

PARTICIPACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE EN EL DESARROLLO DEL SÍNDROME URÉMICO HEMOLÍTICO

Palabras clave: *Escherichia coli*; toxina Shiga; SUH
Key words: *Escherichia coli*; Shiga toxin; HUS

La forma típica o post-diarreica del Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) es la complicación más grave de las infecciones por cepas de *Escherichia coli* productoras de toxina Shiga (STEC). En Argentina el SUH es un problema crítico en salud pública, ya que representa la principal causa de falla renal aguda en la infancia, la segunda causa de falla renal crónica, y aporta el 20% de los casos de trasplante renal durante la infancia y la adolescencia. A pesar de los avances en el conocimiento de su patogénesis, el único tratamiento actual de los pacientes con SUH es sintomático, y no existen terapias específicas ni preventivas. En la presente revisión expondremos los conocimientos básicos de los mecanismos patogénicos, profundizando particularmente en los avances referidos a la contribución de la respuesta inmune, y discutiremos los enfoques terapéuticos tradicionales e

innovadores. La esperanza de que una mejor comprensión de la dinámica de transmisión y la patogénesis de esta enfermedad genere nuevos tratamientos más eficaces para prevenir la mortalidad y la morbilidad a largo plazo de las infecciones por cepas STEC y el SUH es la fuerza impulsora para intensificar la investigación en este campo.

The typical form of hemolytic uremic syndrome (HUS) is the major complication of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) infections. HUS is a critical health problem in Argentina since it is the main cause of acute renal failure in children and the second cause of chronic renal failure, accounting for a 20% of renal transplants in children and adolescents in our country. In spite of the extensive research in the field, the mainstay of treatment for patients with HUS is supportive therapy, and there are no specific therapies preventing or ameliorating the disease course. In this review, we present the current knowledge about pathogenic mechanisms with special focus in the contribution of immune response, and discuss traditional and innovative therapeutic approaches. The hope that a better understanding of transmission dynamics and pathogenesis of this disease will produce better therapies to prevent the mortality and the long-term morbidity of STEC-infections and HUS is the driving force for intensify research.

■ INTRODUCCIÓN

El sistema inmunológico participa en un sin fin de procesos, tanto fisiológicos como patológicos, a tra-

vés de sus dos brazos principales: la respuesta innata y la respuesta adaptativa. Entre ambas, mantienen a nuestro organismo sano a pesar de la continua exposición a patógenos

agresores. Pero también el sistema inmune participa directamente en la patogenia o el control de otras enfermedades cuya base no es inmunológica. En este sentido hoy se sabe que

■ **Abrey-Recalde, MJ;**
Cabrera, G;
Fernández-Brando RJ;
Mejías, MP;
Palermo, MS;
Panek CA; Ramos, MV.

Laboratorio de Patogenia e
Inmunología de Procesos
Infecciosos, Instituto de Medicina
Experimental, IMEX-CONICET,
Academia Nacional de Medicina.

la respuesta inflamatoria, manifestación de la respuesta innata, tiene un papel central en las enfermedades cardiovasculares, el cáncer y otras patologías tales como la artritis. Por otro lado, la respuesta adaptativa es explotada en la generación de nuevas vacunas preventivas y terapéuticas no sólo contra enfermedades infecciosas, sino también contra el cáncer o para el tratamiento de enfermedades autoinmunes.

En particular nuestro grupo de trabajo ha estudiado la participación de la respuesta innata y la respuesta adaptativa en la evolución y protección de una enfermedad de gran impacto en la salud pública de nuestro país tal como lo es el Síndrome Urémico Hemolítico típico o epidémico (SUH).

■ GENERALIDADES DEL SUH, IMPORTANCIA EPIDEMIOLÓGICA EN ARGENTINA

El síndrome urémico hemolítico (SUH) es una enfermedad caracterizada por la triada anemia hemolítica microangiopática (ruptura mecánica de glóbulos rojos al pasar por los capilares ocluidos), trombocitopenia (drástica disminución del número de plaquetas en circulación por activación y deposición formando trombos) y daño renal agudo (daño del epitelio tubular y del endotelio glomerular), que afecta principalmente a lactantes y niños de la primera infancia, pudiendo afectar también a ancianos (Karmali 1989).

La forma típica del SUH es usualmente precedida por un episodio de diarrea sanguinolenta luego de la ingestión de alimentos contaminados con cepas enterohemorrágicas de *Escherichia coli* productoras de toxina Shiga (STEC). La toxina Shiga (Stx) es el factor patogénico esencial para el desarrollo del SUH. Dentro de las distintas variantes genéticas

conocidas, la Stx tipo 2 (Stx2) es la más patogénica y la que más se asocia con casos de SUH. La Stx se une a su receptor específico, el globotriaosilceramida (Gb3), presente en el endotelio y epitelio renal, induciendo muerte celular por inhibición de la síntesis proteica. Si bien existen varios serotipos de bacterias STEC capaces de producir enfermedad, en nuestro país el serotipo O157:H7 es el más frecuente (Rivas 2006). El principal órgano afectado es el riñón, aunque también pueden observarse lesiones severas en el sistema nervioso central, el colon y en el miocardio. (Gianantonio 1973).

A diferencia de lo que ocurre en el resto del mundo, donde se producen brotes epidémicos esporádicos de mayor o menor envergadura, en Argentina el SUH es endémico. Esto significa que se presentan casos durante todo el año y distribuidos a lo largo de todo el territorio nacional, alcanzando la mayor incidencia del mundo: 17,5 cada 100000 niños menores de 5 años. Esto convierte al SUH en la primera causa pediátrica de insuficiencia renal aguda y la segunda de insuficiencia renal crónica, siendo además responsable del 20% de los trasplantes renales en niños y adolescentes que se realizan en Argentina (Exeni 2001). La letalidad durante el período agudo ha sido reducida a 3-5%, debido al diagnóstico precoz de la enfermedad, la instauración temprana de la diálisis peritoneal y las transfusiones de sangre para contrarrestar la anemia producida por la destrucción de los glóbulos rojos. Del resto de los pacientes y superada la fase aguda, el 60% se recupera sin tener secuelas. Un 30% continúa con grados variables de disfunción renal que puede durar décadas y un 5% de los niños desarrolla una insuficiencia renal crónica, requiriendo en pocos años hemodiálisis permanente o trasplante renal (Spizzirri 1997).

