excepto *stx*_{2f}. Este conjunto se utilizó para amplificar el gen *stx*₂ de nuestros lisados de bacteriófago.

El primer *forward* (5'-ACGGACAGCAGTTATACTACTCT-3') y *reverse* (5'-CTGATTTGCATTCCGGAACGT-3') y una sonda de unión de surco menor (5' - CCAGCGCTGCGACACG-3') con una FAM (6-carboxifluoresceína) reportero y un NFQ (*quencher no fluorescente*) se usó en condiciones estándar en un sistema

Step One RT PCR (Applied Biosystems). Este set de qPCR es específico para el gen *stx₂* y sus variantes 2c, 2d, 2e y 2g pero no detecta la variante *Stx_{2f}*. La amplificación se llevó a cabo en una mezcla de reacción de 20 μ l con la PCR Master Mix (Applied Biosystems). La reacción contiene 9 μ l de la muestra de ADN o ADN plasmídico cuantificado. Las condiciones del termociclador fueron una configuración inicial de 10 minutos a 95°C y cuarenta ciclos de 15 s de desnaturalización a 95°C y 1 minutos de extendido a 60°C.

Todas las muestras se analizaron por triplicado así como los controles estándares y negativos. El número de GC se definió como el promedio de los datos obtenidos por triplicado.

Marcación para Citometría de flujo

Internalización del bacteriófago (mediante el uso de anticuerpos).

Células Vero E6 (ATCC® CRL-1586™) y MiaPaca2 (ATCC® CRL-1420™) se replicaron con tripsina EDTA 0,25% (EMEVE) durante 5 minutos a 37°C. Se centrifugó 5 minutos a 300 xg y se resuspendieron en DMEM con Antibiótico-Antimicótico (Gibco). Entre 10^5 y 5×10^5 células se agregaron a eppendorfs de 1,5 ml en 100 μ l.

Se incubaron con bacteriófagos durante distintos tiempos y a distintas MOI. Se incubó a tiempo 0, 30 minutos y 1 hora.

Transcurridos los tiempos de incubación las muestras se centrifugaron a 750 xg durante 5 minutos seguido de lavados con PBS 1X 2% SFB. Se fijó durante 10 minutos en hielo con Cytifix BD (50 μ l pozo⁻¹), se centrifugó nuevamente y se lavó con PBS 1X 2% SFB.

Una vez fijadas las muestras, se procedió a la primera marcación extracelular con el anticuerpo policlonal anti-bacteriófago previamente obtenido (Del Cogliano *et al.*, 2018). Se incubó 30 minutos a 4°C y una dilución de 1:300 en PBS 1X 2% SFB. Se centrifugó y lavó con PBS 1X 2% SFB y realizó la segunda marcación con anticuerpo anti-IgG mouse Alexa 488 (BD). Se utilizó una dilución 1:800 en PBS 1X 2% SFB.

Se dejó en heladera durante 30 minutos en oscuridad.

Para la marcación intracelular se centrifugó y lavó con solución de permeabilización Cytoperm BD 1X e incubó con anticuerpo anti-bacteriófago (dilución 1:300) durante 30 minutos a 4°C.

Se centrifugó y lavó con solución de permeabilización Cytoperm BD 1X, para luego incubar con anticuerpo anti-IgG mouse Alexa 660 BD (1:500), durante 30 minutos a 4°C. Por último se centrifugó, lavó y resuspendió en 200 µl de medio PBS1X. Los controles negativos fueron muestras sin anticuerpo primario y muestras sin anticuerpos secundarios.

Internalización del bacteriófago (mediante Sybr Gold)

A diferencia del protocolo previamente descrito, en este caso se utilizaron bacteriófagos previamente marcados con Sybr Gold para evaluar su internalización.

De esta manera, las células resuspendidas fueron incubadas con el bacteriófago 933W marcado, durante distintos tiempos y a distintas MOI, luego se realizaron 2 pasos de lavado con PBS1X + 2%SFB y se fijaron con Cytofix BD durante 10 minutos a 4°C. Para finalizar, se lavaron nuevamente con PBS1X + 2%SFB y resuspendieron en PBS 1X hasta su medición.

Integrinas

Las células MiaPaca2, Vero y K562 se resuspendieron y sembraron, en eppendorfs, a una concentración de $1 \cdot 10^5$ - $5 \cdot 10^5$ por eppendorf en el medio correspondiente para cada línea celular (DMEM para MiaPaca2 y Vero, y RPMI para K562), sin suero fetal bovino. Se realizaron lavados con PBS1X+2%SFB. Las muestras se fijaron con solución fijadora Cytfix (BD), con 50 μ l por muestra durante 10 minutos a 4°C. Se lavó y marcó con anticuerpo anti-integrin alpha V beta 3, a 2 μ g por cada 10^6 células durante 30 minutos a 4 °C. Se lavó y marcó con 50 μ l por muestra de una dilución 1:800 del anticuerpo anti-IgG mouse Alexa 488 (BD) durante 30 minutos a 4°C y oscuridad. Finalmente se lavó y resuspendió en 200 μ l de buffer para citometría de flujo. Los controles negativos fueron muestras sin anticuerpo primario y muestras sin anticuerpos secundarios.

Neutralización de la entrada del bacteriófago

Para evaluar el ingreso del bacteriófago mediante FACS se utilizó el mismo marcado con Sybr Gold incubándolo con las células en DMEM sin suero durante 30 minutos y fijando las muestras.

Para esto, las células se repicaron con tripsina EDTA 0,25% (EMEVE) durante 5 minutos a 37°C. Se centrifugó 5 minutos a 300 xg y se resuspendieron en DMEM con Antibiótico-Antimicótico (Gibco). Entre 10^5 y 5×10^5 células se agregaron a eppendorfs de 1,5 ml en 100 μ l.

Se incubaron distintas MOI (0,5 y 0,1) durante 30 minutos a 37°C. Se realizaron lavados con PBS 1X y se fijaron con solución Cytfix BD (50 μ l muestra⁻¹) durante 10 minutos a 4°C. Por último se realizó un lavado con PBS 1X y resuspendió la muestra en buffer Isoflow y conservaron a 4°C hasta su análisis en el citómetro de flujo (FACS Canto BD).

Una vez optimizado el protocolo de internalización se testearon distintos compuestos como potenciales neutralizantes del bacteriófago.

Hidróxido de Bismuto

Se usaron distintas concentraciones de Hidróxido de Bismuto (Chobet®, Argentina) para pre-incubar con el bacteriófago 933W a 37°C ON.

Los bacteriófagos pre-incubados con el Hidróxido de Bismuto se incubaron con las células en suspensión previamente repicadas. Y se continuó con el protocolo de titulación o “Internalización del bacteriófago (mediante Sybr Gold)” previamente descritos.

Motivos RGD

El péptido ARG-GLY-ASP (RGD) (Sigma-Aldrich) se utilizó para estudiar su efecto en la internalización del bacteriófago.

Células Vero se resuspendieron con tripsina EDTA 0,25% (EMEVE) durante 5 minutos a 37°C. Se centrifugó 5 minutos a 300 xg y se resuspendieron en DMEM con Antibiótico-Antimicótico (Gibco). Entre 10^5 y 5×10^5 células se agregaron a eppendorfs de 1,5 ml en 100 μ l. Partiendo de un stock de 10 mg ml⁻¹ de RGD se incubaron 5, 0,5 y 0,1 mM durante 30 minutos y 37°C. Transcurrido este tiempo se agregaron los bacteriófagos a MOI=0,5. Como control positivo se utilizaron células que no fueron incubadas con RGD pero sí con bacteriófagos.

Microscopía Confocal

Para el análisis de la capacidad de internalización del bacteriófago en células eucariotas, las mismas fueron incubadas con los bacteriófagos previamente marcados con Sybr Gold (8×10^5 p.f.u) en medio DMEM a 37°C y atmósfera con

5% CO₂. A los 30 minutos y 1 hora post-infección las células se lavaron con PBS 1X a temperatura ambiente y tiñeron con 1 µM de Hoechst 33342 (Thermo Fisher, USA) y 2,5 µg ml⁻¹ de CellMask Deep red *plasma membrane* (Thermo Fisher, USA) durante 5 minutos a 37°C y oscuridad. Las células teñidas se fijaron con paraformaldehído 4% durante 10 minutos a temperatura ambiente y finalmente fueron montadas con Mowiol® 4-88 (Sigma-Aldrich) ON a temperatura ambiente. Se tomaron imágenes de las células mediante microscopía confocal (Zeiss LSM 880), utilizando una lente objetivo de 63X y 1,4 NA.

Usando el mismo microscopio se realizaron ensayos *in vivo*, sin fijar las células, para poder tomar fotos en lapsos de 10 minutos hasta las 5 horas.

Modelo animal

Los ratones C57BL/c fueron criados en las instalaciones del Instituto de Medicina Experimental (IMEX), Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires, Argentina. Los ratones (17 a 20 días de edad, 8 a 11 g de peso corporal) se mantuvieron en un ciclo de luz/oscuridad de 12 h a 22 ± 2 C y se alimentaron con dieta estándar y agua *ad libitum*. Los experimentos realizados en este documento fueron aprobados por el Comité de Cuidado Animal de la Academia Nacional de Medicina, estando de acuerdo con los principios establecidos en la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (National Institute of Health, 1985).

Después de 4 h de inanición, los ratones destetados se dividieron en tres grupos. Un grupo se inoculó por vía intragástrica a través de una cánula de acero inoxidable (modelo 7.7.1, 0.38 mm 9 22G) (Harvard Apparatus, Holliston, MA) con una dosis única de 100 µl de *E. coli* C600:933W (2 x 10⁸ UFC 100 µl⁻¹ ratones⁻¹), otro con una dosis única de 100 µl de *E. coli* C600:933W:pr1. El grupo control se inoculó con la cepa *E. coli* C600 siguiendo el mismo protocolo.

Se administraron dos dosis de antibióticos a los 5 y 30 minutos después de la infección con una mezcla de 100 µg de ciprofloxacina (Roemmers) y 5 µg de

mitomicina C (Sigma Aldrich). Luego de 4 horas de la inoculación, se proporcionó alimento y agua a los ratones.

Preparación de cepas e inóculos

Cepas *E. coli* C600:933W, *E. coli* C600:933W:pr1 y *E. coli* C600 se cultivaron en medio LB durante 16 horas a 37°C en agitación. Los cultivos ON se centrifugaron a 3000 xg durante 15 min. El sedimento se lavó y se resuspendió en sacarosa al 20% a una dosis de 2×10^8 UFC $100 \mu\text{l}^{-1}$ ratón⁻¹.

La inducción de bacteriófagos se realizó por tratamiento con una mezcla de ciprofloxacina ($100 \mu\text{g ratón}^{-1}$) y mitomicina C ($5 \mu\text{g ratón}^{-1}$), que se inoculó intragástricamente 30 minutos después de la infección.

Curva de crecimiento bacteriano

Las cepas se cultivaron durante la noche (ON) en medio LB a 37°C con agitación. Los cultivos ON se diluyeron 1:100 en LB en Erlenmeyers de 250 ml con un volumen final de 50 ml. Las muestras se tomaron cada hora durante 6 h y ON (T0=tiempo 0, T1=1h, T2=2h, T3=3h, T4=4h, T5=5h, T6=6h, TON=24 h) y se midió la densidad óptica a 600 nm de cada muestra.

Histología

Para el análisis histológico, los ratones se sacrificaron 72 h después de la infección y se sometieron a necropsia. Se perfundieron transcárdialmente con PBS para eliminar completamente la sangre, seguido de un 5% de tampón-formaldehído. Se tomaron los riñones, intestino delgado, intestino grueso y cerebro, se seccionaron, se fijaron en tampón-formaldehído al 5% y se colocaron en parafina. Las secciones de órganos de tejidos incluidos en parafina se tiñeron con hematoxilina y eosina

(H&E) y se examinaron mediante microscopía óptica. Otro grupo de ratones se sacrificó para el análisis de inmunofluorescencia.

Los ratones se anestesiaron con pentobarbital (100 mg kg^{-1}) y se perfundieron transcardialmente con solución de NaCl al 0,9%, seguido de paraformaldehído al 4% en solución de tampón fosfato 0,1 M (fijador por peso del animal (ml g^{-1})). Los cerebros se extrajeron y fijaron posteriormente en la misma solución fijadora durante 2 h. Las secciones del cerebro se cortaron en un criostato. Se obtuvieron cortes en serie de $20 \mu\text{m}$ de espesor en serie y se colocaron en una solución de tampón de fosfato 0,1M. Las secciones del cerebro obtenidas se procesaron para inmunofluorescencia de bacteriófagos, Stx, GFAP o NeuN.

Inmunohistología

Los cerebros se procesaron en un criostato y las secciones ($20 \mu\text{m}$ cada una) se mantuvieron a 20°C en una solución crioconservante (50% de PBS más 30% de etilenglicol más 20% de glicerol) hasta el día en que se realizaron los diferentes ensayos de inmunofluorescencia. Después de varios lavados con PBS 10 mM, se permeabilizaron secciones del cerebro con Triton X-100 al 0,1% y se bloquearon con suero de cabra normal al 10% (Sigma, St. Louis, MO, EE. UU.) Con la misma solución tampón durante 1 h, e inmediatamente incubado (a 4°C durante 48 h) con diferentes anticuerpos primarios (1:500) anticuerpo anti-Stx2 de conejo (1:50; $1,35 \text{ mg ml}^{-1}$), anti-bacteriófago de ratón 933W, anti-NeuN de ratón (Millipore, Temecula, CA, EE. UU.), Anti-CC1 de conejo (Abcam, Cambridge, Reino Unido) o proteína de ácido fibrilar antiglial de conejo (GFAP, Dako, Glostrup, Dinamarca).

Después de varios lavados con 10 mM PBS-X-100 al 0,025%, las secciones se incubaron con los anticuerpos secundarios (1:500) IgG de cabra anti-conejo Alexa Fluor 555 (Invitrogen Molecular Probes, Carlsbad, California, EE.UU.). Para Stx2, bacteriófago o Inmunofluorescencia GFAP, e IgG de cabra anti-ratón/Texas Red (Amersham, GE, Piscataway, NJ, EE. UU.) Para la inmunofluorescencia NeuN.

Todos los anticuerpos secundarios se prepararon en el mismo buffer con Triton X-100 al 0,3% y se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente. Finalmente, las secciones se enjuagaron con PBS 10 mM y se montaron en portaobjetos. Los controles se realizaron utilizando el mismo procedimiento pero sin agregar el anticuerpo primario. Se agregó un control positivo para la inmunofluorescencia Stx2; se analizaron cerebros de ratones tratados con Stx (1 μg por cada ratón inyectado por vía intravenosa con un volumen final de 100 μl de una solución de 0,01 $\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$).

Análisis de micrografías

Los datos se obtuvieron a partir de la medición de las micrografías de ocho secciones de cuatro cerebros independientes por tratamiento. Se utilizó un microscopio biológico de barrido láser confocal (Olympus FV10-ASW). Las imágenes obtenidas se analizaron utilizando el software Image-J (NIH, ciudad, EE. UU.).

El complemento de "contador de células" del software Image-J se empleó para cuantificar el número de células inmunorreactivas Stx2 y la NeuN anormal. El criterio para determinar el fenotipo de estrés neuronal fue el desplazamiento del marcador nuclear al citoplasma. El ROI manager del software Image-J se empleó para cuantificar la expresión de GFAP y la presencia del bacteriófago, y para determinar los astrocitos reactivos y si los bacteriófagos estaban presentes en el parénquima cerebral. Para este propósito, los canales de color de las micrografías se dividieron por el software, y se seleccionó el canal de color rojo (ahora en un formato de escala de grises de 8 bits) para analizar el área de interés. Para observar en qué células del SNC se localizaron los bacteriófagos, al ensayo de inmunofluorescencia de los bacteriófagos se siguió con el de GFAP (astrocitos), CC1 (oligodendrocitos), NeuN (neuronas) e IBA-1 (microglia).

Se usó Hoechst 33342 (Sigma, St. Louis, MO, EE. UU.) ($1 \mu\text{g ml}^{-1}$ durante 10min) para mostrar los núcleos celulares en todos los ensayos de inmunofluorescencia. Los valores observados en todas las micrografías de control del anti-GFAP y del antibacteriófago 933W se restaron de las micrografías de ratones tratados.

Estudio del efecto neutralizante del Hidróxido de Bismuto in vivo

Estudio in vivo (2 dosis de bismuto)

De la misma manera que se llevaron a cabo los ensayos antes descritos en la sección en “Modelo animal”.

Después de 4 h de inanición, los ratones destetados se dividieron en dos grupos. Un grupo se inoculó por vía intragástrica a través de una cánula de acero inoxidable (modelo 7.7.1, 0.38 mm 9 22G) (Harvard Apparatus, Holliston, MA) con una dosis única de 100 μl de *E. coli* C600:933W (2×10^8 UFC 100 μl ratón⁻¹). Luego, se administraron dos dosis de antibióticos a los 5 y 30 minutos después de la infección con una mezcla de 100 μg de ciprofloxacina (Roemmers) y 5 μg de mitomicina C (Sigma Aldrich). Se llevaron dos grupos de ratones. El grupo sin tratamiento y el grupo tratado con Hidróxido de Bismuto, los cuales recibieron dos dosis de Hidróxido de Bismuto (10 mg ml^{-1}) vía intragástrica, 4 y 24 horas post-infección.

Estudio in vivo (3 dosis de Bismuto)

Debido a que si bien se observó protección con dos dosis de Hidróxido de Bismuto en el modelo animal, se realizó otro tratamiento utilizando 3 dosis con el fin de evaluar si la protección mejoraba a nivel histológico.

Se llevaron dos grupos de ratones. El grupo sin tratamiento y el grupo tratado con Hidróxido de Bismuto, los cuales recibieron tres dosis de Hidróxido de Bismuto (10 mg ml^{-1}) vía intragástrica, 4, 24 y 48 horas post-infección. Los ratones se

sacrificaron a las 72 h y se les tomó muestras de sangre para medición de urea y recuento de células sanguíneas.

Generación de mutante $\Delta pr1:933W$

Se utilizó el método lambda red (Figura 12) para obtener dos *E. coli* C600 lisogénicas mutantes. Una primera, a la cual se le agregó un gen de resistencia a tetraciclina (paso necesario para obtener el 2do mutante) y otra donde se delecionó el motivo tata-box del promotor *pr1* del gen de la toxina *Stx* del bacteriófago 933W (Figura 13)

A partir de una cepa *E. coli* 459 conteniendo el plásmido pACYC184 (Genbank X06403) se obtuvo, con los *primers* PfM1 y PrM1, el gen de tetraciclina junto a las secuencias de homología con el genoma del bacteriófago 933W en los extremos.

Perfil del ciclado: 94°C, 5 minutos, 94°C, 30 segundos, 57°C, 30 segundos, 72°C, 1 minuto y medio, y por ultimo 72°C durante 7 minutos.

Por otro lado se contaba con un cepa *E. coli* C600:933W conteniendo el bacteriófago 933W integrado en su genoma, más el plásmido pKD46 (Genbank AY048746) con las enzimas del sistema lambda red (*exo*, *bet*, *gam*). El producto lineal de tetraciclina, conteniendo las secuencias de homología se transformó, mediante electroporación, en la *E. coli* C600:933W.

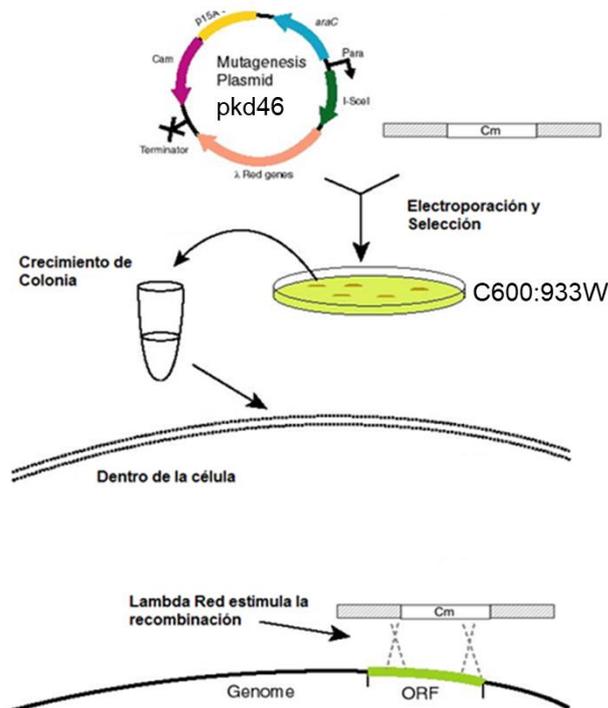


Figura 12. Sistema de recombinación Lambda Red. (Serra -Moreno *et al.*, 2006).

Para la transformación, al cultivo ON de la cepa C600:933W se agregó arabinosa 0,5% y ampicilina en medio SOB (2% w v⁻¹ triptona (20 g), 0,5% w v⁻¹ extracto de levadura (5 g), 8,56mM NaCl (0,5 g), o 10mM NaCl (0,584 g), 2,5mM KCl (0,186 g), ddH₂O 1000 mL, 10mM MgCl₂ (anhidro 0,952 g) y 10mM MgSO₄ (heptahidratado 2,467 g)) a 30°C.

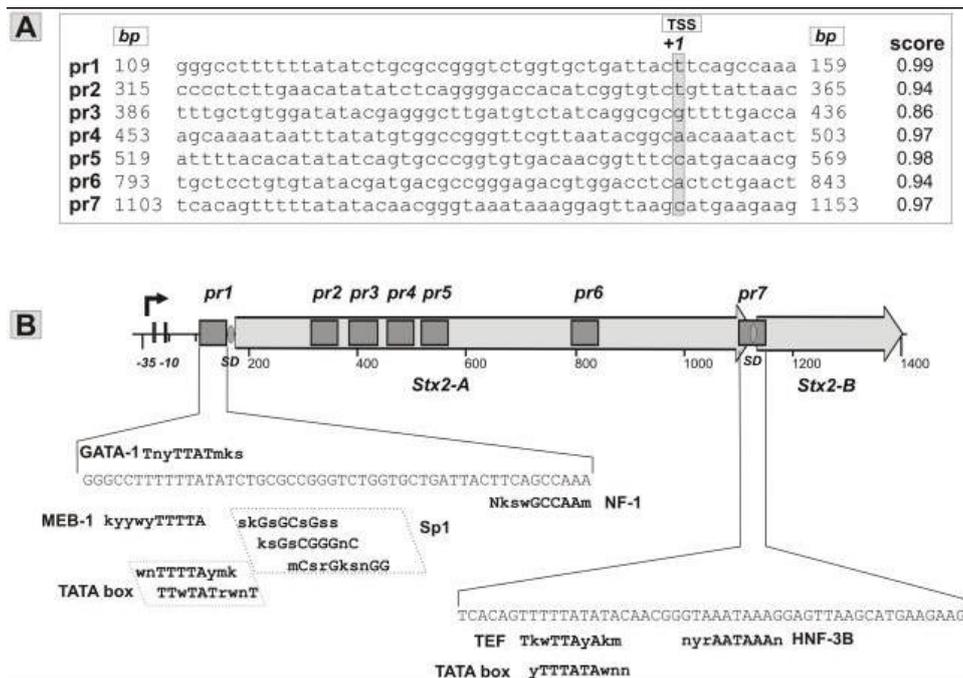


Figura 13. Análisis *in silico* de la secuencia de *Stx2*. (A) Siete regiones (pr1-7) con alto puntaje para secuencias promotoras putativas eucariotas fueron encontradas. El sitio putativo de inicio de transcripción (TSS, +1) detectado con el server predictor de promotores se encuentra remarcado en gris (B). Las regiones pr1-pr7 están indicadas con cajas negras sobre el gen *stx2*. Los sitios de unión a factores de transcripción putativos eucariotas se indican en las secuencias correspondientes de las regiones pr1 y pr7. (Bentancor *et al.*, 2013).

Las colonias resultantes se seleccionaron por resistencia a tetraciclina en placas de LB (5 ug ml⁻¹ tetraciclina). Con los *primers* Tc5 (sobre tetra) + pr1 Rv (sobre bacteriófago) se comprobó la correcta inserción.

Perfil de ciclado: 94°C, 5 minutos, 94°C, 30 segundos, 57°C, 1 minuto 30 segundos, 72°C, 1 minuto y medio, y por ultimo 72°C durante 7 minutos.

A estas colonias lisogénicas se las llamo MUT1, conteniendo el bacteriófago *wild type* más una resistencia a tetraciclina. Por último, para la mutación del pr1 (Figura 14), se generó un producto lineal mediante PCR, sobre la cepa lisogénica MUT1, con los *primers* PfM1 y Pr1mutrev (homología con pr1 mas mutación puntual).

Se obtuvo un amplímero conteniendo al gen de tetraciclina y el promotor pr1 mutado (secuencia TTTTAT de la región TATA por un sitio de restricción BamHI). De la misma forma que se procedió para la obtención del MUT1, se transformaron la cepa *E. coli* C600:933W, se seleccionaron los recombinantes mediante selección positiva por resistencia a tetraciclina y luego se secuenció para confirmar la mutación en el promotor.

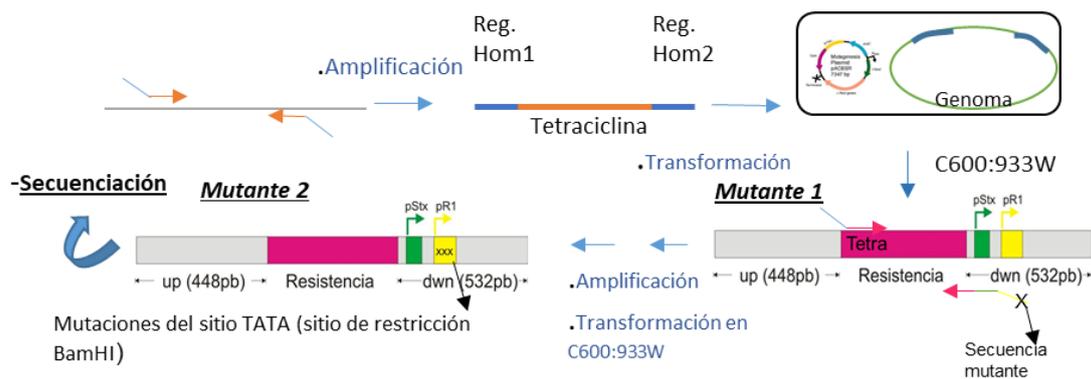


Figura 14. Estrategia de mutación mediante el sistema lambda red.

Primers:

PfM1:

GGCGCGTTGACTGGATTCTGAACCAAGTGACCGATTGCTCAGAAGGCAATTGCTCTGTCCGGTGGAGTG
GTGAATCCGTTAG

PrM1:

GAAGCTGGCTGCGCGGGGTTTCGAGTCCTCGATGGCGGTCCATTATCTGCATTATGCGTTGTTAGCTCAG
TCAGCCCCATACGATATAAG

Pr1mutrev:

ACAGGTGTTCTTTGGCTGAAGTAATCAGCACCAGACCCGGCGCAGATGGATCCAAGGCCCGCAAAA
GCGAGCC

TC5:

TCAGCCCCATACGATATAAG

Pr1 rv.:

CCAGTAACAGGCACAGTACC

Péptidos catiónicos (cAMPs)

Cada péptido se sintetizó con la amidación C terminal. Los péptidos se sintetizaron y se obtuvieron con un grado de pureza de > 95% mediante HPLC (GenScript Co., Piscataway, NJ 08854, EE. UU.). Los péptidos catiónicos helicoidales alfa P5, P8, P8.1, P2 y P6.2 se diseñaron previamente utilizando un enfoque combinado y asistido por computadora, identificando regiones activas putativas cortas de las bases de datos de AMP (Faccone *et al.*, 2014; Maturana *et al.*, 2017). Las secuencias peptídicas son:

péptido 2: GLLKKWLKKWKEFKRIVGY; péptido 8.1: RIVQRIAKWAKKWKYKAGK, péptido 6.2: GLLRKWGKKWKEFLRRVWK; péptido 5: RIVQRIKKWLLKWKKLGY; péptido 8: RIVQRILKWLLKWKYKLGK. Omiganan (MBI-226): ILRWPWWPWRRK; péptido *random* no-alfa helicoidal: MVVFSVPKFKSTVAKLLSSA.

La conformación en rueda helicoidal puede observarse en la figura 15.

A partir de las 2 secuencias peptídicas ya analizadas se realizaron cambios específicos en ciertos aminoácidos con el objetivo de mejorar la actividad antimicrobiana y disminuir la hemólisis.

A partir de la secuencia del péptido 2 se realizaron cambios específicos para mejorar la anfipaticidad como se muestran en los diagramas de *helical wheel* de la figura 15 para obtener la secuencia 6.2

Al péptido 5 también se le realizaron 4 modificaciones que, como se puede apreciar en la figura 15, la secuencia 8 crea dos caras bien diferenciadas, una hidrofílica y otra hidrofóbica al estructurarse el péptido como alfa hélice. A partir de esta secuencia, se realizaron tres cambios, se reemplazaron las L por A, con el objetivo de disminuir la hemólisis, de acuerdo al trabajo publicado por Yin LM y colaboradores (Yin, L.M. *et al.*, 2012) generando el péptido 8.1.

