



Estrés celular y acción de antibióticos sobre bacterias productoras de toxinas

Farm. Natalia Angel Villegas

Tesis de Doctorado

Año 2014

IMBIV-CONICET

Departamento de Farmacia - Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Nacional de Córdoba

DIRECTORA:

Dra. María Gabriela Paraje

COMISIÓN ASESORA:

Dra. María Cecilia Becerra

Dra. Susana Genti

Dra. Andrea Smania

RESUMEN

Escherichia coli productor de toxina Shiga (STEC) es un patógeno emergente transmitido por alimentos, asociado frecuentemente a casos de Síndrome Urémico Hemolítico (SUH). En Argentina es endémico con un promedio de 450 a 500 casos por año, siendo el país del mundo con mayor incidencia de esta enfermedad.

STEC posee diversos factores de virulencia, pero la acción de la toxina Shiga (Stx) es determinante para la patología del SUH. Recientemente se ha descrito la capacidad de formar biofilms y esto podría ser considerado un factor de virulencia adicional como estrategia de supervivencia.

Hasta el presente no existe una terapia específica para el tratamiento de las infecciones por STEC y aunque es susceptible a los antibióticos (ATBs) usados comúnmente, la utilización de terapia antimicrobiana es controvertida debido al efecto sobre la inducción del ciclo lítico del fago que contiene los genes que codifican para Stx. Recientes publicaciones sugieren que los ATBs convencionales aumentan el riesgo de SUH en pacientes infectados con STEC debido a que desencadenan en estas bacterias una respuesta SOS que promueve la liberación de Stx. Se ha demostrado que ciertos ATBs no sólo inducen la replicación y expresión de los genes *stx*, sino que como consecuencia de la lisis bacteriana, también aumentan la liberación de Stx. Sin embargo, estudios clínicos han revelado resultados contradictorios y sigue siendo un tema muy controvertido.

Cada vez hay más evidencias de que el mecanismo de muerte celular iniciada por algunos ATBs incluye la producción de especies reactivas del oxígeno (ERO) como mecanismo secundario al mecanismo principal, incluso existen antecedentes

que han indicado que el estrés oxidativo constituye una posible causa del daño bacteriano generado por distintos antimicrobianos.

En esta tesis doctoral se planteó como objetivo principal esclarecer aspectos metabólicos y fisiológicos en relación al estrés celular que sufren las células del biofilm de STEC al ser sometidas a diferentes condiciones de cultivo. Además, se propuso evaluar la existencia de factores que podrían modificar la liberación de Stx desde el biofilm y la acción de la toxina sobre células sensibles.

Los resultados obtenidos permitieron demostrar que diferentes condiciones de cultivo tuvieron influencia sobre la formación del biofilm y se pudo observar que esta formación estuvo directamente relacionada al estrés oxidativo. En condiciones de cultivo que resultaron favorables para la formación del biofilms, como el agregado de glúcidos (glucosa, manosa y maltosa) o un medio reductor (con y sin agregado de azúcares), se evidenció una disminución de ERO y especies reactivas del nitrógeno (ERN) con niveles de enzimas antioxidantes tales como superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT) bajos. En condiciones de cultivo desfavorables como el uso de un agente estresante exógeno o en presencia de ATBs tales como ciprofloxacina (CIP), rifaximina (RIF) y fosfomicina (FOS), la biomasa del biofilms disminuyó; siendo CIP capaz de reducir la misma en mayor medida. También hubo una disminución en las ERO y ERN con aumentos marcados en la actividad de las enzimas SOD y CAT sugiriendo que el desarrollo del biofilm de STEC estaría influenciado por la producción de metabolitos oxidantes y la respuesta de las defensas antioxidantes. Los tres ATBs utilizados mostraron diferencias significativas tanto en la reducción del biofilm como en el desbalance oxidativo siendo más marcado este desbalance con CIP.

El uso de secuestrantes utilizados para evaluar el estrés oxidativo causado por CIP en los biofilms de STEC, permitió observar una variación dosis dependiente de la biomasa del biofilm. En presencia de un secuestrante específico de anión superóxido como el Tirón, se evidenció un aumento significativo en la formación del biofilm en todas las concentraciones de CIP estudiadas con respecto al basal sin agregado de antioxidante. Glutación (un antioxidante no enzimático preformado en las células) y ácido ascórbico (un compuesto capaz de oxidarse cediendo sus electrones y evitando la oxidación de otros compuestos) también disminuyeron el estrés oxidativo generado por CIP. La utilización de estos tres antioxidantes permitió observar un aumento en los niveles de nitritos lo cual indicaría que las ERN también estarían involucradas en la generación del estrés oxidativo inducido por CIP.

Además, se evidenció que el biofilm de STEC fue capaz de liberar Stx y esto incrementó cuando éste fue expuesto a una condición estresante (agregado de CIP) ya que el efecto citotóxico de Stx sobre células sensibles como las Vero, aumentó significativamente con el incremento del estrés oxidativo. Se observaron diferencias en la liberación de toxina desde los biofilms de STEC expuestos a los ATBs utilizados, siendo mayor con CIP, mientras que RIF y FOS no modificaron la liberación de toxina o incluso en algunas concentraciones la disminuyeron. Estos resultados corroboran lo encontrado por otros investigadores en bacterias planctónicas quienes describen que los ATBs que actúan sobre la síntesis de ADN aumentan la producción de Stx, mientras que los que actúan sobre la síntesis de proteínas y de la pared celular inhiben la producción de Stx. Por otro lado, indican que la inducción de la replicación de profagos que contienen genes *stx* ocurre no solo en presencia de ATBs que interfieren con el ADN sino también bajo condiciones de estrés oxidativo. En este trabajo de tesis, la liberación de toxinas pudo ser

revertida, al menos parcialmente por agentes exógenos secuestrantes o inhibidores de ERO con un marcado aumento de óxido nítrico, posiblemente porque este último reduce drásticamente la expresión de *recA* suprimiendo la respuesta SOS bacteriana inducida por agentes que dañan el ADN y de esta manera inhibe la replicación del fago y la expresión de Stx en STEC.

En los distintos capítulos de esta tesis doctoral se comprueba el rol del estrés oxidativo en la formación del biofilm de STEC y la liberación de toxina Shiga, concluyendo que existe una relación entre ellos. El estudio de diferentes efectores implicados en la liberación de toxinas durante la formación de biofilms podría contribuir a una mejor comprensión de la patogénesis de STEC.

ABREVIATURAS

AA	ácido ascórbico
AMH	agar Müller Hinton
ATB	antibiótico
ATS	agar Tripteína Soya
CAT	catalasa
CIM	concentración inhibitoria mínima
CIP	ciprofloxacina
CLSI	Clinical Laboratory Standards Institute
CTS	caldo tripteína soya
CV	cristal violeta
DMSO	dimetilsulfóxido
DO	densidad óptica
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
EMB	eosina azul de metileno
EPS	sustancia polimérica extracelular
ERN	especies reactivas del nitrógeno
ERO	especies reactivas del oxígeno

FOS	fosfomicina
FRAP	“Ferrous Reduction Antioxidant Potency”
Gb3	globotriaosilceramida
Glu	glucosa
GSH	glutación reducido
LPS	lipopolisacárido
MBEC	concentración de erradicación mínima de biofilms
MEM	“Minimum Essential <i>Media</i> ”
NBT	azul de nitrotetrazolio – “ <i>nitroblue tetrazolium</i> ”
ONOO ⁻	peroxinitrito
OH [•]	radical hidroxilo
¹ O ₂	oxígeno singlete
O ₂ ^{•-}	anión superóxido
ON	óxido nítrico
PBS	buffer fosfato salino
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
QL	quimioluminiscencia
QS	“Quorum Sensing”
RC	rojo congo

RIF	rifaximina
SOD	superóxido dismutasa
SFB	suero fetal bovino
SMAC	agar MacConkey sorbitol
STEC	<i>E. coli</i> productor de toxina Shiga
Stx	toxina Shiga
Stx1	toxina Shiga tipo 1
Stx2	toxina Shiga tipo 2
SUH	Síndrome Urémico Hemolítico
TPTZ	2,4,6-tris (2-piridil)-1,3,5-triazina
UBB	unidad de biomasa de biofilms
UFC	unidades formadoras de colonias
URL	unidades relativas de luz

Capítulo 1: INTRODUCCIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

INTRODUCCIÓN

1.1 *Escherichia coli* productor de toxina Shiga

Escherichia coli productor de toxina Shiga (STEC¹) es considerado un patógeno emergente transmitido por alimentos, asociado a casos esporádicos y brotes de diarrea, colitis hemorrágica y Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) (Rivas y col, 2008).

STEC fue descrito por primera vez por Knowalchuk y col. en 1977, quienes informaron que cepas de *E. coli* de los serogrupos O18, O26, O111 y O128 aisladas de niños con diarrea producían una toxina a la que se denominó Verotoxina, debido al efecto citotóxico en células Vero (células de riñón de mono africano verde). Pocos años después O'Brien y col. (1982) aislaron cepas de *E. coli* que producían efecto citotóxico, el que podía ser neutralizado por un antisuero anti-toxina Shiga de *Shigella dysenteriae* tipo 1, por lo cual se las llamó "Shiga – like toxin". En 1983, el serotipo *E. coli* O157:H7 es identificado por primera vez como patógeno humano (Riley y col., 1983) y siguiendo estos estudios se encontró que las cepas STEC estaban asociadas a colitis hemorrágica. La asociación entre SUH e infección por STEC se demostró primero en Canadá en 1983 (Karmali y col., 1983) y posteriormente se confirmó en distintos países (Bergan y col., 2012).

STEC es el agente etiológico más comúnmente asociado al SUH en Argentina. Existen más de 200 serotipos de STEC que comparten el mismo potencial patogénico y causan enfermedades en los seres humanos siendo, *E.*

coli O157:H7, el más comúnmente asociado con la enfermedad clínica y brotes con alimentos (Rivas y col., 2006). Sin embargo, también se han descrito otros serotipos: O26:H11; O103:H2; O111:NM; O121:H19; O145:NM, O8:H19, O145:H25 y O104:H4 (Krüger y col., 2011; Leotta y col., 2008; Mercado y col., 2004; Nataro, 2005; Rangel y col, 2005; Rivas y col., 2006; Tarr y col, 2005; Ullrich y col., 2013).

¹ Shiga toxin-producing *E. coli*

1.2 Características microbiológicas

STEC (O157:H7 y no O157) son bacilos Gram negativos, aerobios o anaerobios facultativos de la familia de las Enterobacterias. La serotipificación es normalmente el método más utilizado para tipificar estas cepas (Blanco y col., 2004). Está basada en la identificación del antígeno somático “O” (lipopolisacárido de la pared celular), el antígeno flagelar “H” y el antígeno capsular K (polisacárido). El antígeno de membrana “O”, es empleado para definir los principales serogrupos, mientras que los serotipos quedan definidos de acuerdo al antígeno flagelar “H” que acompañe al antígeno “O”. En el esquema internacional de serotipificado existen 174 antígenos “O” y 56 antígenos “H”, por lo que son posibles una gran variedad de combinaciones de los antígenos “O” y “H” (Scheutz y col., 2001).

Una forma de diferenciar la mayoría de los aislamientos de *STEC* es por su incapacidad para fermentar el sorbitol, por lo que esta característica metabólica se utiliza para diferenciarlas en medio Mac Conkey-sorbitol (Page y Liles, 2013).

1.3 Factores de virulencia de STEC

STEC implementa dos principales estrategias de virulencia, la producción de una citotoxina denominada toxina Shiga (Stx) y la formación de la lesión AE². Además posee otros factores de virulencia como enterohemolisina e intimina y ambos se suman a la acción de la Stx que es el determinante de virulencia más importante para la patología del SUH (Kaper y col., 2004).

² Del inglés attaching and effacing

1.3.1 Isla de patogenicidad LEE

STEC contiene una isla de patogenicidad denominada LEE³ que es crucial para el desarrollo de lesiones AE ya que allí se encuentran todos los genes necesarios para la formación de la lesión (Kaper y col., 2004).

Las lesiones AE involucran cambios estructurales, incluyendo acortamiento de la microvellosidad del enterocito e íntima unión de la bacteria a la superficie de la célula (Paton y Paton, 2002). Debajo de la bacteria adherida, existe una acumulación de componentes del citoesqueleto del enterocito, resultando en la formación de una estructura en forma de pedestal (Pacheco y Sperandio, 2012).

Entre los factores de adherencia intestinal que se encuentran codificados en la región LEE, el gen *eae* codifica una proteína de membrana externa llamada intimina. Esta proteína es la responsable de la unión de la bacteria al enterocito y la desorganización de las microvellosidades con producción de la lesión AE. La región LEE codifica además un receptor translocado (Tir) para la intimina y el sistema de secreción tipo III, responsable de secretar otras proteínas codificadas en LEE, entre ellas: EspA, EspB y EspD, que son necesarias para iniciar los cambios ultraestructurales de las microvellosidades (Paton y Paton, 1998). Ciertos serotipos de STEC-LEE positivos (O157:H7, O26:H11, O111:NM y O145:NM) están considerados como altamente virulentos y más comúnmente asociados a brotes y casos esporádicos de enfermedad severa en humanos (Jenkis y col., 2003 y Paton y col., 1998). Sin embargo la presencia de la región LEE no sería esencial para la patogénesis, dado que un gran número de cepas STEC-LEE negativas fueron capaces de causar enfermedad severa y ocasionales brotes (Keskimaki y col., 1997; Paton y col., 1999). Por lo tanto, en estas cepas, otros factores de virulencia adicionales estarían involucrados en la patogénesis.

³ Del inglés locus of enterocyte effacement

1.3.2 Megaplásmido

El megaplásmido de 60 MDa (pO157) se encuentra presente en *E. coli* O157 y algunos serotipos no-O157. Contiene alrededor de 35 genes, algunos de los cuales codifican para factores de virulencia que estarían involucrados en la patogénesis de la infección. Entre ellos *espP* (serina proteasa extracelular), *katP* (catalasa-peroxidasa), *hlyA* (enterohemolisina-proteína formadora de poros), *etp* (sistema de secreción tipo II) y para una fimbria que podría estar involucrada en la colonización inicial de los enterocitos. Sin embargo, la importancia biológica de pO157 en la patogénesis no está del todo descrita (Lim y col., 2010).

1.3.3 Toxina Shiga

1.3.3.1 Estructura de Stx

Stx es el factor de virulencia característico de STEC y pertenece a una familia de proteínas estructural y funcionalmente relacionadas con la toxina Shiga sintetizada por *Shigella dysenteriae*. Hay dos tipos de Stx (Bergan y col., 2012; Rasko y col., 2011; Rivas y col., 2008): Stx tipo 1 (Stx1) que difiere en un solo aminoácido con Stx de *S. dysenteriae*; y Stx tipo 2 (Stx2) la cual tiene sólo 56% de identidad con Stx1 (Jacewicz y col., 1995). Ambas se encuentran codificadas por bacteriófagos insertos en el cromosoma bacteriano y pertenecen a la familia de las toxinas A1B5. Están constituidas por una subunidad A (componente activo de la toxina) unida a 5 subunidades idénticas que constituyen la subunidad B. Este pentámero es imprescindible para permitir la unión de la toxina a su receptor celular, un glicolípido denominado globotriaosilceramida o Gb3 (Gal [1-4]Gal [1-4] glucosilceramida) (Bergan y col., 2012) (Figura 1.1).

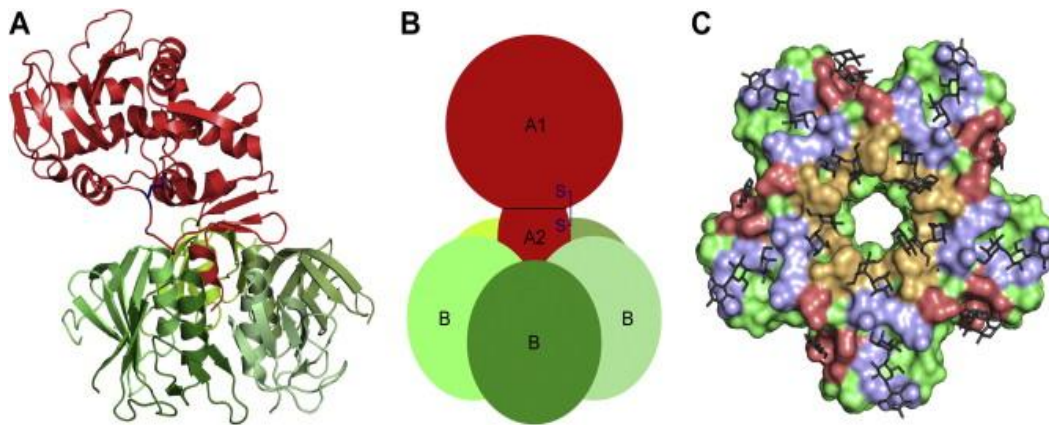


Figura 1.1: (A) Estructura de la toxina Shiga determinada por cristalografía de rayos X (B) Representación esquemática de la estructura de la toxina de Shiga. (C) Superficie del pentámero B₅ indicando la ubicación de los 15 sitios potenciales de unión al receptor, basado en la estructura de la toxina Shiga acomplejada con Gb3 (Bergan y col., 2012).

1.3.3.2 Regulación de la expresión de Stx

Múltiples señales ambientales regulan la expresión de Stx, incluyendo la temperatura, la fase de crecimiento, los antibióticos, las especies reactivas del oxígeno (ERO) y el “quorum sensing” (QS) (Pacheco y Sperandio, 2012).

Los genes que codifican Stx (*stx1* y *stx2*) se encuentran en genomas de porfagos de la familia lambda que se integran al cromosoma bacteriano (Figura 1.2). El ciclo del fago tiene un papel central en la regulación de la producción de Stx por STEC. Existen trabajos que han demostrado que la inducción de fagos puede contribuir a la patogénesis de STEC de diferentes maneras: a) mediante el aumento en el número de copias del gen de la toxina como resultado de la replicación del genoma del fago, b) el aumento en la transcripción de la toxina a partir de los promotores del fago que son reprimidos durante la lisogenia y c) la liberación de la toxina a partir del proceso de lisis bacteriana mediada por el fago (Wagner y col., 2001).

Los genes *stx1* y *stx2* se encuentran específicamente dentro de los genes tardíos del fago donde la expresión de StxAB está bajo el control del ciclo del fago. Stx2 se produce solo cuando el fago entra a su ciclo lítico mientras que Stx1 está regulada por el ciclo del fago y un promotor regulado por hierro (Tyler y col., 2004; Wagner y col., 2002).

El fago lambda permanece en reposo debido a la unión del represor cI a los operadores OR (derecha) y OL (izquierda) y a su vez inhiben la actividad de los promotores PR (derecha) y PL (izquierda). Para la inducción del ciclo lítico, el bacteriófago que codifica StxAB aprovecha la respuesta SOS de la célula bacteriana. El sistema de reparación del ADN conocido como SOS es utilizado por las bacterias para recuperar el ADN dañado. La respuesta de este sistema es controlada por dos proteínas regulatorias, productos de los genes *recA* y *lexA*. La proteína LexA actúa como un represor que se une a secuencias consenso de los operadores de cada gen del sistema SOS e inhibe su transcripción. La proteína RecA, en cambio actúa como inductora directamente clivando LexA por un mecanismo proteolítico que adquiere al interactuar con el ADN dañado o indirectamente cuando la proteína RecA modificada actúa como un efector alostérico en la digestión autocatalítica de LexA (Little, 1984; Slilaty y col., 1986). Estas proteínas controlan la transcripción de un grupo de genes conocidos como genes SOS, cuyos productos de expresión entre otros son enzimas reparadoras del ADN e inhibidores del ciclo celular (Walker, 1984).

Cuando RecA se activa en el bacteriófago que codifica StxAB, promueve la escisión del represor cI aliviando la represión. La proteína Q se une a PR' y conduce a la transcripción de los genes *stxAB*. Las bacterias se someten a lisis y liberan Stx en el medio ambiente (Figura 1.2) (Pacheco y Sperandio, 2012).

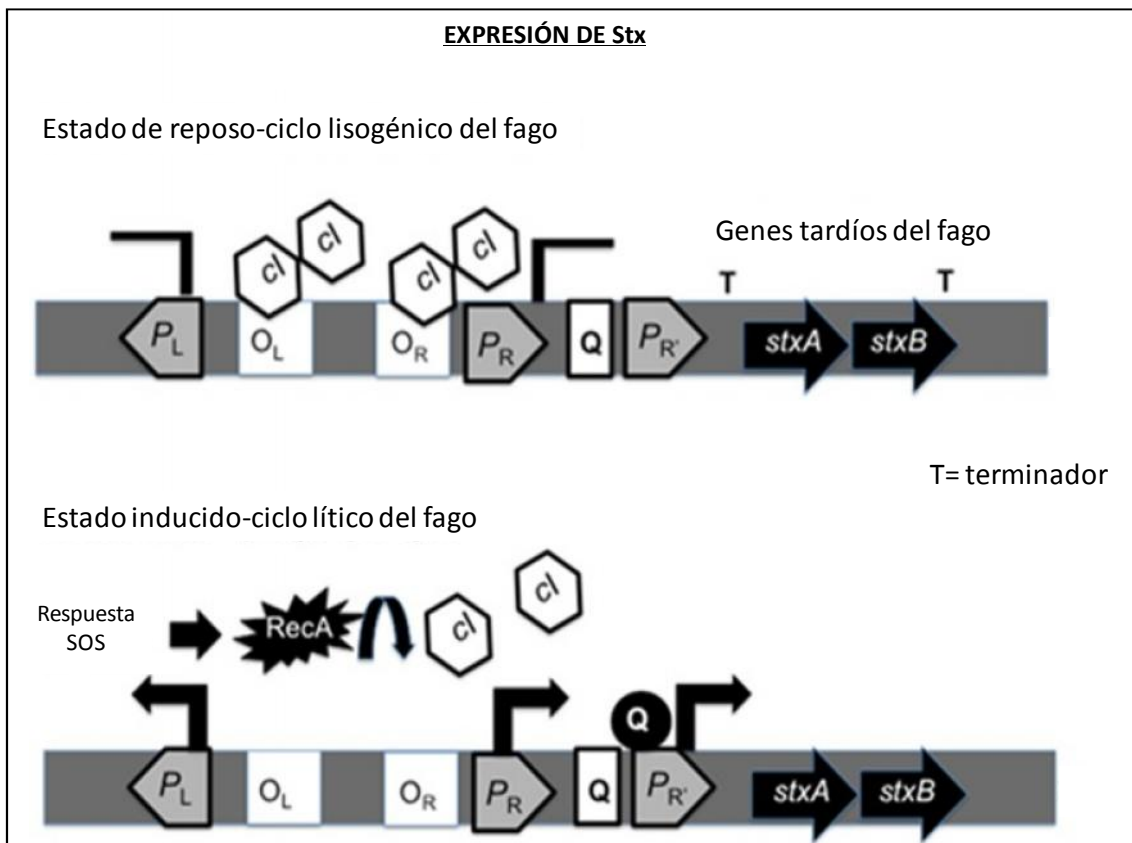


Figura 1.2: Regulación de la expresión de Stx por el ciclo del fago. (Pacheco y Sperandio, 2012).

1.3.3.3 Mecanismo de acción de Stx

La toxicidad de Stx es ejercida por inactivación catalítica de la subunidad ribosómica 60S, inhibiendo de esta manera eficazmente la síntesis de proteínas en las células diana (Bergan y col., 2012).