Esta patología implica un gran costo social y económico para el sistema de salud, no sólo por la alta complejidad de la atención que se requiere durante la etapa aguda, sino porque los niños que han padecido SUH necesitan seguimiento y tratamiento al menos hasta la adolescencia, sin contar los que requieren diálisis o trasplante renal (Caletti 2006).

En Argentina cada año se producen más de 500 nuevos casos de SUH (Rivas 2010). Hasta el presente no se cuenta con tratamientos específicos que logren controlar la evolución de la enfermedad, ni vacunas para prevenirla. El estudio de los mecanismos patogénicos y la epidemiología son la base racional que permite avanzar en el control de esta enfermedad.

■ MODELOS ANIMALES

Los animales de laboratorio son considerados fundamentales en la investigación biomédica y para un empleo apropiado de los mismos se han establecido normas, principios y legislaciones que regulan el uso desde un punto de vista ético (Barassi 1996).

A partir de investigaciones con animales de laboratorio se han generado numerosas vacunas, como las de la rabia, el ántrax, la viruela, el tétanos, la difteria, la tos convulsa y la poliomielitis, y se han conseguido avances importantes en la investigación sobre cáncer, cardiología, trasplantes de órganos, SIDA y otros (Klein 2000).

En el caso del SUH, es necesario el desarrollo de modelos animales que reproduzcan los aspectos de la infección por STEC en humanos para la generación y ensayo de vacunas y estrategias terapéuticas. En este sentido, varios modelos han sido desarrollados para evaluar la

colonización del intestino por las bacterias STEC, y el daño sistémico causado por la toxina Stx (Mohawk 2011).

En nuestro laboratorio se ha optimizado un modelo de infección de ratones en la edad del destete que reproduce varias de las manifestaciones sistémicas de la enfermedad y demuestra que la edad es un factor importante que afecta la susceptibilidad a la infección (Brando 2008). Actualmente, dicho modelo está siendo empleado para investigar las alteraciones que produce la infección de bacterias STEC sobre el sistema inmune del intestino.

Por otra parte, nuestro grupo también emplea un modelo de SUH en el cual se inocula la Stx2 pura en el torrente sanguíneo del ratón, lo que permite analizar los efectos de esta toxina en los distintos tejidos y sistemas, una vez que pasa del intestino a la sangre. En base a este modelo, hemos demostrado que la reacción inflamatoria que acompaña este cuadro es determinante en la evolución y pronóstico de la enfermedad.

■ PARTICIPACIÓN DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA EN EL DESARROLLO DEL SUH

La respuesta inflamatoria es la primera manifestación de la respuesta inmune frente a un agente agresor, en este caso una bacteria que es capaz de dañar el epitelio intestinal y producir una toxina sumamente agresiva para el ser humano. Si bien la inflamación es indispensable para montar una respuesta efectiva que proteja al individuo, su alto poder destructivo requiere estrictos mecanismos de control que limiten el grado y extensión de dicha respuesta inflamatoria. En algunas circunstancias una respuesta inflamatoria desmedida puede llegar a tornarse peligrosa dado que daña el propio

tejido del huésped.

Nuestro grupo de Inmunología ha establecido que la respuesta inflamatoria mediada por los leucocitos polimorfonucleares neutrófilos (PMN), y los monocitos son importantes en la patogénesis del SUH ya que contribuyen al daño endotelial mediado directamente por la Stx, a través de la secreción de enzimas, especies reactivas del oxígeno y citoquinas (Dran 2002, Fernández 2000, Fernández 2006, Fernández 2007, Fernández 2002, Fernández 2012, Fernández 2005, Palermo 1999, Ramos 2007)(Figura 1).

Distintas quimioquinas como la interleuquina 8 (CCL8), la proteí-

na inflamatoria de macrófagos alfa (CCL3), ó el RANTES (CCL5), interactúan con sus receptores específicos presentes en los PMN y/ó monocitos e inducen su reclutamiento en el riñón. Estas células activadas, con alto poder citotóxico, amplifican el daño endotelial mediado directamente por la Stx, potencian la respuesta inflamatoria y contribuyen al desarrollo de la enfermedad (Figura 1, Ramos, 2012). Una evidencia a favor del papel determinante de los PMN y monocitos en la patogénesis del SUH, lo constituye el hecho de que la depleción de estas poblaciones celulares en el modelo murino, disminuye el daño renal y la muerte inducidos por la Stx.