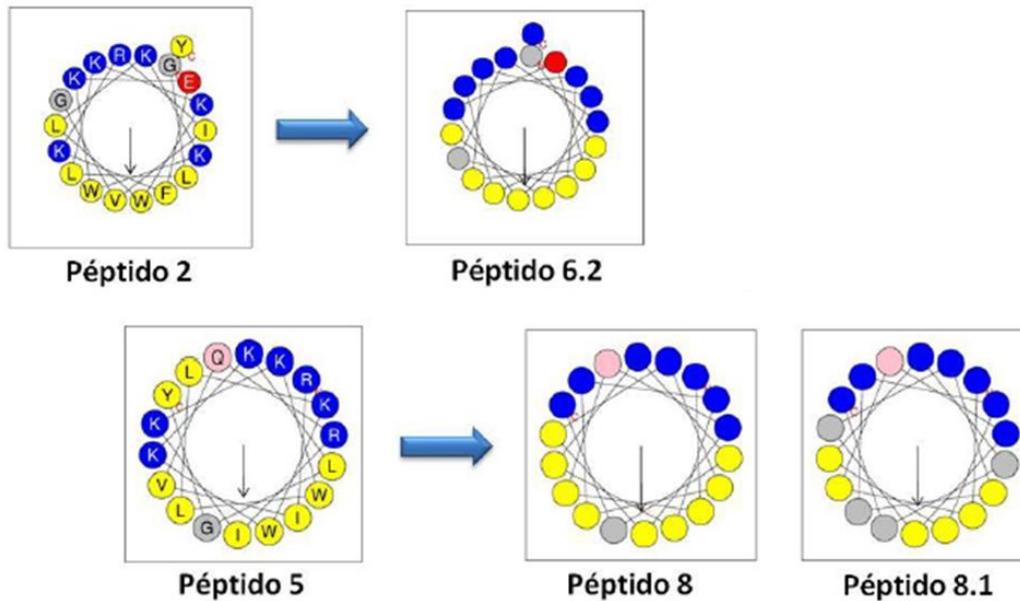


Figura 15. Proyecciones en *helical wheel*. La flecha azul indica la serie de péptidos modificados a partir del mismo péptido original. Los aminoácidos hidrofóbicos se representan en color amarillo y los hidrofílicos en rojo y azul. Las flechas verticales representan el momento hidrofóbico de cada péptido. Las proyecciones de los péptidos modificados se presentan sin la identificación de aminoácidos debido a que no se ha presentado aun la solicitud de patente de estos péptidos. Fuente: <http://heliquest.ipmc.cnrs.fr/cgi-bin/ComputParamsV2.py>

Actividad Anti-Bacteriófago

El bacteriófago GFP se incubó con péptidos diluidos en 400 μl de PBS a una concentración final de 0,1 $\mu\text{g ml}^{-1}$, 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$, 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ o 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ durante 16 h a 37 °C DO. Después de la incubación, los títulos de bacteriófagos se midieron como se describe anteriormente. La cepa de *E. coli* (ATCC 37197), utilizada para el ensayo de titulación, se incubó con péptidos solos como control. Durante el ensayo de titulación, la concentración final de péptidos en la suspensión bacteriana fue de 1,4, 2,8 y 14 $\mu\text{g ml}^{-1}$, respectivamente.

Potencial Z

El potencial Zeta medido en voltios (ξ) se calculó utilizando la ecuación de Smoluchowski: donde η es la viscosidad de la suspensión a 20°C, D es la constante dieléctrica de la solución a 20°C y μ es la movilidad electroforética de las partículas (micrómetros por voltio cm⁻¹). El bacteriófago se incubó con una solución que contenía el péptido 5 y Omiganan a una concentración final de 5,7 $\mu\text{g ml}^{-1}$ durante 30 minutos a 25°C bajo agitación suave. Las mediciones se realizaron en un analizador de partículas nano SZ100 (Horiba) a 25°C, cada valor representa el promedio de dos lotes independientes y se obtuvieron 100 determinaciones individuales por lote.

Dispersión dinámica de la luz

Los experimentos de dispersión dinámica de la luz se llevaron a cabo en un analizador SZ100 (Horiba) con una detección de retrodispersión a 173°C, utilizando células de poliestireno desechables. Las suspensiones de bacteriófagos (con o sin péptido) se dejaron durante 15 minutos a 25°C. Las funciones de autocorrelación de intensidad normalizada se analizaron mediante el método CONTIN (Provencher, 1982), lo que produjo una distribución de los coeficientes de difusión (D). D se utiliza para calcular el diámetro hidrodinámico (D_H) a través de la relación Stokes-Einstein: (3) donde k es la constante de Boltzmann, T la temperatura absoluta y η la viscosidad del medio. El valor de D_H se calculó a partir de un conjunto de 15 mediciones (~ 13 series cada una) para el bacteriófago en presencia del péptido p5 o solo. La D_H de la muestra se obtuvo del pico con la mayor intensidad de luz dispersada (i.e, el modo) en distribuciones de intensidad de dispersión de la luz.

Análisis estadístico

La importancia de la diferencia entre las concentraciones se analizó utilizando el software Prism 5.0 (software GraphPad), y el valor de P se indica mediante asteriscos en las Figuras. Los datos corresponden a la media \pm errores estándar de la media (SEM) para cada concentración utilizando triplicados. Las diferencias estadísticas se determinaron mediante el análisis de varianza de una vía (ANOVA). Las comparaciones *a posteriori* entre los grupos se realizaron utilizando el análisis de prueba de comparación múltiple de Tukey.

Hidróxido de Bismuto

Se preincubó al bacteriófago con Hidróxido de Bismuto (Chobet, Argentina) ON a 37°C. En tubos eppendorfs de 1,5 ml se pre-incubaron distintas concentraciones de Hidróxido de Bismuto con cantidad de bacteriófago suficiente para obtener colonias cuantificables más 12,5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de MgCl_2 , 25 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de CaCl_2 y cantidad suficiente de $\text{H}_2\text{O}_{\text{bd}}$ para llegar a un volumen final de 400 μl .

Como control de toxicidad se preincubó al bismuto sin bacteriófagos y, control positivo, tubos sin Hidróxido de Bismuto (Tabla 2).

	1 mg/ml	1 mg/ml Sin fago	5 mg/ml	5 mg/ml Sin fago	Bacteri ófago	0,5 mg/ml	0.1 mg/ml
GHBio (42,8 mg/ml)	9.3	9.3	47	47	-	4.65	0.93
Bacteriófa go (1,2.10⁷ pfu/ml)	100 (dil-2)	(100 ul PBS 1X)	100 (dil-2)	(100 ul PBS 1X)	100 (dil-2)	100	100
CaCl₂ (1M)	6.8 (dil-2)	6.8 (dil-2)	6.8 (dil-2)	6.8 (dil-2)	6.8 (dil-2)	6.8	6.8
MgCl₂ (950ug/ml)	5.26	5.26	5.26	5.26	5.26	5.26	5.26
H₂O (hasta 400 μl)	278.64	278.64	241	241	288	283.3	287

Tabla 2. Mix pre-incubación gel bismuto más bacteriófagos.

A las muestras pre-incubadas, luego de 24hs se les agregó 1 ml de *E. coli* Y1090 en crecimiento exponencial siguiendo el protocolo de titulación anteriormente descrito. Por último, se contaron las placas de lisis de los distintos tratamientos con respecto al control positivo.

Resultados

Estabilidad de los bacteriófagos

Se indujo la escisión del bacteriófago GFP y el bacteriófago 933W a partir de los cultivos bacterianos lisogénicos de *E. coli* C600: Δ TOX:GFP y *E. coli* C600:933W respectivamente.

Sobre un cultivo *over night* (ON) de las cepas lisogénicas se realizó una dilución 1:100 y se indujo la escisión del bacteriófago mediante el agregado de antibiótico. Una vez purificados, según se detalla en “Materiales y Métodos”, se almacenaron a 4°C y se estudió su estabilidad mediante ensayos de titulación. A tiempo 0 se obtuvo un título en el orden de 10^7 pfu ml⁻¹ para ambos bacteriófagos. Superado el mes de almacenamiento a 4°C, el título se redujo en un orden de magnitud llegando a 10^6 pfu ml⁻¹ para el bacteriófago GFP y se mantuvo estable hasta los 84 días (máximo tiempo de prueba) (Figura 15).

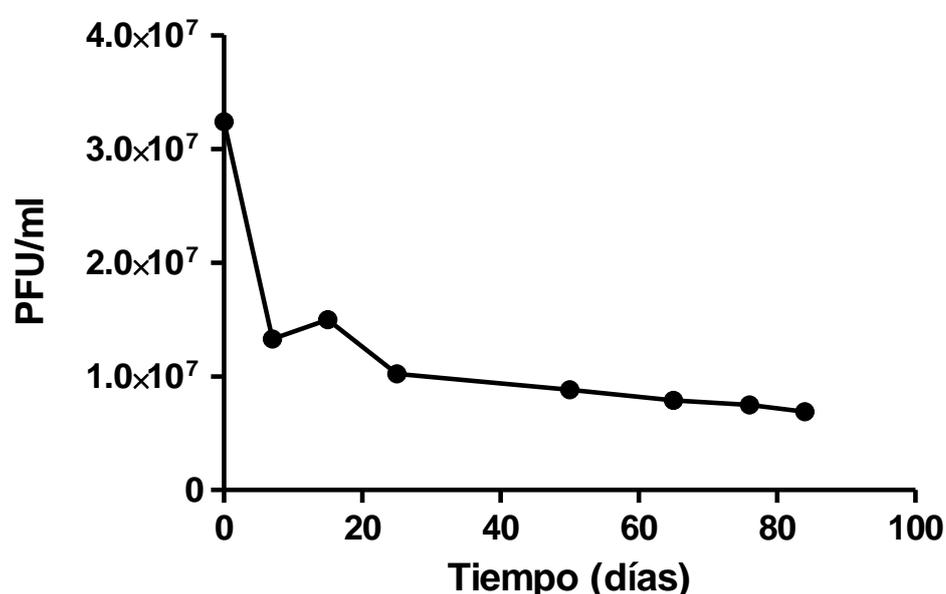


Figura 16. Estabilidad del bacteriófago GFP a 4°C evaluada mediante conteo de placas de lisis en función del tiempo.

Por otro lado, luego de la purificación, el título detectable del bacteriófago 933W disminuyó de 10^7 pfu ml⁻¹ a 0 pfu ml⁻¹ en una semana.

Si bien la única diferencia entre el bacteriófago GFP y el bacteriófago 933W es el reemplazo del gen *stx* por *gfp*, la estabilidad varía sustancialmente.

Aunque aún no se comprenden las causas, Marinus y colaboradores demostraron que la estabilidad del bacteriófago 933W se pierde por completo al día siguiente de su purificación (Marinus, *et al.*, 2013).

Desarrollo de anticuerpos anti-bacteriófago GFP en ratones

Para contar con anticuerpos anti-bacteriófago que no están disponibles comercialmente, ratones BALB/c de dos meses de edad fueron inmunizados según el protocolo descrito en “Materiales y Métodos”. A los 54, 68 y 82 d.p.v. se tomaron muestras de suero y se midió el título de anticuerpos mediante ELISA.

Evaluación de la respuesta inmune humoral sistémica mediante ELISA

El ensayo de ELISA para detectar anticuerpos anti-bacteriófago GFP se realizó según el protocolo descrito en “Materiales y Métodos”. En la figura 16 se muestra la respuesta de anticuerpos de tipo IgG a 54 y 68 d.p.v., observándose que los animales desarrollaron un título de anticuerpo anti-bacteriófago de 5×10^5 .

Estos anticuerpos fueron la herramienta utilizada en los ensayos de inmunohistoquímica y marcación primaria en citometría de flujo para identificar los bacteriófagos.

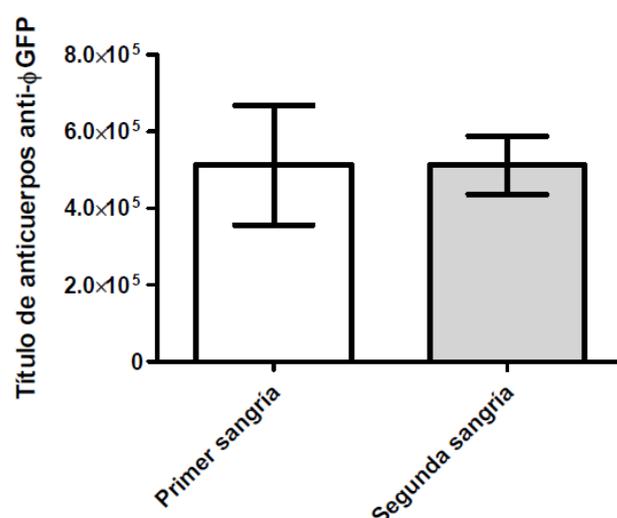


Figura 17. Título de anticuerpo IgG anti-bacteriófago GFP.

Bacteriófago como target terapéutico

Se utilizaron distintos componentes como potenciales agentes terapéuticos contra el bacteriófago. Teniendo presente la capacidad de éstos de infectar otras bacterias susceptibles en la flora comensal del intestino, amplificando la expresión de toxina Stx y producción de progenie viral (Gamage *et al.*, 2003), la utilización de compuestos capaces de neutralizar la capacidad infectiva de los bacteriófagos podría contribuir a tratamientos que controlen la infección y minimicen el riesgo de desarrollar SUH.

Péptidos anti-microbianos

Para evaluar si los péptidos catiónicos podrían afectar la infección por bacteriófagos, evaluamos siete cAMPs diseñados previamente por el grupo del Dr. Maffia (Faccone *et al.*, 2014; Hollmann *et al.*, 2016; Maturana *et al.*, 2017) como posibles agentes anti-bacteriofágicos. Para analizar el efecto de estos péptidos sobre el bacteriófago, evaluamos su capacidad de inactivar la infección en la cepa *E. coli* Y1090, cepa utilizada para la titulación de dicho bacteriófago.

Los siete péptidos mostraron diferentes eficiencias en la inactivación. Los péptidos 6,2, 5 y 8 mostraron la mayor actividad de inactivación, logrando neutralizar significativamente a los bacteriófagos en las condiciones evaluadas (Figuras 18 y 19).

Como se describió en “Materiales y Métodos”, se evaluaron 2 grupos de péptidos. El péptido 6,2 proviene del 2, al cual se le realizaron modificaciones en su secuencia para aumentar sus características anfipáticas. Estos péptidos tuvieron una capacidad de neutralización de un 60 y 90% respectivamente.

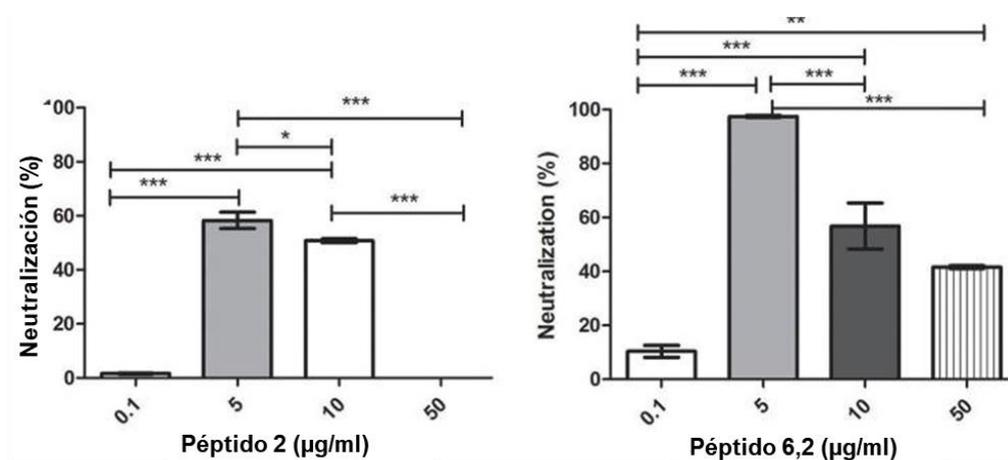


Figura 18. Inactivación de bacteriófagos con péptido 2 y 6,2. Después de la preincubación de bacteriófagos con diferentes concentraciones de péptidos, la inactivación se midió mediante la titulación de *E. coli* Y1090, cepa (ATCC 37197). Se utilizó el software Prism 5.0 (software GraphPad) para determinar la significación estadística entre diferentes muestras. Péptido 2: * $p < 0,05$, *** $p < 0,0001$. Péptido 6,2: ** $p < 0,05$, *** $p < 0,0001$. (Del Cogliano *et al.*, 2017).

Por otro lado, se analizaron los péptidos 5, 8 y 8,1. Tanto el péptido 8 como el 8,1 derivan del 5. En este caso, al péptido 5 también se le realizaron 4 modificaciones que lo hacen mas anfipático, denominado péptido 8. A partir de esta secuencia, se realizaron tres cambios para disminuir la hemólisis, generando el péptido 8.1.

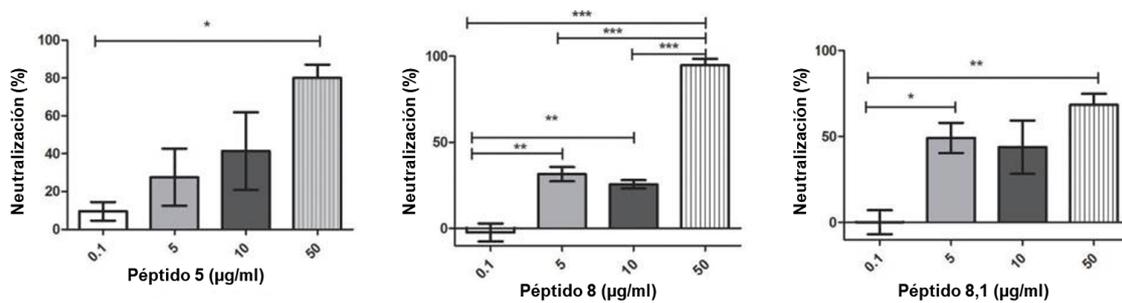


Figura 19. Inactivación de bacteriófagos por péptidos catiónicos. Después de la preincubación de bacteriófagos con diferentes concentraciones de péptidos, la inactivación se midió mediante la titulación de *E. coli*, cepa (ATCC 37197). Se usó el software Prism 5.0 (software GraphPad) para determinar la significación estadística entre diferentes muestras mediante el análisis de varianza de una vía (ANOVA). Péptido 5: * $p = 0,0313$. Péptido 8: ** $p < 0,005$, *** $p < 0,0001$. Péptido 8.1: * $p < 0.05$, ** $p = 0.008$. (Del Cogliano *et al.*, 2017).

Con el fin de analizar qué característica de los cAMPs está implicada en la inhibición del bacteriófago, se han analizado los controles con los péptidos *Random* y *Omiganan*.

Por otro lado, los péptidos 2 y 8.1 mostraron menor capacidad de inactivación entre los cAMPs probados. Los péptidos *Random* y *Omiganan* no mostraron capacidad de inactivación de los bacteriófagos en las condiciones evaluadas (Figura 20).

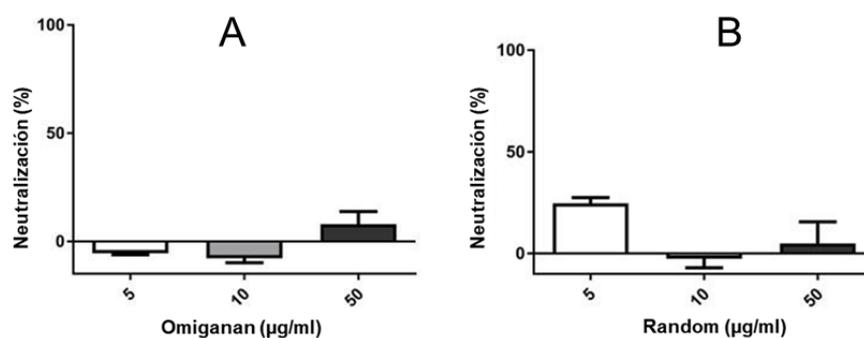


Figure 20. Inactivación de bacteriófagos por los péptidos control. (A) *Omiganan*, un péptido catiónico comercial con estructura beta. **(B)** *Random*, un péptido catiónico sin estructura alfa helicoidal. Se usó el software Prism 5.0 (software GraphPad) para determinar la significación estadística entre diferentes muestras mediante el análisis de varianza de una vía (ANOVA). *Omiganan*: ns. Aleatorio: ns. (Del Cogliano *et al.*, 2017).

Es importante notar que, según el protocolo que usamos, después de la incubación de cada péptido con los bacteriófagos, la mezcla péptido-bacteriófago se incubó con la cepa *E. coli* indicadora (Y1090). Por esa razón, la actividad antimicrobiana de los cAMPS sobre esta cepa de *E. coli* fue evaluada previamente, y no se observó muerte bacteriana. Cabe mencionar que la concentración final del péptido que afecta al césped bacteriano durante el ensayo de titulación osciló entre 1,4 y 14 $\mu\text{g ml}^{-1}$, que es significativamente menor que la actividad inhibitoria mínima (CIM) obtenida previamente para cada péptido en *E. coli* (p.2 = 56 mg ml^{-1} , p.5= 56 mg ml^{-1} , p.8=56 mg ml^{-1} , p.8,1=56 mg ml^{-1} , p.6,2=56 mg ml^{-1}) (Faccone *et al.*, 2013; Hollmann *et al.*, 2016; Maturana *et al.*, 2017).

Interacción Bacteriófago-péptido

Con el fin de evaluar si una interacción directa entre péptidos y bacteriófagos está involucrada en la capacidad de inactivación, se realizaron experimentos de potencial zeta, utilizando el péptido 5 como modelo.

Observamos que el péptido 5 fue capaz de modificar la carga superficial de los bacteriófagos, al disminuir la carga negativa neta expuesta. Los resultados sugieren que los péptidos cargados positivamente y los bacteriófagos están interactuando a través de cargas electrostáticas (Figura 21). Se observó el mismo comportamiento con el péptido Omiganan, aunque éste no mostró actividad antibacteriofágica.

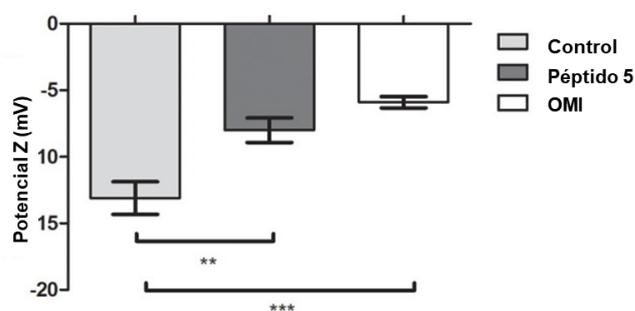


Figura 21. Potencial zeta de los bacteriófagos incubados con el péptido 5 u Omiganan (OMI), o en solución tampón (control). Cada punto representa la media de 2 lotes independientes \pm SEM. ** $P < 0.01$; *** $P < 0,001$, ANNOVA de una vía seguido de una prueba posterior de Dunnett para comparaciones múltiples frente al control. (Del Cogliano *et al.*, 2017).

Utilizamos DLS (*Dynamic light scatter*) para evaluar si el tamaño del bacteriófago se modificó como consecuencia de su interacción con los péptidos. Este ensayo también nos permite determinar si se genera efecto de agregación luego de la incubación del bacteriófago con los péptidos. Los resultados muestran que los péptidos no afectan el diámetro hidrodinámico del bacteriófago (Figura 22).

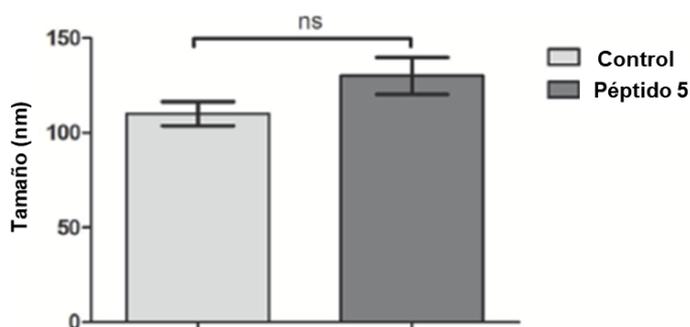


Figura 22. Diámetro hidrodinámico promedio de bacteriófagos incubados con el péptido 5 o en solución tampón (control). Ns, no significativo, t-test (desapareado). (Del Cogliano *et al.*, 2017).

Hidróxido de Bismuto

Además de los péptidos catiónicos, se utilizaron distintas concentraciones de Hidróxido de Bismuto como potencial inhibidor de la infección (Figura 23).

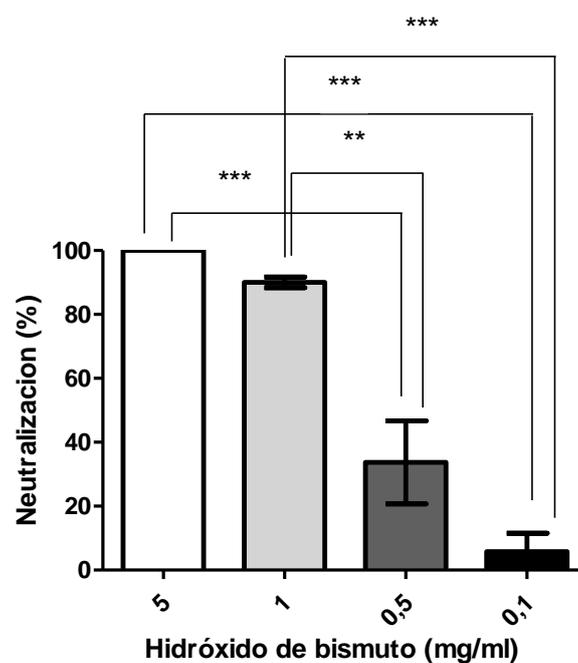


Figura 23. Capacidad neutralizante del Hidróxido de Bismuto. ** P <0.01; *** P <0,001, ANNOVA de una vía seguido de una prueba posterior de Dunnett para comparaciones múltiples frente al control.

El Hidróxido de Bismuto tiene actividad anti-bacteriofágica siguiendo una curva dependiente de la concentración. Estos resultados muestran la especificidad de la neutralización, ya que a concentraciones bajas, la actividad anti-bacteriofágica disminuye significativamente.

Construcción del bacteriófago 933W mutado en el promotor pr1 (C600:933W:pr1)

A partir de resultados previos, donde se pudo determinar que el promotor putativo eucariota pr1 es reconocido por la maquinaria eucariota y permite la transcripción y traducción activa de toxina Stx, se reemplazó el motivo TATA box (secuencia TTTTAT) por un sitio BamH1 mediante el sistema lambda red recombinasa.

Al bacteriófago 933W se le agregó una resistencia a tetraciclina. Para esto se generó un amplímero de 1472 pb, a partir de la cepa *E. coli* 459, del gen de tetraciclina incluyendo fragmentos de homología con regiones del bacteriófago. La amplificación fue corroborada en un gel de agarosa 1,2% (Figura 24). A partir de este primer mutante se pudo generar un amplímero conteniendo la resistencia a tetraciclina y el sitio BamH1 para así recombinarlo sobre el fragmento de ADN blanco.

Una vez corroborada la correcta amplificación, el amplímero se purificó mediante el uso de un kit de purificación a partir del producto de PCR y la extracción se comprobó en gel de agarosa.

Teniendo el amplímero purificado, se transformó la cepa de *E. Coli* C600:933W conteniendo el plásmido pkd46. Los *primers* Tc5 (sobre tetraciclina) + pr1 Rv (sobre el bacteriófago) se utilizaron para comprobar la correcta inserción en las cepas resistentes a tetraciclina (Figura 25).

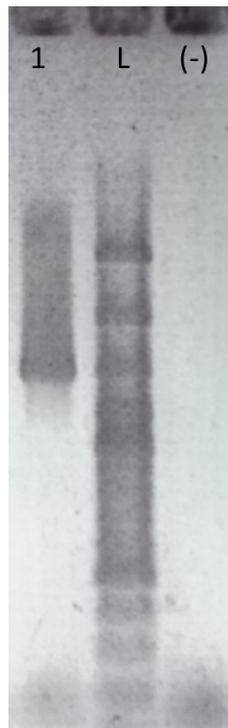


Figura 24. Amplificación del gen de tetraciclina + fragmentos de homología. Calle 1: amplificación sobre *E. coli* 459 con los primers pfM1 y prM1. **Calle L:** se utilizó ladder de 1000 pb. **Calle (-):** control negativo sin molde.

Con los primers PfM1 y Pr1mutrev (homología con pr1 incluyendo la mutación puntual) sobre las cepas resistentes, se obtuvo un amplímero conteniendo al gen de tetraciclina y el promotor pr1 mutado (secuencia TTTTAT de la región TATA por un sitio de restricción BamH1) (Figura 26).

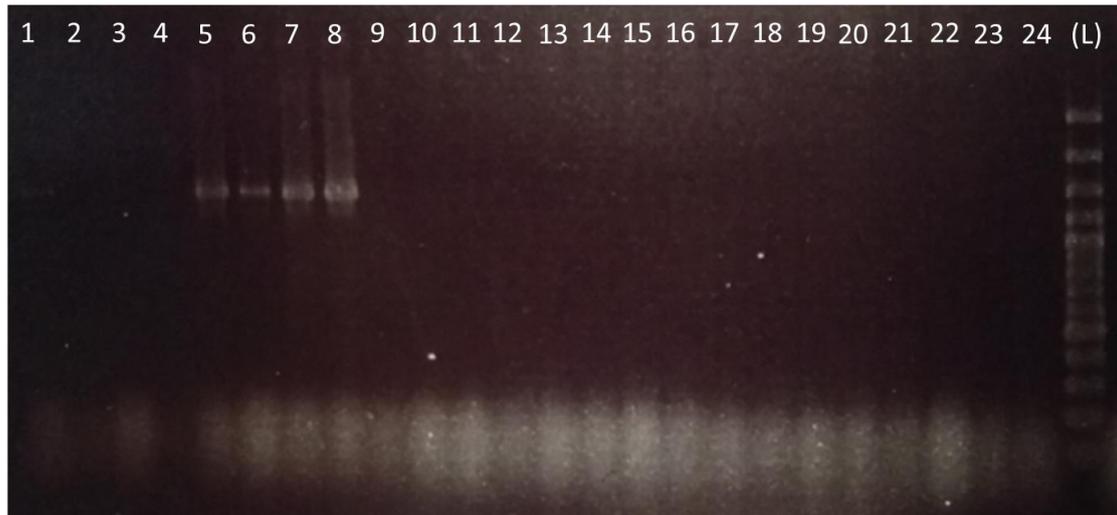


Figura 25. PCR para comprobar la correcta inserción del gen de tetraciclina en *E. coli* C600:933W. Calle (1-24): amplificación con los primers Tc5 y pr1 Rv sobre cepas *E. coli* C600:933W, transformadas con el gen de tetraciclina incluyendo los fragmentos de homología, numeradas del 1 al 24. **Calle (L):** ladder 1000 pb.