Cuando la bacteria coloniza el intestino, la toxina pasa a la circulación sanguínea y se une al receptor específico Gb3 del endotelio renal y el epitelio tubular. Este receptor también se encuentra en el hígado, páncreas y sistema nervioso central (O'Loughlin y Robins-Browne, 2001). Luego de la unión al receptor, la toxina es internalizada por endocitosis a los endosomas tempranos. En algunas células, la toxina unida a su receptor Gb3 se fusiona con los lisosomas celulares y esto resulta en la degradación de la toxina. Sin embargo, en las células que son particularmente sensibles a Stx, las vesículas endosomales que contienen los complejos toxina-receptor son traslocadas al aparato de Golgi y

posteriormente al retículo endoplásmico. Durante este proceso la subunidad A es proteolíticamente clivada en el puente disulfuro por enzimas del citosol y del retículo endoplásmico, para dar lugar a la subunidad A1, responsable de la actividad enzimática de la toxina, y a un pequeño fragmento A2. El fragmento A1 activo se trasloca al citoplasma donde actúa como una N-glicosidasa que remueve un residuo específico de adenina en la región 3' de la unidad ribosomal 28S, lo que resulta en una inhibición irreversible de la síntesis de proteínas (Figura 1.3) (Paton y Paton 2006). Además algunas citoquinas proinflamatorias tales como TNF- α e IL-1 β inducidas por las Stx o por el lipopolisacárido (LPS) durante la infección pueden incrementar la síntesis de Gb3 en varios tipos celulares, lo cual facilita la acción de las mismas e incrementa la severidad de la infección por STEC (Gyles, 2007; Djordjevic y col 2004).

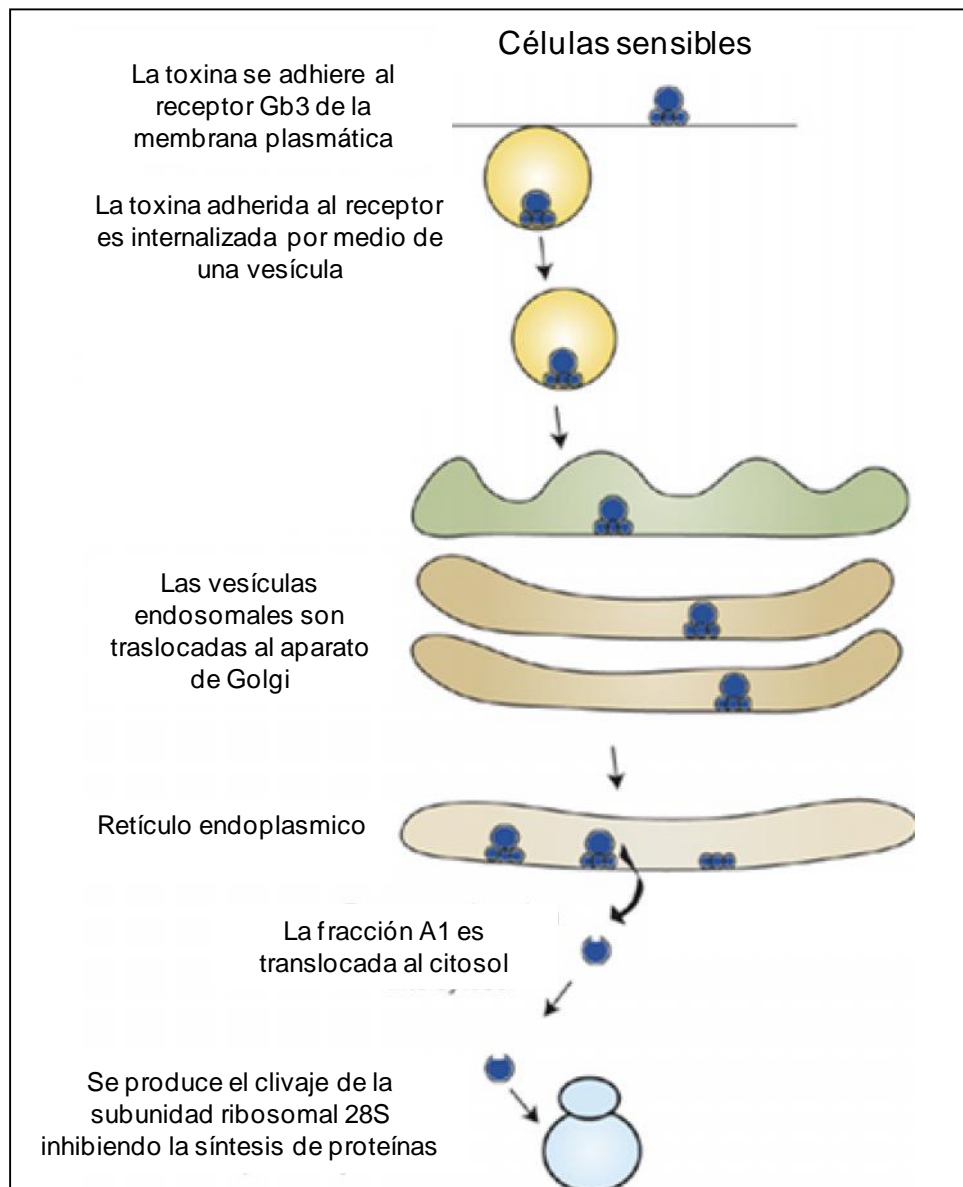


Figura 1.3: Mecanismo de acción de Stx (Paton y Paton 2006).

El ensayo de citotoxicidad utilizando células Vero es considerado como la técnica “gold standard”, debido a que poseen una alta sensibilidad a las Stx. Estas células poseen en su membrana plasmática una alta concentración de receptores Gb3, lo que permite detectar Stx1, Stx2 y sus variantes. Stx1 posee 10 veces mayor afinidad que Stx2 a los receptores Gb3 y su toxicidad es más potente sobre las células Vero. Sin embargo, Stx2 posee 400 veces más actividad citotóxica (Gyles, 2007). La citotoxicidad específica en células Vero se utiliza para determinar la capacidad de las bacterias aisladas de muestras

clínicas de producir Stx. Stx2 se produce y se libera al medio de forma continua durante la fase de crecimiento exponencial, mientras que Stx1 se acumula en el espacio periplásmico de las bacterias y se libera al final de la fase exponencial (Krüger y col., 2011; Fernández y col., 2013). Existen estudios que sugieren que el crecimiento en fase estacionaria aumenta la producción de Stx. Konowalchuk y col. (1978) han reportado una máxima actividad citotóxica cuando los cultivos bacterianos fueron agitados durante 24 h (Konowalchuk y col., 1978), una condición donde las bacterias entran en fase estacionaria y los *stxAB* son inducidos (Bergholz y col., 2007).

1.3.4 Biofilm bacteriano

Un factor de virulencia adicional recientemente descrito, sería la capacidad de cepas STEC de formar biofilms. Los microorganismos pueden encontrarse como organismos individuales (células planctónicas) o unidos a una superficie (sésiles) formando parte de la estructura de un biofilm. Los biofilms tienen un estilo de vida microbiana multicelular y se definen como una comunidad estructurada de células sésiles unidas irreversiblemente a una superficie viva o inerte, embebidas en una matriz exopolisacárida que ellas mismas producen (Costerton y col., 2003). La formación de biofilms ocurre como resultado de una secuencia de eventos, adherencia de la bacteria, proliferación celular, producción de la matriz extracelular y desprendimiento. Este proceso es controlado parcialmente por QS, un mecanismo de comunicación entre las células que forma parte del biofilm, por el cual los microorganismos utilizan la producción, liberación, intercambio y detección de pequeñas moléculas señalizadoras conocidas como autoinductores para sentir el número de células sésiles (Sauer y col., 2002). En bacterias Gram negativas el principal autoinductor del QS es la acilhomoserina lactona (Sperandio y col., 2001) y cuando en el medio extracelular se acumula una suficiente cantidad del autoinductor, éste activa un receptor específico que altera la expresión de genes afectando a distintos fenotipos. Las bacterias patógenas utilizan esta comunicación célula-célula para regular la producción de

factores de virulencia (Pacheco y Sperandio, 2012). Muchos sistemas de QS se componen de sistemas de dos componentes que involucra un sensor histidina quinasa (HK) y un regulador de respuesta para regular la transducción de señales, incluyendo la regulación de virulencia en STEC mediada por QS (Hughes y col., 2009). Dos receptores de HK, QseC y QseE, han sido caracterizados en *E.coli* para detectar epinefrina y norepinefrina. Un análisis transcripcional mostró que QseC regula la expresión de Stx2 a través de la activación del *recA*. Estos hallazgos demuestran que este receptor adrenérgico participa en la generación de la respuesta SOS en bacterias y que la señalización bacteriana célula-célula juega un papel importante en la regulación de la expresión de *stx* (Pacheco y Sperandio, 2012).

Aunque la composición del biofilm es variable, en general, el componente mayoritario es el agua, que puede representar hasta un 97% del contenido total. En menor cantidad se encuentran otras macromoléculas como proteínas, ADN y productos diversos procedentes de la lisis celular microbiana, las cuales son denominadas en conjunto sustancia polimérica extracelular (EPS) (Flemming y col., 2007; Hall-Stoodley y col., 2004; Kives y col., 2006; Bales y col., 2013). Además se caracterizan por poseer estructuras tridimensionales complejas con canales que posibilitan el flujo de agua y nutrientes hasta zonas profundas del biofilm.

STEC es conocida por producir exopolisacáridos de alto peso molecular durante la formación del biofilm y esto le permite a las bacterias adherirse a las superficies y proporcionar una barrera física para proteger a las células sésiles contra el estrés ambiental.

Uno de los aspectos más importantes de la formación del biofilm es el aumento en la resistencia al tratamiento con antibióticos (ATBs) (Bales y col., 2013). Se ha descrito que los biofilms pueden ser entre 10 y 1000 veces más resistentes a antimicrobianos que las células planctónicas. Factores de resistencia intrínsecos y extrínsecos en los biofilms han sido investigados y aunque se han propuesto varias teorías, el mecanismo preciso de cómo se altera esta sensibilidad no está esclarecido (Costerton y col., 2003; Paraje, 2011; Zhang, 2012). Los factores intrínsecos de resistencia se activan como parte de la vía de desarrollo

de los biofilms, por ejemplo: la matriz del biofilm puede actuar como una barrera de difusión física y química a la penetración de los ATBs; dentro de los biofilms pueden establecerse microambientes como la presencia de gradientes en la concentración de nutrientes; pequeñas poblaciones de bacterias en los biofilms pueden diferenciarse en células persistentes; un aumento de la producción de estrés oxidativo podría provocar cambios en la fisiología de las bacterias; y mecanismos de degradación activa en algunas partes de los biofilms que podrían disminuir la acción de los ATBs. Otros factores denominados extrínsecos o de resistencia inducida, resultan de la inducción de la transcripción propia de un tratamiento con ATBs. La frecuencia de mutación de las bacterias que forman parte de un biofilm es significativamente mayor en comparación con el crecimiento de bacterias en estado planctónico y hay un aumento de la transmisión horizontal de genes en los biofilms. Estas condiciones fisiológicas podrían explicar por qué las bacterias creciendo en forma de biofilm presentan resistencia a los ATBs (Paraje, 2011).

Los biofilms pueden causar graves problemas en la salud y pueden ser responsables de muchas infecciones crónicas (Costerton y col., 1987). El Centro de Control y Prevención de Infecciones de EEUU (CDC) estima que el 65% de las infecciones son causadas por biofilms, implicados generalmente en infecciones crónicas y resistentes a los tratamientos (CDC, 2007).

STEC es una especie bacteriana que participa en la patogénesis de diferentes enfermedades y ha sido asociada en algunos casos con la presencia de biofilms (Bentancor y col., 2007; Heffernan y col., 2009; Kuczyńska-Wisnik y col., 2010; Skandamis y col., 2009). Recientemente se ha descrito la capacidad de *E. coli* O157:H7 de formar biofilms en alimentos, acero inoxidable, vidrio o poliestireno y puede ser considerado como una estrategia de supervivencia de las bacterias (Rivas y col., 2007; Ryu y col., 2004; Ryu y Beuchat, 2005; Santos Mendonca y col., 2012; Uhlich y col., 2006).

Muchos estudios se han hecho para correlacionar la patogenicidad y la unión bacteriana en términos de las características fisicoquímicas de las células, tales como la

carga de superficie celular y la hidrofobicidad. La importancia de estas propiedades en la adherencia y la infección por parte de los microorganismos se ha enfatizado observando en algunos casos un vínculo entre ambas, mientras que otros estudios, no han encontrado una relación evidente por lo que no está definido el rol de las propiedades fisicoquímicas bacterianas en la formación del biofilm (Chen y col., 2004; Kim y col., 2006; Rivas y col., 2007).

Entre los factores importantes para la formación del biofilm en STEC se encuentra el flagelo o la fimbria tipo I “curli” que está involucrado en la agregación celular y también media la adhesión e invasión en células eucariotas, por lo que son potentes inductores de la respuesta inflamatoria (Barnhart y Chapman, 2006). En *E. coli*, la formación de biofilm se asocia con la expresión de curli y EPS tales como celulosa y ácido colánico (Danese y col., 2000). La fimbria curli y la celulosa son los componentes mayoritarios de la matriz extracelular de aislamientos de *E. coli* (Robbe-Saule y col., 2006) y la coexpresión de fimbrias y celulosa conduce a un fenotipo de colonias roja, seca, y rugosa “rdar”⁴ debido a que las bacterias que expresan la fimbria curli retienen el colorante diazo Rojo Congo (RC) y se tiñen de rojo oscuro, brindando una forma conveniente de identificación (Costerton y col., 1999). Las cepas deficientes en curli y celulosa producen una colonia lisa y blanca “saw”⁵.

Al menos 6 proteínas codificadas en los operones *csgBA* y *csgDEFG* están dedicadas a la formación de curli en *E. coli* (Figura 1.4) (Hammar y col., 1995). CsgD es un regulador transcripcional positivo del operón *csgBA*. Todas las proteínas codificadas por los operones *csg*, excepto CsgD contienen señales de traslocación hacia el espacio periplásmico. CsgG es una lipoproteína de membrana externa que se necesita para la estabilidad y la secreción de otras dos proteínas: CsgA y CsgB. CsgA es secretada al exterior de la célula donde CsgB la nuclea dentro de la fibra. CsgE y CsgF interactúan con

⁴ Del inglés red, dry and rough

⁵ Del inglés soft and white

CsgG y son necesarias para un correcto ensamblado de la fimbria (Barnhart y Chapman, 2006).

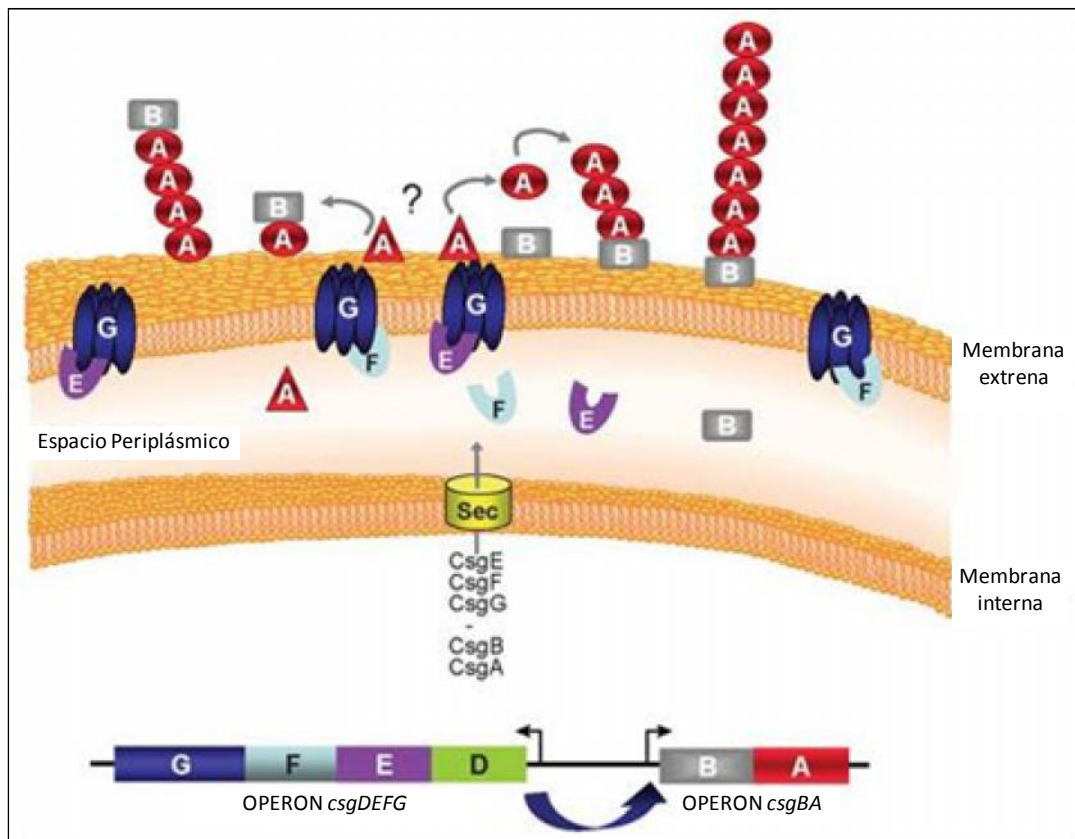


Figura 1.4: Modelo del ensamblaje de curli en *E. coli* (Barnhart y Chapman, 2006).

La regulación de la expresión de la fimbria curli es muy compleja (Figura 1.5) y es sensible a diversas señales ambientales (Gerstel y Romling, 2003). CsgD regula positivamente el operón *csgBA* y debido a que *csgD* es absolutamente necesario para la actividad promotora de *csgBA*, aquellos reguladores que actúen sobre la expresión de *csgD* influenciarán la expresión de *csgBA*.

Las bacterias se exponen rutinariamente a limitaciones de nutrientes y otras condiciones de estrés en sus hábitats naturales. En consecuencia, crecen y se dividen lentamente entrando en una fase estacionaria. Esta respuesta se controla a nivel molecular

por un factor sigma de fase estacionaria (RpoS) que es necesario para la virulencia, la resistencia al estrés, la formación de biofilm, y el desarrollo del fenotipo “rdar” por lo tanto juega un rol clave en la regulación de los genes de curli tanto directa como indirectamente. Los genes que codifican para curli se expresan al máximo durante la fase estacionaria y su expresión depende de RpoS. Crl (una proteína de *E. coli*) interactúa con RpoS para facilitar la unión de este último a la región promotora csgBA por lo tanto Crl se requiere en la mayoría de las cepas para la expresión curli y es considerado un regulador indirecto del operón (Barnhart y Chapman, 2006; Robbe-Saule y col., 2006). Sin embargo, algunas cepas expresan curli independiente de Crl. Crl y RpoS regulan cooperativamente otros genes inducidos en la fase estacionaria. Crl es considerado un sensor térmico que maximiza la expresión del operón curli a bajas temperaturas y se ha demostrado que la proteína Crl es más estable a temperaturas más bajas (Bougdour y col., 2004). Esta estabilidad selectiva de Crl a bajas temperaturas podría explicar la propiedad de curli de maximizar su expresión a temperaturas inferiores a 30°C. Sin embargo, se ha demostrado que muchas cepas clínicas de *E. coli*, pueden expresar curli a 37 °C (Barnhart y Chapman, 2006).

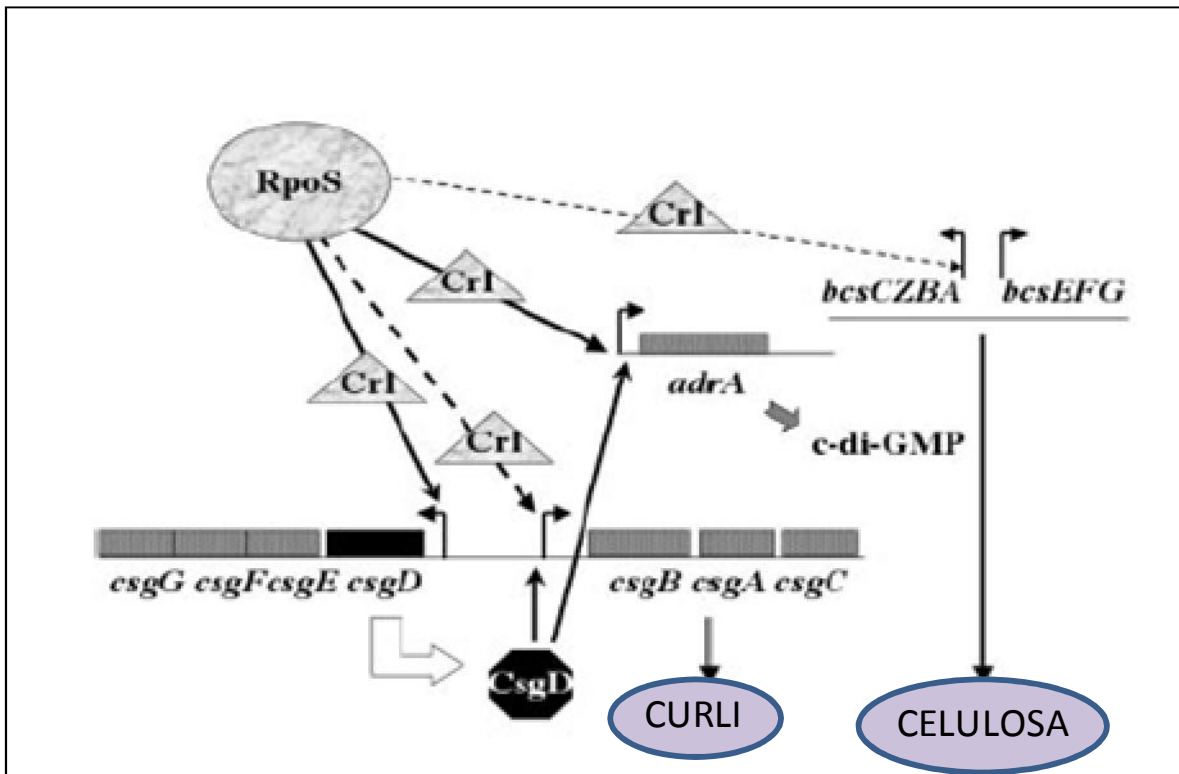


Figura 1.5: Esquema representativo de la regulación de los genes que controlan la expresión de curli y celulosa en *E. coli* (Robbe-Saule y col., 2006).

1.4 Reservorio y vías de transmisión de STEC

STEC se ha aislado del intestino de numerosas especies animales, considerándose a los rumiantes en general y el ganado vacuno en particular, como principal reservorio de STEC (Padola y col., 2004; Blanco y col., 2004).

Los rumiantes representan la principal fuente de contagio para el hombre debido a que excretan estas bacterias en sus heces, es por ello que la contaminación fecal del agua y la diseminación de las bacterias contaminantes durante la faena se han señalado como fuentes importantes de infección. Distintos alimentos como carne molida y productos cárnicos crudos o insuficientemente cocidos, hamburguesas, embutidos fermentados, leche no pasteurizada, yogur, quesos, mayonesa, papas, lechuga, brotes de soja y alfalfa, jugos de manzana no pasteurizados, entre otros, han sido señalados como fuente de contaminación en casos esporádicos o brotes asociados a STEC. (Gómez y col., 2002; Gyles, 2007; Rangel y col., 2005). Otras formas de transmisión son: la contaminación

cruzada durante la preparación de los alimentos, el contacto directo del hombre con los animales, y persona a persona, por la ruta fecal-oral.

Una característica notable de la infección por STEC es su baja dosis infectiva: se estima que 50-100 unidades formadoras de colonias (UFC) son suficientes para causar la enfermedad en individuos sanos (Pacheco y Sperandio, 2012).

Se ha demostrado que los familiares de pacientes con SUH están usualmente infectados por STEC y que la transmisión persona a persona puede jugar un papel importante en la alta incidencia de la enfermedad en nuestro país (Rivas y col., 1993; Rivas y col., 2003).

1.5 SUH causado por STEC

El SUH, descrito por primera vez en 1955 por Gasser y col, es una enfermedad de comienzo agudo con anemia hemolítica microangiopática, plaquetopenia y daño renal, que habitualmente puede seguir o no a un episodio de diarrea con o sin sangre, principalmente en lactantes, y en niños de la primera infancia, pudiendo afectar también a ancianos (Karmali MA, 1989).