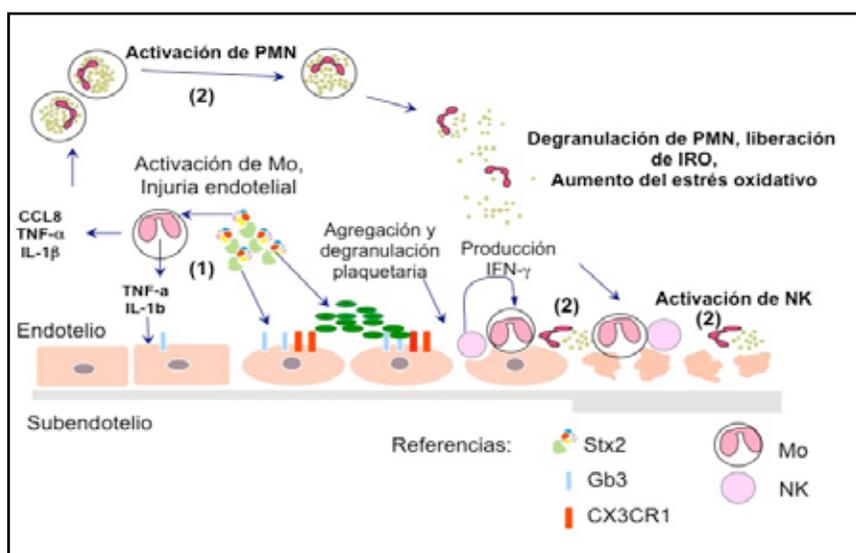


Figura 1: Participación de la respuesta innata en el daño por toxina Shiga (Stx2). En el esquema se representa el daño endotelial producido por diversas vías: **1) daño directo:** se produce por la interacción de la Stx2 con su receptor específico globotriaosilceramida o Gb3 en endotelio. El endotelio injuriado pasa a un estado pro-trombótico e inflamado, que produce citoquinas inflamatorias (TNF-α, IL-1b) y quimioquinas como CCL8. Simultáneamente, la Stx2 activa directamente a los monocitos (Mo) que liberan citoquinas y quimioquinas inflamatorias (TNF-α, IL-1b, CCL-8). **2) daño indirecto:** se produce por la activación de la respuesta innata y está mediado por las citoquinas inflamatorias secretadas por los Mo, cuyo blanco son el endotelio y los otros componentes celulares de la respuesta innata, los polimorfonucleares neutrófilos (PMN) y las células Natural Killer (NK). En el endotelio se induce el aumento en la expresión de Gb3, de la expresión de P- y E-selectinas, y de la molécula de adhesión intercelular ICAM-1, como así también el aumento de la expresión de receptores para quimioquinas (ej. CX3CR1). Por su parte, los PMN y las células NK aumentan su adhesión al endotelio, lo cual promueve el daño a través de mecanismos citotóxicos de ambas poblaciones celulares (PMN: por degranulación e inducción del estallido respiratorio, aumento en la concentración de intermediarios reactivos del oxígeno o IRO y del estrés oxidativo; células NK: por liberación de perforinas).

Paralelamente a la respuesta inflamatoria desencadenada durante el SUH, se activan mecanismos anti-inflamatorios que pueden limitar la toxicidad renal específica de la Stx. Entre ellos, hemos demostrado que los glucocorticoides (GC) endógenos son factores fundamentales en el control de la inflamación durante el SUH (Palermo 2000). Así, la depleción de GC endógenos por adrenalectomía o por el tratamiento con un antagonista del receptor de GC (Ru486), aumenta el daño renal inducido por Stx2 (Gómez 2003). La protección mediada por los GC endógenos se encuentra asociada, al menos en forma parcial, a su capacidad para contrarrestar las funciones inflamatorias de los PMN (Gómez 2005). De esta forma, la interacción entre el sistema inmune y el sistema neuroendócrino modula el nivel de daño generado durante el desarrollo del SUH.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el modelo animal, analizamos algunos parámetros inmunológicos en los pacientes con SUH. Así encontramos que al momento del diagnóstico de SUH, tanto monocitos como PMN, presentan profundas alteraciones fenotípicas y funcionales. Los pacientes presentan un marcado aumento en el número de leucocitos PMN en sangre periférica, pero presentan una capacidad de respuesta francamente disminuida, por lo cual se consideran "agotados". Dado que los PMN son células terminales, mueren luego de participar en un proceso patológico. El hallazgo de los PMN agotados, exhaustos, nos sugiere que estas células sufrieron un proceso previo de activación muy marcado, tras el cual y luego de liberar su potencial tóxico al entorno (contribuyendo al daño de vasos y tejidos) se encuentran con una función disminuida. Contrariamente a los PMN, los monocitos al ser activados se diferencian hacia di-

ferentes fenotipos, que cumplen funciones específicas. En este caso, en los monocitos de los pacientes con SUH se observaron cambios que sugieren un estado *inflamatorio* con mayor capacidad citotóxica. Ambos parámetros, el nivel de agotamiento de los PMN y el perfil inflamatorio de los monocitos, correlacionan con la severidad del cuadro de SUH. Estos datos sugieren que el análisis de los componentes celulares de la respuesta inflamatoria (PMN y monocitos) en los pacientes con SUH aporta una herramienta valiosa no sólo como indicador del pronóstico del paciente, sino que abre una posibilidad de intervención en el proceso patológico. Así, la identificación de los pacientes que cursan un proceso más agresivo permitiría aplicar un tratamiento preventivo en la etapa de la diarrea exclusivamente a aquellos que muestran altas posibilidades de desarrollar SUH.

La respuesta inmune también incluye la posibilidad de montar una respuesta específica protectora, evidenciada en muchos casos por la presencia de anticuerpos. En el caso del SUH, la presencia de anticuerpos anti-Stx que bloquean la toxina ha sido sugerida como indispensable para la no repetición de esta enfermedad. Recientemente estudiamos la presencia de anticuerpos contra la Stx en niños luego de haber sufrido el SUH, y en un grupo de niños controles, sanos (Fernández-Brando 2011). Entre los hallazgos destacamos que efectivamente luego de haber tenido SUH, un mayor porcentaje de niños presentan anticuerpos anti-Stx2, sugiriendo que estos anticuerpos podrían contribuir a prevenir un segundo episodio de SUH. Pero tal vez, más interesante fue encontrar también entre los controles, niños sanos y que no habían padecido SUH en el pasado, un número muy elevado de sueros positivos anti-Stx2 (67%) en compa-

ración a los porcentajes referidos en otros países como Alemania (10%) o Canadá (46%) (Karmali 2003, Ludwig 2001). Además, niños que habían sufrido un episodio de SUH hacía más de 10 años continuaban presentando anticuerpos contra la Stx2. Esto podría estar relacionado al comportamiento endémico de la enfermedad en nuestro país, en el cual un porcentaje alto de nuestra población esta expuesto al agente patógeno sin tener manifestaciones clínicas. Por otra parte, cuando estudiamos la frecuencia de anticuerpos dirigidos contra la Stx1, todos los grupos presentaron frecuencias similarmente bajas, menores al 10%. Estos resultados concuerdan con datos epidemiológicos que muestran una amplia circulación de cepas productoras de Stx2 en la Argentina, y una casi nula presencia de cepas productoras de Stx1.

■ RESERVORIOS Y VÍAS DE TRANSMISIÓN

Numerosos estudios realizados en diferentes países, incluyendo a la Argentina permitieron confirmar que el intestino del ganado vacuno es el mayor reservorio de cepas STEC. Por lo tanto, la principal vía de transmisión de STEC son los alimentos contaminados: productos cárnicos crudos o insuficientemente cocidos, principalmente carne picada en forma de hamburguesas, embutidos fermentados, morcilla; derivados lácteos como leche no pasteurizada, yogur, quesos; pero también papas, lechuga, brotes de soja y alfalfa, jugos de manzana no pasteurizados, y agua, entre otros (Rivas 2006). La contaminación de los alimentos se debe principalmente al contacto con las heces del ganado bovino, en forma directa durante el faenamiento o a través del medioambiente por arrastre del agua de lluvias. Otras formas de transmisión incluyen el contacto directo del hombre con los

animales de granja, la contaminación cruzada durante la preparación de alimentos, y la transmisión persona a persona por la ruta fecal-oral