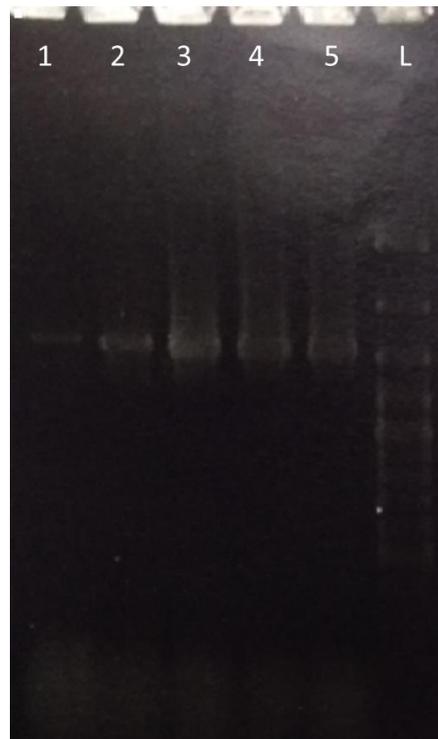


Figura 26. Amplificación del gen de tetraciclina + mutación en pr1 y fragmentos de homología. Calle (1-5): amplificación sobre cepas resistentes a tetraciclina con primers pfM1 y pr1mutrev. **Calle (L):** ladder 100 pb.

Se purificó el producto de PCR y se transformó en una cepa de *E. coli* C600:933W conteniendo pkd46.

Se seleccionaron las cepas resistentes a tetraciclina, y se enviaron a secuenciar. Así, se pudo corroborar la correcta inserción de la mutación en pr1 (Figura 28). Luego se realizaron sucesivos pasajes en LB con tetraciclina para eliminar el plasmido pkd46. Finalmente se armaron los stocks de la cepa mutante y se mantuvieron a -80°C hasta su utilización.

En el esquema 3 se puede ver la secuencia del mutante, con el gen de resistencia a tetraciclina, y la mutación en pr1.

```

TGAGCTGGAGAGCGGGCGTTTTGAGCAGACGGTCAGGGAAGTTCAGAATGTAGTCAG
TCAGAACGGATGATATTGCAGGATTAGTTACGTACCGTTATTATCCTGCGCCCGGCCCTTT
AGCTCAGTGGTGAGAGCGAGCGACTCATAATCGCCAGGTCGCTGGTTCAAATCCAGCA
AGGGCCACCATATCACATACCGCCATTAGCTCATCGGGACAGAGCGCCAGCCTTCGAAG
CTGGCTGCGCGGGGTTTCGAGTCCTCGATGGCGGTCCATTATCTGCATTATGCGTTGTTAG
CTCAGCCGGACAGAGCAATTGCCTTCTGAGCAATCGGTCACTGGTTCGAATCCAGTACA
ACGCGCCATATTTATTTACCAGGCTCGCTTTTGCGGCCTTTTTTAATCTGCGCCGGGTC
TGGTGCTGATTACTTCAGCCAAAAGGAACACCTGTATATGAAGTGTATATTATTTAAATGG
GTA CTGTGCCTGTTACTGGGTTTTCTTCGGTATCCTATCCC GGGAGTTTACGATAGACT
TTTCGACCCAACAAAGTTATGTCTCTTCGTTAAATAGTATACGGACAGAGATATCGACCCC
TCTTGAACATATATCTCAGGGGACCACATCGGTGTCTGTTATTAACCACACCCCACCGGG
CAGTTATTTTGCTGTGGATATACGAGGGCTTGATGTCTATCAGGCGCGTTTTGACCATCTT
CGTCTGATTATTGAGCAAAATAATTTATATGTGGCCGGGTTTCGTTAATACGGCAACAAATA
CTTTCTACCGTTTTTCAGATTTTACACATATATCAGTGCCCGGTGTGAC

```

Figura 27. Secuencia parcial del genoma 933W. En amarillo (NN) se remarca la secuencia del promotor putativo pr1. En verde oscuro (NN) la región TATA box dentro de pr1. Subrayado (NN) el RBS putativo. En verde claro (NN) el promotor pStx2 y NN indica el inicio del ORF de la subunidad A de stx2 (stx2A).

```

Gen de resistencia a
Tetraciclina.....CCGCGTTGCAGGCCATGCTGTCCAGGCAGGTAGAT
GACGACCATCAGGGACAGCTTCAAGGATCGCTCGCGGCTCTTACCAGCCTAACCTCGATCACTG
GACCGCTGATCGTCACGGCGATTTATGCCGCCCTCGGCGAGCACATGGAACGGGTGGCATGGAT
TGTAGGCGCCGCCCTATACCTTGTCTGCCTCCCCGCGTTGCGTCCGCGGTGCATGGAGCCGGGCC
ACCTCGACCTGA CGGACAGAGCAATTGCCTTCTGAGCAATCGGTCACTGGTTCGA
ATCCAGTACAACGCGCCATATTTATTTACCAGGCTCGCTTTTGC GGGCCTTggatcc
ATCTGCGCCGGGTCTGGTGCTGATTACTTCAGCCAAAAGGAACACCTGTATATG
AAGTGTATATTTAAATGGGTACTGTGCCTGTTACTGGGTTTTTCTTCGGTATCC
TATCCCGGGAGTTTACGATAGACTTTTCGACCCAACAAAGTTATGTCTCTTCGTT
AAATAGTATACGGACAGAGATATCGACCCCTCTGAACATATATCTCAGGGGACC
ACATCGGTGTCTGTTATTAACCACACCCACCGGGCAGTTATTTGCTGTGGATAT
ACGAGGGCTTGATGTCTATCAGGCGCGTTTTGACCATCTTCGTCTGATTATTGAG
CAAATAATTTATATGTGGCCGGTTCGTTAATACGGCAACAAATACTTTCTACCG
TTTTTCAGATTTACACATATATCAGTGCCCGGTGTGACAA

```

Figura 28. Mutante pr1 (C600:933W:pr1). En azul (NN) se representa el gen de tetraciclina, con verde (NN) el promotor pStx2, en amarillo (NN) el promotor putativo eucariota pr1. La secuencia mutante se indica en nn, dentro del pr1. NN y NN representan el RBS putativo y el inicio del ORF de stx2A respectivamente.



Esquema 3. Secuencia del mutante C600:933W:pr1. En violeta: gen de resistencia a tetraciclina. pStx: promotor stx del gen de la toxina shiga. Pr1: promotor pr1 putativo eucariota. xxx: mutación en el TATA box.

Curvas de crecimiento de cepas E. coli C600, E. coli C600:933W y E. coli C600:933W:pr1

Con el fin de evaluar los parámetros de crecimiento de las cepas que se utilizarán en los ensayos de infección, se realizaron las curvas de crecimiento correspondientes. La figura 29 muestra que *E. coli* C600, *E. coli* C600:933W y *E. coli* C600:933W:pr1 presentan un crecimiento similar entre 0 y 15 h. Las cepas también mostraron un recuento de viabilidad sin diferencias significativas a las 16 horas (Figura 29).

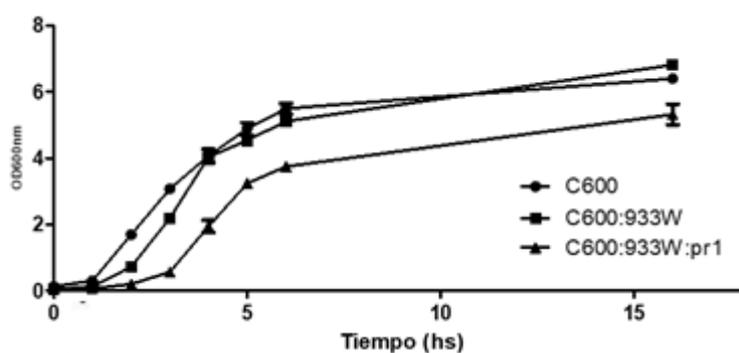


Figura 29. Curvas de crecimiento de *E. coli* C600, *E. coli* C600:933W y *E. coli* C600:933W:pr1. Ambas cepas presentan una curva de crecimiento similar sin diferencia significativa entre los recuentos de viabilidad. Cada barra representa la media \pm SEM de 4–6 ratones por grupo.

Optimización de la dosis a ser utilizada in vivo

La dosis de bacteria a inocular en los ratones se optimizó en base a la sobrevida y el daño renal producido por *E. coli* C600:933W a las 72 y 120 hs post inducción (Figura 30).

Se utilizó la medición de urea plasmática como parámetro de daño renal (Fernandez *et al.*, 2006; Keepers *et al.*, 2006).

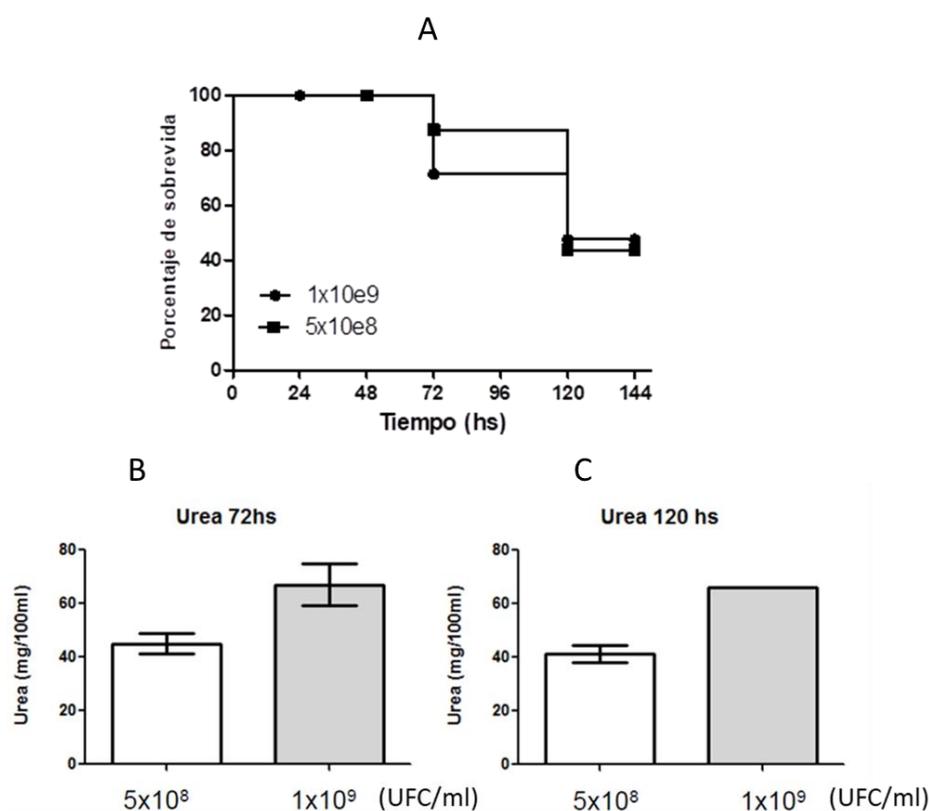


Figura 30. Sobrevida y Daño renal en ratones a 72 y 120 h post-inducción. (A) Sobrevida. (B, C) Daño renal. En el eje Y se muestran las concentraciones de bacterias expresadas como UFC por mililitro de cultivo. Cada barra representa la media \pm SEM de 4–6 ratones por grupo.

La dosis de $1 \cdot 10^9$ UFC por mililitro generó mayor daño renal y muerte del 75% de los ratones a las 72 horas. En función a esto, la dosis seleccionada para infectar ratones fue la de $1 \cdot 10^9$ UFC por mililitro.

Relevancia del bacteriófago 933W en el desarrollo del Síndrome Urémico Hemolítico

Anteriormente reportamos la expresión de Stx2 por las células eucariotas *in vitro* e *in vivo*. Debido a que los genes que codifican las dos subunidades de Stx se encuentran en el genoma del bacteriófago 933W, se evaluó el rol de la inducción del mismo en el desarrollo del SUH en ausencia del *background* de la cepa patogénica *E. coli* O157:H7.

Los ratones infectados con *E. coli* C600:933W y *E. coli* C600:933W:pr1 murieron a las 72 horas post- infección

Una vez seleccionada la dosis óptima de *E. coli* C600:933W, se procedió con los ensayos para estudiar el rol del bacteriófago en el desarrollo del SUH.

En este caso, los grupos analizados fueron ratones infectados, vía oral, con la cepa *E. coli* C600:933W, el mutante *E. coli* C600:933W:pr1 y la cepa *E. coli* C600 como control.

Los ratones infectados con la cepa C600 no patógena lisogenizada con bacteriófago 933W (C600:933W) y la cepa mutante en pr1 (C600:933W:pr1) murieron 72 horas después de la infección (Figura 31). Los ratones control infectados con la cepa *E. coli* C600 no patógena y sin el bacteriófago 933W permanecieron sanos durante 5 días, después de lo cual se sacrificaron.

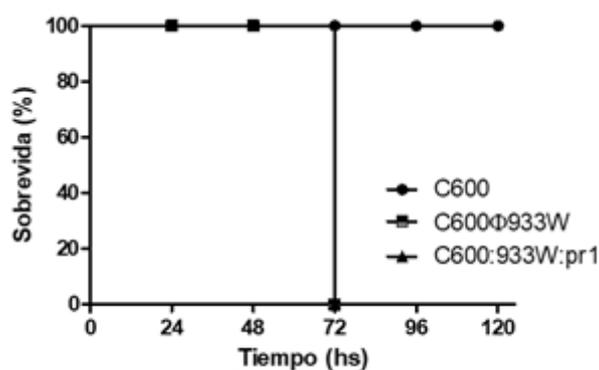


Figura 31. Curva de supervivencia. Se muestran los porcentajes de supervivencia de ratones infectados con *E. coli* C600:933W y *E. coli* C600:933W:pr1. Los ratones infectados con *E. coli* C600 se utilizaron como controles.

Los ratones infectados con *E. coli* C600:933W y *E. coli* C600:933W:pr1 mostraron un aumento significativo en el nivel de urea en plasma en comparación con los ratones infectados con *E. coli* C600 (Figura 32). Esto nos indica que los ratones presentan daño renal debido a la inducción de bacteriófagos y la producción de Stx. Los ratones infectados con la cepa mutante presentaron un incremento en los niveles de urea (160 mg ml^{-1}) al igual que los tratados con la cepa sin mutar.

Estos ensayos deberían repetirse en animales *germ free* o con algún tratamiento que permita evitar la producción de toxina Stx por parte de bacterias presentes en el tracto intestinal.

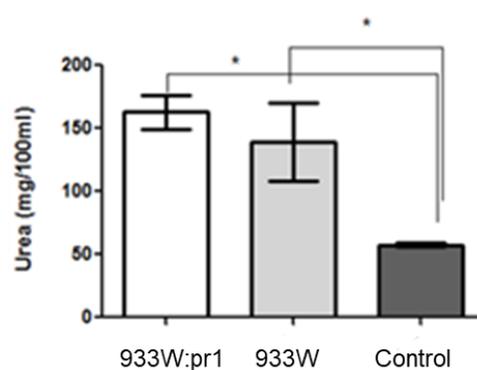


Figura 32. Daño renal inducido por Stx. Los niveles de urea plasmática a las 72 horas después de la infección se midieron como un parámetro de daño renal. Cada barra representa la media \pm SEM de 4–6 ratones grupo-1. * $P = 0,0095$.

Histología de riñón e intestino de ratones infectados con E. coli C600:933W, C600:933W:pr1 y C600.

En otra serie de experimentos, los grupos de ratones se infectaron con *E. coli* C600:933W, *E. coli* C600:933W:pr1 o *E. coli* C600 y se sacrificaron a las 72 horas. Los riñones, intestinos y cerebros de los ratones se extirparon para estudios histológicos.

Los riñones de ratones infectados con *E. coli* C600:933W y *E. coli* C600:933W:pr1 mostraron proliferación mesangial (flecha negra en las Figuras 33A, B), necrosis y desprendimiento de células tubulares (punta de flecha negra en las Figuras 33A), así como también dilatación tubular (asterisco negro en las Figuras 33A, B). Los ratones control infectados con *E. coli* C600 mostraron características histológicas normales (Figuras 33C).

Los intestinos de ratones infectados con *E. coli* C600:933W y *E. coli* C600:933W:pr1 mostraron signos de daño, incluida la infiltración linfocitaria en el músculo, edema mucoso y submucoso en el intestino delgado (Figura 34), y edema mucoso en el intestino grueso (Figuras 34A, B). Los ratones control infectados con *E. coli* C600 no mostraron daño intestinal (Figuras 34C).

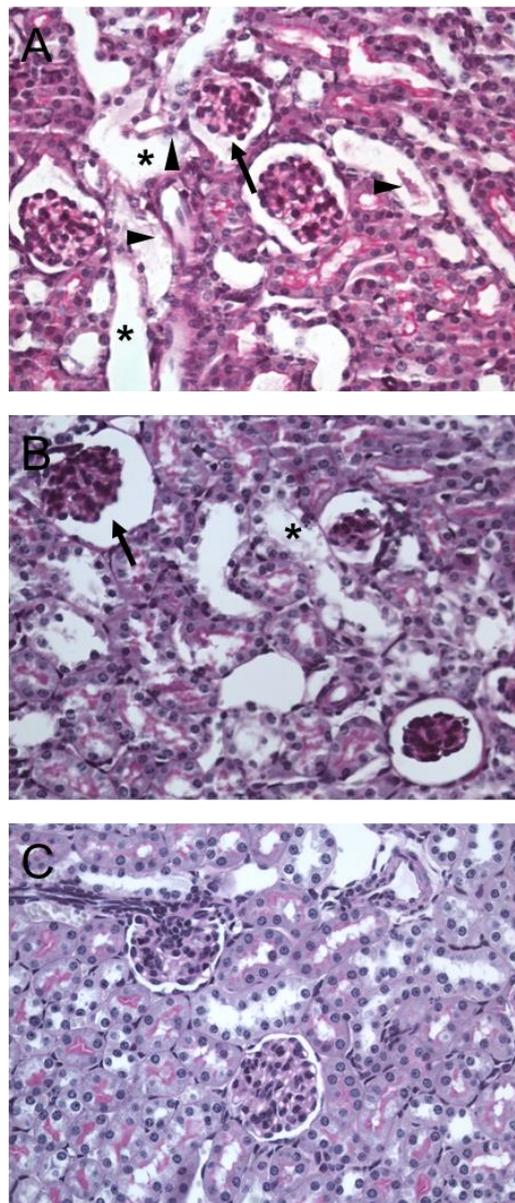


Figura 33. Histología del riñón. (A) Ratones infectados con la cepa *E.coli* C600:933W. **(B)** Ratones infectados con la cepa *E. coli* C600:933W:pr1. **(C)** Ratones control inoculados con la cepa *E. coli* C600. Se observa proliferación mesangial en ratones infectados con *E. coli* C600:933W y *E. coli* C600:933W:pr1 (flecha negra en **A**, **B**), así como necrosis y desprendimiento de células tubulares (punta de flecha negra en **A**) y dilatación tubular (asterisco negro en **A**, **B**). No se observó ningún efecto en ratones infectados con la cepa de control *E. coli* C600 **(C)**. Periodic acid shift (PAS). Ampliación: 200 X.

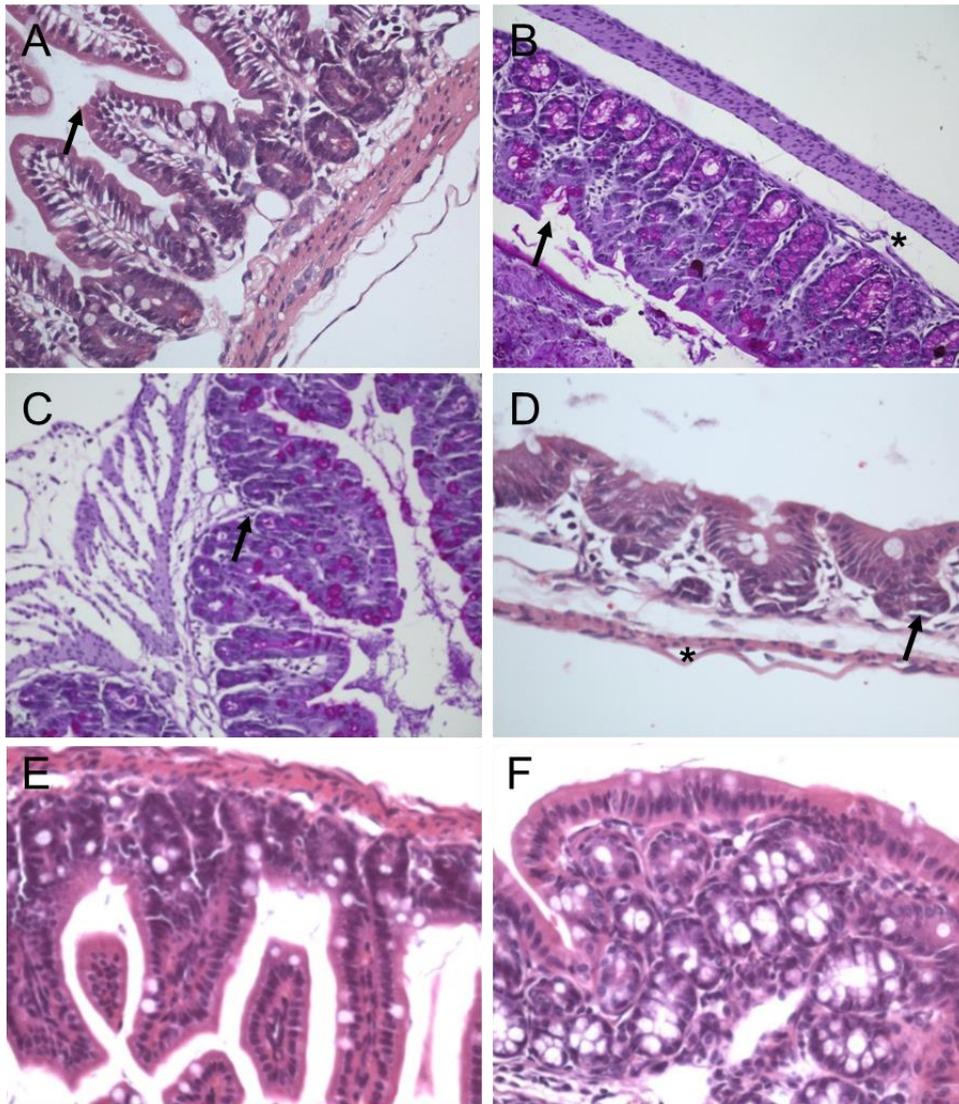


Figura 34. Histología del intestino. (A-B) Ratones infectados con la cepa *E. coli* C600:933W. **(C-D)** Ratones infectados con la cepa *E. coli* C600:933W:pr1. **(A, C, E)** Intestino delgado. **(B, D, F)** Intestino grueso. Se observa necrosis en microvellosidades intestinales (flecha negra, A, C) del intestino delgado y en la cripta del intestino grueso (flecha negra en B, D). También hay un edema marcado que rodea las criptas de la mucosa y las fibras musculares (asterisco negro en B, D). **(E-F)** Ratones control, no presentaron lesiones. H&E. Ampliación: 200 X.

Detección de Stx2 en cerebro

Para evaluar la presencia de Stx2 en cerebro de ratones infectados con *E. coli* C600:933W y *E. coli* C600:933W:pr1, se realizó un ensayo de inmunofluorescencia con un anticuerpo policlonal anti-Stx2 (Tironi-Farinati *et al.*, 2010). El área analizada fue la corteza motora (Figura 35N). Se encontraron células inmunopositivas para Stx2 en ratones infectados con *E. coli* C600:933W (Figuras 35G-I) mientras que no se detectó marca en los ratones control, infectados con *E. coli* C600 (Figuras 35A-C) y *E. coli* C600:933W:pr1 (Figuras 35D-F). Además, los ratones control positivo inoculados con 1 µg de Stx2 mostraron un mayor número de células inmunopositivas para Stx2 (Figuras 35J-L) en comparación con los ratones tratados con *E. coli* C600:933W ($17,73 \pm 1,89$ C600:933W vs. $56,6 \pm 2,46$ células de control positivo, Figura 35M). La toxina Stx2 no fue inmunodetectada en los controles negativos (Figura 35O).

Detección de bacteriófago 933W en cerebro

La presencia del bacteriófago fue detectada mediante inmunofluorescencia utilizando anticuerpos anti-bacteriófago 933W.

Además, los anticuerpos anti-CC1, anti-GFAP, anti-NeuN y anti-IBA-1 se utilizaron para identificar oligodendrocitos, astrocitos, neuronas y microglia, respectivamente, para determinar qué tipo de célula fue marcada con el anti-bacteriófago 933W.

Pudimos observar que el bacteriófago 933W se inmunolocalizó en el parénquima cerebral (Figura 36R) en oligodendrocitos de la sustancia blanca del cuerpo calloso (Figuras 36E-H), y en astrocitos inmunoreactivos GFAP que forman el glia *limitans* (astrocitos asociados con la lámina basal parenquimatosa que rodea el cerebro y la médula espinal) del hipotálamo ventral (Figuras 36I-L). En los ratones tratados con la cepa *E.coli* C600:933W:pr1 el bacteriófago se limitó a los vasos (Figura 36M, N, P). Finalmente, no se observó marca en ratones infectados con *E. coli* C600 (Figuras 36A, C, D) ni en los controles negativos que omiten el anticuerpo

primario (Figura 36B). La presencia del bacteriófago 933W en el parénquima cerebral fue cuantificada, ver "Materiales y Métodos": 0,00 C600 vs. 40,051 \pm 1.89 C600:6933W AU en IOD (Figura 36Q).

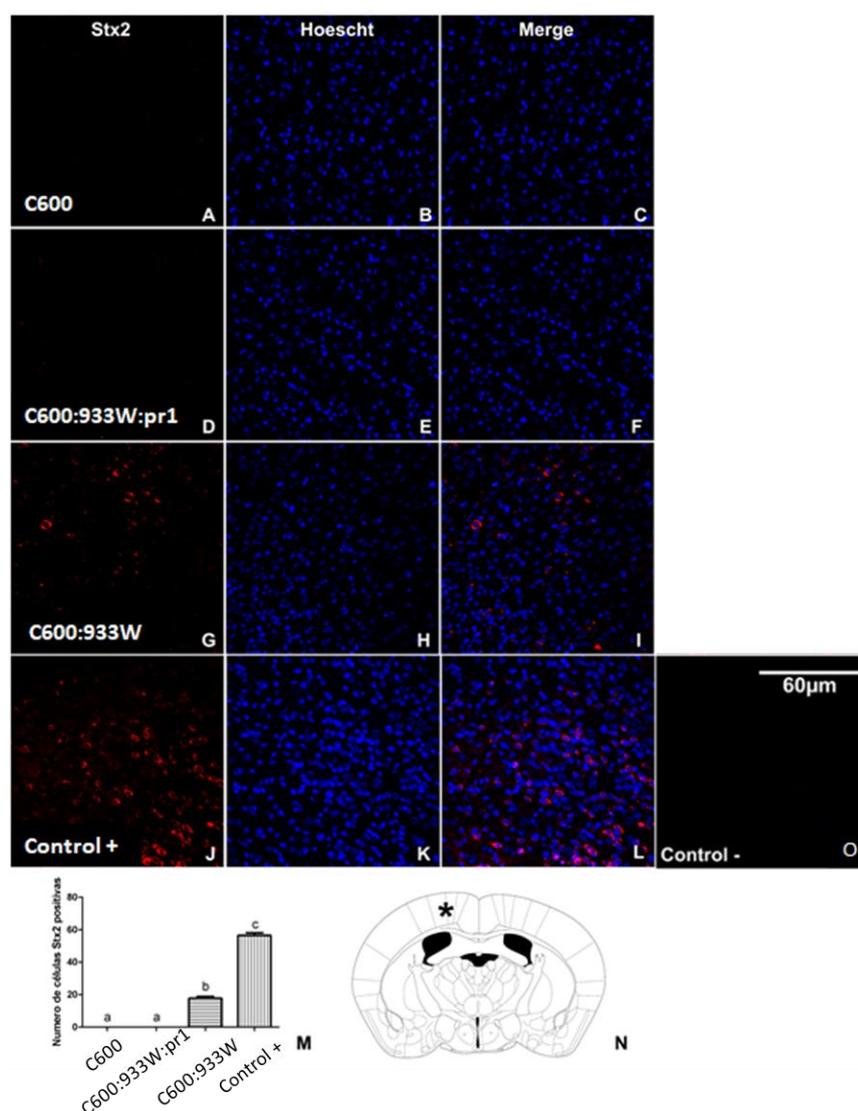


Figura 35. Detección de Stx2 en cerebros. (A–C) Sección cerebral representativa de un ratón control infectado con *E. coli* C600. (D–F) Sección del cerebro de un ratón infectado con *E. coli* C600:933W:pr1. (G–I) Sección del cerebro de un ratón infectado con *E. coli* C600:933W. (J–L) Sección del cerebro de un ratón control positivo después de 4 días de tratamiento con 1 μ g de Stx2. (O) Control negativo omitiendo el anticuerpo anti-stx (M) Número de células inmunopositivas para Stx2 en la corteza motora del ratón (mc) por micrografía. (N) El área observada se encuentra en el ratón en mc(*). La barra de escala en "O" se aplica a todas las micrografías. * P < 0.005 según lo calculado por la prueba t de Student.