Desde 1982, STEC ha sido reconocido como un importante patógeno entérico y un aumento en el número de brotes recientes se atribuye a la aparición de cepas más virulentas (Kulasekara y col., 2009). El mayor número de casos de SUH notificados hasta la fecha se produjo en un brote alemán en 2011, lo que sugiere que STEC ha aumentado su virulencia en el tiempo. Análisis genómicos de esta cepa determinaron que se trataba de una *E. coli* enteroagregativa que había adquirido una codificación stx2 del fago lambda de (Rasko y col., 2011). Esta cepa era capaz de formar biofilm en el intestino y esta capacidad combinada con la producción de Stx resultó en una cepa STEC altamente virulenta que causó 34 muertes y 908 casos de SUH en 2011. El agente causal del brote fue identificado como *E.coli* enteroagregativa de serotipo O104:H4 (Buchholz y col., 2011)

El SUH está ampliamente distribuido en el mundo y en América del Sur el problema se concentra en países del Cono Sur, principalmente Argentina, Chile y Uruguay (López y col., 2000). Sin embargo, en Argentina el SUH es endémico con un promedio de 450 a 500 casos nuevos por año y una letalidad del 3 al 5% durante el período agudo de la enfermedad. Argentina es el país del mundo con mayor incidencia de esta enfermedad y presenta hasta 11 veces más casos en niños que en otros países que también la padecen. La tasa de notificación en el 2009 fue de 12 casos/100.000 niños menores de 5 años según el Servicio de Fisiopatogenia del Instituto Dr. Carlos G Malbrán, siendo éstos los últimos datos publicados. Constituye 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 (Rivas y col., 2008).

En el hombre, los síntomas clínicos asociados a infección con STEC tales como palidez, petequias, hematomas, oliguria, edema, hipertensión arterial y cambios neurológicos como letargia o convulsiones, aparecen luego de 3 a 5 días de ingerida la bacteria en dosis muy bajas (Gianantonio y col., 1973). Las manifestaciones gastrointestinales comienzan con diarrea acuosa, dolor abdominal severo, y ocasionalmente náuseas y vómitos, la fiebre no es una característica de la infección (Thorpe, 2004). Esta diarrea puede progresar en 1 ó 2 días a colitis hemorrágica que se caracteriza por la presencia de sangre en heces y ocasionalmente fiebre con evidencia de edema y erosión de la mucosa del colon (Griffin y col., 1990).

En la mayoría de los casos de ingestión de STEC, los síntomas de diarrea acuosa desaparecen en una semana sin secuelas evidentes. Sin embargo, pueden ocurrir complicaciones como púrpura trombocitopénica, SUH, falla renal aguda y muerte (Paton y Paton, 1998).

1.6 Tratamiento del SUH

Hasta el presente no existe una terapia específica para el tratamiento de las infecciones por STEC (Goldwater y Bettelheim, 2012). 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, de acuerdo al estado de la función renal y el grado de anemia. (Fernandez-Brando y col., 2011).

Aunque STEC es susceptible a los antibióticos usados comúnmente, la utilización de terapia antimicrobiana es controvertida debido al efecto sobre la inducción del ciclo lítico del fago que contiene los genes que codifican para Stx (Zhang y col., 2000). Los datos actuales sugieren que los ATBs convencionales aumentan el riesgo de SUH en pacientes infectados con STEC (McGannon y col., 2010; Krüger y col., 2011) debido a que desencadenan en estas bacterias una respuesta SOS que promueve la liberación de Stx, responsable de gran parte de la morbilidad y mortalidad asociada a la infección por STEC. Se ha demostrado que los ATBs no solo inducen la replicación y expresión de los genes *stx*, sino que como consecuencia de la lisis bacteriana, también aumentan la liberación y difusión de Stx en el ambiente (Fernandez-Brando y col., 2011; Nguyen y Sperandio, 2012). Sin embargo, estudios clínicos han revelado resultados contradictorios y esto sigue siendo un tema muy controvertido.

Muchos estudios han demostrado que los ATBs, tales como las quinolonas y mitomicina C aumentan la producción o liberación de Stx (Mc Gannon y col., 2010; Zhang y col., 2000). Específicamente, mitomicina C se usa comúnmente en investigación para la inducción del profago por su capacidad para interferir con la replicación del ADN y la consecuente activación de la respuesta SOS (Los y col., 2010).

Las quinolonas son una clase de ATBs conocidos por inducir la replicación de fagos que contienen los genes para la expresión de Stx debido a la activación de la respuesta SOS en STEC. Un estudio realizado por Zhang y col. (2000) mostró que la administración de

ciprofloxacina (CIP) y fosfomicina (FOS) causaron una reducción en la carga bacteriana de STEC en las heces. Sin embargo, el tratamiento de ratones infectados con CIP resultó en aumentos de los niveles de Stx en las heces, así como en un aumento de la mortalidad. Por el contrario, el tratamiento con FOS, un inhibidor de la síntesis de la pared celular que no induce la replicación, no aumentó la producción de Stx (Zhang et al., 2000). Ochoa y col. (2007) evaluaron el potencial de rifaximina (RIF) (un ATB utilizado en muchos países para el tratamiento de la diarrea del viajero) en la inducción de la replicación de fagos, la bacteriolisis inducida por fármacos y la liberación de toxinas en contraste con CIP, un conocido inductor de la replicación del fago Stx que actúa interfiriendo en el ADN bacteriano por inhibición de la ADN-girasa y topoisomerasa IV. Estos autores reportaron que RIF que actúa inhibiendo la RNA polimerasa, no indujo la replicación de fagos ni la bacteriolisis mediada por fagos y la liberación de toxina no se vio modificada en presencia o ausencia del ATB (Ochoa y col., 2007).

McGannon y col. (2010) apoyaron la hipótesis de que el uso de quinolonas podría empeorar la evolución de un paciente durante la infección por STEC. Estos autores investigaron la influencia de los ATBs en la producción y liberación de Stx y observaron que azitromicina, doxiciclina, FOS y gentamicina reducían la producción o liberación de Stx, mientras que ampicilina y CIP la aumentaban (McGannon y col., 2010). Sin embargo, ATBs como la ceftriaxona y rifampicina no afectaron la producción de Stx. Estos resultados sugieren que los ATBs que controlan la síntesis de ADN aumentan la producción de Stx mientras que los que actúan sobre la síntesis de proteínas y de la pared celular inhiben la producción de Stx (Pacheco y Sperandio, 2012).

A pesar que STEC es susceptible a los agentes antimicrobianos usados comúnmente, los estudios clínicos realizados no han demostrado que la aplicación de una terapia antimicrobiana en el tratamiento de estas infecciones aporte o no algún beneficio para el paciente y a su vez el uso de ATBs en SUH parece aumentar la gravedad de la

infección, no estando esclarecida la causa de esta contraindicación (Pacheco y Sperandio, 2012).

1.7 Estrés celular y acción de antibióticos

Los antimicrobianos pueden ser incluidos dentro de dos categorías, drogas bactericidas, que actúan matando a las bacterias con una eficiencia superior al 99,9% y drogas bacteriostáticas que solamente inhiben el crecimiento bacteriano (Pankey y Sabath, 2004). Cada vez hay más evidencias de que el mecanismo de la muerte celular iniciada por algunos ATBs incluye la producción de ERO como mecanismo secundario al principal (Kohanski y col, 2007 ; Dwyer y col., 2007), incluso existen antecedentes que han indicado que el estrés oxidativo constituye una posible causa del daño bacteriano generado por varios antimicrobianos (Albesa y col., 2004, Becerra y Albesa 2002; Becerra y col., 2006; Bogdanov y col., 1997;1998).

Las ERO y las especies reactivas del nitrógeno (ERN), se generan en todos los organismos aeróbicos por reacciones enzimáticas y no enzimáticas, tanto en procesos fisiológicos como patológicos, existiendo mecanismos eficientes involucrados para su detoxificación. Son moléculas orgánicas o inorgánicas, en general, extremadamente inestables y muy reactivas, cuya característica está dada por uno o más electrones desapareados en un nivel energético superior (Figura 1.6) (Becerra y col., 2006; Páez y col., 2010).

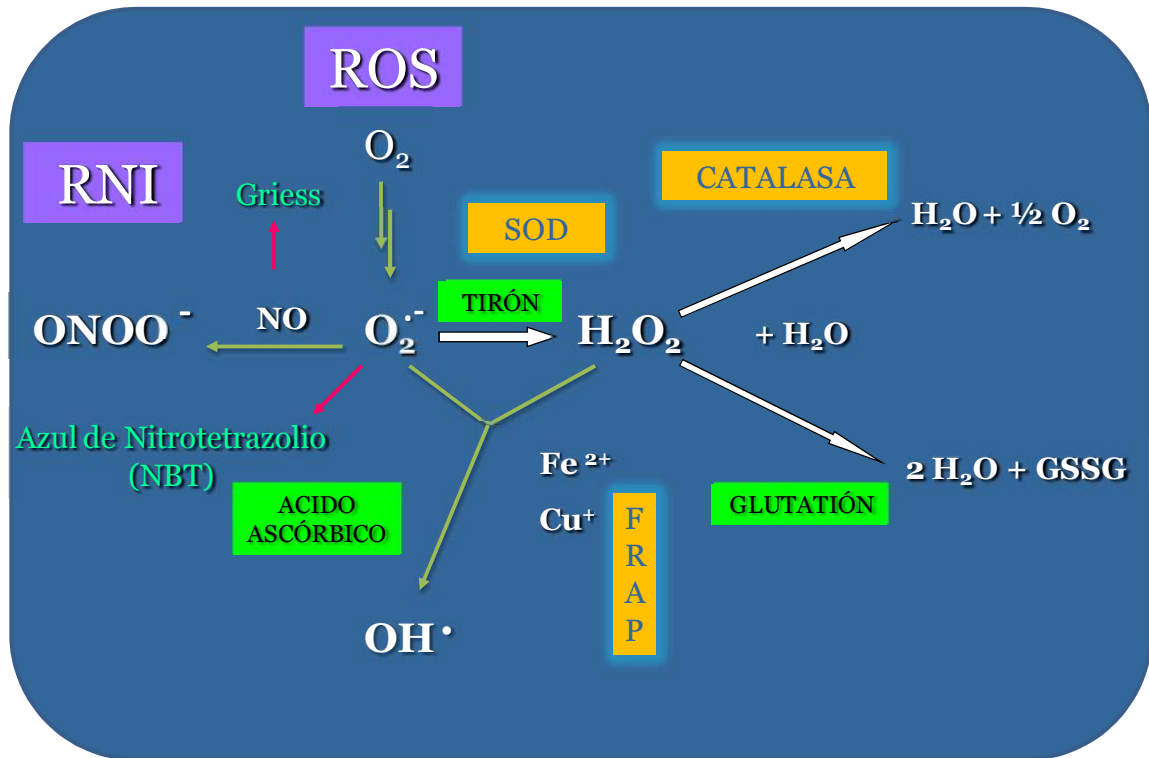


Figura 1.6: Vía metabólica del oxígeno y el nitrógeno.

Entre las ERO se encuentran el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radicales hidroxilo (OH^{\cdot}) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) mientras que las ERN que más se destacan incluyen el radical peroxilo, el radical óxido nítrico (ON) y los peroxinitritos ($ONOO^{\cdot}$). (Baronetti y col. 2011; Becerra y col., 2006; Páez y col., 2010).

El $O_2^{\cdot-}$ es la principal ERO producida *in vivo* y posee baja reactividad pero puede dar origen a ERO muy reactivas tales como H_2O_2 , OH^{\cdot} u oxígeno singlete (1O_2) los cuales si resultan altamente reactivos. La dismutación del $O_2^{\cdot-}$ conduce a la formación de H_2O_2 . Esta molécula, no posee carga y puede atravesar libremente membranas y difundir a través de la célula. El OH^{\cdot} es la especie más reactiva y se produce *in vivo* como consecuencia de la irradiación del agua con rayos X, luz UV, o por reacciones de Fenton y Haber-Weiss. El radical OH^{\cdot} reacciona rápida e indiscriminadamente con toda clase de biomoléculas incluyendo ácidos nucleicos, nucleótidos libres, proteínas, lípidos y carbohidratos causando

así daño oxidativo (Baronetti y col. 2011; Bartosz, 2009; Becerra y col., 2006; Páez y col., 2010).

Otra forma de estrés se denomina estrés nitrosativo, donde intermediarios reactivos del nitrógeno, tales como el nitrato (NO_3^-) y nitrito (NO_2^-), se utilizan como receptores terminales de electrones bajo condiciones anaeróbicas, mientras que el ON es un radical libre de corta duración producido enzimáticamente en varios tipos de células, y tiene una gran difusión a través de membranas (Baronetti y col., 2011). Dado que el ON reacciona lentamente con la mayoría de las macromoléculas, resulta un agente protector eficiente porque evita la acción de otros radicales más reactivos y oxidantes como el O_2^- (Lam y col., 2008). Se admite que la producción fisiológica de ON puede resultar beneficiosa cuando aumenta en respuesta a agentes oxidantes y reacciona con el exceso de ERO, manteniendo un equilibrio entre la síntesis y el consumo de ERO. El ON es conocido como un intermediario en la respiración anaeróbica; y en la actualidad se le reconoce un efecto dual, ya que en bajas concentraciones resulta fisiológico o beneficioso para las bacterias, mientras que a concentraciones elevadas puede interactuar con proteínas bacterianas inhibiendo la respiración aeróbica (Mukhopadhyay y col., 2004).

La reacción del OH^\bullet con el ON conduce a la formación de ONOO^- , un agente oxidante muy fuerte capaz de inducir peroxidación lipídica en lipoproteínas. Durante el estrés oxidativo de las células, también aumentan las ERN que pueden actuar como prooxidante o como antioxidante según su concentración y equilibrio en los sistemas biológicos (Bartosz, 2009).

Una alteración en el equilibrio prooxidante-antioxidante en favor de la sobreproducción de ERO puede resultar en daño a los componentes celulares. La acumulación de estos radicales libres resulta en estrés oxidativo celular el cual puede producir daño de biomoléculas como membranas lipídicas, proteínas y ADN (Albesa y col., 2004; Baronetti y col., 2011). Si no se repara este daño, se puede producir mutagénesis y muerte celular, lo

que probablemente participa en la patogénesis de diferentes enfermedades tales como la enfermedad de Alzheimer, la esclerosis múltiple, la diabetes y las enfermedades infecciosas, incluyendo la enfermedad de Chagas, la meningitis bacteriana y la hepatitis (Baronetti y col., 2013).

Para contrarrestar el estrés oxidativo, los organismos han evolucionado desarrollando sistemas de defensa antioxidantes. Se define como antioxidante a todas aquellas sustancias que al estar presentes en bajas concentraciones en comparación con los sustratos oxidables demoran o previenen significativamente la oxidación de ese sustrato. Dentro de esta definición se encuentran antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos. En el primer grupo encontramos a la enzima superóxido dismutasa (SOD) y a la enzima catalasa (CAT), mientras que se pueden mencionar como antioxidantes no enzimáticos al glutatión, ácido ascórbico, α -tocoferol y carotenoides entre otros (Aiassa y col., 2011; Páez y col., 2010) (Figura 1.6).

La enzima SOD es una metaloproteína que cataliza la dismutación de O_2^- , la primera ERO producida por la reducción del oxígeno. Convierte el O_2^- en H_2O_2 y O_2 . CAT es uno de los componentes centrales en las vías de detoxificación que previenen la formación del OH^\bullet mediante la descomposición de H_2O_2 en agua y oxígeno.

Moléculas antioxidantes no enzimáticas como glutatión reducido (GSH) actúan frente a numerosos compuestos oxidantes, tales como H_2O_2 , O_2^- , OH^\bullet y protegen de manera directa e indirecta membranas lipídicas y proteínas. El ácido ascórbico reacciona en forma directa con O_2^- , OH^\bullet ; el α -tocoferol y los carotenos reaccionan con el radical peroxilo y con 1O_2 (Cabiscol y col., 2000).

El desequilibrio oxidativo se debe a una sobreproducción de ERO o una reducción en las defensas antioxidantes que resulta insuficiente para eliminar los radicales libres por lo

tanto el sistema de defensa antioxidante juega un papel muy importante en el control de este proceso.

1.8 Estrés celular y regulación de Stx

La inducción de la replicación de profagos que contienen genes *stx* ocurre no solo en presencia de antibióticos que interfieren con el ADN sino también bajo condiciones de estrés oxidativo (H_2O_2) (Los y col., 2010). Agentes que dañan el ADN como la mitomicina C y la irradiación UV inducen la expresión de los fagos Stx, sin embargo la mayoría de los pacientes que desarrollan graves secuelas de la infección por STEC no están expuestos a estos agentes y es poco probable que estas situaciones se den *in vivo*. Por lo tanto, quizás algún otro agente endógeno presente en el intestino humano puede activar el ciclo lítico de los bacteriófagos y de ese modo provocar *in vivo* la producción de Stx por STEC (Wagner y col., 2001).

Muchos investigadores se han centrado en agentes presentes en el intestino humano que podrían contribuir a la producción de Stx que conduce al SUH. Wagner y col. (2001) investigaron que la exposición de STEC a H_2O_2 *in vitro* produjo un aumento en la producción de Stx de una manera dosis-dependiente así como un aumento en los títulos de los fagos. Del mismo modo La incubación de STEC con neutrófilos humanos aumento la producción de Stx, lo que indica que los productos derivados de los neutrófilos pueden inducir una respuesta SOS que conduce a la liberación de Stx (Pacheco y Sperandio, 2012; Wagner y col., 2001). Un estudio realizado por Los y col. (2010) corroboró los resultados que indican que el H_2O_2 aumenta la producción de Stx ya que ciertas condiciones de estrés oxidativo que ocurren durante la colonización del huésped, como las ERO producidas por las bacterias comensales, podrían aumentar la producción de Stx, lo que contribuye a la patogénesis de STEC (Los y col., 2010).

Una característica de la patogénesis de STEC es la colonización intestinal que resulta en la inducción de una fuerte respuesta inmune innata. Estudios clínicos han reportado altos niveles de citoquinas de tipo 1 en pacientes con SUH. Otros efectores de defensa no específica pueden ser producidos por la mucosa inflamada, incluyendo el ON, un radical libre que posee numerosas propiedades fisiológicas, en particular en el sistema inmunológico (Vareille y col., 2007). La producción celular de ON requiere de la enzima ON sintasa que oxida la L-arginina como sustrato; la ON sintasa inducible (iNOS) isoforma dependiente de calcio, se expresa en numerosas células, por ejemplo en los enterocitos en respuesta a las citoquinas de tipo 1 (Marion y col., 2003). Una alta producción de ON derivado de iNOS es citotóxico para las bacterias patógenas o puede inducir cambios transcriptómicos mediante la interacción con diferentes sensores de ON, tales como el receptor sensible a nitrito (NsrR), un regulador clave del estrés nitrosativo en enterobacterias (Vareille y col., 2007).

Fuentes químicas o celulares de ON suprimen la respuesta SOS bacteriana inducida por agentes que dañan el ADN por lo tanto inhiben la replicación del fago y la expresión de Stx sin alterar la viabilidad de STEC. Varielle y col. (2007) informaron que la expresión de Stx2 durante la fase de crecimiento estacionario podría ser disminuida por la administración de NOR4 un donador de ON. El efecto inhibitorio de ON fue evidente cuando STEC se cultivó en presencia de mitomicina C, un conocido inductor de la producción de Stx. El uso de cPTIO, un secuestrante de ON restauró la expresión de Stx2 en cultivos de STEC tratado con ON. Este efecto inhibitorio también fue observado en los niveles de partículas del fago. El tratamiento con ON (NOR4) reduce drásticamente la expresión de *recA* por lo tanto el efecto inhibitorio de ON sobre Stx es debido a la interferencia con la respuesta SOS bacteriana (Pacheco y Sperandio, 2012).

El estrés oxidativo podría ser uno de los factores responsables de la estimulación de la patogenicidad de STEC (Los y col., 2010). En biofilms, diversas situaciones de estrés incluyendo baja disponibilidad de nutrientes y oxígeno, alta osmolaridad, presencia de etanol

y concentraciones subinhibitorias de ATBs, pueden alterar las funciones celulares asociadas con el metabolismo oxidativo, estimulando así la producción ERO (Arce Miranda y col., 2011). Aunque las respuestas de adaptación frente al estrés oxidativo causado por estas ERO se han estudiado extensamente en células planctónicas, se sabe relativamente poco acerca de las respuestas de los biofilms.

Hipótesis

Se postula que existiría una relación entre la liberación de toxina Shiga y la acción de ATBs con el estrés bacteriano en el biofilm de STEC, de cumplirse esta hipótesis se realizarían importantes aportes al estudio de la patogenicidad y el tratamiento del SUH.

Objetivo general

El objetivo general del presente trabajo de tesis doctoral es esclarecer aspectos metabólicos y fisiológicos en relación al estrés celular, la liberación de toxina y a la acción de ATBs sobre biofilm de STEC.

Objetivos específicos

- ✓ Caracterizar factores de virulencia de cepas clínicas aisladas de pacientes con SUH, estudiando la capacidad de formar biofilms de cepas STEC y la influencia de distintas condiciones de cultivo en el estrés oxidativo de las células sésiles.
- ✓ Profundizar el conocimiento sobre los efectos de ATBs bactericidas como (ciprofloxacina y fosfomicina) y bacteriostático como (rifaximina) y la relación con el estrés oxidativo y nitrosativo de las células sésiles del biofilm de STEC.
- ✓ Evaluar factores que modifican la liberación de toxina Shiga desde el biofilm de STEC y la citotoxicidad sobre células sensibles.

Capítulo 2: MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

En este trabajo de tesis doctoral, se trabajó con ocho cepas clínicas de *E. coli* aisladas de pacientes pediátricos que fueron diagnosticados con SUH provistas por Hospitales pediátricos de la provincia de Córdoba. Se utilizó una cepa de referencia, EDL 933 (O157:H7) cedida por la Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud (ANLIS) “Dr. Carlos G. Malbrán”. Estas cepas fueron cultivadas en agar tripteína soya (ATS-Britania) e incubadas a 37 °C durante 24 h. Se realizaron repiques periódicos de las cepas en estudio y se preservaron los cultivos bacterianos a -80 °C utilizando glicerol al 10 % (v/v) como crioprotector (Baronetti y col., 2013; Villegas y col., 2013).

Para estandarizar los inóculos, a un cultivo “overnight” en Caldo Tripteína Soya (CTS-Britania) se le determinó la densidad óptica (DO) a 600 nm mediante un espectrofotómetro Shimadzu Modelo UV-160A a 600 nm y se realizó el recuento de unidades formadoras de colonias/ml (UFC/ml) en ATS. Se definió que una $DO_{600nm}=1$ equivale a 1.10^{12} UFC/ml (Villegas y col., 2013).

2.2 Caracterización de las cepas

2.2.1 Caracterización fenotípica de las cepas STEC

2.2.1.1 Siembra en agar Eosina Azul de Metileno y agar Mac Conkey sorbitol

Las cepas fueron sembradas en agar Eosina Azul de Metileno (EMB Britania), medio selectivo y diferencial, para el crecimiento de Enterobacterias. La combinación de eosina y azul de metileno, inhibe el desarrollo de bacterias Gram (+) y posterior a un período de incubación de 24 h a 37 °C, permite la diferenciación de bacterias fermentadoras de lactosa (colonias de color azulado-negro con cierto brillo metálico)

y no fermentadoras (colonias incoloras). Se realizó además, una siembra en Agar Mac Conkey Sorbitol (SMAC-Britania), que inhibe el crecimiento de microorganismos Gram (+) y permite determinar la capacidad fermentadora del sorbitol. La lectura luego de 24 h de incubación a 37 °C permite diferenciar los microorganismos fermentadores de sorbitol (colonias rosadas-rojizas) de los no fermentadores (colonias incoloras) (Hermos y col., 2011; Janezic y col., 2013).