■ PREVENCIÓN

Existen varias estrategias posibles que podrían ser usadas para reducir la incidencia y/o los efectos de la infección con STEC en humanos. Debido a que el ganado bovino es el principal reservorio de STEC, una opción sería vacunar al ganado con el fin de reducir la carga de STEC y minimizar la contaminación en la carne a ser utilizada en alimentación humana. Algunos de los antígenos blanco incluyen proteínas involucradas en la colonización (proteínas de secreción tipo III, intimina) o el lipopolisacárido O157. Aunque la inmunización del ganado con algunas de estas proteínas fue capaz de montar una respuesta de anticuerpos y de reducir la carga de *E. coli* O157:H7 (Potter 2004), en un estudio comercial a gran escala realizado en Canadá dicha vacunación no aportó grandes beneficios. Diversos estudios han mostrado que si bien estos protocolos de vacunación disminuyen la colonización y la carga bacteriana inicial, todavía no logran controlar la persistencia de estas bacterias en el intestino del bovino (Van Donkersgoed 2005). Otro problema que acarrea la vacunación del ganado es que implicaría la vacunación de un gran número de animales, generando un importante costo económico para la industria ganadera, poco dispuesta a afrontarlo teniendo en cuenta que las infecciones con STEC no interfieren con el rendimiento económico del ganado. Sin embargo, la vacunación no es la única opción de intervención en este punto de la cadena productiva de *la vaca a la boca*. Se ha observado que la administración de un coctel de bacterias *E. coli* no patógenas es capaz de reducir sig-

nificativamente la excreción de *E. coli* O157:H7 en el ganado (Tkalcic 2003, Zhao 1998, Zhao 2003). Estas bacterias no patógenas son capaces de excluir competitivamente a *E. coli* O157:H7 tanto del ganado adulto como de los terneros neonatales y al destete, a través de la producción de colicinas (proteínas que específicamente atacan a *E. coli*). Otra bacteria, *Lactobacillus acidophilus*, también ha demostrado ser capaz de reducir la carga de *E. coli* O157:H7 en el ganado en feedlot hasta un 50% (Brashears 2003, Elam 2003, Younts-Dahl 2005). Este producto se encuentra disponible comercialmente en Estados Unidos (Callaway 2004). Vale aclarar que ninguna de estas intervenciones se realiza actualmente en Argentina.

Otra posible estrategia es la administración de bacteriófagos (virus que específicamente matan bacterias). Los bacteriófagos son altamente específicos, incluso pueden ser específicos contra una sola cepa de bacterias. Por lo tanto, su uso ha sido propuesto como una estrategia para eliminar patógenos en poblaciones microbiológicas mixtas. A pesar de que diversos estudios presentan resultados variables, en algunos se ha observado reducción de los niveles de *E. coli* O157:H7 (Bach 2009, Sheng 2006) resultando, incluso, en una patente en Estados Unidos (Waddell 2002). La principal desventaja del uso de bacteriófagos es que, si bien O157:H7 es el serotipo predominante causante del SUH, no es el único. Por este motivo, deberían considerarse el desarrollo y uso de mezclas de bacteriófagos con capacidad de infectar a distintos serotipos bacterianos, encareciendo la aplicación de este protocolo.

Como se dijo anteriormente, otra opción es la vacunación en humanos. Distintas estrategias se han analizado en modelos animales.

La toxina Shiga posee una subunidad A tóxica unida a un pentámero de subunidades B encargado de la unión a su receptor específico presente en las membranas celulares. Ya que la subunidad B aislada no manifiesta efectos tóxicos, diversos protocolos la han utilizado como inmunógeno (McEwen 1989). Sin embargo, la subunidad B de Stx2, variante epidemiológica y clínicamente más relevante, ha mostrado ser poco inmunogénica y difícil de expresar y purificar, aparentemente por presentar una estructura inestable (Acheson 1995). En nuestro laboratorio hemos generado una vacuna a ADN, que consiste en un plásmido codificante para la subunidad B de Stx2 junto con un pequeño fragmento (la parte que carece de actividad tóxica) de la subunidad A. Esta construcción fue capaz de generar en ratones una respuesta humoral específica que protegió parcialmente (el 50%) de los animales inoculados con una dosis letal de Stx2. Si bien la eficacia de protección mejoró al administrarla conjuntamente con un estimulador de la función y maduración de células dendríticas (sobrevivió el 70% de los animales) (Bentancor 2009), seguimos trabajando en la búsqueda de un inmunógeno que genere una respuesta humoral capaz de proteger al 100% de los animales. Otros grupos han generado proteínas de fusión entre las subunidades B de Stx1 y Stx2 (Gao 2009), entre la subunidad A de Stx2 y la B de Stx1 (Cai 2011), la subunidad B de Stx2 inmunizada por vía oral (Tsuji 2008) o un toxoide de Stx2 expresado en plantas (Wen 2006). En todos estos casos se obtuvieron distintos grados de protección parcial en el modelo murino. El desarrollo de un inmunógeno eficaz y seguro, que genere una respuesta humoral protectora, capaz de neutralizar o bloquear a la toxina Stx2 de manera eficiente es el punto clave para luego generar una vacuna profiláctica