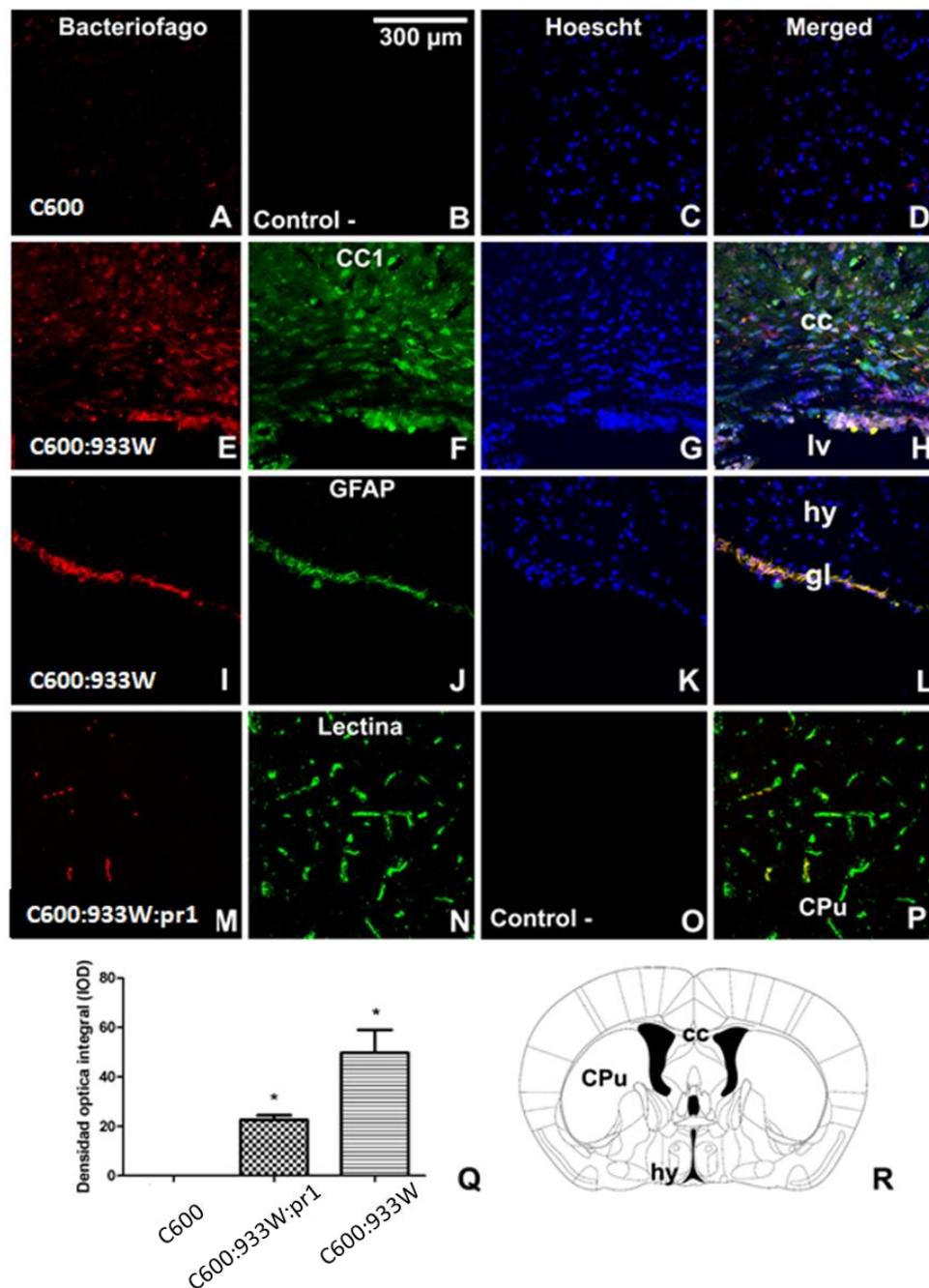


Figura 36. Detección de bacteriófagos. (A, B, C, D) Cerebro del ratón control infectado con *E. coli* C600. (E-L) Cerebro de ratón infectado con *E. coli* C600:933W 72 hs después de la inoculación. (E-H) cápsula externa; (I-L) hipotálamo. (B) Control negativo omitiendo el anticuerpo secundario. (R) Se detectaron bacteriófagos en el cuerpo calloso del ratón (cc) y el hipotálamo (hy). (Q) Cuantificación de bacteriófagos en el parénquima cerebral por densidad óptica integral (IOD). Iv, ventrículo lateral; gl, glia limitans. La barra de escala en "B" se aplica a todas las micrografías. * $P < 0.005$ según lo calculado por la prueba t de Student.

El bacteriófago 933W aumentó la expresión de GFAP en astrocitos

Anteriormente, nuestro grupo de investigación demostró que las células de mamíferos pueden expresar Stx2 después de la transfección *in vivo* del plásmido procariota pStx2, lo que llevó a un aumento de GFAP en los astrocitos (Bentancor *et al.*, 2013).

En el trabajo de tesis presente, se evaluó si se observaba un aumento de GFAP a partir de bacteriófago 933W libre, luego de la inducción *in vivo* a partir de *E. coli* C600:933W y *E. coli* C600:933W:pr1. La expresión de GFAP fue significativamente mayor en la cápsula interna (Figura 37L) de ratones infectados con *E. coli* C600:933W 72 hs post-infección (Figuras 37G-I) en comparación con los ratones infectados con *E. coli* C600 (Figuras 37A-C) y *E. coli* C600:933W:pr1 (Figura 37D-F) ($13,63 \pm 2,209$ C600 vs. $62,77 \pm 9,102$ C600:933W AU en IOD, Figura 37K).

En el mismo sentido, los ratones infectados con *E. coli* C600:933W:pr1 no mostraron diferencia significativa de expresión de GFAP respecto a los controles infectados con *E. coli* C600. No se encontró inmunofluorescencia correspondiente a GFAP en los controles negativos donde se omitió el anticuerpo primario (Figura 37J).

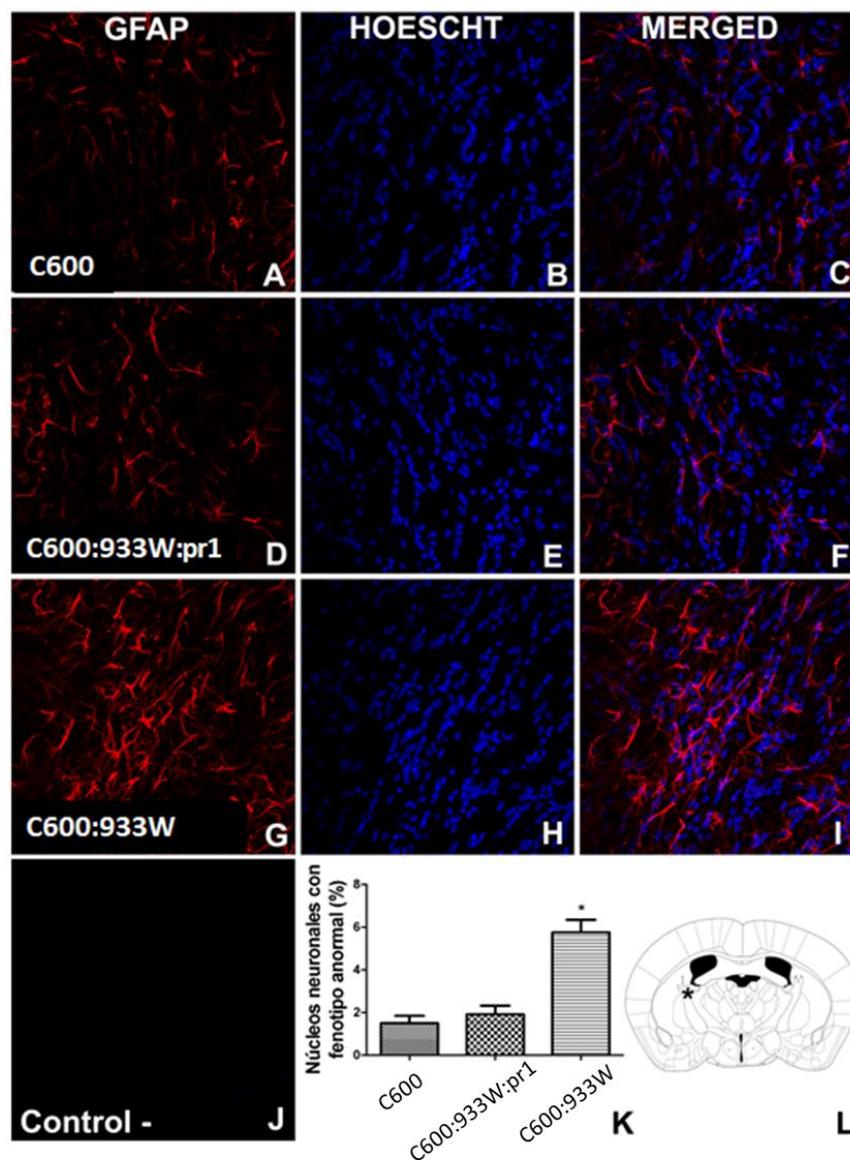


Figura 37. La expresión de GFAP aumentó en los astrocitos. (A-C) Sección del cerebro del ratón control infectado con *E. coli* C600. (D-F) Sección del cerebro del raton infectado con *E. coli* C600:933W:pr1. (G-I) Sección del cerebro del ratón infectado con *E. coli* C600:933W. (J) Control negativo omitiendo el anticuerpo secundario. (K) Expresión de GFAP medida por densidad óptica integral (IOD). (L) el área observada se encuentra en la cápsula interna del ratón (*). * P <0.005 según lo calculado por la prueba t de Student.

El bacteriófago 933W produjo daño neuronal

Previamente fue reportado que Stx2 induce toxicidad en las neuronas (Fujii *et al.*, 1994; Goldstein *et al.*, 2007). El marcador nuclear neuronal NeuN se usó para determinar si el bacteriófago 933W causa toxicidad en las neuronas. El criterio utilizado para identificar las neuronas dañadas fue la sub-localización celular ectópica de NeuN (Pinto *et al.*, 2013). Un patrón de inmunofluorescencia nuclear conservado y homogéneo para NeuN confirmó neuronas sanas en ratones control infectados con *E. coli* C600 (Figuras 38A-C) y *E. coli* C600:933W:pr1 (Figura 38D-F).

En contraste, se observó un importante patrón de inmunofluorescencia perinuclear o citoplásmica neurodegenerativa en ratones infectados con *E. coli* C600:933W (Figuras 38G-I) en comparación con las neuronas conservadas en ratones infectados con *E. coli* C600 ($1,53 \pm 0,42$ C600 vs. $5,68 \pm 0,66$ C600:933W, figura 38K). No se observó inmunofluorescencia correspondiente a NeuN en los controles negativos que omitieron el anticuerpo primario (Figura 38J).

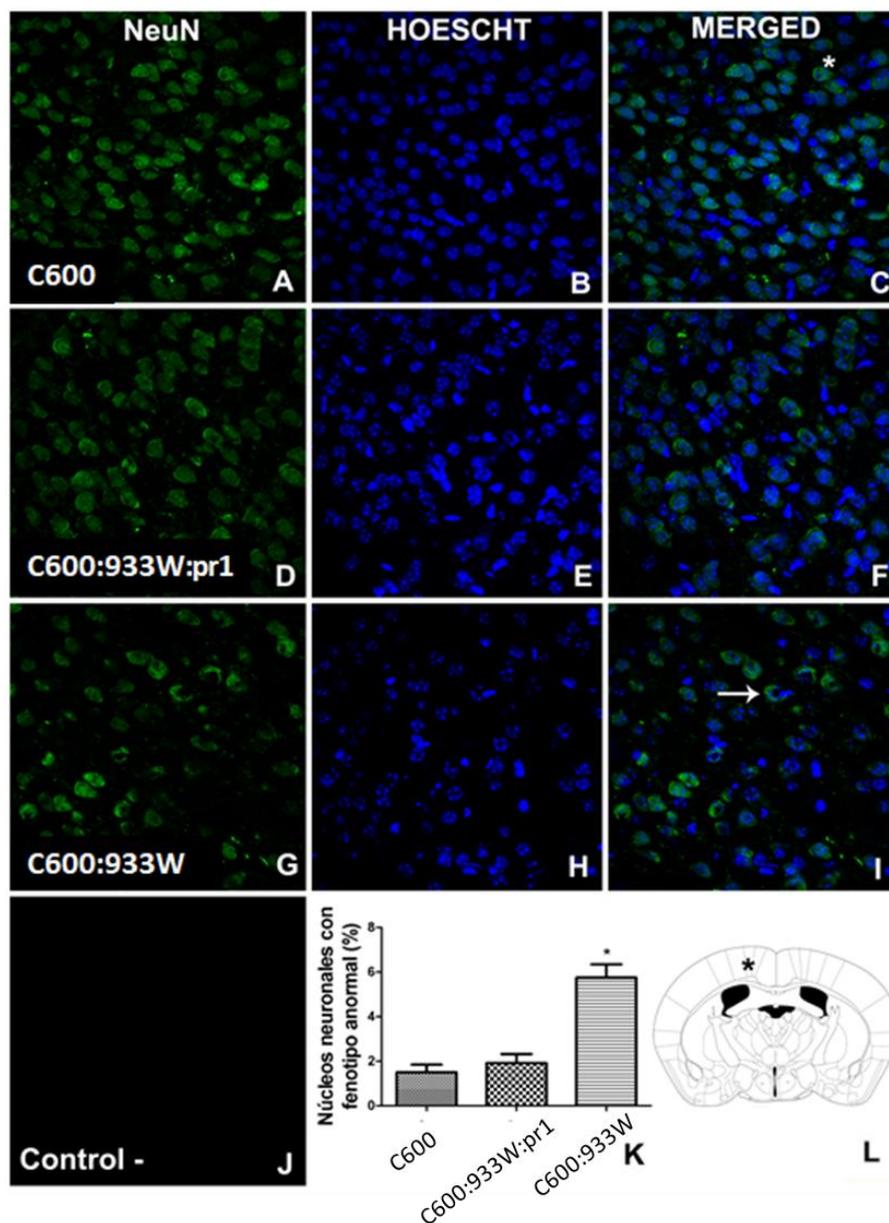


Figura 38. La infección por *E. coli* C600:933W produjo un patrón de daño NeuN en las neuronas del cerebro de ratón. (A–C) Sección del cerebro del ratón control infectado con *E. coli* C600. (D–F) Sección del cerebro de un ratón infectado con *E. coli* C600:933W:pr1. (G–I) Sección del cerebro de un ratón infectado con *E. coli* C600:933W. (J) Control negativo omitiendo el anticuerpo secundario. (K) La cuantificación de NeuN que muestra un aumento significativo en la cantidad de inmunolocalización celular anormal de NeuN en ratones tratados con *E. coli* C600:933W (flecha en I) en comparación con un patrón de inmunofluorescencia nuclear conservado y homogéneo en ratones tratados con *E. coli* C600 (asterisco en C). (L) El área observada se encuentra en la corteza motora del ratón (*). * $P < 0.005$ calculado por la prueba t de Student.

Estudio de la capacidad anti-bacteriofágica del Hidróxido de Bismuto in vivo

Una vez evaluada la capacidad del Hidróxido de Bismuto de inactivar la infección *in vitro*, se estudió la capacidad neutralizante *in vivo*.

A los ratones infectados con la cepa *E. coli* C600:933W se los trató con 10 mg ml⁻¹ raton⁻¹ de Hidróxido de Bismuto a las 4 y 24 horas post-inducción para evaluar la sobrevida y medir parámetros típicos del SUH.

Una vez estudiada la sobrevida y los parámetros típicos del SUH, se realizó otro ensayo suministrando 3 dosis, con el fin de optimizar las dosis necesarias para observar mayor protección a nivel histológico.

Estudio de sobrevida (2 dosis)

Se comenzó aplicando 2 dosis de Hidróxido de Bismuto post-infección.

En la figura 39A se puede observar que los ratones que recibieron el tratamiento con Hidróxido de Bismuto, tuvieron una sobrevida del 100% respecto a los no tratados, los cuales murieron a las 72hs post-infección.

Cabe destacar que el único ratón que sobrevivió sin tratamiento fue un ratón que había sido marcado por que la segunda dosis de antibióticos para inducir la escisión del bacteriófago no fue efectiva. A los ratones se les tomó muestra de sangre y se realizó una medición de urea plasmática como parámetro de daño renal. Tanto los ratones tratados con Hidróxido de Bismuto como el único ratón que sobrevivió de los no tratados, presentaron una medición de urea normal (Figura 39B).

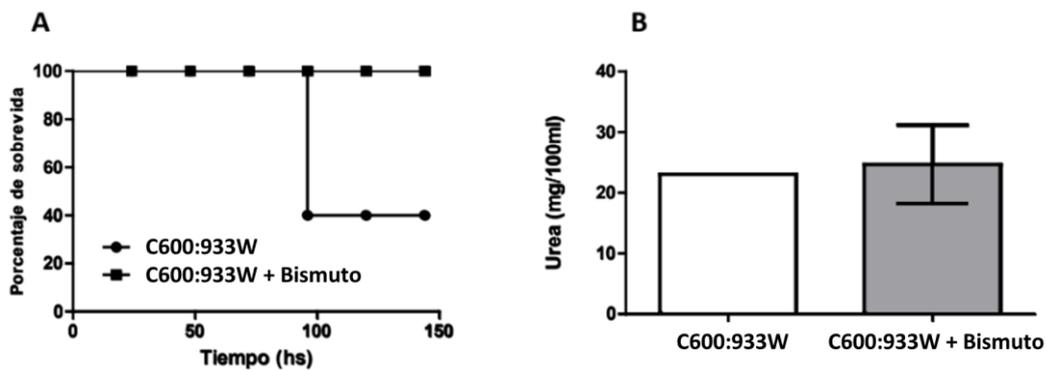


Figura 39. Estudio de capacidad anti-bacteriofágica del Hidróxido de Bismuto *in vivo*. (A) Sobrevivencia de los ratones tratados con Hidróxido de Bismuto vs. no tratados. **(B)** Urea plasmática como parámetro de daño renal.

Histología de intestino delgado y grueso

En la figura 40 se pueden observar las histologías del intestino delgado y del intestino grueso, de ratones no tratados y tratados.

Se observa que tanto el intestino delgado como el intestino grueso presentan mucosa adelgazada con vellosidades acortadas y flexuosas. El epitelio se observa con pronunciada disminución de células caliciformes y enterocitos de bordes irregulares. Además se observan paredes musculares adelgazadas (Figura 40A, C, E, G).

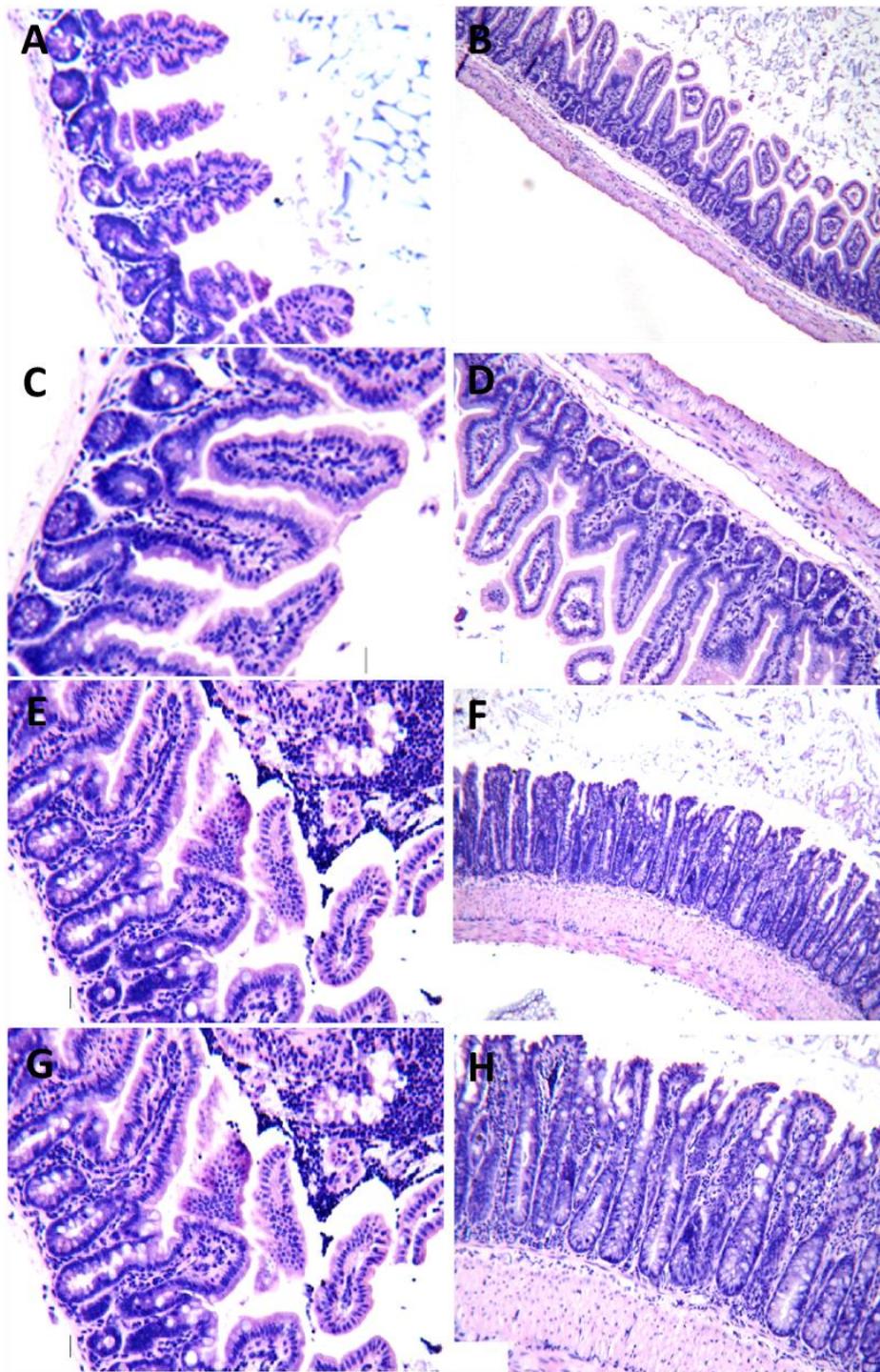


Figura 40. Intestino delgado e intestino grueso de ratones infectados con *E. coli* C600:933W. (A, C, E, G) Ratones sin tratar. (B, D, F, H) Ratones tratados con Hidróxido de Bismuto.

En los ratones tratados, tanto el intestino delgado como el grueso presentaron mucosa de espesor cuasi-normal y vellosidades alargadas y rectas. El epitelio presentó una disminución moderada de células caliciformes y enterocitos de bordes regulares. Además, las paredes musculares presentaron un espesor conservado.

Histología de riñón

En la figura 41 se pueden observar microscopías representativas de riñones de animales no tratados con Hidróxido de Bismuto (Figura 41A, C, E, G). Los mismos presentan glomérulos con tamaños y formas irregulares, retraídos con aumento relativo en las células mesangiales. El espacio de Bowman es mínimo o inexistente. Los glomérulos muestran zonas de adhesión entre las capa visceral y parietal de la cápsula de Bowman. Los capilares están ocupados por material amorfo ligeramente eosinófilo. Además, los túbulos proximales se observan dilatados y recubiertos por células epiteliales de citoplasma claro y bordes apicales difusos con protuberancia de los núcleos. Los túbulos distales dilatados muestran material fibrinoide adherido al borde apical y en ubicación intraluminal.

En la figura 41 se pueden observar microscopías representativas de riñones de animales tratados con Hidróxido de Bismuto (Figura 41 B, D, F, H). Los glomérulos se observan moderadamente retraídos con un aumento regular en el número de células mesangiales. El espacio de Bowman se muestra visible al microscopio con pequeñas zonas de adherencia entre las capas visceral y parietal de la cápsula de Bowman. Los túbulos distales se observan ligeramente dilatados y muestran, en algunos de ellos, un escaso material fibrinoide. Los capilares glomerulares están ocupados por material amorfo eosinófilo. Además, los túbulos proximales, levemente dilatados, se observan recubiertos por células epiteliales con citoplasma eosinófilo y bordes apicales conservados. El espacio de Bowman es microscópicamente visible sin zonas de adhesión y se observan capilares glomerulares permeables.

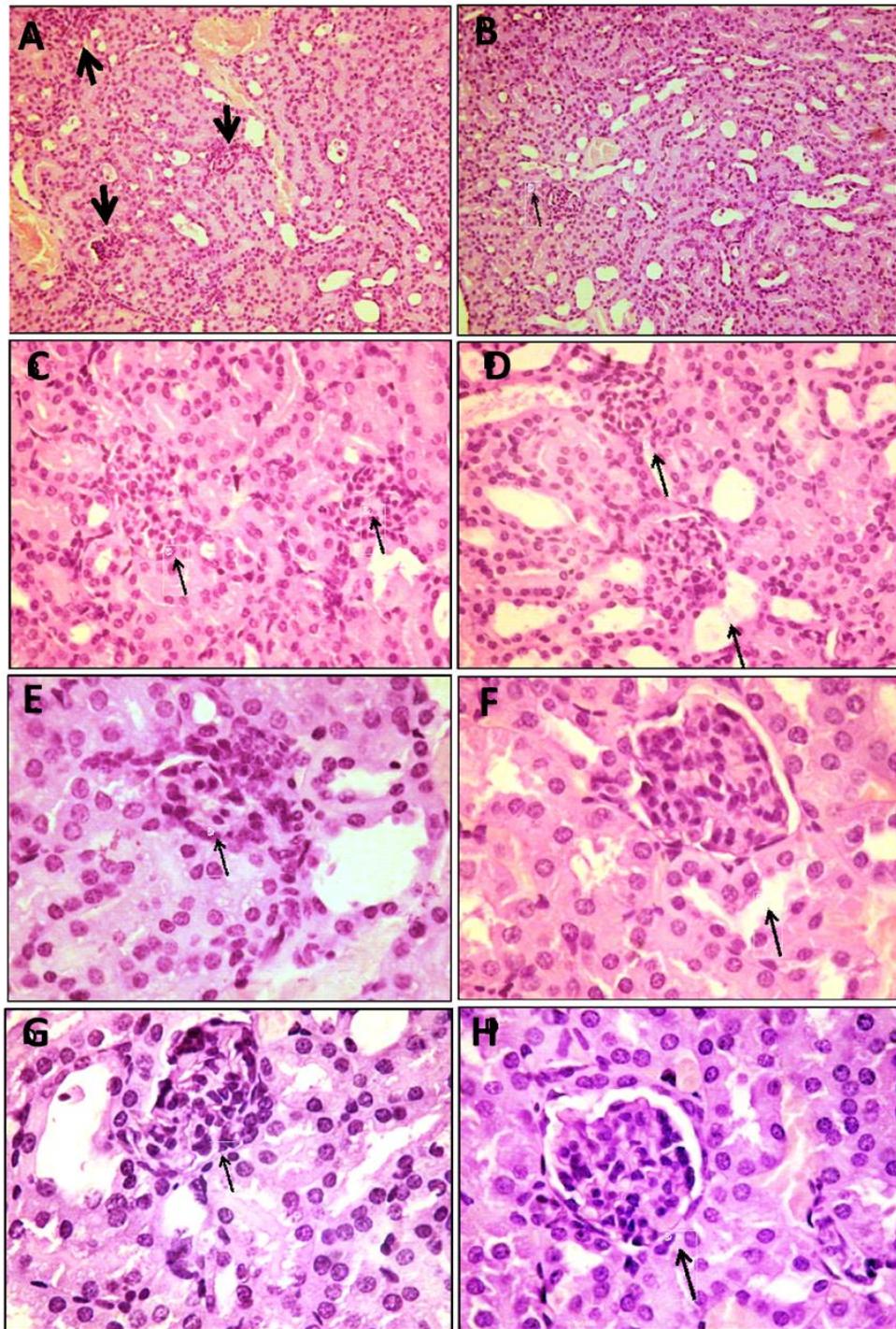


Figura 41. Riñón de ratones infectados con *E. coli* C600:933W. (A, C, E, G) Ratones sin tratar. (B, D, F, H) Ratones tratados con Hidróxido de Bismuto.

Estudio de sobrevida (3 dosis)

En este caso, se repitió el procedimiento del ensayo anterior, pero se agregó una dosis adicional de Hidróxido de Bismuto con el fin de evaluar si se mejoraba la protección a nivel histológico.

En la figura 42 se puede observar que los ratones tratados presentaron valores de urea normales respecto a los valores observados en los ratones no tratados.

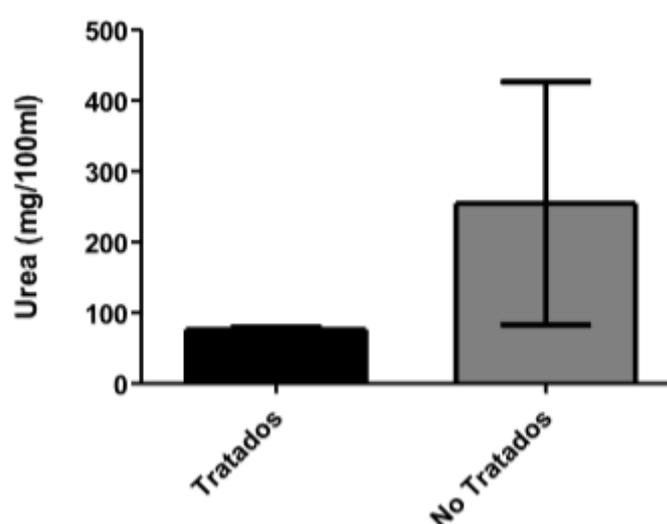


Figura 42. Urea plasmática como parámetro de daño renal. Se usó el software Prism 5.0 (software GraphPad) para determinar la significación estadística entre diferentes muestras mediante el análisis de varianza de una vía (ANOVA). Cada barra representa la media \pm SEM de 4–6 ratones por grupo.