2.2.1.2 Determinación de los antígenos de superficie O y H

Se realizó el diagnóstico presuntivo de *E. coli* O157 basada en el empleo de anticuerpos específicos anti-O157 adsorbidos a partículas de látex (Oxoid Ltd.), que aglutinan con la bacteria cuando el antígeno O está presente en el lipopolisacárido bacteriano (Chapman y col., 1989; Zhang y col. 2002).

La detección del antígeno flagelar, se realizó por la técnica convencional de aglutinación en tubo, utilizando anticuerpos anti-H desde H1 hasta H56 debido a que hay al menos 56 tipos de antígenos diferentes (Zhang y col. 2002). Se estimuló la movilidad de cada cepa en Bacto Mil Medium (Difco), en tubos "U" a 37 °C durante 18 h y se sembró en 8 ml de caldo cerebro – corazón (Britania). A las 6 h de cultivo se adicionó a cada tubo 8 ml de solución salina formolada al 0,5% y se dejó en reposo durante 18 h. Se prepararon los antisueros H diluyendo 1 µl en 200 µl en solución fisiológica y se pusieron en contacto 200 µl de cada antisuero con 200 µl del preparado mencionado anteriormente. Se efectuó la lectura analizando la precipitación, luego de un período de incubación de 2,5 h a 45 °C.

2.2.1.3 Detección de toxinas

Se realizó la detección de las toxinas Stx1 y Stx2 mediante un inmunoensayo óptico utilizando el kit BioStar OIA SHIGATOX. Se añadieron 200 µl de un cultivo “overnight” en CTS a una mezcla de anticuerpos conjugados. Transcurrido un minuto, dos gotas de esa mezcla de reacción fueron transferidas directamente sobre el centro de la superficie de ensayo que contiene anticuerpos policlonales específicos para Stx1 y Stx2. Estos anticuerpos inmovilizados capturaron el complejo antígenos/conjugado y luego del lavado, se añadió el sustrato. Se utilizó toxina Shiga purificada (Inverness medical) e inactivada como control positivo y PBS como control negativo. Se consideró un resultado positivo aquel que muestra un punto de control dentro de un círculo de reacción de color azul fuerte o púrpura. (Teel y col., 2007)

2.2.1.4 Análisis de la fimbria curli.

La caracterización fenotípica de la expresión de la fimbria curli se realizó mediante diseminación en estrías por agotamiento en agar RC (agar Luria Bertani suplementado con RC 40 mg/l y azul brillante G de Coomassie 20 mg/l) durante 48 h a 28 °C (Bokranz y col., 2005; Ryu y Beuchat 2005).

Las bacterias que expresan la fimbria curli retienen el colorante diazo RC y se tiñen de rojo, brindando una forma conveniente de identificar la expresión de los genes (Costerton *et al.*, 1999). Se consideró un resultado positivo a la producción de fimbria curli cuando la colonia bacteriana presentó una coloración roja y con superficie rugosa (fenotipo “rdar”⁶, de las siglas) y que también sintetizan celulosa. Se interpretó como resultado negativo de la producción de fimbria curli cuando la

⁶ Del inglés red, dry and rough

colonia fue blanca y lisa (-) (fenotipo “saw”⁷) y que no sintetiza celulosa (Da Re y Ghigo, 2006; y Uhlich y col., 2006). Se utilizó la cepa O157:H7 EDL933 como referencia para el fenotipo “saw”.

2.2.1.5 Hidrofobicidad celular

Para el estudio de hidrofobicidad de las cepas bacterianas se realizó una partición entre fase acuosa-fase orgánica (relación 1:1) en ampollas de decantación. Cultivos “overnight” en 5 ml de CTS (fase acuosa) de cada cepa se pusieron en contacto con 5 ml de un solvente orgánico (xileno) empleándose este solvente por su carácter apolar e insolubilidad en H₂O. Los tubos fueron agitados utilizando un Vortex durante 2 min y colocados durante 30 min en un baño termostatzado a 37 °C para permitir la separación de las fases. Dos ml de la fase acuosa fueron extraídos de cada ampolla de decantación para la determinación de la DO_{600nm} en un espectrofotómetro (UV-1601 PC Visible Spectrophotometer SHIMADZU, Japan) llevado a cero con Buffer Fosfato Salino (PBS pH=7,2).

Se calculó el porcentaje que particionó a la fase orgánica midiendo las DO_{600nm} de las suspensiones bacterianas (Hassan y Frank, 2004). La fórmula empleada para obtener los resultados fue:

$$\% \text{ de hidrofobicidad} = 100 - \left(\frac{DO_{\text{final}} \times 100}{DO_{\text{inicial}}} \right)$$

⁷ Del inglés soft and white

2.2.2 Caracterización genotípica de las cepas STEC

2.2.2.1 Detección de factores de virulencia

En las nueve cepas estudiadas se analizó la presencia de genes que codifican para diferentes factores de virulencia. Los genes investigados fueron: *stx1* (toxina Shiga 1), *stx2* (toxina Shiga 2), *eae* (intimina) y *hlyA* (enterohemolisina) y los set de primers utilizados fueron los descritos en la tabla 2.1 utilizando la metodología empleada por Paton y Paton (2002).

La PCR⁸ se realizó con una solución buffer 10X de KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM pH 9, Tritón X-100 al 0,1%, MgCl₂ 2 mM, gelatina al 0,01%, 0,2 mM de cada dNTP y 250 nM de cada “primer” (Tabla 2.1). Se trabajó en volumen final de 50 µl conteniendo 1U de Taq ADN polimerasa (Highway) y 5 µl de muestra. El termociclado se realizó en ciclador térmico programable (Ivema modelo T17). Los productos de amplificación se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio y se visualizaron con luz UV.

La amplificación por PCR- MULTIPLEX fue realizada bajo las siguientes condiciones experimentales: ciclo 1 a 9 (etapa de desnaturalización: 95 °C, 60 s; etapa de hibridación: 65 °C, 120 s; etapa de extensión: 72 °C, 90 s) ciclo 10 a 15 (desnaturalización: 95 °C, 60 s; hibridación: 65 °C a 60 °C (-1° C en cada ciclo), 120 s; extensión: 72 °C, 90 s) ciclo 16 a 24 (desnaturalización: 95 °C, 60 s; hibridación: 65 °C, 120 s; extensión: 72 °C, 90 s) y ciclo 25 a 35 (desnaturalización: 95 °C, 60 s; hibridación: 65 °C, 120 s; extensión: 72 °C, 150 s).

⁸ En colaboración con los Dres. Parma y Padola de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Centro de la Provincia de Buenos Aires.

Tabla 2.1. Primers utilizados en la amplificación por PCR-MULTIPLEX para la detección de genes de virulencia (*stx*₁, *stx*₂, *eae*, *hlyA* y *saa*).

Gen	Primers*	Fragmento amplificado (pb)
<i>stx</i> ₁ for	5´ATA AAT CGC CAT TCG TTG ACT AC	180
<i>stx</i> ₁ rev	5´AGA ACG CCC ACT GAG ATC ATC	
<i>stx</i> ₂ for	5´GGC ACT GTC TGA AAC TGC TCC	255
<i>stx</i> ₂ rev	5´TCG CCA GTT ATC TGA CAT TCT G	
<i>eaeA</i> for	5´GAC CCG GCA CAA GCA TAA GC	384
<i>eaeA</i> rev	5´CCA CCT GCA GCA ACA AGA GG	
<i>hlyA</i> for	5´GCA TCA TCA AGC GTA CGT TCC	534
<i>hlyA</i> rev	5´AAT GAG CCA AGC TGG TTA AGC T	

*Primers diseñados por Paton y Paton (2002). Abreviaturas: for (forward), rev (reverse), pb (pares de bases).

2.2.2.2. Detección del antígeno flagelar “H7”

En las nueve cepas estudiadas se analizó la presencia del gen *fliCh7* que codifica para el antígeno flagelar “H7”. El conjunto de primers utilizados fueron los descritos en la tabla 2.2 utilizando la metodología empleada por Gannon y col. (1997).

La PCR se realizó con una solución buffer 1X de KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM pH 8,3; Tritón X-100 al 0,1%; MgCl₂ 1,5 mM, gelatina al 0,01%, 0,2 mM de cada dNTP y 250 nM de cada “primer” (Tabla 2.2). Se trabajó en volumen final de 25 µl

conteniendo 1,5 U de Taq ADN polimerasa (Highway) y 5 µl de muestra. El termociclado se realizó en ciclador térmico programable (Ivema modelo T17). Los productos de amplificación se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio y se visualizaron con luz UV. Los parámetros de amplificación incluyeron 35 ciclos cada uno de desnaturalización a 94 °C 15 s, hibridación a 65 °C 15 s y extensión a 72 °C 75 s, seguido de una extensión final a 72 °C durante 10 min.

Tabla 2.2. Primers utilizados en la amplificación por PCR para la detección del gen *fliCH7*.

Gen	Primers*	Fragmento amplificado (pb)
<i>fliCH7 for:</i>	5'GCGCTG TCG AGT TCT ATC GAG C3	650
<i>fliCH7 rev:</i>	5'CAA CGG TGA CTT TAT CGC CAT TCC3'	

*Primers diseñados por Gannon y col (1997). Abreviaturas: for (forward), rev (reverse), pb (pares de bases).

2.2.2.3 Detección de los genes codificantes de la fimbria curli

En las cepas STEC se detectó la presencia de los genes codificantes para la fimbria curli mediante la utilización de una reacción de PCR. Los genes investigados fueron: *csgA* (subunidades de curlina) y *csgD* (regulador transcripcional). También se estudió la presencia del gen de un regulador indirecto de la expresión de *csgA* (*crI*). El conjunto de primers utilizados fueron los descritos en la tabla 2.3 utilizando la metodología empleada por Maurer y col. (1998) y Dyer y col. (2007).

Las muestras y reactivos se prepararon según lo indicado en el punto 2.2.2.1.

Las condiciones de termociclado de las reacciones PCR para la detección de los genes relacionados con la formación de biofilm (*csgA* y *crl*) fueron las siguientes: temperatura y tiempo inicial (94°C, 120 s); 30 ciclos (desnaturalización: 94 °C, 30 s; hibridación: 54 °C, 30 s; extensión: 68 °C, 30 s); temperatura y tiempo final (72 °C, 600 s). Para el gen (*csgD*), también relacionado con la formación de biofilm las condiciones fueron: temperatura y tiempo inicial (94 °C, 120 s); 30 ciclos (desnaturalización: 94 °C, 30 s; hibridación: 46 °C, 30 s; extensión: 68 °C, 30 s); temperatura y tiempo final (72 °C, 600 s).

Tabla 2.3 Primers utilizados para la detección de genes relacionados con la formación de biofilm, por medio de PCR.

Gen	Primers*	Fragmento amplificado (pb)
<i>crl for</i>	5'TTTCGATTGTCTGGCTGTATG	250
<i>crl rev</i>	5'CTTCAGATTCAGCGTCGTC	
<i>csgAfor</i>	5'ACTCTGACTTGACTATTACC	200
<i>csgA rev</i>	5'AGATGCAGTCTGGTCAAC	
<i>csgD for</i>	5'ATGTTTAATGAAGTCCATAG	650
<i>csgD rev</i>	5 TTATCGCCTGAGGTTATC	

*Primers diseñados por Maurer y col. (1998) y Dyer y col. (2007). Abreviaturas: for (forward), rev (reverse), pb (pares de bases).

2.3 Estudio de la susceptibilidad a antimicrobianos en células planctónicas de STEC

La concentración inhibitoria mínima (CIM) está definida como la menor concentración de droga capaz de inhibir en un 99,9% el crecimiento microbiano en relación al inóculo inicial y su determinación permite conocer la actividad de una droga y su espectro antibacteriano. Se utilizaron los correspondientes controles positivos y negativos (CLSI, 2010).

Se evaluó la susceptibilidad de las cepas frente a dos antibióticos bactericidas: (CIP- Todo Droga) y (FOS- Química Luar) y un bacteriostático: (RIF- Aventis-Sanofi).

La CIM a CIP se determinó utilizando el método de dilución en tubos. La CIM a FOS y RIF fue determinada mediante el método de dilución en agar. Las determinaciones se realizaron de acuerdo a normas internacionales del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2010).

Brevemente, en el método de CIM para CIP, el inóculo bacteriano se preparó suspendiendo 4 ó 5 colonias de cultivos de 18 h en agar Müller Hinton (AMH- Britania) y se ajustó la turbidez al 0,5 de la escala de Mc Farland (1×10^8 UFC/ml), diluyéndose en caldo Müller Hinton hasta obtener aproximadamente 5×10^5 UFC/ml en cada tubo. Luego se adicionó CIP (rango: $7,8 \times 10^{-3}$ a $64,0 \mu\text{g/ml}$).

Para la CIM a FOS y RIF se utilizó un rango de concentraciones de 0,5 a 128 $\mu\text{g/ml}$ que fueron agregadas a placas de Petri y mezcladas con AMH suplementado con 25 mg/ml de glucosa-6-fosfato, [Sigma Chemical Co.] para FOS. Para la preparación del inóculo también se ajustó la turbidez al 0,5 de la escala de Mc Farland y posteriormente se realizó una dilución 1/10 en CTS estéril obteniéndose una concentración de 1×10^7 UFC/ml y se sembraron 2 μl de cada cepa sobre las placas para obtener la concentración final de 1×10^4 UFC en "spot" de 5 – 8 mm de

diámetro. La lectura de todas las CIM se realizó después de 20 h de incubación a 37°C.

2.4 Formación de biofilms

2.4.1 Formación de biofilms en cepas STEC

El ensayo para la formación de biofilms por microtécnica fue adaptado del método descrito por O'Toole y Kolter (O'Toole y Kolter., 1998). Para la determinación de las condiciones óptimas de formación de biofilms en cepas STEC se variaron diversos parámetros como: concentración del inóculo inicial, tiempo de adherencia y tiempo de incubación.

Para el estudio de la concentración del inóculo inicial, se sembraron 200 μL /pocillo en microplacas de 96 pocillos de un cultivo de $\text{DO}_{600\text{nm}}=1$ (1×10^{11} UFC/ml) y diferentes diluciones ($1/10=1 \times 10^{11}$ UFC/ml, $1/50=2 \times 10^{10}$ UFC/ml, $1/100=1 \times 10^{10}$ UFC/ml y $1/200=5 \times 10^9$ UFC/ml) de cada cepa. Se incubaron por un período de 48 h en estufa a 37 °C, se retiró el sobrenadante de la microplaca, se realizaron 3 lavados con 200 μL /pocillo de PBS y se dejó secar la placa en forma invertida durante 24 h a temperatura ambiente. Se coloreó con cristal violeta (CV-Anedra) 1% (p/v) por 30 min y luego se eluyó con alcohol/acetona (70:30-Porta/Merck) para cuantificar la formación de biofilms mediante la determinación de la $\text{DO}_{600\text{nm}}$ (Modelo BioRad 680, Hercules, CA). Como control negativo se empleó CTS estéril (DOc). (Arce Miranda y col., 2011; Villegas y col., 2013). Se definió arbitrariamente una Unidad de Biomasa de Biofilms (UBB), como $\text{DO}_{600\text{nm}} = 0,1$ corresponde a 1 UBB (Arce Miranda y col., 2011).

Se analizó la adherencia de cepas STEC a tres tiempos diferentes (2,4 y 24 h). Se sembraron 200 μL /pocillo en microplacas de 96 pocillos de un cultivo de 1×10^{11} UFC/ml y posterior al período de adherencia se retiró el sobrenadante y se realizó un cambio de medio de cultivo para eliminar las células planctónicas. Las microplacas fueron incubadas durante 48 h en estufa a 37 °C. Estos mismos volúmenes y concentraciones de inóculo fueron utilizados para el estudio del tiempo de incubación. Las placas fueron incubadas durante 24, 48 y 72 h a 37 °C con un período de adherencia de 24 h previo a la incubación y se cuantificó la formación de la biomasa del biofilms como se mencionó en el párrafo anterior.

Las cepas fueron clasificadas según la siguiente escala (Rivas y col., 2007):

DO DOc	No productora de biofilms
DOc <DO (2 × DOc)	Débil productora de biofilms
(2 × DOc) <DO (4 × DOc)	Moderada productora de biofilms
(4 × DOc) <DO	Fuerte productora de biofilms

DOc: densidad óptica control

2.4.2 Formación de biofilms en diferentes condiciones ambientales y nutricionales.

Se evaluó la influencia de diversas condiciones de cultivo (microaerofilia, agregado de glúcidos y agente reductor) sobre la formación de biofilms utilizando un inóculo de 1×10^{11} UFC/ml de las tres cepas de *E. coli*.

La microaerofilia se obtuvo mediante el consumo de O_2 colocando las microplacas en el interior de un recipiente hermético hasta el agotamiento del mismo. Para el estudio de la influencia del oxígeno sobre la formación de biofilms se utilizó como agente reductor el medio de cultivo tioglicolato con indicador (Tiog - Britania). Este medio retarda la dispersión de CO_2 y O_2 y la presencia de grupos -

SH-, aportados por la cisteína y el tioglicolato de sodio disminuye el potencial de óxido-reducción (Arce Miranda y col., 2011). El efecto del agregado de nutrientes (glúcidos) sobre la formación de biofilm se evaluó mediante el empleo de glucosa (Glu), manosa y maltosa, en una concentración del 0,50 % (18 h, 37° C) por ser la concentración que mostró un mayor aumento en la formación de biofilms en *E.coli*. La matriz exopolisacárida del biofilm está compuesta por glúcidos por lo que se seleccionaron los elementos antes mencionados para evaluar la influencia en la formación de biofilm de STEC (Bales y col., 2013). Se evaluó además, el efecto sinérgico de un medio reductor como tioglicolato con la adición de un nutriente como la glucosa.

2.4.3 Influencia de un agente oxidante

Se utilizó un oxidante exógeno como H₂O₂ (30%-Merck) a distintas concentraciones (0; 2,5; 5; 15 y 30 mM) con el objetivo de analizar su efecto sobre la formación del biofilm (Baldeck y Marquis, 2008). Las cepas STEC fueron adheridas a microplacas de 96 pocillos durante 24 h y posteriormente se retiró el sobrenadante. Se realizó un cambio de medio con CTS conteniendo las diferentes concentraciones de H₂O₂ y se incubó durante 24 h a 37 °C. Posteriormente se determinó la formación de biofilm como se explicó en el punto 2.4.1.

2.4.4 Concentración de erradicación mínima de biofilm (MBEC) en células sésiles frente a ATB

Se estudio la MBEC mediante la adaptación del método descrito por Ceri y col. (1999; 2001). Se sembraron en microplacas de 96 pocillos, inóculos de 1×10^7 UFC/ml de cada cepa en estudio. Posterior al período de adherencia de 24 h se retiraron los sobrenadantes de cultivo para eliminar las bacterias planctónicas, se lavó cada pocillo 2 veces con 200 μ l de PBS pH=7,2 y se agregaron diluciones seriadas de los antibióticos CIP, FOS y RIF según CIM determinada en estado planctónico. Los rangos de concentración fueron: de $3,9 \times 10^{-3}$ a 312 μ g/ml para CIP, de 0,25 a 2000 μ g/ml para FOS y de 4 a 3200 μ g/ml para RIF. Se retiró el sobrenadante, se colocaron 50 μ l de PBS pH=7,2 en cada pocillo y se realizó un sonicado (40KHz, 60s) en un aparato de ultrasonido (testlab). La MBEC se determinó mediante recuento de bacterias viables posterior a 24 h de incubación a 37 °C.

2.4.5 Adición de antibióticos bactericidas y bacteriostático

Según las CIMs de las cepas determinadas en estado planctónico para cada ATB, se sembraron en microplacas de 96 pocillos, inóculos de 1×10^7 UFC/ml de cada cepa. Posterior a un período de adherencia de 24 h se retiraron los sobrenadantes de cultivo, se lavó cada pocillo 2 veces con 200 μ l de PBS pH=7,2 y se realizó un cambio de medio conteniendo diferentes concentraciones de ATBs (2 concentraciones subCIM, la concentración correspondiente a la CIM y 2 concentraciones supraCIM. Las microplacas fueron incubadas con las diferentes concentraciones de ATB durante 24 h a 37 °C. Posteriormente, se retiró el sobrenadante de la microplaca y se dejó secar en forma invertida durante 24 h a temperatura ambiente. Se coloreó con CV 1% y se determinó la formación de biofilm según se describió en el punto 2.4.1.

2.5 Estudio de estrés celular bacteriano.

2.5.1 Determinación cuantitativa de ERO y ERN.

2.5.1.1 Determinación de ERO en células planctónicas

En estado planctónico, se utilizó un ensayo de quimioluminiscencia (QL) para la determinación de metabolitos del oxígeno. En la QL se cuantifica la luz emitida por la lucigenina (N,N'-dimetil-9,9'-bisacridina dinitrato, SIGMA)) que en presencia de ERO; principalmente de O_2^- ; se oxida dando origen a un diojetano inestable, que se descompone formando dos moléculas de N-metilacridona y emitiendo luz a 470 nm (Faulkner y Fridovich, 1993).

Se prepararon cultivos de 18 h de las cepas de *E.coli* en CTS a 37°C, y se ensayaron directamente por QL. Se incubaron 0,3 ml de cada suspensión bacteriana ($DO_{600}=1$) con 0,3 ml de CIP o RIF (concentración final $7,80 \times 10^{-3}$; 0,50 y 0,03 $\mu\text{g/ml}$ para CIP y 8; 32 y 320 para RIF) y se incubaron durante 120 minutos a 37 °C. Después de la incubación se agregaron 0,3 ml de lucigenina y 0,1 ml de dimetil sulfóxido (DMSO, Anedra) para permeabilizar las bacterias. Para determinar la producción basal de ERO de cada cepa se efectuó el ensayo en ausencia de ATB. Las determinaciones fueron realizadas a temperatura ambiente en un quimioluminómetro Bio-Orbit modelo 1253 y se expresó como % de aumento de unidades relativas de luz (URL) con respecto al basal.

2.5.1.2 Ensayo de producción de anión superóxido en biofilms

En el biofilm, la producción de O_2^- se determinó mediante la técnica de reducción del azul de nitrotetrazolio (NBT-SIGMA). En esta prueba, el NBT oxidado (incoloro) pasa a su forma reducida (NBTH), formándose un precipitado, el azul de formazán. Para determinar las ERO liberadas al medio se utilizó sobrenadante de

biofilms y se incubó el mismo con NBT (1 mg/ml) a 37 °C durante 30 minutos. Posteriormente, la reacción fue detenida por el agregado de 0,02 ml de HCl 0,1 N y se determinaron las DO a 540 nm utilizando un lector de microplacas (Bio-Rad Model 550) (Arce Miranda y col., 2011; Villegas y col., 2013). La unidad de medida de las ERO es DO por lo tanto los resultados fueron expresados en función del biofilms específico para cada cepa y condición (DO de ERO/UBB).

2.5.1.3 Producción de ON en biofilms

La producción de ON en el biofilms se determinó mediante la cuantificación de nitritos en los sobrenadantes del biofilms utilizando la reacción de Griess. Esta reacción se basa en la formación de un cromóforo por la reacción de sulfanilamida con nitrito en medio ácido, seguido de un acoplamiento con aminas bicíclicas tales como el N-1-(naftil) etilendiamina dihidrocloruro. A 100µl del sobrenadante de cultivo se le agregó una alícuota de 200 µl del reactivo de Griess preparado a partir de la mezcla de volúmenes iguales de sulfanilamida (1.5% en HCL 1N) y diclorhidrato de N-(1-Naftil) etilendiamina (0,13% en H₂O). Luego se incubó durante 15 min a temperatura ambiente en oscuridad y se determinaron las DO a 540 nm utilizando el lector de microplacas mencionado anteriormente. Se realizó una curva de calibración con una solución 500 µM de NaNO₂ para determinar la concentración de nitritos presentes y los resultados obtenidos se expresaron como concentración de nitritos por UBB [Nitritos (µM)/UBB]. (Baronetti y col., 2011; Paraje y col., 2009; Villegas y col., 2013).