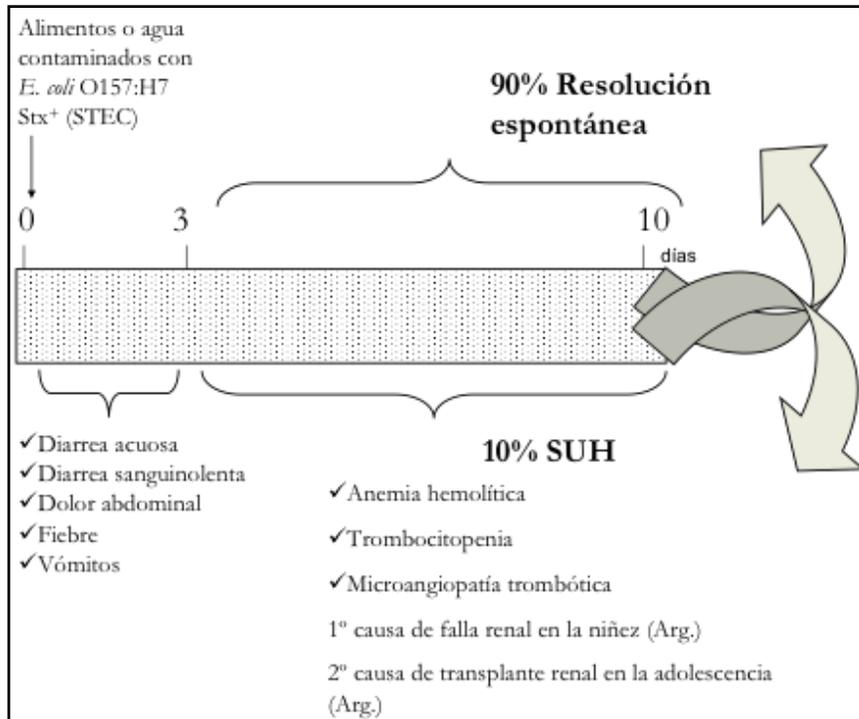


Figura 2: Esquema de progresión de las infecciones por *E. coli* O157:H7 en niños. Dentro de los 3 días posteriores a la ingesta de las bacterias, el paciente desarrolla diarrea, dolor abdominal, fiebre, vómitos. Luego de 1-2 días (o a veces antes) la diarrea suele transformarse en sanguinolenta en el 80-90% de los casos. Durante estas instancias los pacientes presentan un recuento de plaquetas normal, función renal conservada y hematocrito normal, sin fragmentación de glóbulos rojos. Sin embargo, ya pueden observarse ciertos parámetros de activación tanto de la respuesta inflamatoria como de los sistemas de coagulación y fibrinolítico. Aún así, en el 90% de los casos la infección se resuelve espontáneamente, sin desarrollar el SUH en su forma completa. Dentro de los niños que evolucionan a SUH, el 70-80% se resolverá sin dejar secuelas, el 25-30% quedará con distintos grados de disfunción neurológica y/o renal, y en menos del 5% de los casos, generalmente aquellos casos con compromiso neurológico temprano y agudo, su desenlace será la muerte.

o una vacuna terapéutica. Más allá de los inconvenientes técnicos que dificultan la obtención de un buen inmunógeno, para implementar una nueva vacuna profiláctica se deben contemplar otros aspectos como la incidencia, la relación costo-eficacia, etc. Sin embargo, el desarrollo de un inmunógeno efectivo contra Stx2 es un objetivo válido para desarrollar vacunas terapéuticas o anticuerpos protectores para administrar durante un brote epidémico por contaminación con cepas patógenas STEC, en el período ventana entre el desarrollo de los signos y síntomas de infección gastrointestinal y el desarrollo de su complicación

sistémica (Figura 2). En este sentido el brote ocurrido durante el año 2011 en Europa, específicamente en Alemania y Francia (Beutin 2012, Borgatta 2012, Werber 2012), en el que se produjeron más de 800 casos de SUH y alrededor de 60 muertes, mostró las consecuencias de no contar con un agente terapéutico específico para prevenir el SUH durante un brote masivo.

Otra estrategia ha sido el desarrollo de una vacuna a base del componente mayoritario de la parte externa de las bacterias *E. coli* O157:H7, el lipopolisacárido (LPS) (Ahmed 2006). Aunque esta vacuna

se encuentra en fase III, y ha sido aplicada a un grupo piloto de niños en Estados Unidos, ha mostrado inducir una respuesta de anticuerpos séricos anti-LPS O157 que decae muy rápidamente y no se aportaron datos del nivel de anticuerpos generados en mucosas. Por lo tanto esta vacuna tiene dos desventajas: solo estaría protegiendo los casos de SUH desarrollados luego de las infecciones con cepas STEC del serotipo O157:H7, y además la protección sería de corta duración.

■ TRATAMIENTO

Aunque se ha discutido mucho acerca de las ventajas y desventajas del uso de antibióticos durante la etapa previa al SUH, actualmente existe consenso acerca de que el tratamiento con antibióticos está contraindicado en casos de sospecha o confirmación de infecciones con STEC entéricos (Wong 2000), fundamentalmente porque estos agentes inducen mayor producción o liberación de toxina (Wong 2000), lo que aumenta el daño al huésped.

La base del tratamiento para los pacientes con SUH es la terapia de apoyo, que generalmente incluye: control de fluidos y electrolitos, control de la hipertensión, y uso de diálisis y transfusiones de sangre, según se requiera, no existiendo hasta el momento alguna intervención específica previa o durante las primeras etapas de la enfermedad que logren controlar el nivel de daño en los tejidos blanco.

Sin embargo, durante los últimos diez años se han ensayado distintas estrategias terapéuticas específicas. Uno de los primeros enfoques en la búsqueda de tratamientos específicos que despertó gran interés entre los nefrólogos pediátricos, fue la idea de adsorber la Stx libre en el intestino a través de compuestos

amorfos ó inertes. Con este fin, se desarrolló y ensayó un compuesto derivado de diatomeas unido a una cadena de oligosacárido conocido con el nombre comercial Synsorb® Pk, para ser administrado oralmente. Sin embargo, a pesar de su alto potencial para unir y neutralizar la Stx *in vitro*, cuando se lo probó en ensayos clínicos, no resultó beneficioso en prevenir o disminuir la severidad de las complicaciones sistémicas (Palermo 2009). Luego se desarrollaron diversas estrategias con fines similares, que incluyeron polímeros de Gb3 o bacterias recombinantes que expresan el receptor Gb3 en su membrana, los cuales arrojaron buenos resultados al ser ensayados en modelos animales pero nunca fueron probados en humanos (Paton 2001). El mayor inconveniente que tienen estos tratamientos experimentales es que aún trazas de Stx que logren escapar de sus agentes bloqueantes en el intestino e ingresar a la circulación, serían suficientes para inducir el SUH. Debido a estas consideraciones, se comenzaron a desarrollar polímeros del receptor para Gb3 para ser administrados por vía sistémica. Entre ellos, Starfish es un nuevo compuesto que une Stx con 1000 veces mayor eficiencia que Synsorb® Pk y se administra por vía endovenosa. Sin embargo, este compuesto mostró buena capacidad para unir y neutralizar Stx1 pero no Stx2. Dado que la variante Stx2, es la que presenta mayor potencial para desencadenar SUH, se desarrolló un nuevo compuesto denominado Daisy, que al menos experimentalmente tiene capacidad para neutralizar la Stx1 y la Stx2. Con este mismo objetivo, un grupo japonés creó otro compuesto llamado SUPER TWIGS, que está formado por 18 trisacáridos de globotriaosilceramida, que no sólo une la Stx en circulación sino que induce su captación y eliminación por los macrófagos (Nishikawa 2005).