Recuento celular en sangre

Se tomaron muestras de sangre de los ratones y se realizó el recuento sanguíneo utilizando el equipo Abacus Junior Vet (Diatron). Este análisis se realizó para determinar si hubo cambios en la neutrofilia.

Se observó una diferencia significativa en el porcentaje total de linfocitos y de granulocitos entre los ratones tratados y sin tratar (Figura 43).

El aumento en el nivel de neutrófilos circulantes es un marcador importante de la gravedad del SUH en humanos (Van Setten *et al.*, 1998; Fernandez *et al.*, 2007) y en varios modelos de ratones con SUH (Fernandez *et al.*, 2006; Keepers *et al.*, 2006).

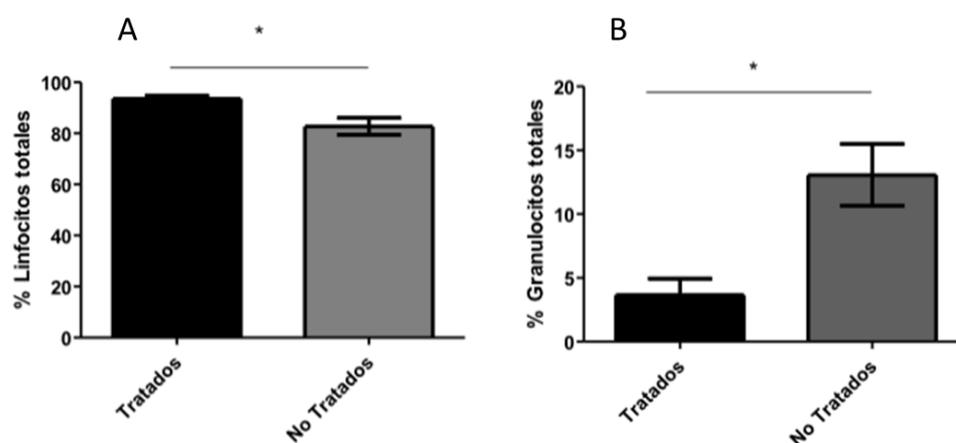


Figura 43. Recuento en sangre entera. (A) Porcentaje de linfocitos totales (B) Porcentaje de granulocitos totales. Se usó el software Prism 5.0 (software GraphPad). GR%, * $p= 0.0265$; LY%, * $p= 0.0370$.

Aunque no suele observarse una disminución de los linfocitos en pacientes con SUH, algunos estudios con modelos murinos del SUH también han informado una disminución después de la infección con Stx2 (Sauter *et al.*, 2008; Keepers *et al.*, 2007).

Histología de intestino delgado e intestino grueso

Los ratones fueron sacrificados a las 72 horas post infección para poder analizar los intestinos y riñones a nivel histológico.

En las figuras 44 y 45 se pueden observar la histología de intestino delgado e intestino grueso, respectivamente. En el grupo de ratones no tratados se observa que el intestino delgado y grueso presentan una mucosa adelgazada y vellosidades acortadas y flexuosas. El epitelio muestra una pronunciada

disminución de células caliciformes y enterocitos de bordes irregulares. Se observan, además, paredes musculares adelgazadas.

En la figura 44 y 45 (B, D, F, H) se pueden observar los cortes histológicos de intestino delgado y grueso de ratones tratados con Hidróxido de Bismuto.

Tanto el intestino delgado como el grueso presentaron mucosa de espesor cuasi-normal y vellosidades alargadas y rectas. El epitelio presentó una disminución moderada de células caliciformes y de enterocitos de bordes regulares. Además, las paredes musculares presentaron un espesor conservado.

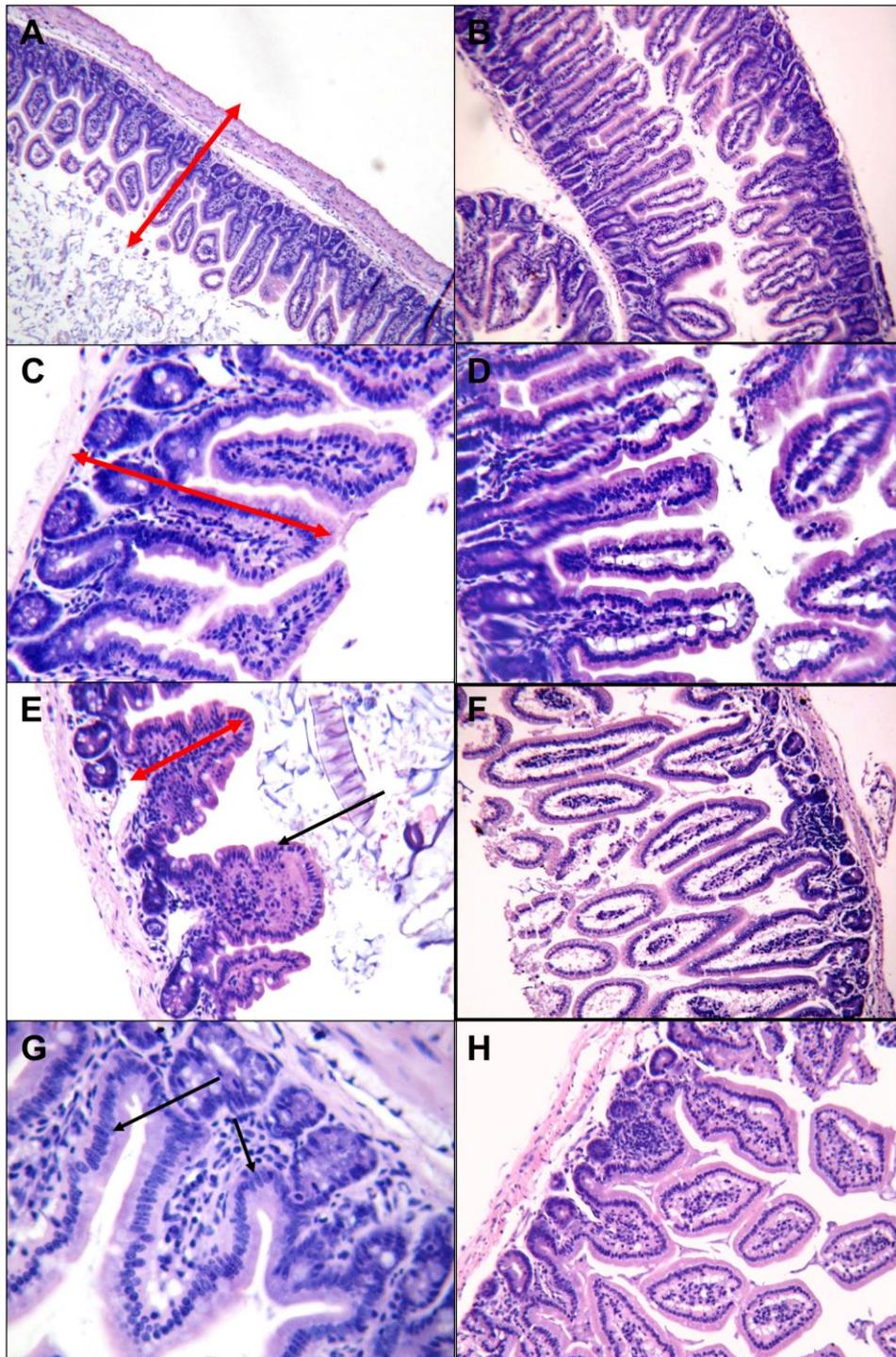


Figura 44. Intestino delgado de ratones infectados con *E. coli* C600:933W. **(A-C-E-G)** ratones sin tratar. **(B-D-F-H)** ratones tratados con Hidróxido de Bismuto post-infección. **(A)** Espesor de la pared disminuido (doble flecha roja). **(C-E)** Mucosa disminuida de espesor (doble flecha roja), con vellosidades irregulares en forma y tamaños. **(E-G)** Epitelio hipo y amuciparo (flecha negra).

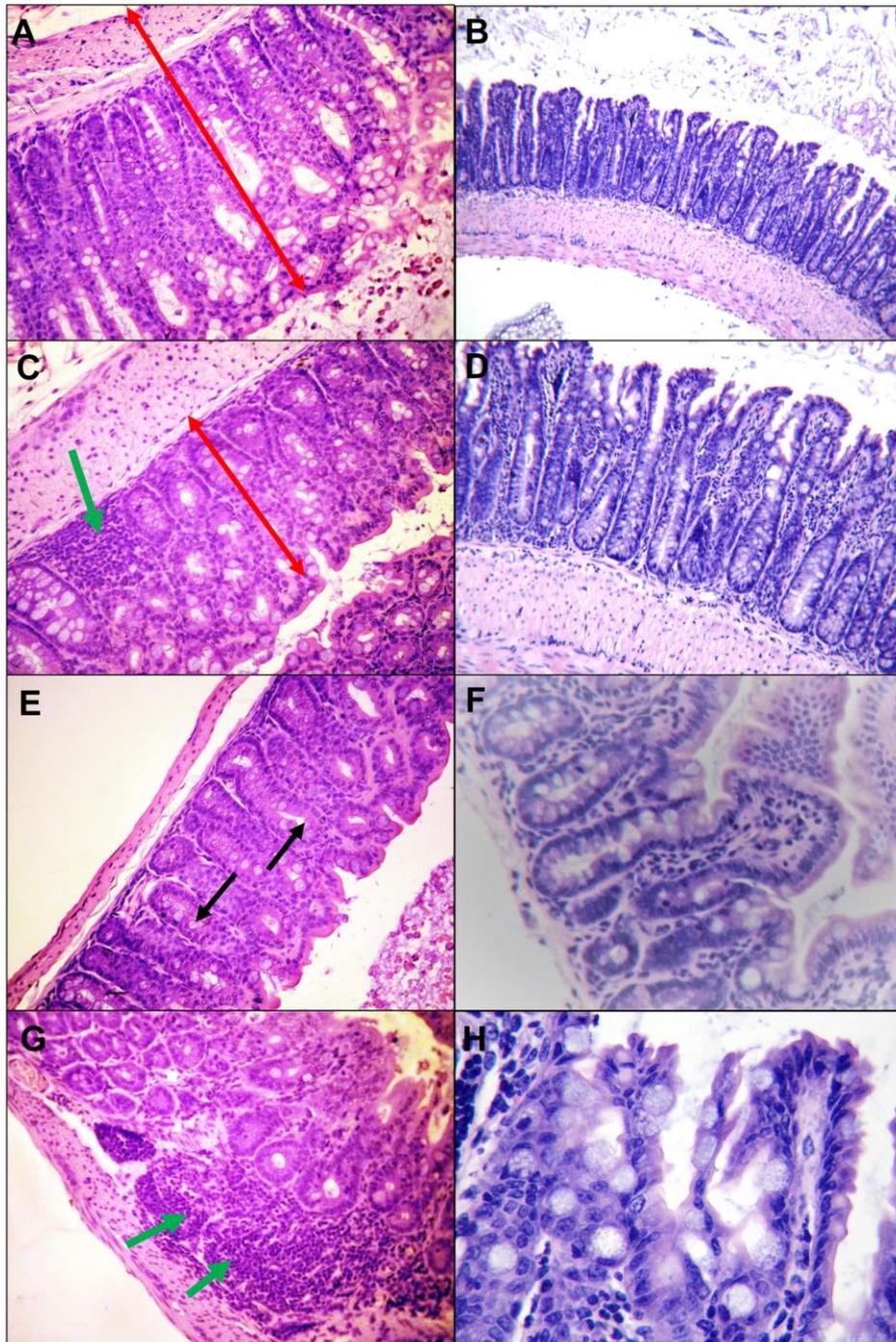


Figura 45. Intestino grueso de ratones infectados con *E. coli* C600:933W. (A, C, E, G) ratones que no fueron tratados con Hidróxido de Bismuto post-infección. **(B, D, F, H)** Ratones tratados. **(A)** Grosor total de la pared disminuido (doble flecha roja). **(B)** Mucosa disminuida de espesor (doble flecha roja), con vellosidades irregulares en forma y tamaños (figura 3.C, E, G.) Epitelio hipo y amucíparo (figura 3.E, G.). MALT (tejido linfoide asociado a las mucosas) evidente (figura 3.C.E.).

Histología de riñón

En la figura 46 se pueden observar microscopías representativas de los riñones de animales infectados con *E. coli* C600:933W y tratados con 3 dosis de Hidróxido de Bismuto y sin tratar. En los ratones sin tratar los glomérulos se observan moderadamente retraídos con un aumento regular en el número de células mesangiales (Figura 46A). El espacio de Bowman es visible al microscopio con pequeñas zonas de adherencia entre las capas visceral y parietal de la cápsula de Bowman (Figura 46C).

Los túbulos distales se observan ligeramente dilatados y muestran, en algunos de ellos, un escaso material fibrinoide. Los capilares glomerulares están ocupados por material amorfo eosinófilo (Figura 46C). Además, los túbulos proximales, levemente dilatados están recubiertos por células epiteliales con citoplasma eosinófilo y bordes apicales y conservados.

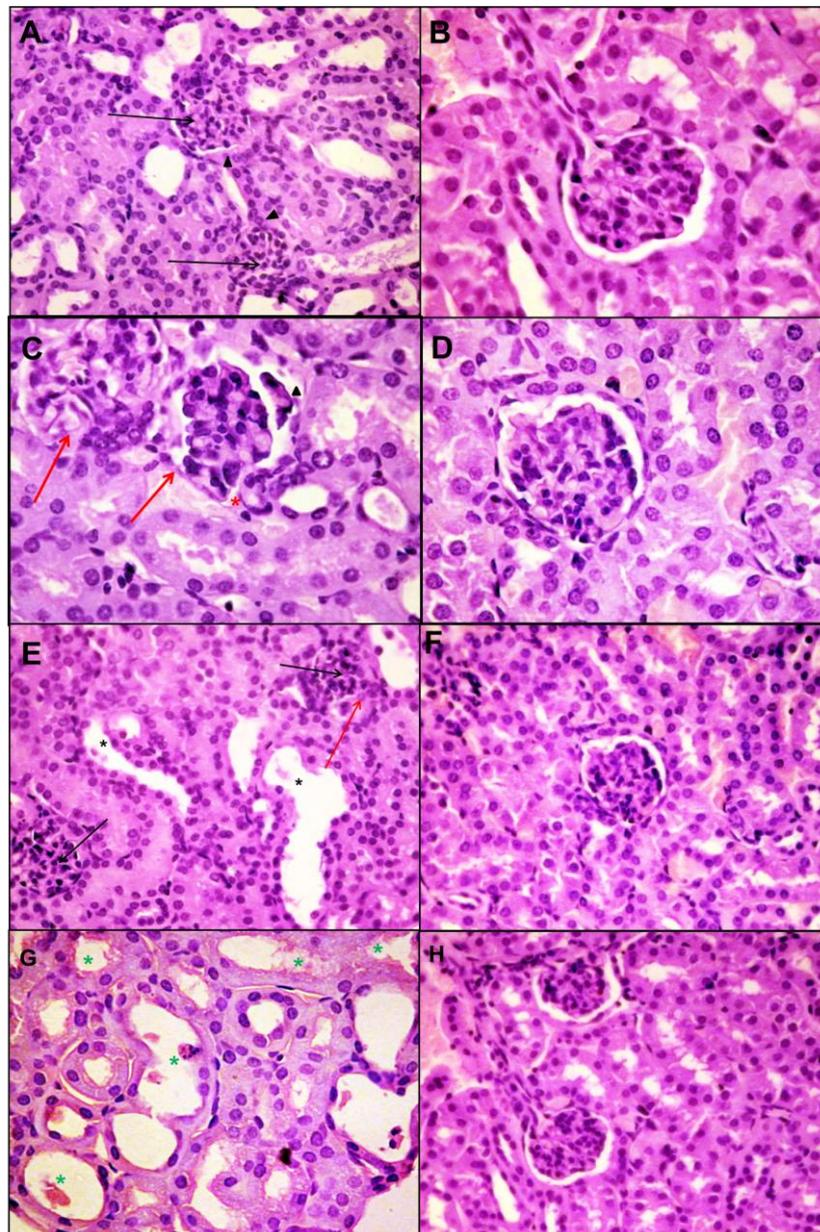


Figura 46. Efecto del Hidróxido de Bismuto en riñones de ratones infectados con *E. coli* C600:933W. (A-C-E-G) ratones sin tratar. (B-D-F-H) ratones tratados con Hidróxido de Bismuto. (A) Glomérulos (flecha negra), con tamaños y formas irregulares, retraídos con un aumento relativo de las células mesangiales. El espacio de Bowman (punta de flecha negra) es mínimo o inexistente. **(C)** Los glomérulos muestran zonas de adhesión (flecha rojo) entre las capa visceral y parietal de la cápsula de Bowman. Los capilares (asterisco rojo) están ocupados por material amorfo ligeramente eosinófilo. **(E)** Túbulos proximales dilatados (asterisco) revestidos por células epiteliales con citoplasma claro y bordes apicales difusos con protrusión de los núcleos. **(G)** Los túbulos distales muy dilatados muestran material fibrinoides (asterisco verde) adheridos al borde apical y con ubicación intraluminal.

Tanto los ratones tratados con 2 o 3 dosis de Hidróxido de Bismuto lograron contrarrestar los efectos presentes en el grupo control sin tratar. Los ratones tratados con 3 dosis presentaron características histológicas normales.

Análisis in silico de la tail fiber protein del bacteriófago 933W

El mecanismo por el cual el bacteriófago 933W ingresa a las células eucariotas es desconocido. En base a reportes sobre el bacteriófago lambda, uno de las hipótesis plantea que el bacteriófago podría ingresar a la célula eucariota mediante unión a integrinas.

El ingreso de diversos virus a las células eucariotas mediante unión a integrinas se basa en la interacción con motivos RGD y RGE presentes en las partículas virales.

Basados en estos antecedentes, se realizaron análisis de las secuencias proteicas del bacteriófago 933W y se detectaron dos motivos RGD y diez motivos RGE en la *tail fiber protein* (Figura 47).

```

MSVVVSGTLKSPDGEAISGANITLTALTVSPDALSGTSASAVTREGGYGTMMDPGEYAVSVT
VKGKTAVYGRVRIEGTESTVTNLNMLLRSLVEVSIPGELLDFRQIQNNVADDLATIRRLNEDTA
TKNTQATQSKESAAASAKSASDSAKTATSRAAEAGQKATDATEAATRAVTAAGNAEESSTRA
GESEKAAGADA EKARQHA EKARLAQESAGEILKRAEAATVSAEEARRMAENARGPRGPQGE
TGPKGDVGP KGETGPVGPQGPAGPKGERGDVGAQGA VGPAGPRGEKGEQGERGPQGIPG
LKGDTGERGPKGDQGDMPKGEKGDPPGAGPQGP KGERGEAGPQGP MGARGERGETG
PRGEPGPAGPRGERGETGPQGP RGE PGPAGSAANVADATTAQKGIVQLSSATDSDDETKAA
TPKAVKAAMDVANEAKTAEAAAAGGGVPGPKGDKGDTGPAGPAGPKGDKGERGDTGPV
GATGERGPAGDAGPAGPQGP KGD RGERGETGLTGNAGPQGP KGD TGAAGPAGPQGP KGE
TGAAGPVGATGPQGP KGD PGETQIRFRLGPGNIIETNSHGWF PDTDGALITGLTFLDPKDAT
RVQGGFFQHLQVRF GDGPWQDVKGLDEVGSDTGRTGE

```

Figura 47. Motivos RGD y RGE de la tail fiber protein. Motivos RGD subrayados en amarillo. Motivos RGE subrayados en azul.

Se realizó la predicción de exposición de estos motivos con el objetivo de evaluar la posibilidad teórica de interactuar con integrinas. En la figura 48 se puede

observar que los motivos RGD y RGE se encuentran expuestos, lo cual indicaría que la interacción hipotetizada sería factible.

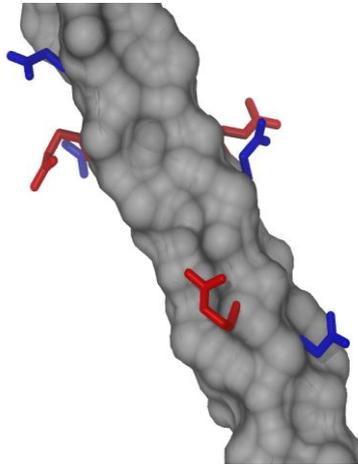


Figura 48. Análisis *in silico* de la *tail fiber protein* del bacteriófago 933W. Usando modeller se obtuvo el modelo de la estructura colagenoide que sería trimérica. Exposición de los residuos: en Rojo ARG(R) y en azul GLU(E).

Análisis de la presencia de integrinas en células eucariotas

Una vez detectados los motivos RGD y RGE que podrían interaccionar con las integrinas de tipo $\alpha 5\beta 3$ (Matilainen *et al.*, 2016) se analizó qué tipo de línea celular podíamos seleccionar para evaluar la hipótesis de que el bacteriófago podría ingresar a la célula eucariota por medio de unión a integrinas.

Se seleccionaron las líneas celulares Vero, K562 y MiaPaca2 para estudiar la presencia respectiva de integrina $\alpha 5\beta 3$ en superficie, mediante análisis por citometría de flujo.

Un 100% de las células Vero fueron positivas para la integrina $\alpha 5\beta 3$ en superficie (Figura 49). Por esta razón y por ser susceptibles a la toxina Stx2, ésta línea celular se utilizó como modelo de internalización por unión a integrinas del bacteriófago 933W en las células eucariotas.

Por otro lado, en las células K562 y MiaPaca2 se obtuvo un 7,6 y 1,1% de marca positiva para la integrina $\alpha 5\beta 3$ (Figura 49) respectivamente.

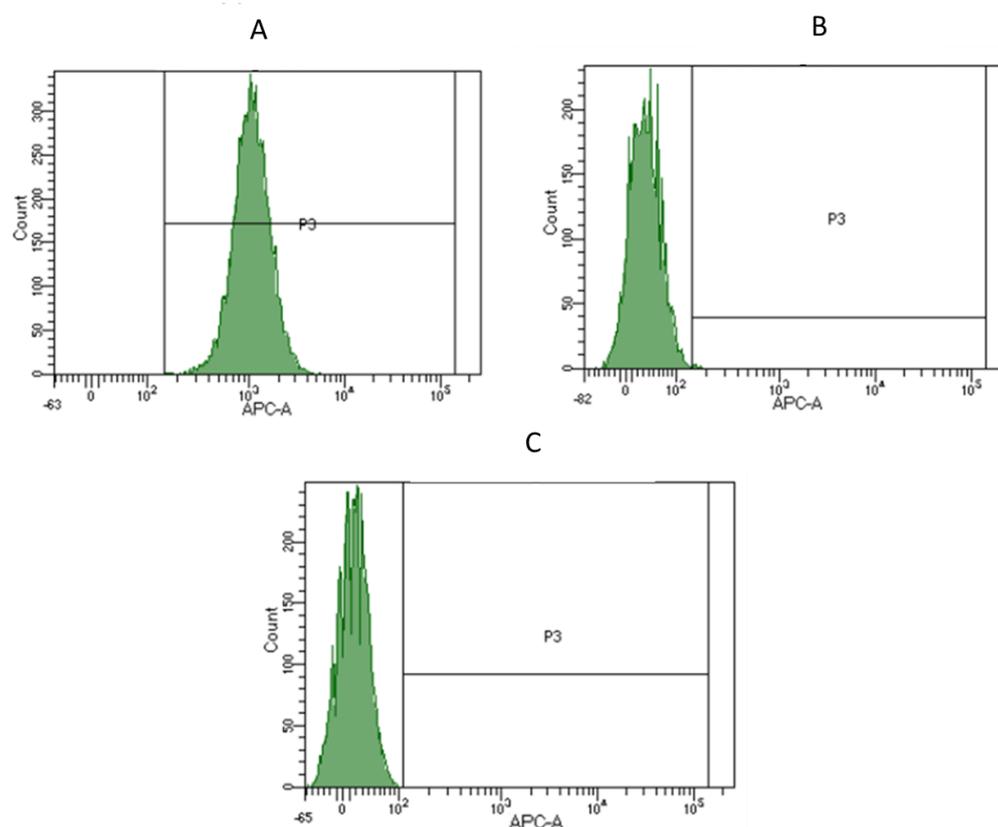


Figura 49. Detección de integrina $\alpha 5\beta 3$ en la superficie celular. Análisis de citometría de flujo de cultivos de células (A) Vero, (B) MiaPaca2 y (C) K562 marcadas con anticuerpos monoclonales anti-integrina $\alpha 5\beta 3$ y anticuerpos anti-IgG conjugados con Alexa fluor 488.

Ensayo de adhesión e internalización

Mediante Marcación con anticuerpos

Una vez comprobada la presencia diferencial de integrinas en la superficie de las células Vero y K562, se decidió evaluar la adhesión e internalización del bacteriófago en las mismas. Para ello se realizaron ensayos de citometría de flujo, en el laboratorio de desarrollo de vacunas de la Universidad de San Pablo (USP,

Brasil), donde se incubaron células Vero y K562 con el bacteriófago 933W durante 30 minutos, 1 y 2 horas.

La adhesión e internalización fueron analizadas utilizando anticuerpos policlonales anti-bacteriófago. Para evaluar la adhesión, el anticuerpo secundario utilizado estuvo conjugado al fluoróforo Alexa fluor 488, mientras que para la internalización se utilizó un anticuerpo secundario conjugado a Alexa fluor 660.

Los resultados obtenidos evidenciaron adhesión e internalización del bacteriófago 933W en células Vero, positivas para la integrina $\alpha 5\beta 3$ (Figura 50).

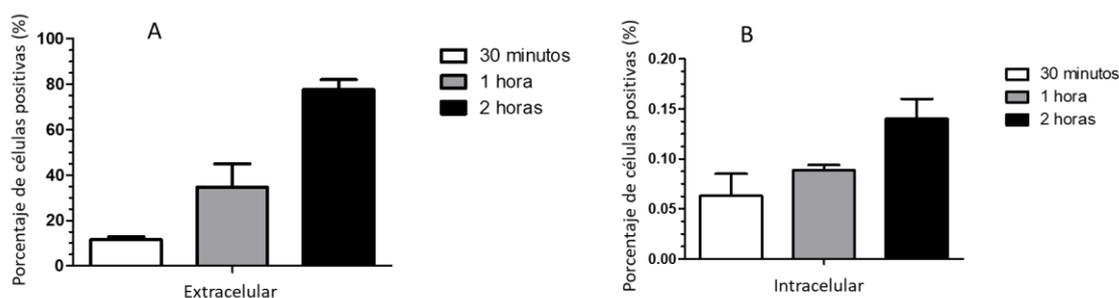


Figura 50. Adhesión e internalización del bacteriófago 933W en células Vero. (A) Adhesión. Anticuerpos policlonales anti-bacteriófago y anticuerpos anti-IgG conjugados con Alexa fluor 488 fueron utilizados. **(B) Internalización.** Anticuerpos policlonales anti-bacteriófago y anticuerpos anti-IgG conjugados con Alexa fluor 660 fueron utilizados. Todas las muestras fueron analizadas por citometría de flujo utilizando el equipo BD Fortessa. Los resultados fueron analizados con FlowJoV10.

Por otro lado, se observó una disminución del 90% en la adhesión e internalización del bacteriófago sobre células K562, las cuales solo un 7,6% de las mismas fueron positivas para la integrina $\alpha 5\beta 3$ (Figura 51).

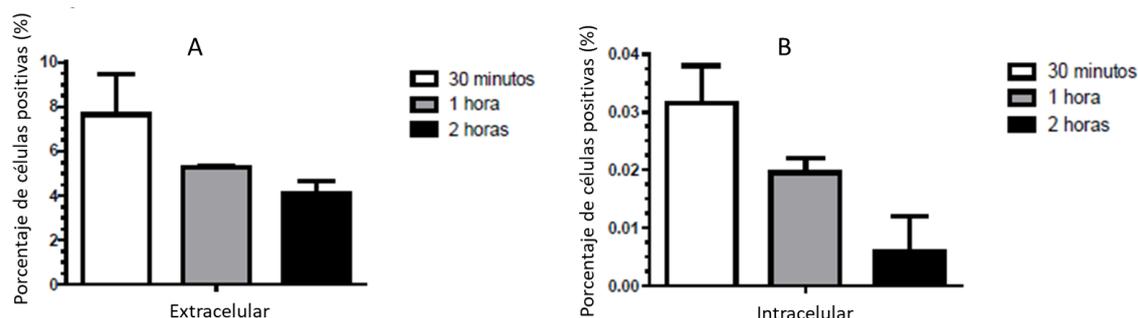


Figura 51. Adhesión e internalización del bacteriófago en células K562. (A) Adhesión. Anticuerpos policlonales anti-bacteriófago y anticuerpos anti-IgG conjugados con Alexa fluor 488 fueron utilizados. **(B) Internalización.** Anticuerpos policlonales anti-bacteriófago y anticuerpos anti-IgG conjugados con Alexa fluor 660 fueron utilizados. Todas las muestras fueron analizadas por citometría de flujo utilizando el equipo BD Fortessa. Los resultados fueron analizados con FlowJoV10.