2.5.2 Estudio de las defensas antioxidantes enzimáticas

2.5.2.1 Determinación cuantitativa de la actividad de la enzima SOD y CAT.

Para la reacción de determinación de SOD se utiliza riboflavina la cual pierde un electrón en presencia de luz y dispara una serie de reacciones que generan $O_2^{\bullet -}$ responsable de reducir el NBT a formazán. La reducción de NBT, por lo tanto, disminuye en presencia de SOD ya que esta enzima dismuta el $O_2^{\bullet -}$ generado a H_2O_2 (Baronetti y col., 2013). Para realizar esta medición, se utilizaron 10 μ L de sobrenadante de cultivo de cada condición ensayada y se procedió al agregado de 30 μ L de metionina (SIGMA) 47,7 mM; 10 μ L de NBT (SIGMA) 0,825 mM en PBS pH=7,2; 30 μ L de EDTA 0,367 μ M y 30 μ L de riboflavina (SIGMA) 7,33 μ M. Esta mezcla de reacción fue expuesta a luz fluorescente de 20 W por 40-60 minutos y la lectura del color final se realizó a 595 nm en un lector de microplacas (Bio-Rad) (Arce Miranda y col., 2011; Baronetti y col., 2011; Villegas y col., 2013). Los resultados se expresaron como % de actividad SOD/UBB.

Para la cuantificación de la actividad CAT en *E. coli* se utilizó el método espectrofotométrico descrito por Sinha (1972) que involucra la utilización de dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$ -Merck) en solución ácida de pH=2,0 (2 g de $K_2Cr_2O_7$ en 25 ml de H_2O destilada y llevar a volumen final 100 ml con ácido acético glacial). Sobre el biofilm ya formado, se colocaron 40 μ L de H_2O_2 0,2 M, 50 μ L de PBS pH=7,2 y finalmente 200 μ L de la solución de $K_2Cr_2O_7$. La microplaca se incubó durante 2 minutos a 100 °C y se enfrió en baño de hielo para determinar la DO a 595 nm. Los resultados fueron expresados como unidades (U) CAT/UBB. Una U CAT desdobra 1 μ M de H_2O_2 por min a 25 °C a pH = 7,0 (Day y col., 2000; Villegas y col., 2013).

2.5.3 Determinación de la capacidad antioxidante total (Ferrous Reduction Antioxidant Potency [FRAP])

Para determinar la capacidad antioxidante total bacteriana se adaptó un método de determinación en fluidos biológicos (Benzie y Strain, 1999). El ensayo FRAP mide el poder reductor de los antioxidantes tanto enzimáticos como no enzimáticos. Esta técnica, se basa en la reducción del complejo Fe^{3+} -2,4,6-tris (2-piridil)-1,3,5-triazina (TPTZ, SIGMA) a su forma ferrosa el cual tiene un color azul intenso, que puede ser monitoreado espectrofotométricamente a 593 nm. El cambio en la absorbancia está directamente relacionado al poder reductor combinado o total de los antioxidantes donantes de electrones presentes en la mezcla de reacción (Aiassa y col., 2011; Baronetti y col., 2013; Páez y col., 2010).

Se utilizaron 10 μL del sobrenadante de cultivo de cada una de las condiciones ensayadas al cual se le agregó 300 μL de una mezcla de reactivos formada por 10 partes de buffer acetato 300 mM de pH 3,6; una parte de solución de TPTZ 10 mM en HCl 40 mM y una de solución de cloruro férrico ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 20 mM. Se emplearon soluciones acuosas de concentraciones conocidas de Fe^{2+} ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) como testigos para realizar la curva de calibración y se determinó el color final en un lector de microplacas (Bio-Rad) a 595 nm. Los resultados se expresaron como $\mu\text{M FeSO}_4/\text{UBB}$. (Aiassa y col., 2011; Baronetti y col., 2013; Páez y col., 2010).

2.6 Efecto de antioxidantes y sequestrantes de ERO sobre el biofilm de STEC

Se analizó el efecto de diferentes antioxidantes y secuestrantes de ERO (Tirón-Sigma (50mM), glutatión-Sigma (10 mM) o ácido ascórbico (AA) -Sigma (10 mM)) sobre la formación del biofilm.

Se sembraron en microplacas de 96 pocillos, inóculos de 1×10^7 UFC/ml de cada cepa en estudio. Posterior al período de adherencia de 24 h se retiraron los sobrenadantes de cultivo y se lavó cada pocillo 2 veces con 200 μ l de PBS pH=7,2. Se realizaron cambios de medio conteniendo las concentraciones correspondientes de antioxidantes y secuestrantes. Se analizó además, el efecto de tres concentraciones de CIP (1 concentración subCIM, la concentración correspondiente a la CIM y 1 concentración supraCIM) junto con el agregado de los antioxidantes y secuestrantes mencionados anteriormente sobre la formación de biofilms de STEC. Posterior a 24 h de incubación a 37 °C se determinó la formación de biofilms según punto 2.4.1.

Las soluciones de tirón, glutatión y ácido ascórbico fueron preparadas en agua destilada estéril y luego adicionadas al medio de cultivo CTS. Tirón es un secuestrante de O_2^{\bullet} ; mientras que glutatión reducido, actúa contra varios compuestos oxidantes tales como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el anión superóxido (O_2^{\bullet}), radicales hidroxilo (HO^{\bullet}) y especies reactivas del carbono. (Páez y col., 2010). El AA o vitamina C por su parte, es también considerado un antioxidante debido a su acción como secuestrante o “scavenger” de radicales libres ya que al oxidarse cede sus electrones evitando la oxidación de otros compuestos (Padayatty y col., 2003).

2.7 Liberación de Stx desde el biofilm de STEC

2.7.1 Análisis de citotoxicidad de Stx sobre células Vero

La liberación de Stx desde el biofilm de STEC en diferentes condiciones de cultivo, se evaluó mediante el ensayo de citotoxicidad en células Vero⁹. Las células Vero fueron cultivadas a 37 °C en medio mínimo esencial (MEM - SIGMA) suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino (SFB – SIGMA), 100 mg/litro de penicilina; 200 mg/litro de estreptomycin, y 2,2 g/litro de NaHCO₃ en una atmósfera de 5% de CO₂. Cada sobrenadante de cultivo fue centrifugado a 8.000 rpm durante 10 min a 4 °C y filtrado con filtro millipore de 0,22 µm. Estas células poseen una gran sensibilidad a las Stx debido a la alta concentración de receptores Gb3 y Gb4 que presentan sobre su membrana plasmática, lo que permite detectar Stx1, Stx2 y sus variantes siendo considerada la técnica “gold standard”.

Se sembraron 50 µl de cada sobrenadante (biofilm de STEC en medios con agregado de glucosa, medios reductores y en presencia de ATBs) por duplicado en placas de 96 pocillos conteniendo 4 × 10⁴ células Vero recién tratadas con tripsina y se incubaron durante 72 h a 37 °C en estufa con atmósfera equivalente a 5% de CO₂. Las monocapas de células se fijaron con formaldehído al 10% (v/v) y luego se tiñeron con CV al 0,2% (v/v). Se utilizó como control positivo Stx2 purificada y como control negativo una cepa *stx* positivo y sin efecto citotóxico (*E. coli* serotipo O15:H21) (Fernandez y col., 2013). La lectura de las células Vero se realizó a las 72 h mediante el recuento de 50 campos por cada muestra utilizando un microscopio óptico invertido y aumento de 100x. Los resultados se expresaron como % de efecto citotóxico/UBB.

⁹ En colaboración con los Dres. Parma y Padola de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Centro de la Provincia de Buenos Aires.

2.7.2 Análisis cuantitativo en células Vero

Para determinar el título de la actividad citotóxica se realizaron diluciones (1/10 y 1/100) de los sobrenadantes que resultaron positivos en el ensayo anterior. Con cada una de estas muestras se realizaron diluciones seriadas que fueron sembradas (50 μ l) sobre una placa conteniendo 4×10^4 células Vero recién tratadas con tripsina. La placa se incubó durante 72 h a 37 °C en estufa con atmósfera equivalente a 5% de CO₂. Las monocapas de células se fijaron con formaldehído al 10% (v/v) y se tiñeron con CV al 0,2% (v/v). Se utilizó como control positivo Stx2 purificada y como control negativo una cepa *stx* positivo y sin efecto citotóxico (*E.coli* O15:H21). El título se definió como la inversa de la dilución más alta que presentó destrucción en el 50% de la monocapa.

2.8 Método Estadístico

Los ensayos fueron realizados por triplicado y las diferencias entre las medidas fueron evaluadas usando ANOVA seguido de la prueba de Student-Newman-Keuls para comparaciones múltiples. Un valor de $p < 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo. Los símbolos (*), (**) o (#) indican diferencias significativas a niveles de $p < 0,005$, $p < 0,05$ y $p < 0,01$ según *t* de Student.

RESULTADOS

Capítulo 3: SECCIÓN 1

CAPÍTULO 3

SECCIÓN 1: Caracterizar factores de virulencia de cepas clínicas aisladas de pacientes con SUH, estudiando la capacidad de formar biofilms de cepas STEC. Influencia de distintas condiciones de cultivo en la respuesta de estrés oxidativo de las células sésiles.

3.1 Caracterización feno-genotípica de cepas STEC O157:H7 y no-O157:H7

3.1.1 Caracterización fenotípica de las cepas STEC

Nueve cepas STEC fueron sembradas en medio EMB y se observó que tanto las cepas clínicas como la cepa de referencia (EDL 933) presentaron colonias de color negro-azulado, con brillo metálico característico. En medio SMAC se observó que 7 cepas clínicas (O157) y la cepa de referencia (O157) no fermentaron el sorbitol dando como resultado colonias transparentes, mientras que una cepa clínica (O111), presentó colonias rosadas indicando la fermentación de este azúcar.

La tipificación de las cepas O157 fue confirmada mediante el test de aglutinación con partículas de látex (OXOID) que da positivo cuando el antígeno O está presente en el lipopolisacárido bacteriano, mientras que la cepa clínica O111 no presentó aglutinación (Figura 3.1).



Figura 3.1: Test de aglutinación con partículas de látex de las cepas en estudio

Además, se determinaron los antígenos flagelares de las diferentes cepas mediante la técnica de aglutinación en tubo encontrando sólo un antígeno de los 56 descriptos. Las siete cepas clínicas O157 al igual que la cepa de referencia presentaron el antígeno flagelar (H7) mientras que la cepa O111 no presentó antígeno flagelar por lo que se denominó O111:NM (no móvil) u O111:(H-).

3.1.2 Detección de toxinas

Mediante un inmunoensayo óptico se realizó la detección cualitativa de las Stx1 y Stx2 producidas por las cepas STEC y se observaron resultados positivos para las 8 cepas clínicas analizadas (Figura 3.2).

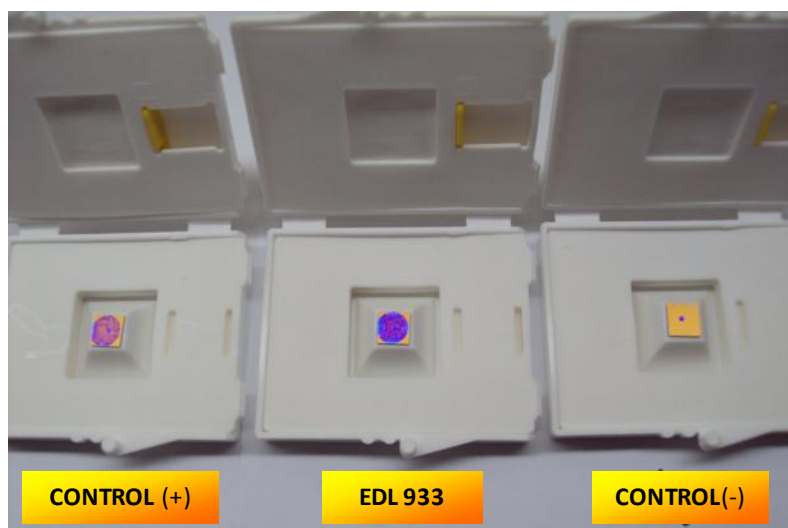


Figura 3.2: Detección de Stx1 y Stx2 de las cepas estudiadas utilizando kit BioStar OIA SHIGATOX.

3.1.3 Análisis cualitativo de la producción de fimbria curli.

La determinación cualitativa se realizó según la morfología y la coloración de las colonias que desarrollaron en agar RC. Se consideró un resultado positivo de la producción de fimbria curli cuando la colonia bacteriana presentó una coloración roja y con superficie rugosa (fenotipo “rdar”) y como resultado negativo a la producción de fimbria curli cuando la colonia fue blanca y lisa (fenotipo “saw”). Se utilizó la cepa O157:H7 EDL933 como referencia para el fenotipo “saw”.

El fenotipo “rdar” estuvo presente sólo en la cepa clínica (O111:H-) mientras que las siete cepas clínicas (O157:H7) presentaron fenotipos “saw” al igual que la cepa de referencia (Tabla 3.1).

Tabla 3.1: Fenotipos de los aislamientos de STEC, sembrados en placas de agar RC. rdar: expresión de fimbria curli. saw: ausencia de expresión de fimbria curli.

CEPA	Nº1 (O111:H-)	Nº2 (O157:H7)	EDL 933 (O157:H7)
Fenotipo en agar RC	rdar 	saw 	saw 

3.1.4 Estudio de hidrofobicidad celular

Una propiedad fisicoquímica relacionada con la formación de biofilm es la hidrofobicidad, por lo cual se estudió la interacción físico-química mediante un ensayo de partición de fases entre la fase acuosa y la orgánica. En las 8 cepas clínicas estudiadas se observaron bajos porcentajes de hidrofobicidad con valores máximos en promedio de 3% indicando que las mismas presentan características hidrofílicas (tabla 3.2). Esto podría indicar que estas cepas STEC tendrían menor capacidad de adherencia a superficies, lo cual podría ser un factor influyente en la formación de biofilms, aunque no está definido su rol.

Tabla 3.2: Hidrofobicidad (%) de las cepas estudiadas

CEPA	Hidrofobicidad (%)	CEPA	Hidrofobicidad (%)	CEPA	Hidrofobicidad (%)
Nº1 O157:H7	0,26 ± 0,08	Nº4 O111:H-	2,32 ± 0,38	Nº7 O157:H7	2,85 ± 0,29
Nº2 O157:H7	1,53 ± 0,14	Nº5 O157:H7	1,03 ± 0,13	Nº8 O157:H7	1,43 ± 0,18
Nº3 O157:H7	0,40 ± 0,05	Nº6 O157:H7	3,17 ± 0,21	Nº9 EDL 933	3,28 ± 0,14

3.1.5 Caracterización genotípica de las cepas STEC

STEC es un patógeno que se caracteriza por presentar gran cantidad de factores de virulencia; es por ello que se investigó si algunos de estos factores se encontraban presentes en las cepas clínicas en estudio. Cuatro genes de virulencia (*stx1*, *stx2*, *hlyA* y *eae*) fueron estudiados mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa PCR-Multiplex.

Todas las cepas estudiadas fueron positivas para los genes *hlyA* (hemolisina) y *eae* (intimina) mostrando productos de amplificación de 534 y 384 pb respectivamente. Se observó la presencia del gen *stx2* en todas las cepas clínicas de serotipo O157:H7 con amplicones de 255 pb mientras que la cepa O111 no presentó este gen y sólo presentó el gen *stx1* con productos de amplificación de 180 pb. Además, sólo una cepa clínica O157:H7 al igual que la cepa de referencia, presentaron ambos genes *stx1* y *stx2* (figura 3.3).

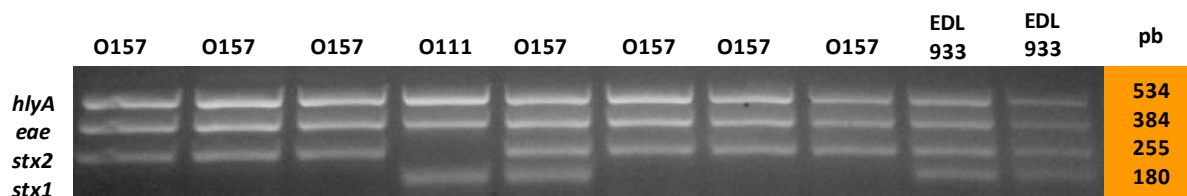


Figura 3.3: Detección de genes de virulencia en 8 cepas clínicas STEC y una cepa de referencia por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa PCR-Multiplex: caracterización genética de *hlyA* (hemolisina), *eae* (intimina), *stx2* y *stx1* (toxinas Shiga).

Debido a que O157:H7 es el serotipo más frecuentemente asociado a enfermedad en humanos, se utilizó una PCR para la detección del gen flagelar H7, con el objetivo de mejorar la especificidad en la identificación de cepas STEC. Se detectaron genes *fliCh7* que codifican para el antígeno flagelar en ocho de las cepas estudiadas, sin embargo, la cepa *E.coli* O111 no poseía este gen (figura 3.4).

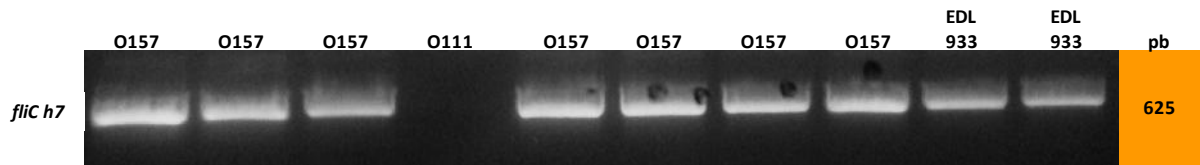


Figura 3.4: Detección del gen *fliCh7* en cepas STEC mediante PCR.

Los genes *csgA* (subunidades de curlina), *csgD* (regulador transcripcional) y *crl* (regulador indirecto de la expresión de *csgA*) que codifican para proteínas que participan en la expresión de curli en cepas STEC, están asociados con la producción de biofilms, es por esto que se investigó si los mismos se encontraban en las cepas en estudio. Mediante PCR se realizó la detección de estos genes y se observó que todas las cepas clínicas resultaron positivas para los tres genes estudiados presentando amplicones de 200 pb para el gen *csgA*, 250 pb para *crl* y 650 pb para *csgD*, similar a la cepa de referencia de *E.coli* EDL 933(Figura 3.5).

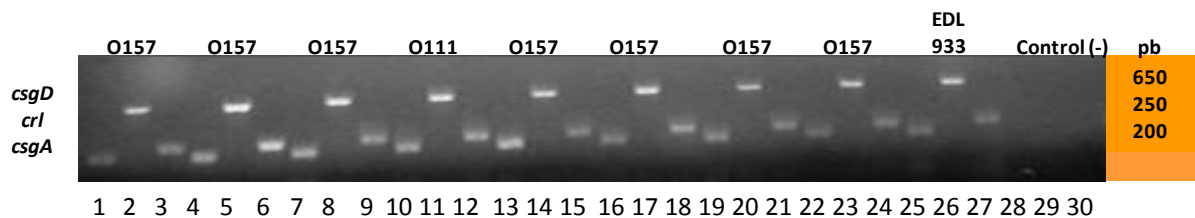


Figura 3.5: Gel de agarosa donde se observan las bandas de amplificación de los genes *crl*, *csgD* y *csgA* de 8 cepas clínicas STEC y una cepa de referencia (EDL 933). Las bandas presentes en las calles 1, 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22 y 25 corresponden al gen *csgA* (200 pb), las bandas de las calles 2, 5, 8, 11, 14, 17, 20, 23 y 26 corresponden al gen *csgD* (650 pb) y las bandas de las calles 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24 y 27 al gen *crl* (250 pb).

En base a los resultados obtenidos en la caracterización fenotípica de las cepas STEC, se seleccionaron dos de las ocho cepas clínicas analizadas que serán objeto de estudio en los ensayos posteriores. Como criterio para la elección, se tuvo en cuenta el serotipo que presentaba la bacteria y la presencia de los genes que codifican para las toxinas, por ser considerados principales factores de

virulencia. Es por ello que se seleccionó la cepa de serotipo O111 que presentaba sólo el gen que codifica para la toxina *stx1* y la única cepa O157 que presentó ambos genes, *stx1* y *stx2*.

Ambas cepas clínicas fueron analizadas en comparación con la cepa de referencia EDL 933 para todos los estudios posteriores.

3.2 Estudio de la formación de biofilm y estrés celular

3.2.1 Formación de biofilm en cepas STEC

Con el objetivo de evaluar la formación de biofilm en cepas STEC y determinar condiciones óptimas de formación, se modificaron diversos parámetros como: concentración del inóculo inicial, tiempo de adherencia, tiempo de incubación y efecto del oxígeno.

Se determinó la capacidad de dos cepas clínicas (N°1=O111:H- y N°2=O157:H7) y la cepa de referencia EDL 933 de formar biofilms mediante la coloración con CV y posterior determinación de la DO_{600nm} expresando los resultados como UBB. Se utilizaron cultivos overnight (1×10^{12} UFC/ml) y diluciones 1/10, 1/50, 1/100 y 1/200 del inóculo de cada cepa en estudio incubando las microplacas por un período de 48 h en estufa a 37 °C, (Tabla 3.1). Se observó que la dilución 1/10 del inóculo fue la que presentó una mayor UBB (N°1= $1,328 \pm 0,036$; N°2= $1,207 \pm 0,029$; N°3= $1,265 \pm 0,065$) para las tres cepas estudiadas mientras que el cultivo overnight sobre placas de poliestireno de 96 pocillos al igual que las diluciones restantes mostraron valores menores y en algunos casos similares al control del medio de cultivo CTS (UBB=1).

Tabla 3.3: Estudio de la formación de biofilm STEC (UBB) en diferentes concentraciones de inóculo.

UBB					
Cepas	1x10 ¹² UFC/ml (Overnight)	1x10 ¹¹ UFC/ml (Dil 1/10)	2x10 ¹⁰ UFC/ml (Dil 1/50)	1x10 ¹⁰ UFC/ml (Dil 1/100)	5x10 ⁹ UFC/ml (Dil 1/200)
Nº1	1,108 ± 0,031	1,328 ± 0,036	1,240 ± 0,003	1,130 ± 0,021	1,210 ± 0,019
Nº2	1,138 ± 0,018	1,207 ± 0,029	1,190 ± 0,012	1,080 ± 0,034	1,140 ± 0,023
Nº3	1,147 ± 0,009	1,265 ± 0,065	1,150 ± 0,007	1,160 ± 0,008	1,203 ± 0,014

Se analizaron diferentes tiempos de adherencia (0, 2, y 24 h) de las cepas a placas de poliestireno de 96 pocillos utilizando una dilución 1/10 del inóculo para evaluar la implicancia de este parámetro sobre la formación de biofilm (Figura 3.6). Posterior a la adherencia las placas fueron incubadas por un período de 48 h en estufa a 37 °C. Se observó que con 24 h de adherencia todas las cepas estudiadas incrementaron las UBB siendo significativo este aumento en las cepas Nº1 y Nº3.