Más recientemente, diversos laboratorios han desarrollado anticuerpos monoclonales, humanizados o no, para ser administrados en el período ventana entre la aparición de la diarrea sanguinolenta, una vez confirmada su asociación con bacterias STEC (Mukherjee 2002). La idea es esencialmente la misma: bloquear la toxina Stx2 antes de que interactúe con su receptor presente en la membrana de las células blanco. En la actualidad existen evidencias suficientes que han demostrado que el agente que pretenda bloquear la toxina debe tener una alta capacidad de unión ó afinidad, en el caso de tratarse de anticuerpos, y que este complejo toxina-bloqueante sea eliminado de la circulación de manera eficiente.

Otra estrategia en fase aún experimental, que ha mostrado algunos resultados promisorios, es el uso de drogas que bloquean transitoria y reversiblemente la síntesis de los receptores Gb3 (Silberstein 2009). Estas drogas, que se usan para el tratamiento de la enfermedad de Fabry, podrían ser usadas en la etapa previa al diagnóstico de SUH para disminuir la expresión de receptores específicos y de esta manera el nivel de daño a los tejidos.

Incluso cuando algunos de los tratamientos específicos que están siendo ensayados resulten aprobados para su aplicación, la eficacia de los mismos depende de su implementación sumamente temprana. Por lo tanto, son imperativos la educación de la comunidad que permita instaurar la idea de la necesidad de una consulta rápida con los especialistas ante la presencia de diarrea, el mejoramiento de los sistemas de vigilancia y salud que permitan la toma de muestra biológica con la suficiente premura, y el desarrollo de métodos de diagnóstico simples y económicos, que posibiliten su implementación en todos los pun-

tos del país, junto con la identificación de indicadores o predictores de mala evolución, para identificar aquéllos niños con alta probabilidad de desarrollar complicaciones.

■ PERSPECTIVAS ACTUALES DE CONTROL

Como se ha discutido, no hay perspectivas a corto plazo de contar con la aplicación de protocolos de inmunización en ganado bovino o en seres humanos, y/o tratamientos específicos para prevenir o controlar el daño durante el SUH. Por lo tanto, nuestra mejor forma de disminuir los estragos producidos por el SUH es la prevención, y para esto lo mejor es prevenir las infecciones primarias con STEC. Particularmente en nuestro país, se requieren controles más estrictos en todos los puntos de la cadena alimentaria que aseguren el cumplimiento de las leyes y normativas de control bromatológico, y políticas educativas dirigidas a toda la población, específicas y sostenidas en el tiempo, que permitan a todos los consumidores y especialmente a aquellos que manipulan alimentos para la población de riesgo, conocer las medidas sanitarias necesarias para tener una alimentación segura. La amplia difusión de las medidas de prevención básicas aconsejadas por la Sociedad Argentina de Pediatría y organizaciones no gubernamentales que trabajan para el control de esta enfermedad (www.lusuh.org.ar) podría ser una ayuda importante.

■ REFERENCIAS

- Acheson DW, De Breucker SA, Jacewicz M, Lincicome LL, Donohue-Rolfe A, Kane AV, Keusch GT. Expression and purification of Shiga-like toxin II B subunits. *Infection and Immunity* 63: 301-308. 1995.
- Ahmed A, Li J, Shiloach Y, Robbins JB, Szu SC. Safety and immunogeni-

- city of *Escherichia coli* O157 O-specific polysaccharide conjugate vaccine in 2-5-year-old children. *Journal of Infectious Diseases* 193: 515-521. 2006.
- Bach SJ, R. P. Johnson, K. Stanford, and McAllister T. A. Bacteriophages reduce *Escherichia coli* O157:H7 levels in experimentally inoculated sheep. *Canadian Journal of Animal Science* 89: 285-293. 2009.
- Barassi N, Benavides F, Ceccarelli A. [Ethics in the use of experimental animals]. *Medicina (B Aires)* 56: 531-532. 1996.
- Bentancor LV, Bilen M, Brando RJ, Ramos MV, Ferreira LC, Ghiringhelli PD, Palermo MS. A DNA vaccine encoding the enterohemorrhagic *Escherichia coli* Shiga-like toxin 2 A2 and B subunits confers protective immunity to Shiga toxin challenge in the murine model. *Clinical and Vaccine Immunology* 16: 712-718. 2009.
- Beutin L, Martin A. Outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) O104:H4 infection in Germany causes a paradigm shift with regard to human pathogenicity of STEC strains. *Journal of Food Protection* 75: 408-418. 2012.
- Borgatta B, Kmet-Lunacek N, Rello J. E. coli O104:H4 outbreak and haemolytic-uraemic syndrome. *Medicina Intensiva*. In press doi:10.1016/j.medint.2011.11.022. 2012
- Brando RJ, Miliwebsky E, Bentancor L, Deza N, Baschkier A, Ramos MV, Fernandez GC, Meiss R, Rivas M, Palermo MS. Renal damage and death in weaned mice after oral infection with Shiga toxin 2-producing *Escherichia coli* strains. *Clinical & Experimental Immunology* 153: 297-306. 2008.
- Brashears MM, Galyean ML, Lonergan GH, Mann JE, Killinger-Mann K. Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 and performance by beef feedlot cattle given *Lactobacillus* direct-fed microbials. *Journal of Food Protection* 66: 748-754. 2003.
- Cai K, Gao X, Li T, Wang Q, Hou X, Tu W, Xiao L, Tian M, Liu Y, Wang H. Enhanced immunogenicity of a novel Stx2Am-Stx1B fusion protein in a mice model of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 infection. *Vaccine* 29: 946-952. 2011.
- Caletti MG, Petetta D, Jaitt M, Casaliba S, Gimenez A. [Hemolytic uremic syndrome (HUS): medical and social costs of treatment]. *Medicina (B Aires)* 66 (3): 22-26. 2006.
- Callaway TR, Anderson RC, Edrington TS, Genovese KJ, Bischoff KM, Poole TL, Jung YS, Harvey RB, Nisbet DJ. What are we doing about *Escherichia coli* O157:H7 in cattle? *Journal of Animal Science* 82 E-Suppl: E93-99. 2004.
- Dran GI, Fernandez GC, Rubel CJ, Bermejo E, Gomez S, Meiss R, Isturiz MA, Palermo MS. Protective role of nitric oxide in mice with Shiga toxin-induced hemolytic uremic syndrome. *Kidney International* 62: 1338-1348. 2002.
- Elam NA, Gleghorn JF, Rivera JD, Galyean ML, Defoor PJ, Brashears MM, Younts-Dahl SM. Effects of live cultures of *Lactobacillus acidophilus* (strains NP45 and NP51) and *Propionibacterium freudenreichii* on performance, carcass, and intestinal characteristics, and *Escherichia coli* strain O157 shedding of finishing beef steers. *Journal of Animal Science* 81: 2686-2698. 2003.
- Exeni R. Síndrome Urémico Hemolítico. *Archivos Latinoamericanos de Nefrología Pediátrica* 1: 35-56. 2001.
- Fernandez-Brando RJ, Bentancor LV, Mejias MP, Ramos MV, Exeni A, Exeni C, Laso Mdel C, Exeni R, Isturiz MA, Palermo MS. Antibody response to Shiga toxins in Argentinean children with enteropathic hemolytic uremic syndrome at acute and long-term follow-up periods. *PLoS One* 6: e19136. 2011.
- Fernandez GC, Rubel C, Dran G, Gomez S, Isturiz MA, Palermo MS. Shiga toxin-2 induces neutrophilia and neutrophil activation in a murine model of hemolytic uremic syndrome. *Clinical Immunology* 95: 227-234. 2000.
- Fernandez GC, Lopez MF, Gomez SA, Ramos MV, Bentancor LV, Fernandez-Brando RJ, Landoni VI, Dran GI, Meiss R, Isturiz MA, Palermo MS. Relevance of neutrophils in the murine model of haemolytic uraemic syndrome: mechanisms involved in Shiga toxin type 2-induced neutrophilia. *Clinical & Experimental Immunology* 146: 76-84. 2006.
- Fernandez GC, Gomez SA, Ramos MV, Bentancor LV, Fernandez-Brando RJ, Landoni VI, Lopez L, Ramirez F, Diaz M, Alduncin M, Grimoldi I, Exeni R, Isturiz MA, Palermo MS. The functional state of neutrophils correlates with the severity of renal dysfunction in children with hemolytic uremic syndrome. *Pediatric Research* 61: 123-128. 2007.