Mediante marcación del bacteriófago 933W con Sybr Gold

Estos ensayos preliminares se continuaron en Argentina. Se realizaron ensayos con los bacteriófagos marcados con sybr gold (Invitrogen), para no tener que usar la doble marcación con anticuerpos secundarios donde encontrábamos cierta variabilidad. En este caso, la internalización del bacteriófago en células eucariotas, se evaluó mediante la detección de fluorescencia a 537 nm en ensayos de citometría de flujo y microscopía confocal.

Se realizaron ensayos en células Vero y MiaPaca2 teniendo en cuenta la diferencia en el porcentaje de integrinas en superficie que presentan ambas líneas celulares.

Se observó internalización de bacteriófagos a los 30 minutos a MOI de 0,5 y 0,1 (Figura 52).

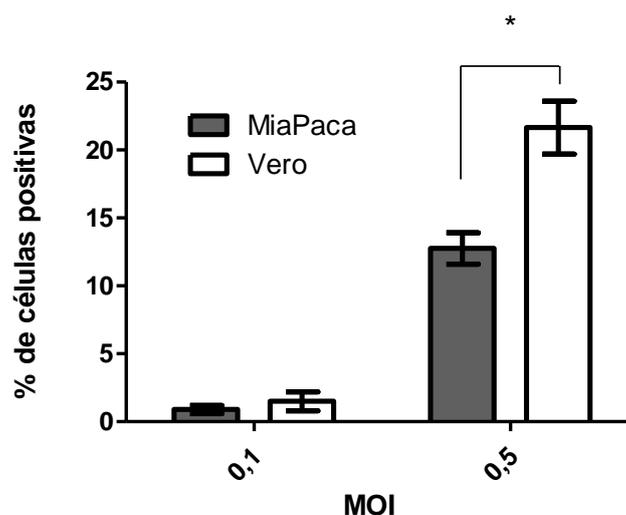


Figura 52. Internalización del bacteriófago 933W en células Vero y MiaPaca2. Se utilizó el Prism 5.0 software (GraphPad Software) para analizar la significancia entre muestras. * $p < 0.0007$.

Si bien se detectó una tendencia mayor de las células positivas Vero sobre MiaPaca2, las diferencias, a $MOI=0,1$, no fueron significativas. Sin embargo, cuando miramos a la $MOI=0,5$ la diferencia de internalización entre células Vero y MiaPaca2 resultó significativa.

A partir de estos resultados se continuó con los ensayos utilizando células Vero y una $MOI=0,5$.

Con el fin de evaluar la especificidad de la marca, en la figura 53 se muestran los histogramas de las células Vero incubadas con el bacteriófago 933W y el control negativo. De esta manera confirmamos que la señal positiva fue debido al ingreso del bacteriófago y no por marcación con sybr gold libre en el medio, que pudo haber quedado excedente luego del protocolo de marcación, ver “Materiales y Métodos”, “Marcación del bacteriófago”.

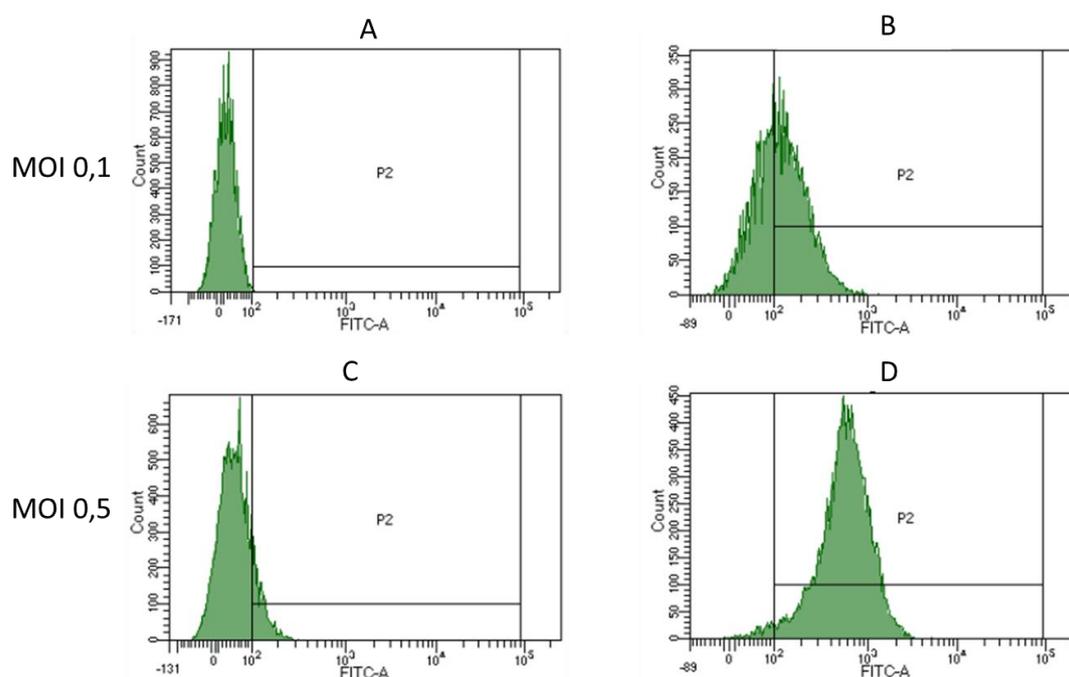


Figura 53. Internalización del Bacteriófago 933W en células Vero. (A-C) Histogramas representativos. En **A y B** se muestran los histogramas de células vero control, incubadas con el sobrenadante de la inducción de una cepa C600 control (sin bacteriófago) y de células con el bacteriófago 933W respectivamente. En **C y D** se representa lo mismo que en **(A-B)** pero con una MOI 5 veces mayor. **(C)** control.

Las diferencias observadas entre Vero y MiaPaca podrían atribuirse a la presencia diferencial de integrinas $\alpha 5 \beta 3$ en superficie. A mayor MOI, las diferencias en el ingreso fueron significativas.

A MOI=0,1 no se vieron diferencias significativas entre las distintas líneas celulares. Esto podría explicarse debido a que el número de bacteriófagos presentes en solución es limitante para la internalización por medio de integrinas. Se vió que el porcentaje de células MiaPaca2 positivas para el ingreso del bacteriofago es de un 1%, el mismo que el de población positiva para integrinas.

Ensayos de microscopia confocal

De manera complementaria a los ensayos realizados por citometría de flujo, se llevaron a cabo pruebas con microscopía confocal. En este caso, el bacteriófago fue incubado con las células adheridas y se tomaron imágenes a tiempo 0, 10 minutos, 30 minutos y 1 hora (Figura 54).

La presencia de bacteriófagos dentro de las células aumentó con el paso del tiempo, observándose mayor ingreso a 1 hora. (Figura 54).

Adicionalmente, se realizó un seguimiento *in vivo* (*time laps*) de las células incubadas con el bacteriófago 933W durante 5 horas. Se puede observar, en la figura 55, (sobre el recuadro amarillo) el seguimiento de partículas bacteriofágicas internalizándose en las células Vero. En este ensayo se utilizó el marcador Vybrant™ Dil Cell-Labeling Solution, el cual marca de color rojo el citoplasma de las células, Hoechst 33342 para el núcleo (color azul) y el bacteriófago se observa verde (Sybr Gold).

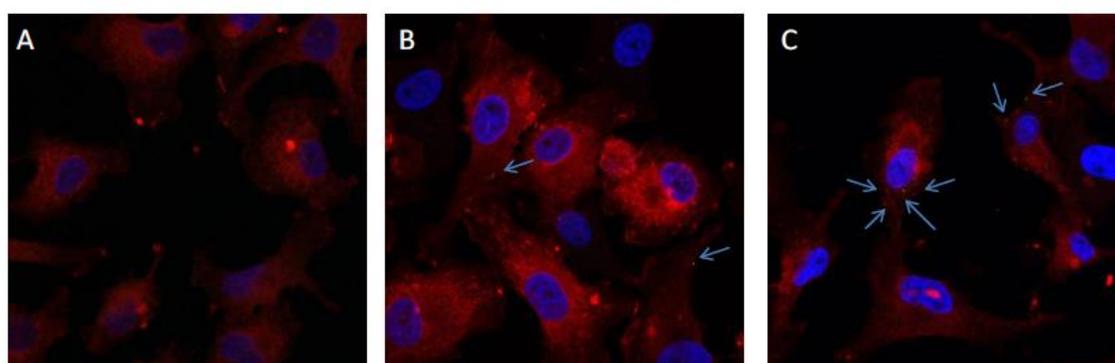


Figura 54. Internalización del bacteriófago 933W en Células Vero fijadas. (A) Células control sin bacteriófago; **(B)** Células incubadas con el bacteriófago 933W (30 minutos); **(C)** Células incubadas con el bacteriófago 933W (1 hora). Aumento: 1000X.

Los resultados obtenidos mediante microscopia confocal condice con los descritos en los ensayos de citometría confocal.

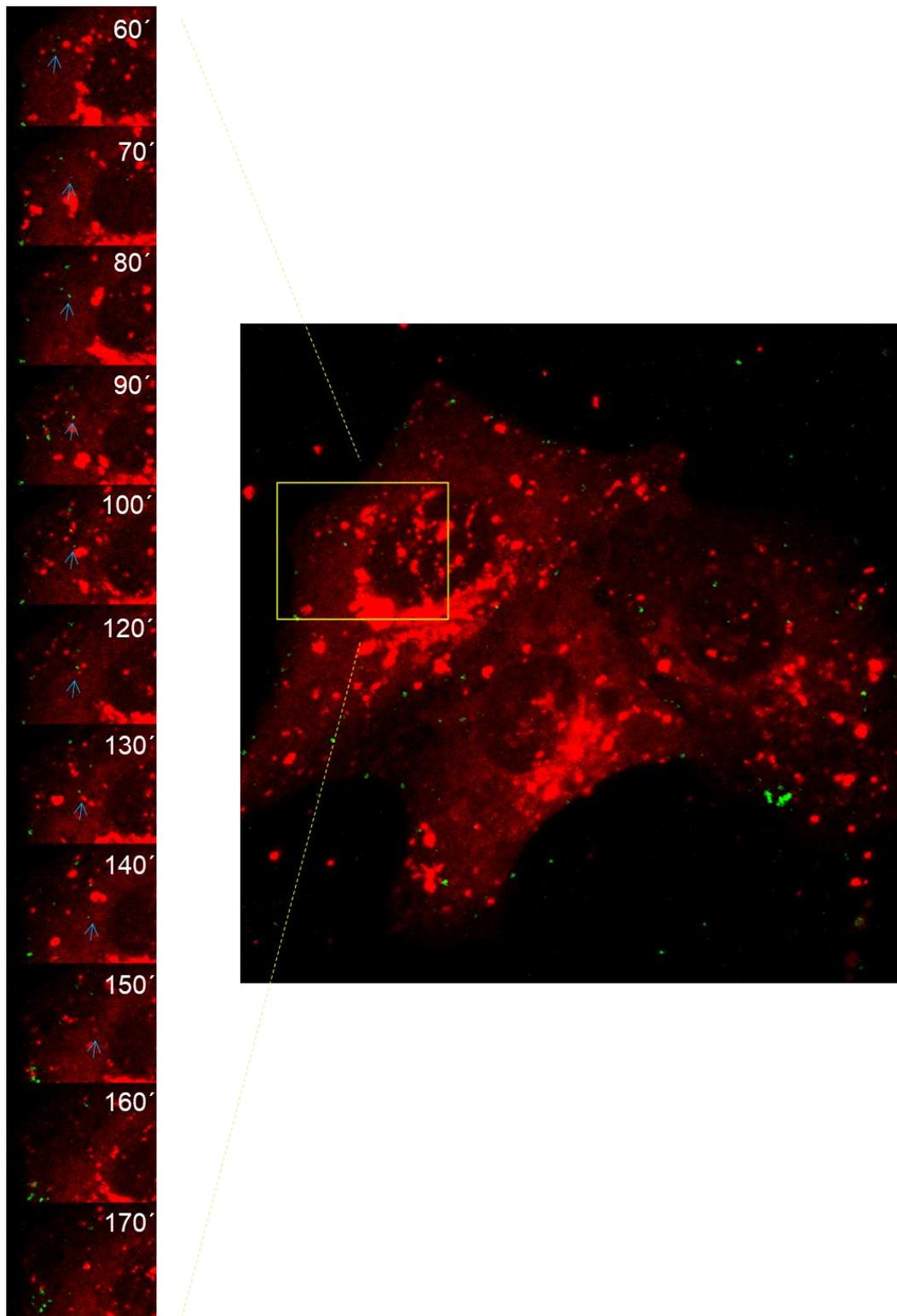


Figura 55. Ingreso del bacteriófago 933W a célula Vero. En la izquierda se encuentra el *time laps* (minutos) de la zona remarcada en amarillo. La flecha azul señala la partícula bacteriófágica en su ingreso a la célula.

Estudio de la actividad anti-bacteriofágica en cultivo celular

Hidróxido de Bismuto

Basados en los ensayos donde se observó internalización del bacteriófago 933W en células eucariotas, utilizamos esta misma metodología para evaluar si el Hidróxido de Bismuto disminuía su internalización.

Se comenzó evaluando 2 concentraciones de Hidróxido de Bismuto, 1 y 5 mg ml⁻¹ (Figura 56). Se pudo observar que cuando las células se pre-incubaron con 5 mg ml⁻¹, la neutralización fue total.

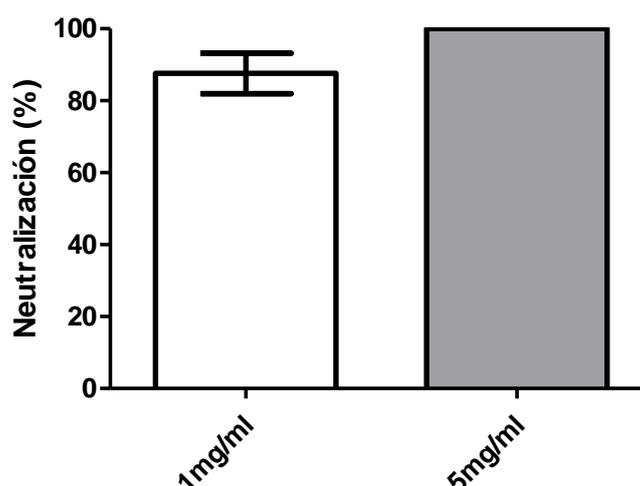


Figura 56. Neutralización del ingreso del bacteriófago con distintas concentraciones de Hidróxido de Bismuto. Se utilizó el Prism 5.0 software (GraphPad Software) para analizar la significancia entre muestras. ns.

A partir de estos resultados, se continuó con los ensayos utilizando 5 mg ml⁻¹ y se estudió el porcentaje de células positivas para la marca del bacteriófago 933W, lo cual representa su internalización.

En la figura 57, se observa una disminución significativa en la internalización al utilizar Hidróxido de Bismuto, respecto al control positivo. Además no se observó marcación en el control negativo (células + Hidróxido de Bismuto).

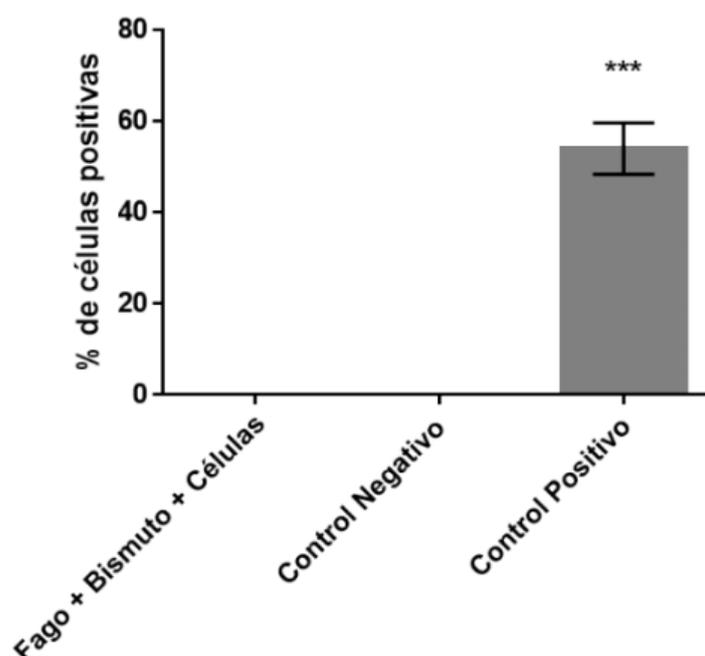


Figura 57. Porcentaje de células positivas para el ingreso del bacteriófago 933W. Análisis estadístico. Se utilizó el Prism 5.0 software (GraphPad Software) para analizar la significancia entre muestras. *** $p < 0.0007$.

Internalización del bacteriófago 933W mediante unión a Integrinas

A partir del análisis donde observamos que la *tail protein* del bacteriófago 933W tiene motivos RGD, se estudió la internalización del bacteriófago 933W en células Vero previamente tratadas con RGD. Las muestras se analizaron mediante citometría de flujo.

Las células incubadas con 0,5 y 0,05 mM de RGD, lavadas y sin lavar, internalizaron entre un 20 y un 40 % más bacteriófago en comparación con el control sin RGD (Figura 58).

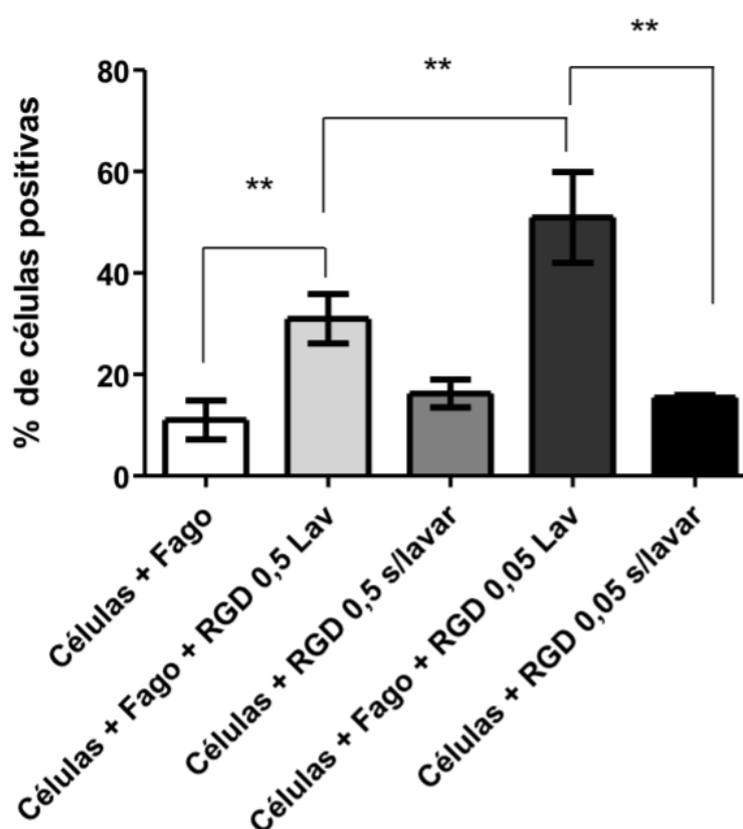


Figura 58. Porcentaje de células positivas para el ingreso del bacteriófago Análisis estadístico. Se utilizó el Prism 5.0 software (GraphPad Software) para analizar la significancia entre muestras. $**p < 0.0007$.

La internalización en las células pre-incubadas con RGD es significativamente mayor en comparación con las células sin RGD.

Al mismo tiempo se sumaron tratamientos lavando y sin lavar el RGD, luego de la pre-incubación con las células, con el fin de estudiar cómo afecta la presencia o ausencia del mismo al momento de incubar las muestras de células pre-incubadas con el bacteriófago 933W.

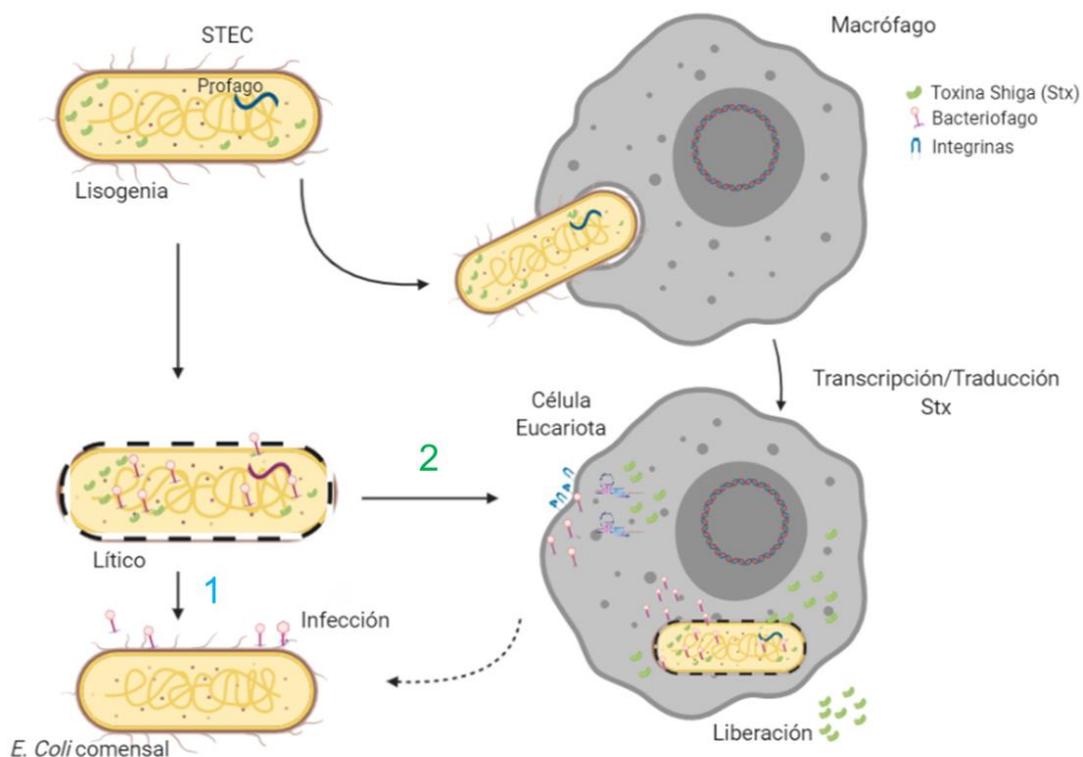
Se encontró que efectivamente existen diferencias significativas entre estos tratamientos. Tanto para 0,5 y 0,05 mM de RGD la internalización aumentó en las muestras lavadas con respecto a las no lavadas.

El RGD estaría teniendo un efecto promotor de la internalización promoviendo interacciones de los bacteriófagos con los receptores celulares.

Discusión

A partir de la hipótesis planteada (Esquema 4) y los resultados descritos durante el desarrollo de este trabajo, se pueden discutir los siguientes puntos centrales:

- 1) Bacteriófago como trarget terapéutico
- 2) Internalización en células eucariotas



Esquema 4. Modelo de la hipótesis planteada. Durante infecciones con STEC se produce la inducción del bacteriófago. Este es capaz de infectar otras cepas bacterianas presentes en el intestino y producir más bacteriófagos y toxina Stx. (1) Es en este punto donde deben pensarse nuevas terapias que contemplen al bacteriófago como *target* principal. (2) Además, durante el ciclo lítico, el bacteriófago, podría estar siendo internalizado en células eucariotas a través de diversos mecanismos, entre ellos mediante interacciones RGD-integrinas, donde la maquinaria eucariota sea capaz de reconocer promotores putativos eucariotas y producir toxina biológicamente activa.

Las cepas de *E. coli* productoras de toxina Stx han sido reconocidas durante mucho tiempo como la causa principal del desarrollo del SUH (Richardson *et al.*, 1988; Karmali, 1989). Más recientemente, se descubrió que la inducción de bacteriófagos que codifican Stx presentes en el genoma de STEC es indispensable para el desarrollo del SUH (Tyler *et al.*, 2013). Además, también se informó que el bacteriófago podía infectar bacterias *in vivo* e *in vitro* (Schmidt, 2001; Cornick *et al.*, 2006).

En este trabajo se probaron distintos compuestos como potenciales inhibidores de la infección del bacteriófago *in vitro*. Esto es debido a que hemos observado previamente una disminución significativa de la expresión de GFP *in vivo* en ratones tratados con quitosan después de la infección con una cepa de *E. coli* no patógena que contiene un bacteriófago mutante en el cual el gen *stx* fue reemplazado por la secuencia *gfp* (Amorim *et al.*, 2014). Esta disminución de la fluorescencia *in vivo* muestra la capacidad del quitosan de inactivar la infección del bacteriófagos en bacterias, tanto *in vitro* como *in vivo*, disminuyendo la potencial expresión y liberación de Stx.

Debido a que no fue demostrado el mecanismo por el cual el quitosan inactiva a los bacteriófagos, pero teniendo conocimiento de la carga catiónica neta del mismo, se optó por analizar un grupo de péptidos catiónicos como agentes antibacteriofágicos. En este trabajo, y por primera vez reportado, observamos que siete cAMPs pudieron inactivar la capacidad del bacteriófago de infectar bacterias susceptibles. Cabe mencionar que en trabajos anteriores se observó que todos los péptidos, excepto el péptido *random*, mostraron actividad antimicrobiana (Facone *et al.*, 2014; Hollmann *et al.*, 2016; Maturana *et al.*, 2017). A pesar de que ambas son secuencias catiónicas, el péptido Omiganan y *random* no mostraron inactivación del bacteriófago. Con respecto a la estructura, a diferencia del resto de las secuencias probadas, estos dos péptidos no se estructuran como alfa hélices en contacto con las membranas lipídicas (Facone *et al.*, 2014).

Es interesante observar que para los péptidos 2 y 6.2 observamos un comportamiento en forma de curva de campana de la actividad neutralizadora del bacteriófago frente a la curva de concentración. Este tipo de comportamiento es común entre algunas drogas. En este caso postulamos que la tendencia a generar agregados, que tienen estos péptidos a altas dosis, debido a la gran cantidad de aminoácidos hidrofóbicos que albergan, podría ser responsable de este fenómeno. Esta tendencia a agregarse, que depende de la composición de aminoácidos y la estructura que muestra la secuencia de péptidos, es probablemente responsable de la inactivación del péptido a medida que aumentamos la concentración y se forman más agregados.

El resultado obtenido confirmó una interacción electrostática entre péptido y bacteriófago. Sin embargo, el Omiganan, que no mostró actividad de inactivación, también mostró interacción directa con el bacteriófago.

Estos hallazgos nos permiten plantear la hipótesis de que las propiedades catiónicas, probablemente responsables de la interacción entre péptidos y bacteriófagos, son necesarias pero no suficientes para lograr una actividad de inactivación.

En general, nuestros resultados nos llevan a plantear la hipótesis de que la interacción específica entre los cAMPs y las proteínas del bacteriófago, después de una primera interacción impulsada por fuerzas electrostáticas, podría ser responsable de la inhibición de la infección.

Hipotetizamos que el complejo generado después de la incubación bacteriófago-péptido podría ser responsable de prevenir la adhesión del bacteriófago en la pared celular bacteriana. Deben realizarse más experimentos para analizar las proteínas del bacteriófago implicadas en la adhesión bacteriana que estarían interactuando con los péptidos.

Con el objetivo de contar con una terapia para disminuir el riesgo de desarrollo del SUH, la inactivación de bacteriófagos por cAMPs podría ser una nueva estrategia prometedora para la inhibición de la replicación de bacteriófagos y la expresión de Stx.

En conjunto, estos resultados destacan que los péptidos catiónicos son candidatos potenciales para futuras investigaciones en tratamientos alternativos para las infecciones por STEC.

Otro compuesto evaluado fue el Hidróxido de Bismuto. Como resultado de la actividad antidiarreica exhibida por el Hidroxido de Bismuto en el tratamiento de diversas patologías asociadas con infecciones del aparato digestivo en humanos, los posibles mecanismos de acción de estos compuestos han sido estudiados con renovado interés. Subils y colaboradores estudiaron los efectos inhibitorios del Hidróxido de Bismuto sobre la cepa *E. coli* EDL933 y su capacidad de contrarrestar los efectos citotóxicos de la toxina Stx. En su trabajo demostraron una disminución significativa en la toxicidad de Stx en células Vero y una concentración inhibitoria mínima de 10 mg ml⁻¹. (Subils *et al.*, 2014). Además, distintos estudios han confirmado la eficacia del tratamiento con Hidroxido de Bismuto para la prevención de la “diarrea de viajero”, en particular para una variedad de virotipos de *E. coli*, *Salmonella spp* y *Shigella spp* (Steffen *et al.*, 1986; DuPont *et al.*, 1987).

Se encontró una respuesta dosis dependiente respecto a la capacidad neutralizante del Hidróxido de Bismuto en ensayos *in vitro*.

Los resultados obtenidos en pruebas con Hidróxido de Bismuto, contra el bacteriófago 933W libre son muy prometedores, con reducciones de 100 y 90% en el título de fago, a concentraciones de 5 y 1 mg ml⁻¹ respectivamente.

La inactivación del bacteriófago libre, causado por el Hidróxido de Bismuto, inhibiría la replicación del bacteriófago a nivel intestinal y de esta manera disminuiría la expresión de Stx.

Además de su eficiencia a nivel procariota, pudimos demostrar que, en un entorno eucariota, donde el bacteriófago es capaz de ingresar a células Vero, el Hidróxido de Bismuto inhibió la entrada. Si bien se comprobó su capacidad de proteger tejido del intestino en ensayos *in vitro* (Massó *et al.*, 2014) en este trabajo se puso a prueba en un modelo animal *in vivo*. Los ratones infectados con la cepa *E. coli* C600:933W y tratados con Hidróxido de Bismuto lograron contrarrestar los efectos tóxicos provocados en el grupo control sin tratar.

El Hidróxido de Bismuto se encuentra aprobado para el uso en humanos (DuPont HI *et al.*, 1987), por lo cual representa una opción económica y segura para ser usada durante la etapa aguda en infecciones por STEC representando un potencial tratamiento para evitar el desarrollo del SUH.