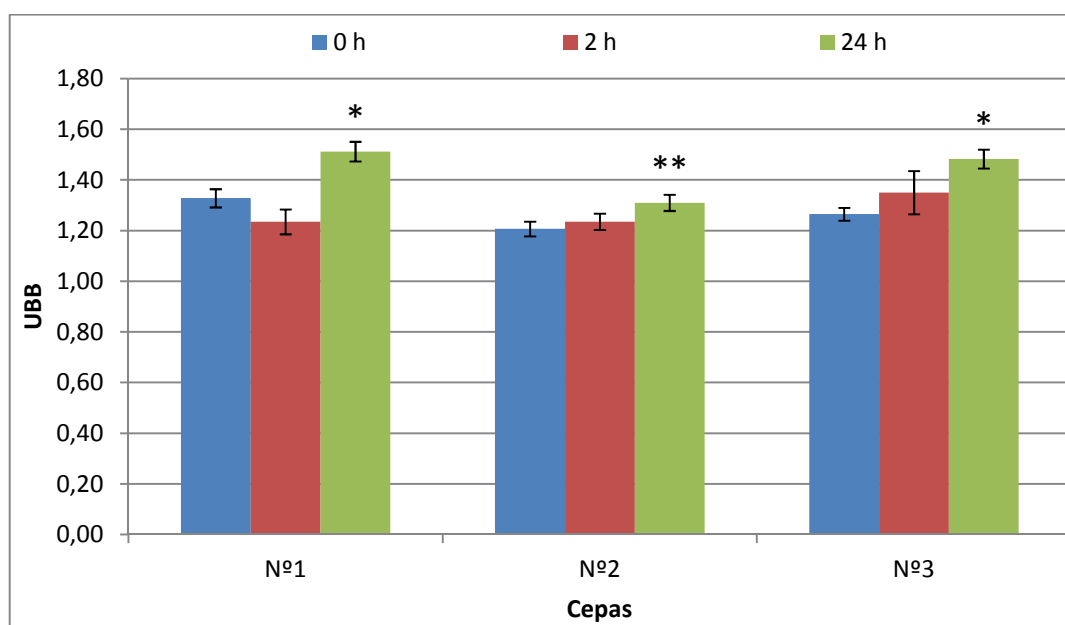


Figura 3.6: Estudio de la adherencia de cepas STEC (UBB) a placas de poliestireno de 96 pocillos. (*p<0,005 vs CTS).

Se analizó también si la formación de biofilm se veía influenciada por el tiempo de incubación luego de un período de adherencia de 24 h. Se evaluaron las UBB obtenidas a las 24, 48 y 72 h y se determinó que las cepas STEC presentaron mayores biomásas a las 48 h de incubación de la placa a 37 °C (Tabla 3.4). Tanto las cepas clínicas como la cepa de referencia fueron clasificadas como débiles productoras de biofilms, $Ab_{sc} < Ab_s$ ($2 \times Ab_{sc}$), según el criterio establecido en Material y Métodos.

Tabla 3.4: Influencia del tiempo de incubación en la formación de biofilm de STEC

UBB			
Cepas	24 h	48 h	72 h
N°1	1,108 ± 0,021	1,512 ± 0,039 *	1,289 ± 0,003 *
N°2	1,168 ± 0,015	1,310 ± 0,032 *	1,165 ± 0,012
N°3	1,187 ± 0,029	1,483 ± 0,037 *	1,150 ± 0,007

(*p<0,005 vs CTS)

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos al variar parámetros como concentración del inóculo inicial, tiempo de adherencia y tiempo de incubación, se determinó que las condiciones óptimas para la formación de biofilm fueron: una dilución 1/10 del inóculo bacteriano que corresponde a 1×10^{11} UFC/ml, un período de adherencia de 24 h y un tiempo de incubación de 48 h posterior a la adherencia a 37 °C debido a que en estas condiciones se obtuvieron los mayores valores de UBB.

Por poseer los biofilms una microaerofilia intrínseca característica de la estructura de los mismos, se evaluó si una limitación aún mayor afectaba la formación de biofilms de cepas STEC. Las condiciones óptimas encontradas

anteriormente fueron probadas en microaerofilia, por ser además STEC un anaerobio facultativo capaz de crecer y metabolizar tanto en presencia como en ausencia de oxígeno, no encontrándose diferencias significativas con las UBB de las cepas en aerofilia (Tabla 3.5).

Tabla 3.5: Formación de biofilms de STEC (UBB) en condiciones de aerofilia y microaerofilia.

UBB		
Cepas	aerofilia a 37 °C	microaerofilia a 37 °C
N°1	1,520 ± 0,056	1,512 ± 0,048
N°2	1,315 ± 0,021	1,298 ± 0,025
N°3	1,495 ± 0,070	1,473 ± 0,061

3.2.2 Cuantificación de la formación de biofilm bajo distintas condiciones de cultivo

La matriz exopolisacárida (EPS) del biofilm está formada por una gran cantidad de glúcidos y es por ello que se analizó la influencia de tres azúcares (glucosa, manosa y maltosa) sobre la formación del biofilm de STEC. Estos azúcares fueron elegidos debido a que STEC es capaz de fermentar glucosa y maltosa. Por otro lado, tanto glucosa como manosa son constituyentes del EPS de STEC.

La figura 3.7 (A) muestra un análisis cuantitativo de la formación de biofilms en el que las tres cepas de STEC mostraron ser débiles productoras de biofilms. Cuando se estudió el efecto de la adición de 0,5% de glucosa sobre la producción de biofilm, se observó un aumento significativo de la EPS en la cepa clínica N°2 (*E.coli*

O157:H7), la cual fue clasificada en estas condiciones como moderada productora de biofilms (UBB = $3,23 \pm 0,07$). Un aumento menor pero aún significativo, se observó tanto en la cepa clínica N°1 (*E. coli* O111) (UBB = $1,82 \pm 0,06$) como en la cepa de referencia EDL 933 (UBB = $1,93 \pm 0,05$) (* $p < 0,01$ vs CTS).

Para evaluar la formación de biofilm en presencia de un agente reductor, las cepas fueron inoculadas en medio de cultivo tioglicolato. Por otro lado, el efecto sinérgico de un medio reductor y un nutriente fue ensayado utilizando tioglicolato con adición de 0,5% de glucosa. Los valores resultantes de UBB sin glucosa fueron para la cepa N°1 (UBB= $1,59 \pm 0,04$), N°2 (UBB= $1,41 \pm 0,05$), y N°3 (UBB= $1,58 \pm 0,03$) sin observarse diferencias significativas entre el medio CTS y tioglicolato. Cuando los ensayos se realizaron con medio tioglicolato suplementado con glucosa se observó un aumento en la formación de biofilm de las tres cepas estudiadas N°1 (UBB= $2,16 \pm 0,07$), N°2 (UBB= $1,87 \pm 0,05$), y N°3 (UBB= $1,97 \pm 0,07$) (# $P < 0,01$ vs Tioglicolato) (Figura 3.7 (A)).

3.2.3 Estrés celular en el biofilm

Se estudió la relación existente entre estas condiciones de cultivo y el estrés celular que sufren las células sésiles del biofilm y para ello los valores obtenidos para ERO y ERN fueron expresados en función de la cantidad de biofilm formado (ERO/UBB y Nitritos/UBB). Los datos de ERO/UBB representados en la Figura 3.7 (B) indican que STEC produce cantidades detectables de ERO en el biofilm de STEC. Cuando se añadió glucosa al medio CTS se observó una disminución importante en la producción de ERO/UBB de 14 veces en la cepa N°3 (UBB= $0,095$

$\pm 0,005$) y 8 veces en las otras dos (N°1 UBB= $0,146 \pm 0,004$; N°2 UBB= $0,193 \pm 0,018$).

En presencia de un agente reductor como el tioglicolato se observó una disminución de ERO/UBB en comparación con CTS. Cuando se combinó la presencia de este agente reductor y un nutriente (glucosa), se observó menor producción de ERO/UBB en comparación con el medio CTS, pero mayor producción que con el agregado de glucosa, y la disminución causada por glucosa no fue tan marcada en presencia de tioglicolato (disminución de 3 a 6 veces, en lugar de 14 a 8 veces) ($\#p < 0,01$ vs tioglicolato).

La producción de cantidades detectables de ON en relación a la biomasa de biofilm se muestra en la Figura 3.7 (C). Se encontraron perfiles similares para los dos metabolitos del estrés (ERO y ERN) en los biofilms, es decir que en presencia de tioglicolato se observó menor producción de nitritos comparado con CTS y con la adición de glucosa hubo reducción de Nitritos/UBB tanto en CTS como en tioglicolato pero menos marcada que la disminución de ERO.

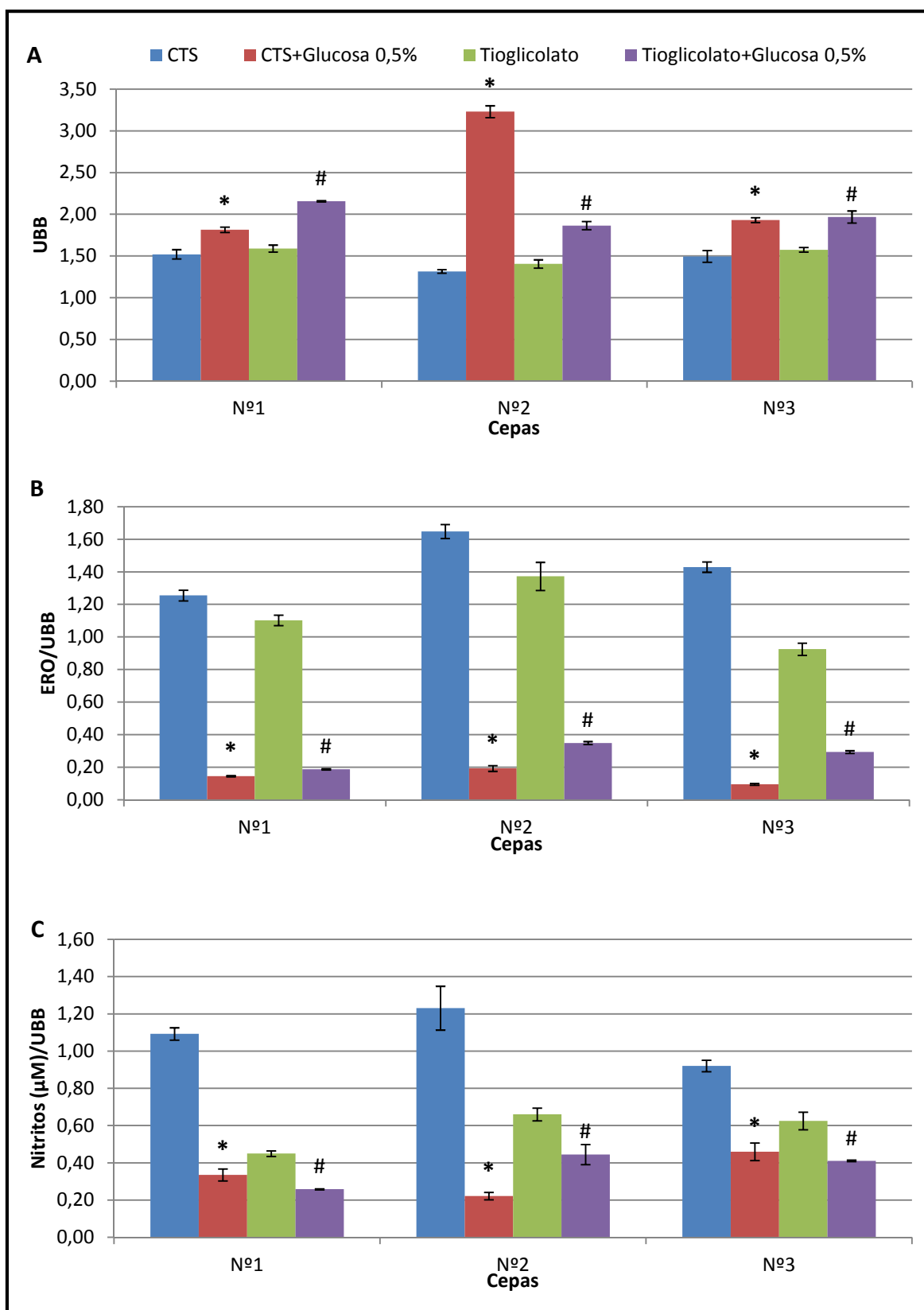


Figura 3.7: Cuantificación de la formación de biofilms (A), ERO/UBB (B) y Nitritos (μM)/UBB (C) en cepas STEC. Se consideró estadísticamente significativo ($*p < 0,01$ vs CTS; $\#p < 0,01$ vs Tioglicolato).

Como se mencionó anteriormente, la influencia de otros dos azúcares como manosa y maltosa fue analizada sobre la formación de biofilm. A modo comparativo, se seleccionó una concentración de 0,5% para ambas azúcares en CTS observándose un comportamiento similar al encontrado con glucosa.

La incorporación de manosa y maltosa al medio de cultivo produjo un incremento en la formación de biofilm, siendo este incremento más significativo, con maltosa en la cepa N°1 (UBB= $2,300 \pm 0,011$) y N°2 ($3,320 \pm 0,014$) con respecto al basal CTS (figura 3.8 (A)). Al igual que con glucosa, en presencia de maltosa se observó un aumento significativo de la EPS en la cepa clínica N°2 la cual fue clasificada como moderada productora de biofilm mientras las cepas restantes presentaron un aumento menor (*p vs CTS < 0,01)

En cuanto a la relación entre la formación de biofilm y el estrés celular se observó una disminución significativa tanto en la producción de ERO/UBB como en Nitritos (μM)/UBB en presencia de manosa y maltosa en las tres cepas en estudio (figura 3.8 (B) y (C)).

La EPS del biofilm se vio incrementada con la incorporación de los tres azúcares empleados mostrando una disminución notable en los metabolitos del oxígeno y del nitrógeno. Otros autores han reportado el aumento en la formación de biofilm por el agregado de glúcidos al medio de cultivo (Aiassa y col., 2012; Arce Miranda y col., 2011; Kalivoda y col., 2008; Lim y col., 2004; Waldrop y col., 2014). Estos resultados permitieron correlacionar ese aumento de biomasa con una disminución del estrés celular en cepas de *E.coli* productoras de toxina Shiga.

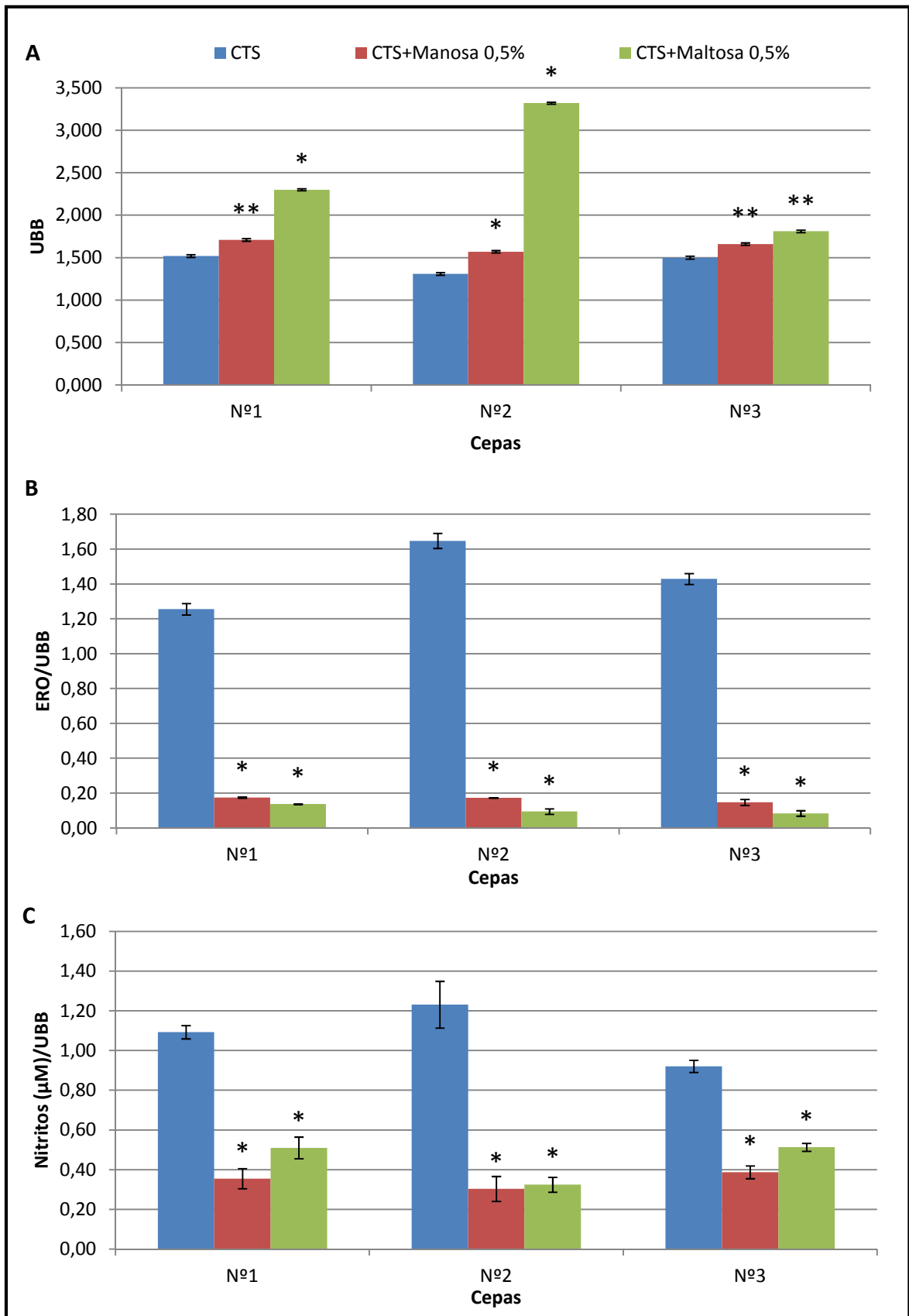


Figura 3.8: Cuantificación de la formación de biofilm (A), ERO/UBB (B) y Nitritos (μM)/UBB (C) en cepas STEC con adición de glúcidos. Se consideró estadísticamente significativo (** $p < 0,05$ vs CTS; * $p < 0,005$ vs C

3.2.4 Estudio de las defensas antioxidantes enzimáticas y no enzimáticas del biofilm de STEC

Teniendo en cuenta la vía metabólica del oxígeno, se estudió el comportamiento de las defensas antioxidantes enzimáticas tales como SOD y CAT de las cepas formadoras de biofilms en las distintas condiciones de cultivo, para evaluar el desbalance oxidativo (Figura 3.9). Además, se evaluó la capacidad antioxidante total FRAP, es decir la capacidad antioxidante tanto enzimática (SOD, CAT) como no enzimática (glutación, ascorbato, compuestos fenólicos, carotenos, etc) para determinar el poder antioxidante total del biofilm (Figura 3.9).

La adición de glucosa (0,5%) al medio de cultivo CTS, produjo una disminución significativa del estrés celular tanto del oxígeno como del nitrógeno, con aumento en la formación del biofilm y disminución en las defensas antioxidantes enzimáticas y no enzimáticas. Del mismo modo, el efecto de un agente reductor como el tioglicolato aumentó la biomasa del biofilm, con disminución de los metabolitos oxidativos y de la actividad de las enzimas SOD y CAT, con una reducción de la capacidad antioxidante total FRAP. Analizando estos resultados, se encontró una correlación entre la disminución de las ERO, ERN y las defensas antioxidantes ya que el azúcar mencionado y el tioglicolato constituirían factores que incrementan la matriz extracelular del biofilm. Es decir, que las células sésiles del biofilm en condiciones favorables de cultivo, presentarían bajos niveles de estrés oxidativo con bajos niveles de actividad SOD, CAT y FRAP.

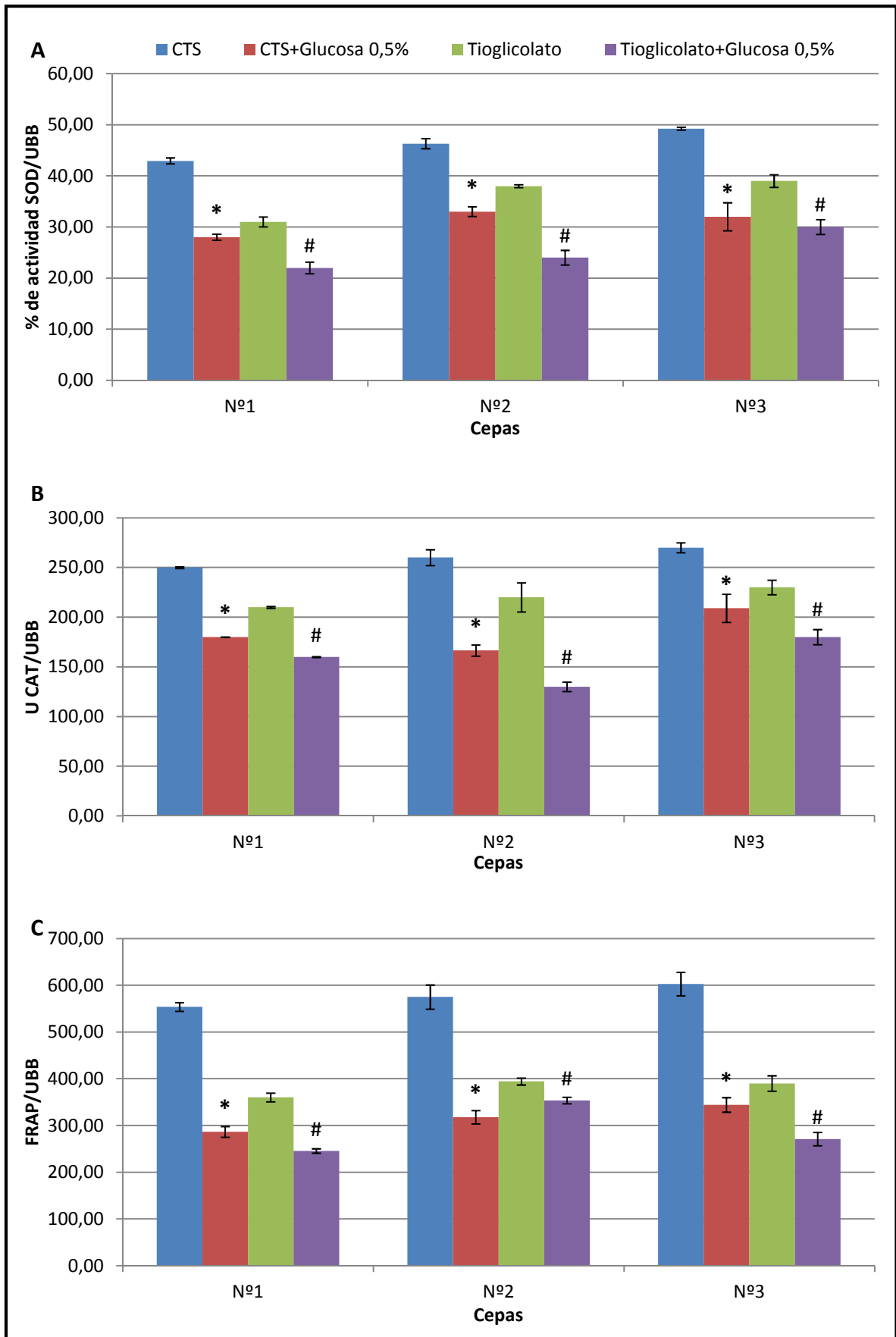


Figura 3.9: Defensas antioxidantes y capacidad antioxidante total en los biofilms de STEC. Se consideró estadísticamente significativo (* $p < 0,01$ vs CTS; # $p < 0,01$ vs tioglicolato).

3.2.5 Estudio de la influencia de un agente oxidante exógeno sobre la formación de biofilm de STEC

Con el objetivo de evaluar el efecto de un agente estresante sobre las vías metabólicas del oxígeno y del nitrógeno, las defensas antioxidantes y la correlación del estrés celular con la formación del biofilm de STEC, se estudió la acción del peróxido de hidrógeno (H_2O_2), por ser un oxidante utilizado en estudios previos en los cuales se ha reportado una disminución en la formación de biofilms sobre otros géneros bacterianos (Toté y col., 2010; Zmantar y col., 2010).

Se observó que las tres cepas en estudio resultaron sensibles a todas las concentraciones de H_2O_2 ensayadas. En la Figura 3.10, se representan los resultados obtenidos con la cepa N°2 (*E.coli* O157:H7), mientras que resultados similares fueron obtenidos con las cepas N°1 y la cepa de referencia.