- Fernandez GC, Rubel C, Barrionuevo P, Lopez L, Ramirez F, Diaz M, Isturiz MA, Palermo MS. Phenotype markers and function of neutrophils in children with hemolytic uremic syndrome. *Pediatric Nephrology* 17: 337-344. 2002.
- Fernandez GC, Ramos MV, Landoni VI, Bentancor LV, Fernandez-Brando RJ, Exeni R, Laso MD, Exeni A, Grimoldi I, Isturiz MA, Palermo MS. Cytokine Production Is Altered in Monocytes from Children with Hemolytic Uremic Syndrome. *Journal of Clinical Immunology*. 32:622-631. 2012.
- Fernandez GC, Ramos MV, Gomez SA, Dran GI, Exeni R, Alduncin M, Grimoldi I, Vallejo G, Elias-Costa C, Isturiz MA, Palermo MS. Differential expression of function-related antigens on blood monocytes in children with hemolytic uremic syndrome. *Journal of Leukocyte Biology* 78: 853-861. 2005.
- Gao X, Cai K, Shi J, Liu H, Hou X, Tu W, Xiao L, Wang Q, Wang H. Immunogenicity of a novel Stx2B-Stx1B fusion protein in a mice model of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 infection. *Vaccine* 27: 2070-2076. 2009.
- Gianantonio CA, Vitacco M, Mendilaharsu F, Gallo GE, Sojo ET. The hemolytic-uremic syndrome. *Nephron* 11: 174-192. 1973.
- Gomez SA, Fernandez GC, Vanzulli S, Dran G, Rubel C, Berki T, Isturiz MA, Palermo MS. Endogenous glucocorticoids attenuate Shiga toxin-2-induced toxicity in a mouse model of haemolytic uraemic syndrome. *Clinical & Experimental Immunology* 131: 217-224. 2003.
- Gomez SA, Fernandez GC, Camerano G, Dran G, Rosa FA, Barrionuevo P, Isturiz MA, Palermo MS. Endogenous glucocorticoids modulate neutrophil function in a murine model of haemolytic uraemic syndrome. *Clinical & Experimental Immunology* 139: 65-73. 2005.
- Karmali MA, Mascarenhas M, Petric M, Dutil L, Rahn K, Ludwig K, Arbus GS, Michel P, Sherman PM, Wilson J, Johnson R, Kaper JB. Age-specific frequencies of antibodies to *Escherichia coli* verocytotoxins (Shiga toxins) 1 and 2 among urban and rural populations in southern Ontario. *Journal of Infectious Diseases* 188: 1724-1729. 2003.
- Karmali MA. Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews* 2: 15-38. 1989.
- Klein S. El uso de animales en la investigación biomédica. *Revista Ciencia hoy en línea* 10: 55. 2000.
- Ludwig K, Karmali MA, Sarkim V, Bobrowski C, Petric M, Karch H, Müller-Wiefel DE. Antibody response to Shiga toxins Stx2 and Stx1 in children with enteropathic hemolytic-uremic syndrome. *Journal of Clinical Microbiology* 39: 2272-2279. 2001.
- McEwen J, Leitner M, Harari I, Arnon R. Expression of Shiga toxin epitopes in *E. coli* immunological characterization. *Immunology Letters* 21: 157-163. 1989.
- Mohawk KL, O'Brien AD. Mouse models of *Escherichia coli* O157:H7 infection and shiga toxin injection. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2011: 258185. 2011.
- Mukherjee J, Chios K, Fishwild D, Hudson D, O'Donnell S, Rich SM, Donohue-Rolfe A, Tzipori S. Human Stx2-specific monoclonal antibodies prevent systemic complications of *Escherichia coli* O157:H7 infection. *Infection and Immunity* 70: 612-619. 2002.
- Nishikawa K, Matsuoka K, Watanabe M, Igai K, Hino K, Hatano K, Yamada A, Abe N, Terunuma D, Kuzuhara H, Natori Y. Identification of the optimal structure required for a Shiga toxin neutralizer with oriented carbohydrates to function in the circulation. *Journal of Infectious Diseases* 191: 2097-2105. 2005.
- Palermo M, Alves-Rosa F, Rubel C, Fernandez GC, Fernandez-Alonso G, Alberto F, Rivas M, Isturiz M. Pretreatment of mice with lipopolysaccharide (LPS) or IL-1beta exerts dose-dependent opposite effects on Shiga toxin-2 lethality. *Clinical & Experimental Immunology* 119: 77-83. 2000.
- Palermo MS, Alves Rosa MF, Van Rooijen N, Isturiz MA. Depletion of liver and splenic macrophages reduces the lethality of Shiga toxin-2 in a mouse model. *Clinical & Experimental Immunology* 116: 462-467. 1999.
- Palermo MS, Exeni RA, Fernandez GC. Hemolytic uremic syndrome: pathogenesis and update of interventions. *Expert Review of Anti-infective Therapy* 7: 697-707. 2009.
- Paton AW, Morona R, Paton JC. Neutralization of Shiga toxins Stx1, Stx2c, and Stx2e by recombinant bacteria expressing mimics of globotriose and globotetraose. *Infection and Immunity* 69: 1967-1970. 2001.
- Potter AA, Klashinsky S, Li Y, Frey E, Townsend H, Rogan D, Erickson G, Hinkley S, Klopfenstein