En los ensayos *in vivo* se utilizaron las cepas *E. coli* C600:933W, *E. coli* C600:933W:pr1 y la cepa *E. coli* C600 sin bacteriófago.

La cepa *E. coli* C600 no tiene proteínas implicadas en la colonización, de esta manera, todo parámetro típico de infección por STEC estará dado por la escisión del bacteriófago y la consecuente expresión y liberación de toxina Stx.

El modelo de ratón descrito se basa en uno desarrollado previamente por el laboratorio de la Dra. Palermo para analizar el daño renal, intestinal y la letalidad, utilizando la cepa de *E. coli* tipo salvaje O157:H7 (EDL933) (Fernandez-Brando *et al.*, 2008). En ese trabajo, se encontró que la administración bacteriana por vía intragástrica causa la colonización intestinal transitoria y síntomas de toxicidad sistémica mediada por Stx2 en un porcentaje de los ratones inoculados.

Nuestro modelo fue adaptado para estudiar los efectos de la inducción del bacteriófago, a partir de bacterias no patogénicas lisogénicas, mediante la administración oral de antibióticos.

Se usaron antibióticos para causar la inducción del bacteriófago 933W, con su consecuente replicación, producción y liberación de Stx (Zhang *et al.*, 2000;

Wagner *et al.*, 2002). La inducción de bacteriófagos *in vivo* usando antibióticos ha sido reportada previamente por nuestro equipo (Amorim *et al.*, 2014). Se observó una respuesta letal en ratones infectados con *E. coli* C600:933W después de la inducción de bacteriófagos.

Los ratones infectados con *E. coli* no patógena portando el bacteriófago productor de Stx (*E. coli* C600:933W) y los ratones infectados con la cepa *E. coli* no patógena portando el bacteriófago mutado en pr1 (*E. coli* C600:933W:pr1) desarrollaron daño renal, intestinal típico de la toxicidad de Stx después de la infección por STEC (Fernandez-Brando *et al.*, 2008). Además, en los tratados con C600:933W se detectó daño en cerebro.

Se demostró que el *background* patógeno bacteriano asociado a las cepas STEC no es necesario para el desarrollo de síntomas fisiológicos típicos del SUH.

Las infecciones por STEC producen daño renal, con un aumento en el nivel de urea y anormalidades glomerulares y tubulares (Zotta *et al.*, 2008). Ambas alteraciones correspondientes a la toxicidad de Stx se observaron en ratones infectados con *E. coli* C600:933W y C600:933W:pr1.

Además, el daño intestinal y cerebral se estudió mediante ensayos histológicos e inmunohistoquímicos respectivamente. Se observó edema en el intestino delgado y grueso, como se informó previamente en ratones después de la infección por STEC (Zotta *et al.*, 2008).

Anteriormente informamos que los ratones inyectados con un plásmido que expresa Stx2 desarrollaron una lesión en el SNC, que mostró una regulación positiva de la expresión de GFAP y una disminución en la expresión de NeuN (Bentancor *et al.*, 2013). El daño observado en el trabajo actual fue similar, pero provocado por Stx expresada por el bacteriófago en ausencia de un *background* bacteriano patógeno.

La toxina Stx y el bacteriófago 933W se detectaron en cerebro por inmunohistoquímica. Es también interesante notar que en los ratones infectados con la cepa mutante la presencia del bacteriófago se vió limitada a los vasos, mientras el *wild type* se detecta en la microglia y en los oligodendrocitos. Un estudio reciente demostró que el bacteriófago T4 fue internalizado por las células endoteliales microvasculares del cerebro humano (hBMec) (Nguyen *et al.*, 2017). Aquí informamos por primera vez la presencia de bacteriófagos en cerebro después de una infección intragástrica con una cepa no patógena. En conclusión, los resultados de este trabajo muestran que los bacteriófagos que expresan toxinas Stx (STB), en ausencia de otros factores bacterianos patógenos, provocaron daños intestinales, renales y cerebrales asociados con el desarrollo de SUH.

Es muy importante observar que se detectó el bacteriófago 933W en los vasos del cerebro de ratones tratados con la cepa *E. coli* C600:933W:pr1, pero no toxina Stx. El bacteriófago contenido en esta cepa tiene mutado el promotor putativo eucariota pr1. De esta manera, la producción de toxina debido a la maquinaria eucariota no estaría ocurriendo. Esto podría estar, entonces, explicando la ausencia de toxina Stx en los ratones tratados con la *E. coli* C600:933W:pr1 y la ausencia de daño a nivel neuronal. La marcación con NeuN mostró patrones celulares normales, sin diferencias significativas con respecto a los ratones control. Lo mismo ocurrió cuando se analizó GFAP.

El nuevo modelo animal descrito en este trabajo se propone como una herramienta útil para estudiar compuestos anti-bacteriofágicos como alternativa terapéutica. Además, abre un enfoque innovador para tratar infecciones causadas por bacteriófagos que codifican toxinas.

Teniendo en cuenta futuros ensayos para evaluar el rol de la expresión de Stx por células eucariotas, deberíamos poder contar con otro modelo *germ free* para evitar la amplificación del bacteriófago y expresión de toxina Stx por parte de bacterias hospedadoras naturales susceptibles presentes en el intestino.

Contando con el modelo animal desarrollado en este trabajo donde la sintomatología y parámetros fisiológicos se deben al bacteriófago productor de toxina Stx, pudimos evaluar los efectos del Hidróxido de Bismuto *in vivo*. Se pudo observar una disminución significativa del daño provocado por el bacteriófago en los órganos blanco, en los ratones tratados con Hidróxido de Bismuto comparado al control. Además el grupo tratado sobrevivió a la infección con la cepa *E. coli* C600:933W mientras que el grupo control murió a los 3 días post-infección.

Habiendo evaluado la capacidad de las células eucariotas de reconocer el promotor de la toxina Stx *in vitro* e *in vivo* y observado que existen agentes antibacteriofágicos que inhiben la capacidad del bacteriófago de replicarse, resta saber cómo el bacteriófago es capaz de ingresar a las células de mamífero.

En base a reportes sobre el bacteriófago lambda, uno de los mecanismos propuestos es que podría ingresar por unión a integrinas, las cuales interactúan con los motivos RGD y RGE presentes en partículas virales (Matilainen *et al.*, 2006).

Mediante el análisis de las secuencias proteicas del bacteriófago 933W encontramos dos motivos RGD y diez motivos RGE en la *tail fiber* protein.

Lankes y colaboradores lograron aumentar la internalización celular del bacteriófago *in vitro* y la transferencia de genes *in vivo* utilizando el péptido RGD de unión a integrina (Lankes *et al.*, 2006) en la superficie del bacteriófago.

En el estudio de la internalización del bacteriófago en células Vero y MiaPaca2, mediante citometría de flujo, se obtuvieron diferencias significativas a MOI de 0,5, donde las células Vero mostraron una mayor internalización. Estas diferencias podrían atribuirse a la presencia de mayor expresión de integrinas $\alpha 5\beta 3$ en la superficie de las células Vero.

De manera contraria a lo esperado, las células Vero fueron capaces de internalizar mayor porcentaje de bacteriófago en presencia de motivos RGD. Caswell y colaboradores demostraron que ligandos de RGD promueven el reciclado de integrinas y su activación (Caswell *et al.*, 2008). Esto podría explicar porqué las células, al ser expuestas a motivos RGD, fueron capaces de internalizar mayor porcentaje de bacteriófago.

Ha sido reportado que los bacteriófagos son capaces de traspasar las barreras epiteliales en el intestino y se estima que unas 31 billones, en promedio, de estas partículas transitan a través de las células epiteliales del intestino del cuerpo humano por día (Nguyen *et al.*, 2017).

Aunque no observamos directamente las partículas de bacteriófago o el ADN dentro del núcleo, investigaciones previas sobre el *delivery* de genes de bacteriófagos y la penetración completa de las células epiteliales por parte de los mismos (Tao *et al.*, 2013; Merrill *et al.*, 1971) requieren mayor investigación. Varios artículos han abordado el tema de la transcitosis epitelial de bacteriófagos. Sin embargo se han realizado pocos intentos para validar experimentalmente si la transcitosis se produce de forma natural, o por medio de qué ruta (Górski *et al.*, 2006). Los mecanismos por los cuales los bacteriófagos son internalizados en las células eucariotas aún no son claros.

En conclusión, podemos citar que el bacteriófago es internalizado por las células eucariotas estudiadas (Vero, MiaPaca2).

Cuando se evaluaron potenciales compuestos inhibidores de la infección del bacteriófago *in vitro*, en un entorno procarionta, se demostró que los péptidos catiónicos antimicrobianos (cAMPs) lograron su inactivación. Como perspectivas a futuro habría evaluar su potencial *in vivo*.

Por otro lado, se probó en ensayos *in vivo*, que los bacteriófagos que expresan toxinas Stx (STB), en ausencia de otros factores bacterianos patógenos, provocaron daños intestinales, renales y cerebrales asociados con el desarrollo del

SUH. Aquí también se informa por primera vez la presencia de bacteriófago en cerebro después de una infección intragástrica con una cepa no patógena

De esta manera se pudo demostrar la importancia que tiene entender el rol que juega el bacteriófago en el desarrollo del SUH. Tanto para el desarrollo de nuevas y eficientes terapias como para entender más sobre su interacción con los sistemas eucariotas.

Bibliografía

Acheson, D.W., Levine M.M., Kaper J.B., and Keusch G.T.. 1996. Protective immunity to Shiga-like toxin I following oral immunization with Shiga-like toxin I B-subunitproducing *Vibrio cholerae* CVD 103-HgR. *Infect. Immun.* 64:355–357.

Ahmed, A., Li, J., Shiloach, Y., Robbins, J.B. and Szu, S.C.. 2006. Safety and immunogenicity of *Escherichia coli* O157 O-specific polysaccharide conjugate vaccine in 2–5-year-old children. *J. Infect. Dis.* 193, 515–521 doi:10.1086/499821.

Amorim, J. H., Del Cogliano, M. E., Fernandez-Brando, R. J., Bilen, M. F., Jesus, M. R., Luiz, W. B., et al.. 2014. Role of bacteriophages in STEC infections: new implications for the design of prophylactic and treatment approaches. *F1000Research* 3:74. doi: 10.12688/f1000research.3718.1

Avendaño, L.H., Aljama García, P., Rodríguez, M.A., Díaz, D.D., De los Ríos, J.E., Peláez, S.L.. 1997. *Nefrología Clínica*. Madrid(España): Editorial Medica Panamericana: 217-225.

Arvidsson, I., Ståhl, A.L., Hedström, M.M., Kristoffersson, A.C., Rylander, C., Westman, J.S., Storry, J.R., Olsson, M.L., Karpman, D.. 2015. Shiga toxin-induced complement-mediated hemolysis and release of complement-coated red blood cell-derived microvesicles in hemolytic uremic syndrome. *J. Immunol.*, 194, 2309–2318.

Banatvala, N., Griffin, P.M., Greene, K.D., Barrett, T.J., Bibb, W.F., Green, J.H., Wells, J.G.. 2001. Hemolytic Uremic Syndrome Study CollaboratorsThe United States National prospective hemolytic uremic syndrome study: microbiologic, serologic, clinical, and epidemiologic findings. *J. Infect. Dis.*, 183, pp. 1063-1070

Bélangier, S.D., Boissinot, M., Ménard, C., Picard, F.J., and Bergeron, M.G.. 2002. Rapid detection of Shiga toxin-producing bacteria in feces by multiplex PCR with molecular beacons on the smart cycler. *J. Clin. Microbiol.* 40, 1436–1440. doi: 10.1128/JCM.40.4.1436-1440.2002

Bentancor, L.V., Bilen, M.F., Mejías, M.P., Fernández-Brando, R.J., Panek, C.A., Ramos,

- M.V., Fernández, G.C., Isturiz, M., Ghiringhelli, P.D., Palermo, M.S.. 2013a. Functional capacity of Shiga-toxin promoter sequences in eukaryotic cells. PLoS One 8, e57128.
- Bentancor, L. V., Mejías, M. P., Pinto, A., Bilen, M. F., Meiss, R., Rodríguez-Galán, M. C., *et al.*. 2013. Promoter sequence of Shiga toxin 2 (Stx2) is recognized *in vivo*, leading to production of biologically active Stx2. MBio 4:e00501–13. doi: 10.1128/mBio.00501-13
- Besser R.E., Griffin P.M., Slutsker L.. 1999. *Escherichia coli* O157:H7 gastroenteritis and the hemolytic uremic syndrome: an emerging infectious disease. Annu Rev Med.;50:355-67.
- Bettelheim, K. A.. 1998. Reliability of CHROMagar O157 for the detection of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O157 but not EHEC belonging to other serogroups. J. Appl. Microbiol. 85, 425–428.
- Bielaszewska, M., Idelevich, E.A., Zhang, W., Bauwens, A., Schaumburg, F., Mellmann, A., Peters, G., Karch, H.. 2012. Effects of antibiotics on Shiga toxin 2 production and bacteriophage induction by epidemic *Escherichia coli* O104:H4 strain. Antimicrob. Agents Chemother. 56, 3277–3282.
- Bielaszewska, M.; Rüter, C.; Bauwens, A.; Greune, L.; Jarosch, K.-A.; Steil, D.; Zhang, W.; He, X.; Llobes, R.; Fruth, A.. 2017. Host cell interactions of outer membrane vesicle-associated virulence factors of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Intracellular delivery, trafficking and mechanisms of cell injury. PLOS Pathog., 13, e1006159.
- Bitzan, M., Richardson, S., Huang, C., Boyd, B., Petric, M., Karmali, M.A.. 1994. Evidence that verotoxins (Shiga-like toxins) from *Escherichia coli* bind to p blood group antigens of human erythrocytes *in vitro*. Infect. Immun., 62, 3337–3347.
- Boerlin, P., McEwen, S. a, Boerlin-Petzold, F., Wilson, J.B., Johnson, R.P., and Gyles, C.L.. 1999. Associations between virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and disease in humans. Journal of clinical microbiology 37: 497–503.

Bomsel M., Alfsen A. 2003. Entry of viruses through the epithelial barrier: pathogenic trickery. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4: 57–68.

Brando, R.J., Miliwebsky, E., Bentancor, L., Deza, N., Baschkier, A., Ramos, M.V., Fernández, G.C., Meiss, R., Rivas, M., Palermo, M.S.. 2008. Renal damage and death in weaned mice after oral infection with Shiga toxin 2-producing *Escherichia coli* strains. *Clin Exp Immunol* 153:, 297—306.

Brian, M.J., Frosolono, M., Murray, B.E., Miranda, A., Lopez, E.L., Gomez, H.F.. 1992. Polymerase chain reaction for diagnosis of enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection and hemolytic-uremic syndrome. *J. Clin. Microbiol.* 30, 1801–1806.

Breitbart M., Hewson I., Felts B., Mahaffy J. M., Nulton J., Salamon P.. 2003. Metagenomic analyses of an uncultured viral community from human feces. *J. Bacteriol.* 185 6220–6223. 10.1128/JB.185.20.6220-6223.2003.

Brown-Jaque, M., Muniesa, M., Navarro, F.. 2016. Bacteriophages in clinical samples can interfere with microbiological diagnostic tools. *Sci. Rep.* 6:33000 10.1038.

Brunder, W., Schmidt, H., and Karch, H.. 1997. EspP, a novel extracellular serine protease of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 cleaves human coagulation factor V. *Molecular microbiology* 24: 767–78.

Burger, R.. 2012. EHEC O104:H4 in Germany 2011: Large outbreak of bloody diarrhea and haemolytic uraemic syndrome by Shiga toxin-producing *E. coli* via contaminated food. *Improving Food Safety Through a One Health Approach: Workshop*. Institute of Medicine (US). Washington (DC): National Academies Press (US)

Calderon, T.C., Rogers, T.J., Svensson, M., Tati, R., Fischer, H., Svanborg, C., Karpman, D.. 2008. Shiga toxin-mediated disease in myd88-deficient mice infected with *Escherichia coli* O157:H7. *Am. J. Pathol.*

- Canpolat, N.. 2015. Hemolytic uremic syndrome. *Türk Pediatri Arşivi* 50: 73–81.
- Casjens S.R. and Hendrix R.W.. 2015. Bacteriophage lambda: Early pioneer and still relevant. *Virology*. 479–480: p. 310–30. pmid:25742714
- Caswell, P. T., Chan, M., Lindsay, A. J., McCaffrey, M. W., Boettiger, D., & Norman, J. C. (2008). Rab-coupling protein coordinates recycling of alpha5beta1 integrin and EGFR1 to promote cell migration in 3D microenvironments. *The Journal of cell biology*, 183(1), 143–155. doi:10.1083/jcb.200804140.
- Chase-Topping, M.E., McKendrick, I.J., Pearce, M.C., MacDonald, P., Matthews, L., Halliday, J.. 2007. Risk factors for the presence of high-level shedders of *Escherichia coli* O157 on Scottish farms. *Journal of clinical microbiology* 45: 1594–603.
- Chui, L., Couturier, M.R., Chiu, T., Wang, G., Olson, A.B., McDonald, R.R.. 2010. Comparison of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* detection methods using clinical stool samples. *J. Mol. Diagn.* 12, 469–475. doi: 10.2353/jmoldx.2010.090221
- Chui, L., Patterson-Fortin, L., Kuo, J., Li, V., and Boras, V.. 2015. Evaluation of enzyme immunoassays and real-time PCR for detecting Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Southern Alberta, Canada. *J. Clin. Microbiol.* 53, 1019–1023. doi: 10.1128/JCM.03288-14
- Cooling, L.L., Walker, K.E., Gille, T., Koerner, T.A.. 1998. Shiga toxin binds human platelets via globotriaosylceramide (pk antigen) and a novel platelet glycosphingolipid. *Infect. Immun.*, 66, 4355–4366.
- Cornick, N.A., Helgerson, A.F., Mai, V., Ritchie, J.M., and Acheson, D.W. 2006. *In vivo* transduction of an Stx-encoding phage in ruminants. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 5086–5088.
- Cuellar Garzón, L.S., López Cruz, R.L., Gastelbondo Amaya, R., Ibáñez Pinilla, M.. 2006 Síndrome hemolítico urémico y transplante renal (segunda parte). *Rev colombiana de*

pediatría; 40(4). URL disponible en:
<http://www.encolombia.com/medicina/pediatria/pediatria40405-sindrome.htm>

Hughes, D.T., Clarke, M.B., Yamamoto, K., Rasko, D.A., Sperandio V.. 2009. The QseC adrenergic signaling cascade in Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC). *PLoS Pathog.* 5(8): p. e1000553. pmid:19696934,

Datsenko, K.A., Wanner, B.L.. 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97:6640–6645. doi: 10.1073/pnas.120163297

Davis, T.K., McKee, R., Schnadower, D.. 2013. Treatment of Shiga toxin-producing. *Escherichia coli* infections. *Infect Dis Clin North Am*;27(3):577–97.

Del Cogliano, M.E., Pinto, A., Goldstein, J., Zotta, E., Ochoa, F., Fernández-Brando, R.J., Muniesa, M., Ghiringhelli, P.D., Palermo, M.S., Bentancor, L.V.. 2018. Relevance of Bacteriophage 933W in the Development of Hemolytic Uremic Syndrome (HUS). *Front Microbiol.* 9:3104. doi: 10.3389/fmicb.2018.03104. eCollection.

Dran, G.I., Fernández, G.C., Rubel, C.J., Bermejo, E., Gomez, S., Meiss, R., Isturiz, M.A., and Palermo M.S.. 2002. Protective role of nitric oxide in mice with Shiga toxin-induced hemolytic uremic syndrome. *Kidney Int.* 62(4): 1338-48.

DuPont, H.I., Ericsson, C., Johnson, P., Bitsura, J.A.M., DuPont, M.W., De la Cabada, F.J.. 1987. Prevention of travelers diarrhea by the tablet formulation of bismuth subsalicylate. *JAMA.* 257:1347–1350.

Eisenhauer, P.B., Chaturvedi, P., Fine, R.E., Ritchie, A.J., Pober, J.S., Cleary, T.G. and Newburg, D.S.. 2001. Tumor necrosis factor alpha increases human cerebral endothelial cell Gb3 and sensitivity to Shiga toxin. *Infect Immun.* 69(3): 1889-94.

Exeni, R., López, E., Devoto, S., Contrini, M.N., De Rosa, M.F. and Sánchez Avalo, J.. 1994. Síndrome Urémico Hemolítico. Arch Arg Pediatr. 92:222-35

Exeni, R.. 2006. Síndrome urémico hemolítico: Manifestaciones clínicas: Tratamiento. Medicina (Buenos Aires);66:6-10

Faccone, D., Veliz, O., Corso, A., Noguera, M., Martínez, M., Payes, C., *et al.*. 2014. Antimicrobial activity of de novo designed cationic peptides against multi-resistant clinical isolates. Eur. J. Med. Chem. 71, 31-35. doi: 10.1016/j.ejmech.2013.10.065

Fayad, A., Vallejo, G., Cañepa, C.. 2001. Síndrome urémico hemolítico. Experiencia en 1059 pacientes entre 1976 y 2000. Rev Hosp Niños Baires. 43 (195): 288-294.

Farfan, M.J., Cantero, L., Vidal, R., Botkin, D.J., and Torres, A.G.. 2011. Long polar fimbriae of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 bind to extracellular matrix proteins. Infection and immunity 79: 3744-50.

Fernandez, G.C., Gomez, S.A., Ramos, M.V., Bentancor, L.V., Fernandez-Brando, R.J., Landoni, V.I.. 2007. The functional state of neutrophils correlates with the severity of renal dysfunction in children with hemolytic uremic syndrome Pediatr. Res., 61, pp. 123-128

Fernandez, G.C., Lopez, M.F., Gomez, S.A., Ramos, M.V., Bentancor, L.V., Fernandez-Brando, R.J.. 2006. Relevance of neutrophils in the murine model of haemolytic uraemic syndrome: mechanisms involved in Shiga toxin type 2-induced neutrophilia Clin. Exp. Immunol., 146, pp. 76-84

Fernandez-Brando, R.J., Cabrera, G., Baschkier, A., Mejías, M.P., Panek, C.A., Miliwebsky, E.. 2014. Oral administration of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* induces intestinal and systemic specific immune response in mice. Med. Microbiol. Immunol. 203, 145-54. 10.1007/s00430-013-0325.

Fernandez-Brando, R.J., Miliwebsky, E., Mejías, M.P., Baschkier, A., Panek, C.A., Abrey,-Recalde, M.J., Cabrera, G., Ramos, M.V., Rivas, M., Palermo M.S.. 2012. Shiga toxin producing *Escherichia coli* O157: H7 shows an increased pathogenicity in mice after the passage through the gastrointestinal tract of the same host. *J. Med. Microbiol.* 61, 852–859.

Fuller, C.A., Pellino, C.A., Flagler, M.J., Strasser, J.E., and Weiss, A.A.. 2011. Shiga Toxin Subtypes Display Dramatic Differences in Potency. *Infection and Immunity* 79: 1329–1337.

Frank, C., Werber, D., Cramer, J.P., Askar, M., Faber, M., an der Heiden, M.. 2011. Epidemic Profile of Shiga-Toxin–Producing *Escherichia coli* O104:H4 Outbreak in Germany. *New England Journal of Medicine* 365: 1771–1780.

Fratamico, P.M., Lori, K., and Bagi, L.K.. 2012. Detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in ground beef using the GeneDisc real-time PCR system. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2:152. doi: 10.3389/fcimb.2012.00152

Friedrich, A.W., Lu, S., Bielaszewska, M., Prager, R., Bruns, P., Xu, J.-G.. 2006. Cytolethal distending toxin in *Escherichia coli* O157:H7: spectrum of conservation, structure, and endothelial toxicity. *Journal of clinical microbiology* 44: 1844–6.

Fujii, J., Kita, T., Yoshida, S., Takeda, T., Kobayashi, H., Tanaka, N.. 1994. Direct evidence of neuron impairment by oral infection with verotoxin-producing *Escherichia coli*O157:H7 in mitomycin-treated mice. *Infect. Immun.* 62, 3447–3453.

Gamage, S.D., Strasser, J.E., Chalk, C.L., and Weiss, A.A.. 2003. Nonpathogenic *Escherichia colican* contribute to the production of Shiga toxin. *Infect. Immun.* 71, 3107–3115.

Gerritzen, A., Wittke, J.W., and Wolff, D.. 2011. Rapid and sensitive detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* directly from stool samples by real-time PCR in comparison to culture, enzyme immunoassay and Vero cell cytotoxicity assay. *Clin. Lab.* 57, 993–998.

Gill, A., Huszczyński, G., Gauthier, M.. 2014. Evaluation of eight agar media for the isolation of shiga toxin-Producing *Escherichia coli*. *J Microbiol Methods*; 96:6–11.

Goldstein, J., Loidl, C. F., Creydt, V. P., Boccoli, J., and Ibarra, C.. 2007. Intracerebroventricular administration of Shiga toxin type 2 induces striatal neuronal death and glial alterations: an ultrastructural study. *Brain Res.* 1161, 106–115. doi: 10.1016/j.brainres.2007.05.067.

Gordjani, N., Sutor, A.H., Zimmerhackl, L.B. and Brandis M.. 1997. Hemolytic uremic syndromes in childhood. *Semin Thromb Hemost*, 23(3): 281-93.

Gordon, D.M.. 2013. The ecology of *Escherichia coli*.

Gorski, A., Miedzybrodzki, R., Borysowski, J., Dabrowska, K., Wierzbicki, P., Ohams, M.. 2012. Chapter 2–“Phage as a modulator of immune responses: practical implications for phage therapy,” in *Advances in Virus Research. Bacteriophages Part B*, eds Lobočka M., Szybalski W., editors. (Sant Diego, CA: Academic Press;), 41–72.

Górski, A., Wazna, E., Dabrowska, B.W., Dabrowska, K., Swiatała-Jeleń, K., Miedzybrodzki, R.. 2006. Bacteriophage translocation. *FEMS Immunol Med Microbiol*;46:313-319

Grif, K., Orth, D., Dierich, M.P.. 2007 Comparison of an immunochromatographic rapid test with enzyme-linked immunosorbent assay and polymerase chain reaction for the detection of Shiga toxins from human stool samples. *Diagn Microbiol Infect Dis*;59(1):97–9.

Hale, C.R., Scallan, E., Cronquist, A.B., Dunn, J., Smith, K., Robinson, T., *et al.*. 2012 Estimates of Enteric Illness Attributable to Contact With Animals and Their Environments in the United States. *Clinical Infectious Diseases* 54: S472–S479.

Hauswaldt, S., Nitschke, M., Sayk, F., Solbach, W., and Knobloch, J. K.. 2013. Lessons

- learned from outbreaks of Shiga toxin producing *Escherichia coli*. *Curr. Infect. Dis. Rep.* 15, 4–9.
- Hanahan, D.. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol.* 1664:557–580. doi: 10.1016/S0022-2836(83)80284-8
- Hermos, C.R., Janineh, M., Han, L.L.. 2011. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in children: diagnosis and clinical manifestations of O157:H7 and non-O157:H7 infection. *J Clin Microbiol*;49(3):955–9.
- Hiriart, Y., Pardo, R., Bukata, L., Lauché, C., Muñoz, L., Colonna, M., Goldbaum, F., Sanguineti, S., Zylberman, V.. 2018. Development of a product anti-Shiga toxin for prevention of the hemolytic uremic syndrome. *Medicina (B. Aires)*;78:107–112.
- Hollmann, A., Martínez, M., Noguera, M. E., Augusto, M. T., Disalvo, A., Santos, N. C., et al. 2016. Role of amphipathicity and hydrophobicity in the balance between hemolysis and peptide-membrane interactions of three related antimicrobial peptides. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 141, 528–536. doi: 10.1016/j.colsurfb.2016.02.003
- Hurley, B.P., Jacewicz, M., Thorpe, C.M., Lincicome, L.L., King, A.J., Keusch, G.T. and Acheson D.W.. 1999. Shiga toxins 1 and 2 translocate differently across polarized intestinal epithelial cells. *Infect Immun*, 67(12): 6670-7.
- Hurley, B. P., Thorpe, C. M., and Acheson, D. W.. 2001. Shiga toxin translocation across intestinal epithelial cells is enhanced by neutrophil transmigration. *Infect. Immun.* 69, 6148–6155.
- Imamovic, L., Ballesté, E., Castillo, E.M., Aljaro, C.G., Muniesa M.. 2016. Heterogeneity in phage induction enables the survival of the lysogenic population. *Environ Microbiol*, 2016. 18(3): p. 957–69. pmid:26626855

Iman-Eini, H., Haghi-Ashtiani, M.T., Emaneini, M., Aligholi, M., Taherikalani, M., Hosseini, H., *et al.*. 2013. Molecular analysis of typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) isolated from children with diarrhoea. *Journal of Medical Microbiology* 62: 191–195.

Ito, H., Terai, A., Kurazono, H., Takeda, Y., and Nishibuchi, M.. 1990. Cloning and nucleotide sequencing of Vero toxin 2 variant genes from *Escherichia coli* O91:H21 isolated from a patient with the hemolytic uremic syndrome. *Microbial pathogenesis* 8: 47–60.

Jandhyala, D.M., Ahluwalia, A., Obrig, T., Thorpe, C.M.. 2008. ZAK: A MAP3Kinase that transduces Shiga toxin- and ricin-induced proinflammatory cytokine expression. *Cell. Microbiol.*;10:1468–1477.

Kaneko, K., Kiyokawa, N., Ohtomo, Y., Nagaoka, R., Yamashiro, Y., Taguchi, T., Mori, T., Fujimoto, J. and Takeda, T.. 2001. Apoptosis of renal tubular cells in Shiga-toxinmediated hemolytic uremic syndrome. *Nephron*. 87(2): 182-5.