El estrés provocado por el H_2O_2 , redujo significativamente la biomasa del biofilms después de 24 h de incubación y se observó una disminución dosis dependiente presentando los menores valores con una concentración de 30 mM. Esta disminución de la biomasa por el agregado de oxidantes, produjo una disminución también de las ERO y los nitritos (Figura 3.11).

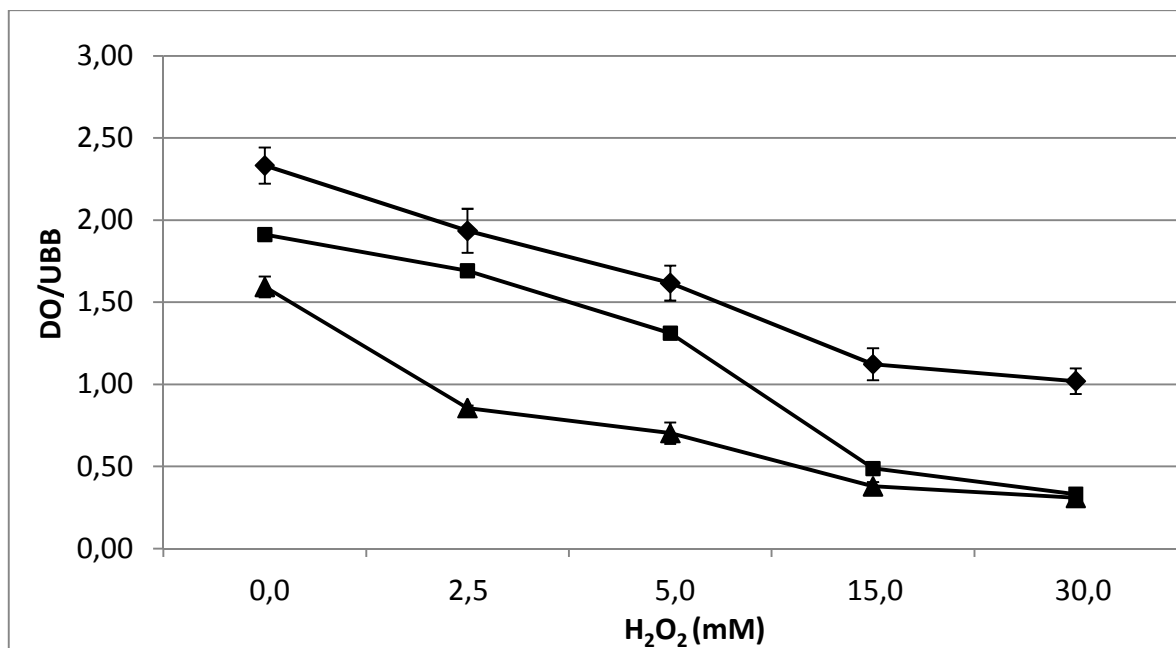


Figura 3.10: Influencia del H₂O₂ en la formación de biofilm (rango de 2,5 a 30 mM) de la cepa N°2. Unidades de biomasa de biofilm (UBB) (- ♦ -), (ERO/UBB) (- ■ -) y (Nitritos (µM)/UBB) (- ▲ -).

En cuanto a las defensas antioxidantes, tanto la enzima SOD como CAT mostraron un marcado aumento en su actividad con el aumento de la concentración del oxidante (figura 3.11), esto indicaría que los sistemas de defensa han respondido frente al agregado de un agente estresante exógeno con una respuesta protectora, que a su vez redujo las UBB. Cuando el equilibrio entre ERO, ERN y los sistemas de defensa se alteró por condiciones desfavorables para la formación de biofilms, un aumento en la producción de los metabolitos oxidativos, resultó en niveles más altos de SOD y CAT capaces de detoxificar el estrés generado por H₂O₂.

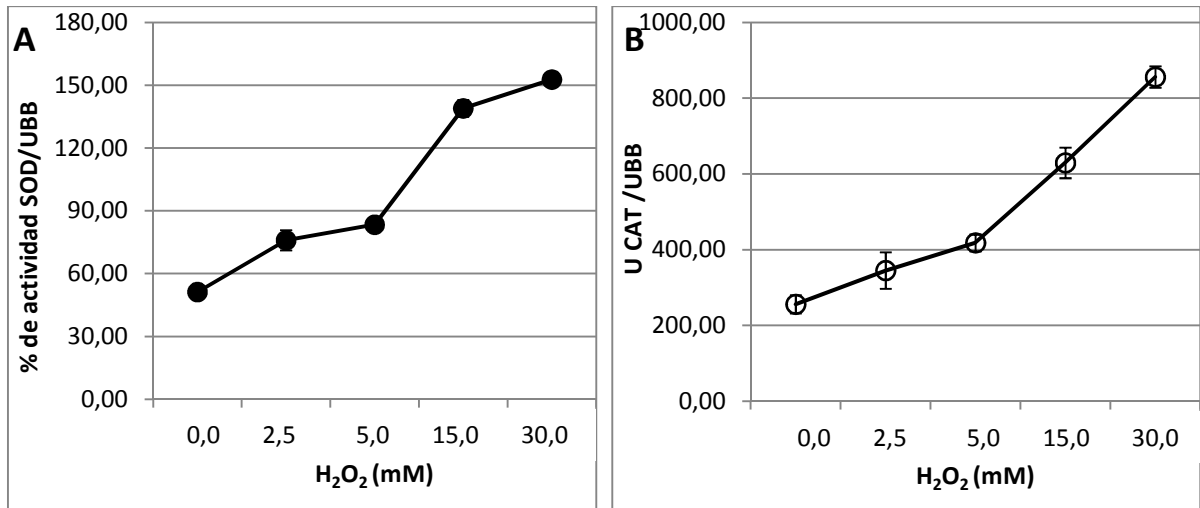


Figura 3.11: Defensas antioxidantes en los biofilms de STEC expuestos a diferentes concentraciones de H₂O₂: (A) % de actividad SOD/UBB y (B) (U)CAT/UBB.

RESULTADOS

Capítulo 3: SECCIÓN 2

CAPÍTULO 3

SECCIÓN 2: Profundizar el conocimiento sobre los efectos de ATBs bactericidas como (Ciprofloxacina y Fosfomicina) y bacteriostático como (Rifaximina) y la relación con el estrés de las células sésiles del biofilm de STEC.

3.3 Formación de biofilm en presencia de antibióticos

3.3.1 Determinación de la sensibilidad a antimicrobianos

Se determinó la sensibilidad de las cepas STEC en estado planctónico frente a un ATB bacteriostático RIF y dos bactericidas (FOS y CIP). Estos ATBs fueron seleccionados por haber sido utilizados durante brotes producidos por esta bacteria (Mc Gannon y col., 2010; Ochoa y col., 2007; Zhang y col., 2000). En la actualidad FOS es el agente antimicrobiano más comúnmente empleado para el tratamiento de las infecciones por *E.coli* productora de toxina Shiga, mientras que RIF está autorizado en muchos países para el tratamiento de la diarrea del viajero. Sin embargo no hay estudios sobre el efecto en biofilms de STEC.

Las cepas N°2 y N°3 fueron sensibles (S) a CIP con CIM de 0,015 y 0,031 µg/ml respectivamente, mientras que la cepa N°1 fue resistente (R) al antibiótico (CIM = 32 µg/ml). Las cepas fueron clasificadas como S a CIP cuando presentaron CIM menores o iguales a 4 µg/ml y como R al exhibir CIM superiores a 4 µg/ml según normas del CLSI.

Todas las cepas fueron clasificadas como S a FOS y RIF con CIM de 32 µg/ml y CIM de 2µg/ml, respectivamente (Tabla 3.6). Para FOS, CIM menores o

iguales a 64 µg/ml fueron clasificadas S y superiores o iguales a 256 µg/ml, resistentes. Para RIF se utilizó como punto de corte 32 µg/ml considerando S valores de CIM menores o iguales a 32 µg/ml y R > 32 µg/ml.

Tabla 3.6: Determinación de sensibilidad de cepas STEC en estado planctónico a diferentes antimicrobianos.

	CIP (µg/ml)	Clasificación	FOS (µg/ml)	Clasificación	RIF (µg/ml)	Clasificación
Nº1	32	R	2	S	32	S
Nº2	0,02	S	2	S	32	S
Nº3	0,03	S	2	S	32	S

(S) Sensible (R) Resistente

3.3.2 Determinación de ERO en células planctónicas

Se estudió el aumento en la producción de ERO expresado en % de URL sobre las cepas de STEC expuestas a una concentración subCIM (CIM/4), a concentración CIM y una supraCIM (CIMx10) de CIP, FOS y RIF. Las tres cepas presentaron un aumento de ERO en presencia de los ATBs, tanto el bacteriostático como los dos bactericidas, siendo más marcado con CIP. Es de destacar que el máximo aumento porcentual en la producción de ERO con respecto al basal sin ATB, se obtuvo con las concentraciones de la CIM de cada cepa para CIP (Nº1= 79,36 ± 7,90%; Nº2= 125,15 ± 2,51% y Nº3= 92,07 ± 7,05%) (Tabla 3.7). Sin embargo, para FOS y RIF el máximo valor de ERO se observó a concentraciones subCIM.

Tabla 3.7: Aumento de especies reactivas del oxígeno en cepas STEC por el agregado de CIP, FOS y RIF en estado planctónico. * $p < 0,05$ respecto al basal sin antibiótico.

Aumento de URL (%) respecto al basal				
		Cepa N°1	Cepa N°2	Cepa N°3
CIP ($\mu\text{g/ml}$)	subCIM	73,81 \pm 2,38*	88,05 \pm 1,89*	88,10 \pm 3,50*
	CIM	79,36 \pm 7,90*	125,15 \pm 2,51*	92,07 \pm 7,05*
	supraCIM	34,92 \pm 9,50	35,22 \pm 10,06	22,90 \pm 6,17
FOS ($\mu\text{g/ml}$)	subCIM	39,58 \pm 2,05*	42,26 \pm 2,87*	54,72 \pm 6,10*
	CIM	34,53 \pm 1,68*	36,15 \pm 0,99*	49,35 \pm 5,73*
	supraCIM	Sin cambios	Sin cambios	Sin cambios
RIF ($\mu\text{g/ml}$)	subCIM	38,76 \pm 1,55*	39,66 \pm 2,37*	51,91 \pm 5,10*
	CIM	30,23 \pm 0,78*	33,13 \pm 0,59*	45,95 \pm 4,68*
	supraCIM	Sin cambios	Sin cambios	8,51 \pm 3,50

3.3.3 Estudio de la concentración de erradicación mínima de biofilms (MBEC) en células sésiles de STEC

Se analizó la susceptibilidad del biofilm de las cepas STEC frente a los ATB mencionados anteriormente.

En la tabla 3.8 se representan los valores de UFC/ml obtenidos en condiciones basales (sin agregado de ATB) y con cinco concentraciones de ATBs. Teniendo en cuenta los valores de CIM obtenidos para las bacterias en estado planctónico, se seleccionaron dos concentraciones subCIM (CIM/4 y CIM/8), la concentración de la CIM y dos concentraciones supraCIM (CIMx100 y CIMx1000 para CIP y FOS) y (CIMx10 y CIMx100 para RIF) debido a que no pudieron evaluarse concentraciones mayores de este ATB por razones metodológicas de solubilidad. Las concentraciones seleccionadas para la realización de este estudio

son mayores en comparación con el ensayo anterior debido a que existen varios reportes que indican que los biofilms son capaces de resistir valores de hasta 1000 veces la concentración de la CIM para la misma bacteria en estado planctónico (Paraje, 2011; Zhang, 2012).

Los resultados muestran una disminución en las UFC/ml de manera dosis dependiente para los tres ATBs ensayados siendo más marcada con CIP ya que alcanzó valores en promedio del orden de 1.10^3 UFC/ml con una concentración equivalente a 1000 veces la CIM; mientras que FOS a esa misma concentración logró disminuir las UFC/ml hasta un valor de 3.10^6 . Las cepas expuestas a RIF, si bien mostraron una disminución en su viabilidad, sólo fue posible alcanzar valores en promedio de 8.10^6 UFC/ml a una concentración de 100 veces la CIM. En ningún caso fue posible lograr la erradicación del biofilms.

Tabla 3.8: Efecto de CIP, FOS y RIF sobre el biofilms de STEC

CIP	CTS	CIM/8	CIM/4	CIM	CIMX100	CIMX1000
UFC/ml						
N°1	$1,45.10^{10}$	$7,2x10^8$	$6,4x10^7$	$1,3x10^6$	$2,7x10^4$	$2,5.10^3$
N°2	$2,04.10^{10}$	$1,9x10^9$	$1,0x10^6$	$1,9x10^5$	$9,4x10^3$	$7,8.10^2$
N°3	$1,38.10^{10}$	$1,5x10^8$	$6,0x10^6$	$2,0x10^5$	$6,8x10^3$	$1,2.10^2$

FOS	CTS	CIM/8	CIM/4	CIM	CIMX100	CIMX1000
UFC/ml						
N°1	$1,45.10^{10}$	$3,02.10^9$	$1,28.10^9$	$1,1.10^8$	$1,1.10^7$	$5,4.10^6$
N°2	$2,04.10^{10}$	$2,88.10^9$	$1,85.10^8$	$1,4.10^8$	$8,2.10^6$	$2,6.10^6$
N°3	$1,38.10^{10}$	$2,70.10^9$	$1,32.10^9$	$1,2.10^8$	$5,1.10^7$	$1,2.10^6$

RIF	CTS	CIM/8	CIM/4	CIM	CIMX10	CIMX100
UFC/ml						
N°1	$1,45.10^{10}$	$3,02.10^9$	$1,28.10^8$	$8,9.10^7$	$5,1.10^7$	$1,4.10^7$
N°2	$2,04.10^{10}$	$2,88.10^9$	$1,85.10^8$	$9,4.10^7$	$8,2.10^7$	$1,6.10^6$
N°3	$1,38.10^{10}$	$2,70.10^9$	$1,32.10^9$	$1,2.10^8$	$5,1.10^7$	$9,2.10^6$

3.3.4 Cuantificación de la formación de biofilms, metabolitos oxidativos y actividad enzimática en cepas STEC expuestas a diferentes concentraciones de antibióticos.

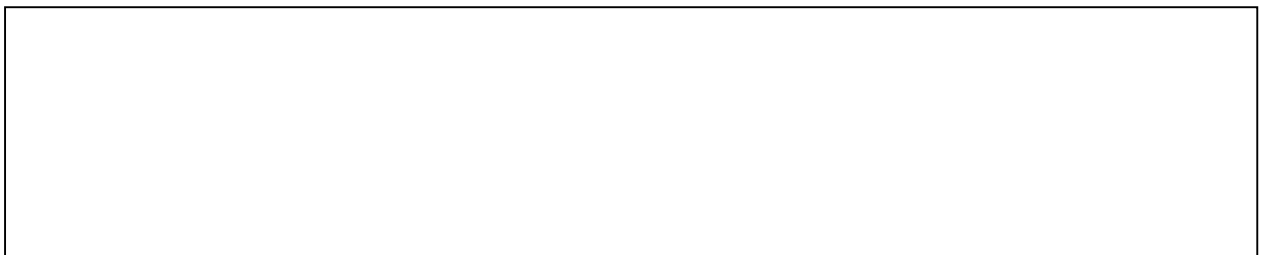
3.3.4.1 Efecto de CIP sobre biofilms de STEC

Teniendo en cuenta la susceptibilidad de las cepas frente a CIP, FOS y RIF, se evaluó el efecto de los tres ATBs sobre la formación de biofilms a las concentraciones mencionadas anteriormente y se analizaron las ERO, los Nitritos y la actividad de las enzimas SOD y CAT.

Los biofilms expuestos a CIP mostraron una disminución dosis dependiente en su biomasa en las 3 cepas estudiadas (figura 3.12 (A)) con valores mínimos obtenidos a concentraciones de 1000 veces la CIM ($N^{\circ}1= 1,13 \pm 0,04$; $N^{\circ}2= 1,24 \pm 0,01$; $N^{\circ}3= 1,13 \pm 0,03$). Es necesario destacar que no se observaron diferencias significativas en las UBB entre las diferentes cepas expuestas a CIP siendo que una de ellas, en estado planctónico, era resistente al ATB. Esto indicaría que las cepas en estado de biofilms presentan una resistencia fenotípica frente al agregado de ATBs y por ende podrían tener un comportamiento diferente al que presentan en estado planctónico.

Si comparamos los valores de UBB a concentraciones de 1000 veces la CIM con la viabilidad de las cepas obtenida a esa misma concentración en el ensayo anterior, es posible observar que si bien hubo una notable disminución de las UBB, no fue suficiente para erradicar al biofilm.

Este mismo comportamiento se observó para los metabolitos del oxígeno y del nitrógeno (figura 3.12 (B) y (C)) alcanzando valores mínimos promedio entre las tres cepas estudiadas de 0,08 y 0,14 respectivamente.



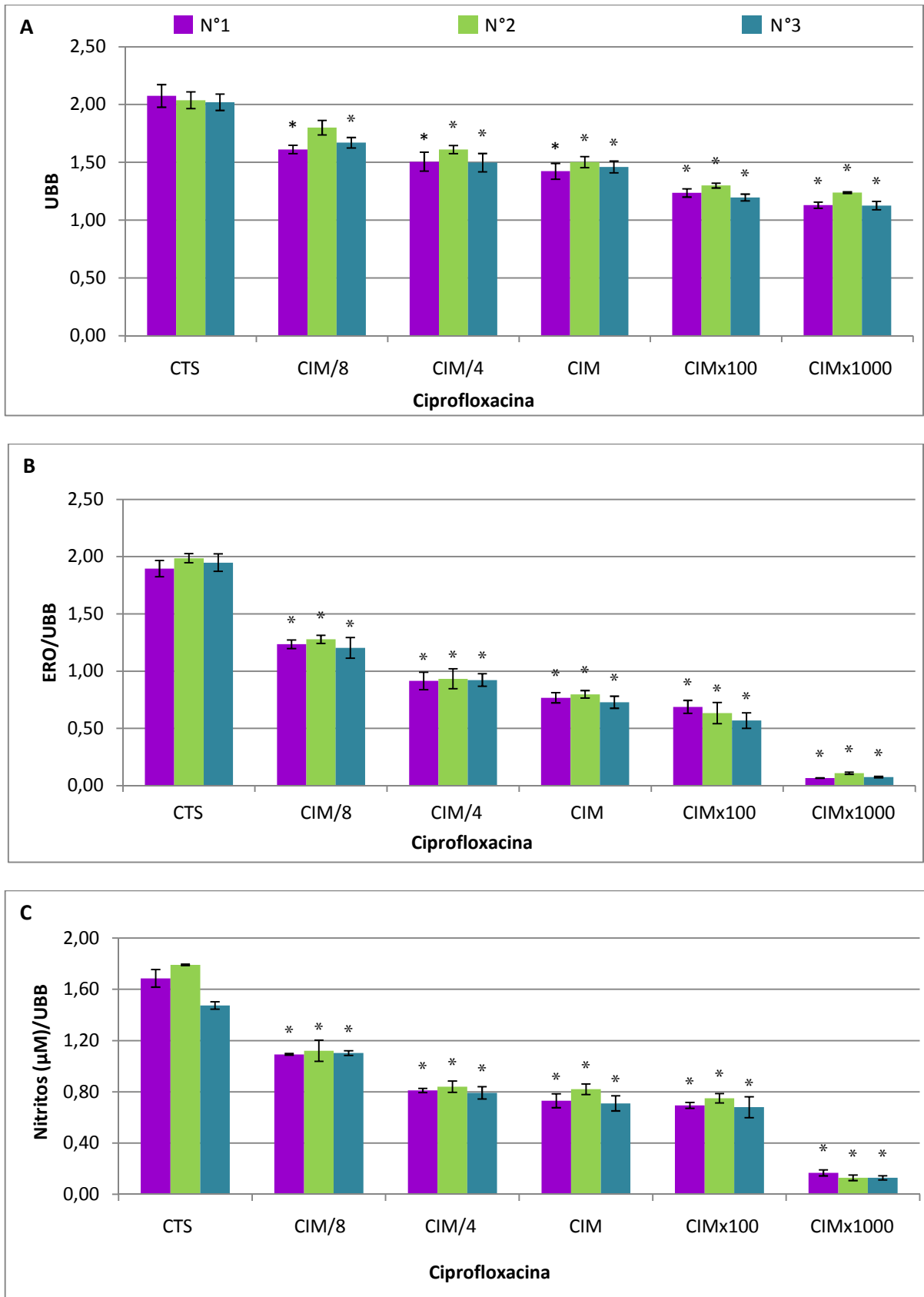


Figura 3.12: Cuantificación de la formación de biofilms (A), ERO/UBB (B) y Nitritos (μM)/UBB (C) en cepas STEC con diferentes concentraciones de CIP. (* $p < 0,005$ vs CTS).

Cuando se estudió la actividad de la enzima SOD, se observó un incremento en la misma como una respuesta al estrés celular, siendo más significativo este aumento en concentraciones supraCIM para las tres cepas estudiadas ($N^{\circ}1= 154,14 \pm 1,44$; $N^{\circ}2= 159,85 \pm 1,87$ $N^{\circ}3= 148,26 \pm 5,12$) (figura 3.13), los cuales correlacionaron con los bajos niveles de ERO.

Como se analizó anteriormente para el caso del agregado de H_2O_2 , la incorporación de CIP al medio de cultivo resultaría una condición desfavorable para la formación de biofilms ya que se observa una disminución de las UBB y de los metabolitos tanto del oxígeno como del nitrógeno a medida que aumenta la concentración del ATB. Como respuesta a esto, se observa una activación de los sistemas de defensa frente al agregado de un agente estresante exógeno y se sugiere que la enzima SOD podría estar detoxificando el estrés generado por el ATB lo cual correlaciona con los bajos valores obtenidos para ERO y ERN

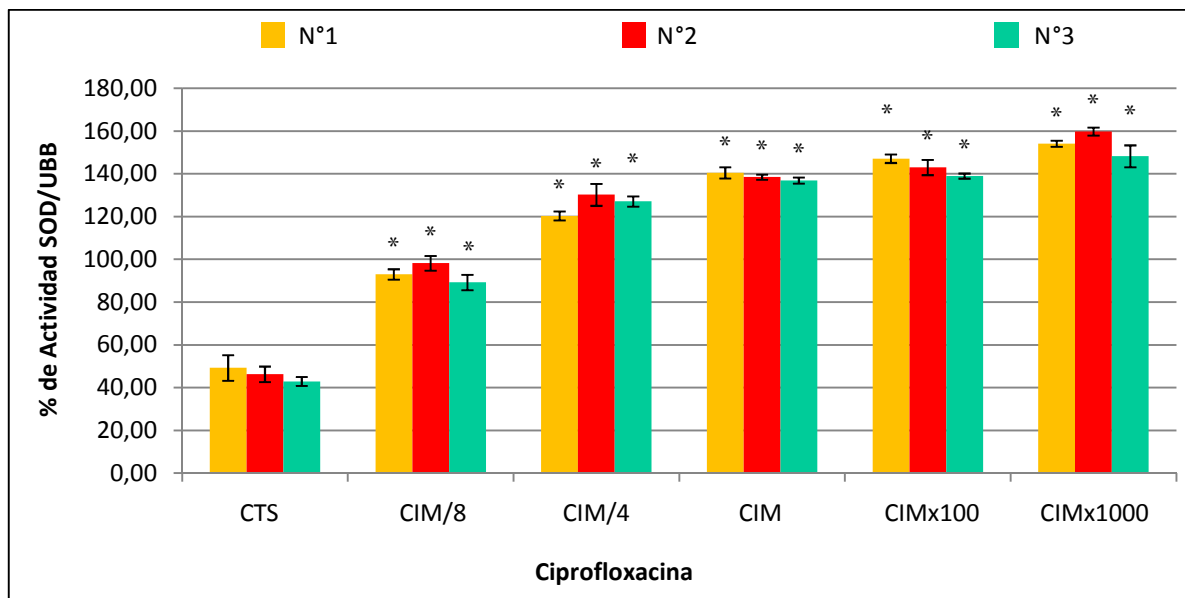


Figura 3.13: Determinación de la actividad de la enzima SOD en biofilm de cepas STEC expuestas a diferentes concentraciones de CIP. (* $p < 0,005$ vs CTS).