- T, Moxley RA, Smith DR, Finlay BB. Decreased shedding of *Escherichia coli* O157:H7 by cattle following vaccination with type III secreted proteins. *Vaccine* 22: 362-369. 2004.
- Ramos MV, Auvynet C, Poupel L, Rodero M, Mejias MP, Panek CA, Vanzulli S, Combadiere C, Palermo M. Chemokine receptor CCR1 disruption limits renal damage in a murine model of hemolytic uremic syndrome. *The American Journal of Pathology* 180: 1040-1048. 2012.
- Ramos MV, Fernandez GC, Patey N, Schierloh P, Exeni R, Grimoldi I, Vallejo G, Elias-Costa C, Del Carmen Sasiain M, Trachtman H, Combadiere C, Proulx F, Palermo MS. Involvement of the fractalkine pathway in the pathogenesis of childhood hemolytic uremic syndrome. *Blood* 109: 2438-2445. 2007.
- Rivas M, Miliwebsky E, Chinen I, Roldán CD, Balbi L, García B, Fiorilli G, Sosa-Estani S, Kincaid J, Rangel J, Griffin PM;. The Case-Control Study Group: Characterization and epidemiologic subtyping of Shiga toxin producing *Escherichia coli* strains isolated from hemolytic uremic syndrome and diarrhea cases in Argentina. *Foodborne Pathogens and Disease* 3: 88-96. 2006.
- Rivas M, Padola, N. L., Lucchesi, P. M. A., Masana, M. Diarrheagenic *Escherichia coli* in Argentina. In Torres AGE (ed)^(eds): *Pathogenic Escherichia coli in Latin America*, Bentham Science Publishers Ltd. 142-161. 2010.
- Sheng H, Knecht HJ, Kudva IT, Hovde CJ. Application of bacteriophages to control intestinal *Escherichia coli* O157:H7 levels in ruminants. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 5359-5366. 2006.
- Silberstein C, Copeland, DP, Chiang, W., Repetto, HA., Ibarra C. A Glucosylceramide synthase inhibitor prevents the cytotoxic effects of Shiga Toxin-2 on human renal tubular epithelial cells. *Journal of Epithelial Biology & Pharmacology* 1: 71-75. 2009.
- Spizzirri FD, Rahman RC, Bibiloni N, Ruscasso JD, Amoreo OR. Childhood hemolytic uremic syndrome in Argentina: long-term follow-up and prognostic features. *Pediatric Nephrology* 11: 156-160. 1997.
- Tkalcic S, Zhao T, Harmon BG, Doyle MP, Brown CA, Zhao P. Fecal shedding of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in weaned calves following treatment with probiotic *Escherichia coli*. *Journal of Food Protection* 66: 1184-1189. 2003.
- Tsuji T, Shimizu T, Sasaki K, Shimizu Y, Tsukamoto K, Arimitsu H, Ochi S, Sugiyama S, Taniguchi K, Neri P, Mori H. Protection of mice from Shiga toxin-2 toxemia by mucosal vaccine of Shiga toxin 2B-His with *Escherichia coli* enterotoxin. *Vaccine* 26: 469-476. 2008.
- Van Donkersgoed J, Hancock D, Rogan D, Potter AA. *Escherichia coli* O157:H7 vaccine field trial in 9 feedlots in Alberta and Saskatchewan. *The Canadian Veterinary Journal* 46: 724-728. 2005.
- Waddell TE, A. Mazzocco, J. Pacan, R. Ahmed, R. Johnson, C. Poppe, and Khakhria, R. Use of bacteriophages for control of *Escherichia coli* O157:H7. In (ed)^(eds): U.S.: 2002.
- Wen SX, Teel LD, Judge NA, O'Brien AD. A plant-based oral vaccine to protect against systemic intoxication by Shiga toxin type 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 7082-7087. 2006.
- Werber D, Krause G, Frank C, Fruth A, Flieger A, Mielke M, Schaade L, Stark K. Outbreaks of virulent diarrhoeagenic *Escherichia coli* - are we in control? *BMC Medicine* 10: 11. 2012.
- Wong CS, Jelacic S, Habeeb RL, Watkins SL, Tarr PI. The risk of the hemolytic-uremic syndrome after antibiotic treatment of *Escherichia coli* O157:H7 infections. *The New England Journal of Medicine* 342: 1930-1936. 2000.
- Younts-Dahl SM, Osborn GD, Galyean ML, Rivera JD, Lonergan GH, Brashears MM. Reduction of *Escherichia coli* O157 in finishing beef cattle by various doses of *Lactobacillus acidophilus* in direct-fed microbials. *Journal of Food Protection* 68: 6-10. 2005.
- Zhao T, Doyle MP, Harmon BG, Brown CA, Mueller PO, Parks AH. Reduction of carriage of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in cattle by inoculation with probiotic bacteria. *Journal of Clinical Microbiology* 36: 641-647. 1998.
- Zhao T, Tkalcic S, Doyle MP, Harmon BG, Brown CA, Zhao P. Pathogenicity of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in neonatal calves and evaluation of fecal shedding by treatment with probiotic *Escherichia coli*. *Journal of Food Protection* 66: 924-930. 2003.