Karmali, M.A., Petric, M., Lim, C., Fleming, P., and Steele, B.T.. 1983. *Escherichia colicytotoxin*, haemolytic-uraemic syndrome, and haemorrhagic colitis. *Lancet* 2, 1299–1300.

Karmali, M.A.. 1989. Infection by verotoxin-producing *Escherichia coli*. *Clin.Microbiol. Rev.* 2:15–38.

Karmali, M.A.. 2004. Infection by Shiga toxin–producing *Escherichia coli*: An overview. *Mol Biotechnol*;26:117–122.

Karpman, D.; Connell, H.; Svensson, M.; Scheutz, F.; Alm, P.; Svanborg, C.. 1997. The role of lipopolysaccharide and Shiga-like toxin in a mouse model of *Escherichia coli* O157:H7 infection. *J. Infect. Dis.*, 175, 611–620.

Karpman, D., Papadopoulou, D., Nilsson, K., Sjögren, A.C., Mikaelsson, C. and Lethagen S.. 2001. Platelet activation by Shiga toxin and circulatory factors as a pathogenetic mechanism in the hemolytic uremic syndrome. *Blood*, 97(10): 3100-8.

Karpman, D.; Ståhl, A.L. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* pathogenesis and the host response. *Microbiol. Spectr.* 2014, 2.

Keepers, T.R., Psocka, M.A., Gross, L.K., Obrig, T.G.. 2006. A murine model of HUS: Shiga toxin with lipopolysaccharide mimics the renal damage and physiologic response of human disease *J. Am. Soc. Nephrol.*, 17, pp. 3404-3414

Keller, R., Traub, N.. 1974. The characterization of *Bacteroides fragilis* bacteriophage recovered from animal sera: observations on the nature of *Bacteroides* phage carrier cultures. *J. Gen. Virol.* 24 179–189. 10.1099/0022-1317-24-1-179.

Kliegman R: Nelson tratado de pediatría. 18th edition. Barcelona: Elsevier; 2008.

Kolling, G.L.; Matthews, K.R. Export of virulence genes and shiga toxin by membrane vesicles of *Escherichia coli* O157:H7. *Appl. Environ. Microbiol.* 1999, 65, 1843–1848.

Konadu, E., Donohue-Rolfe, A., Calderwood, S.B., Pozsgay, V., Shiloach, J., Robbins, J.B.. 1999. Syntheses and immunologic properties of *Escherichia coli* O157 O-specific polysaccharide and Shiga toxin 1 B subunit conjugates in mice. *Infect. Immun.* 67, 6191–6193 PMID:10531288.

Kong, M., Chen, X.G., Xing, K., Park, H.J.. 2010. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review. *Int J Food Microbiol.* Nov 15;144(1):51- 63. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.09.012. Epub 2010 Oct 15. Review.

Konowalchuk, J., Speirs, J.I., and Stavric, S.. 1977. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infection and immunity* 18: 775–9.

Krüger, A. and Lucchesi, P.M.A.. 2015. Shiga toxins and stx phages: highly diverse entities. *Microbiology* 161: 451–462.

Lankes, H.A., Zanghi, C.N., Santos, K., Capella, C., Duke, C.M., Dewhurst S.. 2007. *In vivo* gene delivery and expression by bacteriophage lambda vectors. *J. Appl. Microbiol.* 102, 1337–1349.

Lee, S.-Y., Cherla, R.P., Caliskan, I., and Tesh, V.L.. 2005. Shiga toxin 1 induces apoptosis in the human myelogenous leukemia cell line THP-1 by a caspase-8-dependent, tumor necrosis factor receptor-independent mechanism. *Infection and immunity* 73: 5115–26.

Ly-Chatain, M.H., Moussaoui, S., Vera, A., Rigobello, V., Demarigny Y.. 2013. Antiviral effect of cationic compounds on bacteriophages. *Front Microbiol.* 4: 46. eCollection.

Majowicz, S.E., Scallan, E., Jones-Bitton, A., Sargeant, J.M., Stapleton, J., Angulo, F.J., Yeung, D.H., Kirk, M.D.. 2014. Global incidence of human Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections and deaths: A systematic review and knowledge synthesis. *Foodborne Pathog. Dis.*;11:447–455. doi: 10.1089/fpd.2013.1704.

Malyukova, I., Murray, K.F., Zhu, C., Boedeker, E., Kane, A., Patterson, K., Peterson, J.R., Donowitz, M., Kovbasnjuk O.. 2009. Macropinocytosis in Shiga toxin 1 uptake by human intestinal epithelial cells and transcellular transcytosis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 296, G78–G92

Manning, S.D., et al., 2008. Variation in virulence among clades of *Escherichia coli* O157:H7 associated with disease outbreaks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 105: p. 4868-73. 9

Manrique, P., Bolduc, B., Walk, S.T., van der Oost, J., de Vos, W.M., Young, M.J.. 2016. Healthy human gut phageome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113: 10400-10405.

Martorelli, L., Garbaccio, S., Vilte, D.A., Albanese, A.A., Mejías, M.P., Palermo, M.S., Mercado, E.C., Ibarra, C.E., Cataldi, A.A.. 2017. Immune response in calves vaccinated with type three secretion system antigens and Shiga toxin 2B subunit of *Escherichia coli* O157:H7. PLoS ONE.;12:e0169422. doi: 10.1371/journal.pone.0169422.

Maturana, P., Martinez, M., Noguera, M., Santos, N. C., Disalvo, E. A., Semorile, L., *et al.*. 2017. Lipid selectivity in novel antimicrobial peptides: implication on antimicrobial and hemolytic activity. Colloids Surf. B Biointerfaces 153, 152–159. doi: 10.1016/j.colsurfb.2017.02.003

Matsushiro, A., Sato, K., Miyamoto, H., Yamamura, T., Honda T.. 1999. Induction of prophages of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 with norfloxacin. J Bacteriol. 181(7): p. 2257–60. pmid:10094706

Mejias, M.P., Ghersi, G., Craig, P.O., Panek, C.A., Bentancor, L.V., Baschkier, A., Goldbaum, F.A., Zylberman, V., Palermo, M.S.. 2013. Immunization with a chimera consisting of the B subunit of Shiga toxin type 2 and brucella lumazine synthase confers total protection against Shiga toxins in mice. J. Immunol.;191:2403–2411. doi: 10.4049/jimmunol.1300999.

Mejias, M.P., Cabrera, G., Fernández-Brando, R.J., Baschkier, A., Ghersi, G., Abrey-Recalde, M.J., Miliwebsky, E., Meiss, R., Goldbaum, F., Zylberman, V.. 2014. Protection of mice against Shiga toxin 2 (Stx2)-associated damage by maternal immunization with a Brucella lumazine synthase-Stx2 B subunit chimera. Infect. Immun.;82:1491–1499. doi: 10.1128/IAI.00027-14.

Mejías M.P., Hiriart Y., Lauché C., Fernández-Brando R.J., Pardo R., Bruballa A., Ramos M.V., Goldbaum F.A., Palermo M.S., Zylberman V.. 2016. Development of camelid single chain antibodies against Shiga toxin type 2 (Stx2) with therapeutic potential against Hemolytic Uremic Syndrome (HUS) Sci. Rep.;6:24913. doi: 10.1038/srep24913.

Merril C., Friedman T.B., Attallah AFM, Geier M.R., Krell K., Yarkin R.. 1972. Isolation of bacteriophages from commercial sera. *In Vitro* 8: 91–93.

Milley, D.G., and Sekla, L.H.. 1993. An enzyme-linked immunosorbent assay-based isolation procedure for verotoxigenic *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 4223–4229.

Ministerio de Salud. Boletín Integrado de Vigilancia N° 247, SE 7, 2015, Páginas 53-61. Available at <http://www.msal.gov.ar/index.php/home/boletin-integrado-de-vigilancia>

Miyamoto, Y., Iimura, M., Kaper J.B., Torres, A.G., Kagnoff, M.F.. 2006. Role of Shiga toxin *versus* H7 flagellin in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* signalling of human colon epithelium *in vivo*. *Cell. Microbiol.* 2006;8:869–879.

Mizutani, S., Nakazono, N., and Sugino Y.. 1999. The so-called chromosomal verotoxin genes are actually carried by defective prophages. *DNA Res.* 6(2): p. 141–3. pmid:10382973

Merril, C.R., Geier, M.R., Petricciani, J.C.. 1971. Bacterial virus gene expression in human cells. *Nature* 233:398-400.

Morano, J., Renteria, M.S., Silber, R., Spizzini, F.D.. 2004. Tratado de Pediatría. 3ra Ed. Buenos Aires: Editorial Atlantic; 939-942

Mori, Y., and Notomi, T.. 2009. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases. *J. Infect. Chemother.* 15, 62–69. doi: 10.1007/s10156-009-0669-9

Muniesa, M. and Jofre, J.. 1998. Abundance in sewage of bacteriophages that infect *Escherichia coli* O157:H7 and that carry the Shiga toxin 2 gene. *Appl Environ Microbiol* 64, 2443–2448.

Murray, M.D. and Brater D.C.. 1993. Renal toxicity of the nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 33: 435-65. National Institute of Health. 1985. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

Muthing, J., Schweppe, C. H., Karch, H., and Friedrich, A. .W.. 2009. Shiga toxins, glycosphingolipid diversity, and endothelial cell injury. *Thromb. Haemost.* 101, 252– 264.

Nataro, J.P. and Kaper, J.B.. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical microbiology reviews* 11:142–201.

Navarro, A., Hernández-Chiñas, U., Licona-Moreno, D., Zenteno, E., Cravioto, A., Eslava-Campos, C.A.. 2016. Immunogenic peptide mimotopes from an epitope of *Escherichia coli* O157 LPS. *Biochem. J.*;473:3791–3804. doi: 10.1042/BCJ20160687.

Neely, M.N. and Friedman D.I.. 1998. Arrangement and functional identification of genes in the regulatory region of lambdoid phage H-19B, a carrier of a Shiga-like toxin. *Gene*, 223(1–2): p. 105–13. pmid:9858702

Neely, M.N., and Friedman, D.I.. 1998. Functional and genetic analysis of regulatory regions of coliphage H-19B: location of shiga-like toxin and lysis genes suggest a role for phage functions in toxin release. *Mol Microbiol* 28:1255–1267.

Nelson, W.E., Behrman, R.E., Kligman, R.M., Arvin, A.M.. 1998. Tra-tado de Pediatría. 15ta Ed. Santiago de Atahualtepec (México): McGraw-Hill Interamericana Editores S.A:vol 2:1861-1862.

Nguyen, S., Baker, K., Padman, B.S., Patwa, R., Dunstan, R.A., Weston, T.A., Schlosser, K., Bailey, B., Lithgow, T., Lazarou, M., Luque, A., Rohwer, F., Blumberg, R.S., Barr, J.J.. 2017. Bacteriophage transcytosis provides a mechanism to cross epithelial cell layers. *mBio* 8:e01874-17. [https:// doi.org/10.1128/mBio.01874-17](https://doi.org/10.1128/mBio.01874-17).

Nguyen, Y. and Sperandio, V.. 2012. Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) pathogenesis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2: 90.

Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N.. 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 28:e63. doi: 10.1093/nar/28.12.e63

Obrig, T.G., Del Vecchio, P.J., Brown, J.E., Moran, T.P., Rowland, B.M., Judge, T.K., Rothman, S.W.. 1988. Direct cytotoxic action of Shiga toxin on human vascular endothelial cells. *Infect. Immun.* 56:2373–2378.

O'Donoghue, E.J.; Krachler, A.M. Mechanisms of outer membrane vesicle entry into host cells. *Cell. Microbiol.* 2016, 18, 1508–1517.

Oh, J., Byrd, A. L., Deming, C., Conlan, S., Kong, H. H., Segre, J. A.. 2014. Biogeography and individuality shape function in the human skin metagenome. *Nature* 514 59–64. 10.1038/nature13786.

Orden, J.A., Ruiz-Santa-Quiteria, J.A., Cid, D., García, S., and de la Fuente, R.. 1999. Prevalence and characteristics of necrotoxicogenic *Escherichia coli* (NTEC) strains isolated from diarrhoeic dairy calves. *Veterinary microbiology* 66: 265–73.

Paton, A.W., Paton, J.C.. 1998. Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for stx1, stx2, eaeA, enterohemorrhagic *E. coli* hlyA, rfbO111, and rfbO157. *J Clin Microbiol*;36(2):598–602.

Paton, A.W., Woodrow, M.C., Doyle, R.M., Lanser, J.A., and Paton, J.C.. 1999. Molecular characterization of a Shiga toxigenic *Escherichia coli* O113:H21 strain lacking eae responsible for a cluster of cases of hemolytic-uremic syndrome. *Journal of clinical microbiology* 37: 3357–61.

Paton, J.C and Patton, A.W.. 1998. Pathogenesis and diagnosis of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* infections. *Clin Microbiol Rev* 11, 450-479.

Pennington H.. 2010. *Escherichia coli* O157 *Lancet*, 376, pp. 1428-1435

Philpott, D.J., Ackerley, C.A., Kiliaan, A.J., Karmali, M.A., Perdue, M.H., Sherman P.M.. 1997. Translocation of verotoxin-1 across T84 monolayers: mechanism of bacterial toxin penetration of epithelium. *Am. J. Physiol.* 273, G1349–G1358.

Pinto, A., Jacobsen, M., Geoghegan, P. A., Cangelosi, A., Cejudo, M. L., Tironi-Farinati, C., *et al.*. 2013. Dexamethasone rescues neurovascular unit integrity from cell damage caused by systemic administration of shiga toxin 2 and lipopolysaccharide in mice motor cortex. *PLoS ONE* 8:e70020. doi: 10.1371/journal.pone.0070020.

Perera, L.P., Marques, L.R., and O'Brien, A.D.. 1988. Isolation and characterization of monoclonal antibodies to Shiga-like toxin II of enterohemorrhagic *Escherichia coli* and use of the monoclonal antibodies in a colony enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.* 26, 2127–2131.

Pollard, D.R., Johnson, W.M., Lior, H., Tyler, S.D., and Rozee, K.R.. 1990. Rapid and specific detection of verotoxin genes in *Escherichia coli* by the polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 28, 540–545.

Proesmans, W.. 2001. The role of coagulation and fibrinolysis in the pathogenesis of diarrhea-associated hemolytic uremic syndrome. *Semin Thromb Hemost.* 27(3): p. 201-5.

Provencher, S. W.. 1982. A constrained regularization method for inverting data represented by linear algebraic or integral equations. *Comput. Phys. Commun.* 27, 213–227. doi: 10.1016/0010-4655(82)90173-4

Proulx, F., Seidma, E.G. and Karpman D.. 2001. Pathogenesis of Shiga-toxin-associated hemolytic uremic syndrome. *Pediatr Res.* 50(2): 163-71.

Psotka, M.A.; Obata, F.; Kolling, G.L.; Gross, L.K.; Saleem, M.A.; Satchell, S.C.; Mathieson, P.W.; Obrig, T.G. Shiga toxin 2 targets the murine renal collecting duct epithelium. *Infect. Immun.* 2009, 77, 959–969.

- Ramegowda, B., Samuel, J.E. and Tesh, V.L.. 1999. Interaction of Shiga toxins with human brain microvascular endothelial cells: cytokines as sensitizing agents. *J Infect Dis*, 180(4): 1205-13
- Rangel, J.M., Sparling, P.H., Crowe, C., Griffin, P.M., Swerdlow, D.L.. 2005. Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks, United States, 1982–2002. *Emerg. Infect. Dis.*, 11, pp. 603-609
- Remuzzi, G. and Ruggenti, P.. 1995. The hemolytic uremic syndrome. *Kidney Int*, 48(1): p. 2-19.
- Remuzzi, G. and Ruggenti, P.. 1998. Pathophysiology and management of thrombotic microangiopathies. *Kidney Int Suppl*, 66.: S54-7.
- Rivas, M., Miliwebsky E., Chinen I., Deza N., Leotta G.. 2006. The epidemiology of hemolytic uremic syndrome in Argentina. Diagnosis of the etiologic agent, reservoirs and routes of transmission. *Medicina (Buenos Aires)* 66:27-32.
- Rivas, M., Chinen, I., Miliwebsky, E., Galli, L., Repetto, H.A., Masana, M.O.. 2011. Epidemiology of Argentinean STEC. In: *Population Genetics of Bacteria: A Tribute to*
- Rivero, M.A., Padola, N.L., Etcheverría, A.I., Parma, A.E.. 2004 *Escherichia coli* enterohemorrágica y Síndrome urémico hemolítico en Argentina. *Medicina (Buenos Aires)*. 64: 352-356
- Sacerdoti, F., Mejías, M.P., Bruballa, A.C., Alvarez, R.S., Amaral, M.M., Palermo, M.S., Ibarra, C.. 2016. Immunization with BLS-Stx2B chimera totally protects dams from early pregnancy loss induced by Shiga toxin type 2 (Stx2) and confers anti-Stx2 immunity to the offspring. *Vaccine.*;34:4732–4737. doi: 10.1016/j.vaccine.2016.07.049.
- Samadder, P., Xicohtencatl-Cortes, J., Saldaña, Z., Jordan, D., Tarr, P.I., Kaper, J.B., and Girón, J.A. (2009) The *Escherichia coli* ycbQRST operon encodes fimbriae with laminin-

binding and epithelial cell adherence properties in Shiga-toxigenic *E. coli* O157:H7. Environmental microbiology 11: 1815–26.

Sambrook, J. and Russell D.W.. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 4th edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sauter, K.A., Melton-Celsa, A.R., Larkin, K., Troxell, M.L., O'Brien, A.D., Magun, B.E.. 2008. Mouse model of hemolytic-uremic syndrome caused by endotoxin-free Shiga toxin 2 (Stx2) and protection from lethal outcome by anti-Stx2 antibody Infect. Immun., 76, pp. 4469-4478

Scallan, E., Hoekstra, R.M., Angulo, F.J., Tauxe, R. V, Widdowson, M.-A., Roy, S.L., *et al.*. 2011. Foodborne illness acquired in the United States--major pathogens. Emerging infectious diseases 17: 7–15.

Scheutz, F., Teel, L.D., Beutin, L., Piérard, D., Buvens, G., Karch, H., *et al.*. 2012. Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing Stx nomenclature. Journal of Clinical Microbiology 50: 2951–2963.

Schindler EI, Sellenriek P, Storch GA, *et al.* Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: a single-center, 11-year pediatric experience. J Clin Microbiol 2014; 52(10):3647–53.

Schmidt H.. 2001. Shiga-toxin-converting bacteriophages. Res. Microbiol;152:687–695. doi: 10.1016/S0923-2508(01)01249-9.

Schuller, S., Frankel, G., and Phillips, A.D.. 2004. Interaction of Shiga toxin from *Escherichia coli* with human intestinal epithelial cell lines and explants: Stx2 induces epithelial damage in organ culture. Cell. Microbiol. 6, 289–301.

Segura, A., Auffret, P., Bibbal, D., Bertoni, M., Durand, A., Jubelin, G., Kérourédan, M., Brugère, H., Bertin, Y., Forano, E.. 2018. Factors involved in the persistence of a Shiga

toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 strain in bovine feces and gastro-intestinal content. *Front. Microbiol.*;9:375. doi: 10.3389/fmicb.2018.00375

Serra-Moreno, R., Acosta, S., Hernalsteens, J. P., Jofre, J., & Muniesa, M.. 2006. Use of the lambda Red recombinase system to produce recombinant prophages carrying antibiotic resistance genes. *BMC molecular biology*, 7, 31. doi:10.1186/1471-2199-7-31.

Shimada, O., Ishikawa, H., Tosaka-Shimada, H., and Atsumi, S.. 1999. Exocytotic secretion of toxins from macrophages infected with *Escherichia coli* O157. *Cell. Struct. Funct.* 24, 247–253.

Smith, C.J., Nedwell, D.B., Dong, L.F. and Osborn, A.M.. 2006. Evaluation of quantitative polymerase chain reaction-based approaches for determining gene copy and gene transcript numbers in environmental samples. *Environ Microbiol* 8, 804–815.

Smith, J.L., Fratamico, P.M., Gunther, N.Wt.. 2014. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Adv Appl Microbiol*;86:145–97.

Smith W.E., Kane A.V., Campbell S.T., Acheson D.W., Cochran B.H., Thorpe C.M.. 2003. Shiga toxin 1 triggers a ribotoxic stress response leading to p38 and JNK activation and induction of apoptosis in intestinal epithelial cells. *Infect. Immun.* 71, 1497–1504

Snedeker, K.G., Shaw, D.J., Locking, M.E., and Prescott, R.J.. 2009. Primary and secondary cases in *Escherichia coli* O157 outbreaks: a statistical analysis. *BMC infectious diseases* 9: 144.

Solomon, E.B., Yaron, S., and Matthews, K.R.. 2002. Transmission of *Escherichia coli* O157:H7 from contaminated manure and irrigation water to lettuce plant tissue and its subsequent internalization. *Applied and environmental microbiology* 68: 397–400.

Srivastava, A. S., Chauhan, D. P., Carrier, E.. 2004. In utero detection of T7 phage after systemic administration to pregnant mice. *Biotechniques* 37 81–83.

Ståhl, A.L.; Arvidsson, I.; Johansson, K.E.; Chromek, M.; Rebetz, J.; Loos, S.; Kristoffersson, A.C.; Békássy, Z.D.; Mörgelin, M.; Karpman, D.. 2015. A novel mechanism of bacterial toxin transfer within host blood cell-derived microvesicles. *PLoS Pathog.*, 11, e1004619.

Ståhl, A.L., Sartz, L., Karpman, D.. 2011. Complement activation on platelet-leukocyte complexes and microparticles in enterohemorrhagic *Escherichia coli*-induced hemolytic uremic syndrome, 117, 5503–5513

Steffen, R., DuPont, H., Heusser, R., Helminger, A., Witassek, F., Manhart, M.D., Schär M.. 1986. Prevention of travelers diarrhea by the tablet form of bismuth subsalicylate. *Antimicrob Agents Chemothe*, 29:625–627.

Strachan, N.J.C., Dunn, G.M., Locking, M.E., Reid, T.M.S., and Ogden, I.D.. 2006. *Escherichia coli* O157: Burger bug or environmental pathogen. *International Journal of Food Microbiology* 112: 129–137.

Su, C., Brandt, L.J.. 1995. *Escherichia coli* O157:H7 infection in humans. *Ann Intern Med*;123(9):698–714.

Subils T, Casabonne C, Balagué C.. 2014. The inhibitory effect of colloidal bismuth hydroxide gel on *Escherichia coli* O157:H7 and on the activity of Shiga toxins. *BMC Res Notes*. Dec 4;7:875. doi: 10.1186/1756-0500-7-875.

Szu, S.C. and Ahmed, A.. 2014. Clinical studies of *Escherichia coli* O157:H7 conjugate vaccines in adults and young children. *Microbiol. Spectr.* 2 PMID:26104443.

Tao, P., Mahalingam, M., Marasa, B.S., Zhang, Z., Chopra, A.K., Rao, V.B.. 2013. *In vitro* and *in vivo* delivery of genes and proteins using the bacteriophage T4 DNA packaging machine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:5846 -5851

Tarr, P. I., Neill M.A., Clausen C.R., Watkins S. L., Christie D.L. and Hickman R.O.. 1990. *Escherichia coli* O157:H7 and the hemolytic uremic syndrome: importance of early cultures in establishing the etiology. *J. Infect. Dis.* 162:553–556

Tarr, P.I., Gordon, C.A., Chandler, W.L.. 2005. Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome. *Lancet Lond. Engl.*;365:1073–1086. doi: 10.1016/S0140-6736(05)71144-2.

Teel, L.D., Daly, J.A., Jerris, R.C., Maul, D., Svanas, G., O'Brien, A.D.. 2007. Rapid detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* by optical immunoassay. *J. Clin. Microbiol.* 45, 3377–3380. doi: 10.1128/JCM.00837-07

Te Loo, D.M., Monnens, L.A., Van Der Velden, T.J., Vermeer, M.A., Preyers, F., Demacker, P.N., Van Den Heuvel, L.P., Van Hinsbergh, V.W.. 2000. Binding and transfer of verocytotoxin by polymorphonuclear leukocytes in hemolytic uremic syndrome. *Blood*, 95, 3396–3402.

Tesh, V.L. and O'Brien A.D.. 1991. The pathogenic mechanisms of Shiga toxin and the Shiga-like toxins. *Mol Microbiol*, 5(8): p. 1817-22.

Tesh, V.L.; Ramegowda, B.; Samuel, J.E.. 1994. Purified Shiga-like toxins induce expression of proinflammatory cytokines from murine peritoneal macrophages. *Infect. Immun.*, 62, 5085–5094

Thompson, G.S., Shimizu, H., Homans, S.W., and Donohue-Rolfe, A.. 2000. Localization of the binding site for the oligosaccharide moiety of Gb3 on verotoxin 1 using NMR residual dipolar coupling measurements. *Biochemistry* 39, 13153–13156.

Thorpe, C.M., Hurley, B.P., Lincicome, L.L., Jacewicz, M.S., Keusch, G.T. and Acheson D.W.. 1999. Shiga toxins stimulate secretion of interleukin-8 from intestinal epithelial cells. *Infect Immun*, 67(11): 5985-93.

Thorpe, C.M., Smith, W.E., Hurley, B.P. and Acheson, D.W.. 2001. Shiga toxins induce, superinduce, and stabilize a variety of C-X-C chemokine mRNAs in intestinal epithelial cells, resulting in increased chemokine expression. *Infect Immun*, 69(10): 6140-7.

Torres, A.G.. 2010. Pathogenic *Escherichia coli* in Latin America. Bentham Science; Bentham, UK.

Torres, A.G.. 2016. *Escherichia coli* in the Americas. Springer; Cham, Switzerland.

Tran, S.L.; Billoud, L.; Lewis, S.B.; Phillips, A.D.; Schüller, S.. 2014. Shiga toxin production and translocation during microaerobic human colonic infection with shiga toxin-producing *E. coli* O157:H7 and O104:H4. *Cell. Microbiol.* 16, 1255–1266.

Tyler, J.S., Beeri, K., Reynolds, J.L., Alteri, C.J., Skinner, K.G., Friedman, J.H., Eaton, K.A., Friedman, D.I. 2013. Prophage induction is enhanced and required for renal disease and lethality in an EHEC mouse model. *PLoS Pathog.* 9, e1003236.

Tyler, J.S., Livny, J., and Friedman D.I. 2005. Lambdoid Phages and Shiga Toxin., in *Phages; Their role in Pathogenesis and Biotechnology.*, Waldor M.K., Friedman D.I., and Adhya S., Editors., ASM Press: Washington, D.C. p. 131–164)

Van Setten, P.A., Van Hinsbergh, V.W., Van den Heuvel, L.P., Preyers, F., Dijkman, H.B., Assmann, K.J.. 1998. Monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 levels in urine and serum of patients with hemolytic uremic syndrome *Pediatr. Res.*, 43, pp. 759-767

Virgin H. W.. 2014. The virome in mammalian physiology and disease. *Cell* 157 142–150. 10.1016/j.cell.2014.02.032.

Wagner, P.L., *et al.*, 2002. Bacteriophage control of Shiga toxin 1 production and release by *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 44(4): p. 957–70. pmid:12010491

Waldor, M.K. and Friedman D.. 2005. Phage regulatory circuits and virulence gene expression. *Curr Opin Microbiol.*;8(4):459-65.

Wasilenko, J. L., Fratamico, P.M., Sommers, C., DeMarco, D.R., Varkey, S., Rhoden, K.. 2014. Detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) O157:H7, O26, O45, O103, O111, O121, and O145, and Salmonella in retail raw ground beef using the DuPont™ BAX® system. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 4:81. doi: 10.3389/fcimb.2014.00081

Williams, A.P., McGregor, K.A., Killham, K., and Jones, D.L.. 2008. Persistence and metabolic activity of *Escherichia coli* O157:H7 in farm animal faeces. *FEMS microbiology letters* 287: 168–73.

Wong, C.S., Jelacic, S., Habeeb, R.L., Watkins, S.L., Tarr P.I.. 2000. The Risk of the Hemolytic–Uremic Syndrome after Antibiotic Treatment of *Escherichia coli* O157:H7 Infections. *The New England Journal of Medicine.* 342: p. 1930–1936. pmid:10874060

Wong, C.S., Mooney, J.C., Brandt, J.R., Staples, A.O., Jelacic, S., Boster, D.R., Watkins, S.L., Tarr, P.I.. 2012. Risk factors for the hemolytic uremic syndrome in children infected with *Escherichia coli* O157:H7: a multivariable analysis. *Clin. Infect. Dis.* 55.

Xicohtencatl-Cortes, J., Monteiro-Neto, V., Ledesma, M.A., Jordan, D.M., Francetic, O., Kaper, J.B.. 2007. Intestinal adherence associated with type IV pili of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Clinical Investigation* 117: 3519–3529.

Yamasaki, C.; Natori, Y.; Zeng, X.T.; Ohmura, M.; Yamasaki, S.; Takeda, Y.; Natori, Y.. 1999. Induction of cytokines in a human colon epithelial cell line by Shiga toxin 1 (stx1) and stx2 but not by non-toxic mutant stx1 which lacks n-glycosidase activity. *FEBS Lett.*, 442, 231–234).

Yin, L.M., et al., 2012. Roles of hydrophobicity and charge distribution of cationic antimicrobial peptides in peptide-membrane interactions. *J Biol Chem.* 287(10): p. 7738-45.

Zhang, X., McDaniel, A.D., Wolf, L.E.. 2000. Quinolone antibiotics induce Shiga toxin-encoding bacteriophages, toxin production, and death in mice. *J Infect Dis.*; 181(2): 664–70.

Trabajos Publicados