En la tabla 3.9 se representan los valores de unidades enzimáticas CAT/UBB de las tres cepas estudiadas en condiciones basales (sin agregado de antibiótico) y expuestas a concentraciones subCIM, CIM y supraCIM de CIP. Al igual que SOD, CAT mostró un aumento dosis dependiente en su actividad con el agregado de CIP obteniendo valores significativamente diferentes en comparación con los basales llegando a máximos que oscilan entre las 920 y 970 unidades enzimáticas/UBB para las concentraciones supraCIM de cada una de las cepas estudiadas.

Tabla 3.9: Determinación de la actividad de la enzima catalasa expresada como unidad enzimática CAT/UBB en biofilm de cepas STEC expuestas a diferentes concentraciones de CIP. (*p<0,005 vs CTS).

CEPAS	CTS (+)	SubCIM CIP	CIM CIP	SupraCIM CIP
Nº1	245,92 +/- 10,66	433,78 +/- 12,65 *	737,92 +/- 20,57 *	921,391 +/- 17,65 *
Nº2	230,89 +/- 10,79	476,96 +/- 10,60 *	730,72 +/- 10,99 *	967,032 +/- 21,69 *
Nº3	201,03 +/- 10,26	424,59 +/- 12,04 *	629,92 +/- 14,81 *	942,01 +/- 10,81 *

3.3.4.2 Efecto de RIF sobre biofilms de STEC

En los biofilms expuestos a RIF se observó una disminución de la biomasa a medida que aumentaba la concentración del antibiótico, no encontrándose una diferencia significativa entre las cepas estudiadas (figura 3.14 (A)) con valores mínimos obtenidos a la mayor concentración supraCIM (Nº1= $1,44 \pm 0,04$; Nº2= $1,55 \pm 0,04$; Nº3= $1,38 \pm 0,06$).

Esta disminución dosis dependiente también se observó para las ERO y los nitritos (figura 3.14 (B) y (C)) alcanzando valores mínimos a una concentración de 1000 veces la CIM.

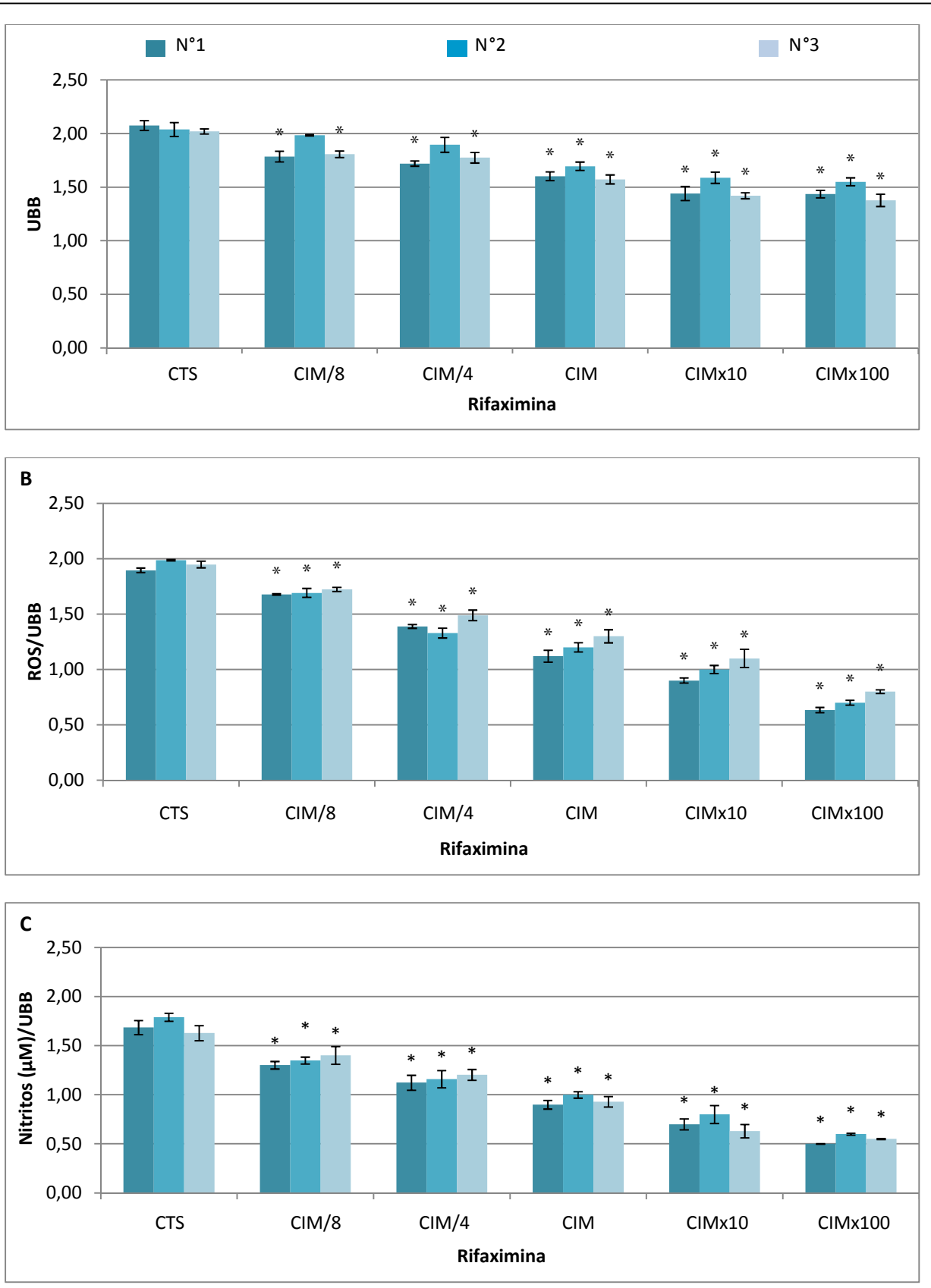


Figura 3.14: Cuantificación de la formación de biofilms (A), ERO/UBB (B) y Nitritos (μM)/UBB (C) en biofilm de cepas STEC expuestas a diferentes concentraciones de RIF. (* $p < 0,005$ vs CTS).

Al analizar el % de actividad de la enzima SOD (figura 3.15) se obtuvo un incremento en función del aumento de la concentración de RIF obteniéndose valores mínimos de actividad en condiciones basales (sin el agregado de antibiótico) ($N^{\circ}1=43,53 \pm 4,50$; $N^{\circ}2= 47,00 \pm 2,10$; $N^{\circ}3= 43,00 \pm 2,12$) y máximos ($N^{\circ}1= 91,00 \pm 1,44$; $N^{\circ}2= 95,00 \pm 1,87$; $N^{\circ}3= 92,00 \pm 3,90$) a concentraciones supraCIM.

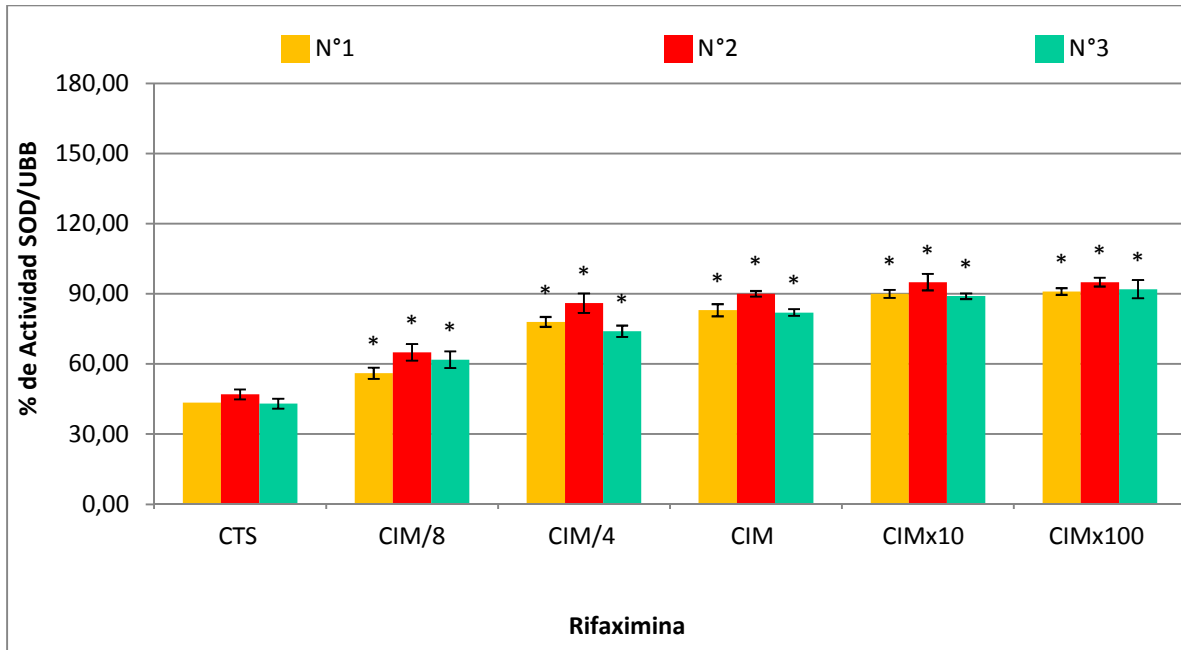


Figura 3.15: Determinación de la actividad de la enzima SOD en biofilm de cepas STEC expuestas a diferentes concentraciones de RIF. (* $p < 0,005$ vs CTS).

Al realizar la cuantificación de la actividad CAT (tabla 3.10) sobre los biofilms de STEC en presencia de las diferentes concentraciones de RIF se observó un incremento de las unidades enzimáticas a medida que aumentaba la concentración del antibiótico, siendo este aumento significativamente menor al observado en presencia de CIP.

Tabla 3.10: Determinación de la actividad de la enzima catalasa expresada como unidad enzimática/UBB en biofilms de cepas STEC expuestas a diferentes concentraciones de RIF. (* $p < 0,005$ vs CTS).

CEPAS	CTS (+)	subCIM RIF	CIM RIF	SupraCIM RIF
Nº1	245,92 +/- 10,66	271,73 +/- 10,45 *	312,94 +/- 20,95 *	441,34 +/- 21,11 *
Nº2	230,89 +/- 10,79	252,04 +/- 10,68 *	363,25 +/- 11,27 *	399,85 +/- 20,94 *
Nº3	201,03 +/- 10,26	231,87 +/- 10,13 *	314,87 +/- 10,87 *	420,93 +/- 12,23 *

3.3.4.3 Efecto de FOS sobre biofilms de STEC

Cuando se realizó la cuantificación de la formación de biofilms de las tres cepas en concentraciones crecientes de FOS (figura 3.16 (A)) se observó una disminución de la biomasa a medida que aumentaba la cantidad de antibiótico presente en el medio. A concentraciones de 1000 veces la CIM, los biofilms de las tres cepas mostraron los menores valores de biomasa (Nº1= $1,502 \pm 0,017$; Nº2= $1,552 \pm 0,019$; Nº3= $1,650 \pm 0,047$).

Un comportamiento similar fue observado cuando se analizaron las ERO y los nitritos (figura 3.16 (B) y (C)), donde se vio una disminución dosis dependiente con las concentraciones crecientes de FOS alcanzando valores mínimos promedio entre las tres cepas estudiadas de 0,8 y 0,6 respectivamente.

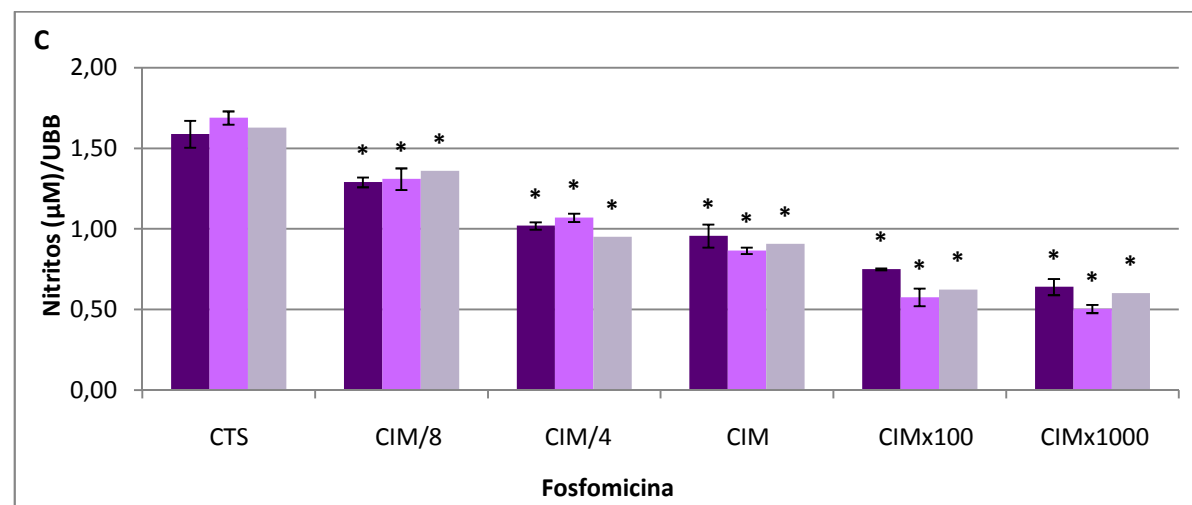
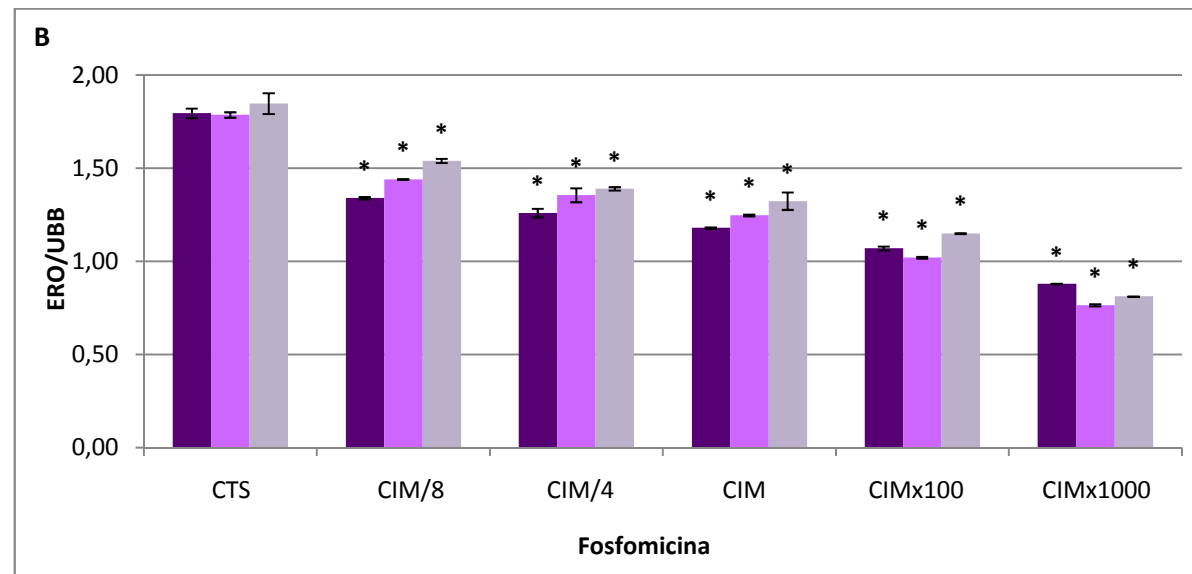
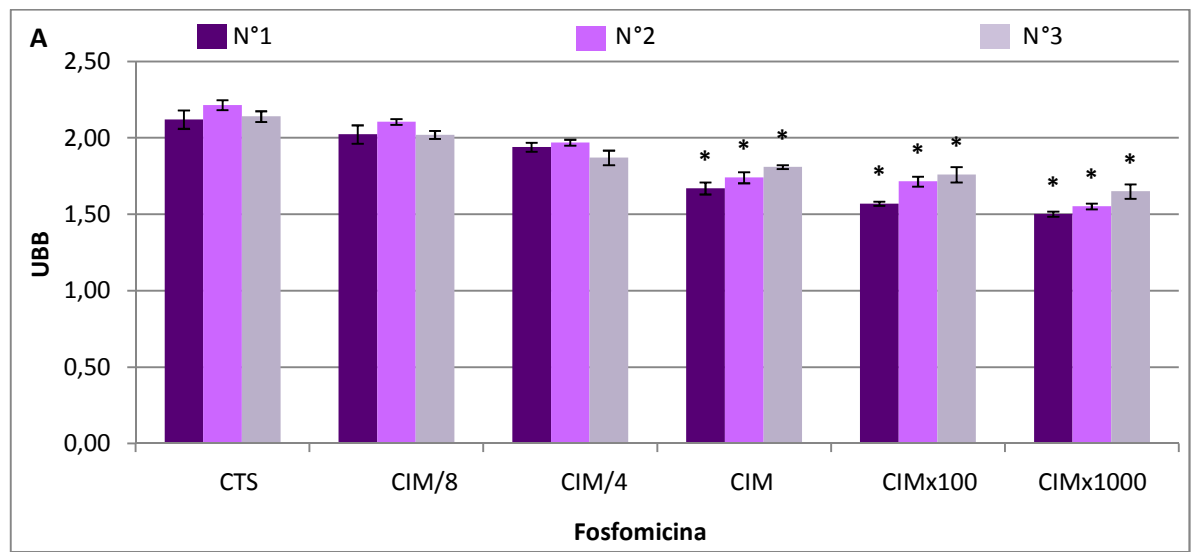


Figura 3.16: Cuantificación de la formación de biofilms (A), ERO/UBB (B) y Nitritos (μM)/UBB (C) en cepas STEC con diferentes concentraciones de FOS. (* $p < 0,005$ vs CTS).

Al determinar el % de actividad SOD (figura 3.17 (A)) fue posible observar un incremento de la actividad a medida que aumentaban las concentraciones de FOS obteniéndose valores máximos de activación a concentraciones supraCIM (N°1= $94,49 \pm 1,165$; N°2= $97,83 \pm 1,916$; N°3= $93,66 \pm 1,732$). Al igual que SOD, en la determinación de CAT (figura 3.17 (B)) se observó un incremento de las unidades enzimáticas también menos significativo que el observado en presencia de CIP.

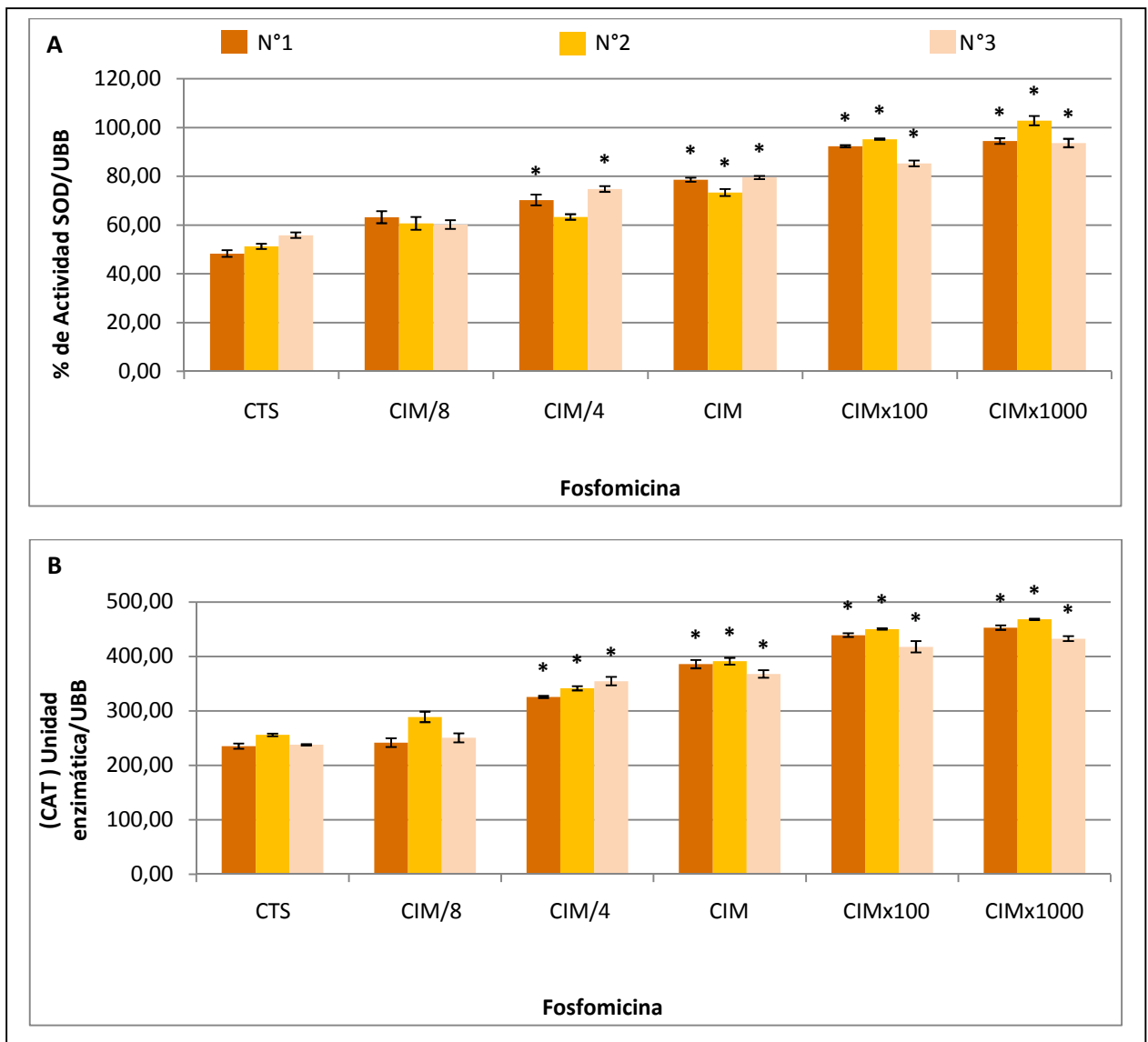


Figura 3.17: Determinación de sistemas de defensa enzimáticos en biofilm de cepas STEC con diferentes concentraciones de fosfomicina. % de activación SOD/UBB (6A) y unidad enzimática CAT/UBB (6B). (* $p < 0,005$ vs CTS).

Además, se investigaron las relaciones existentes entre ERN/ERO para los tres antibióticos ensayados en sus diferentes concentraciones.

En la tabla 3.11, se observa que la relación ERN/ERO fue mayor con la máxima concentración de CIP (1000 veces la CIM) para las tres cepas estudiadas. Mientras que para RIF y FOS no se observaron diferencias significativas. La relación de los metabolitos del nitrógeno en función de ERO aumentó en CIP debido a una disminución notable en las ERO. Estos resultados sugieren que CIP, modifica el balance del estrés oxidativo.

Tabla 3.11: Relación ERN/ERO de biofilm de cepas STEC en condiciones basales (sin antibiótico) y expuestas a diferentes concentraciones de CIP, FOS y RIF.

ERN/ERO CIP	CTS (UFC/ml)	CIM/8 (UFC/ml)	CIM (UFC/ml)	CIMX1000 (UFC/ml)
N°1	0,836	0,916	0,974	1,704
N°2	0,901	0,877	0,757	1,197
N°3	0,889	0,884	0,951	2,530

ERN/ERO FOS	CTS (UFC/ml)	CIM/8 (UFC/ml)	CIM (UFC/ml)	CIMX1000 (UFC/ml)
N°1	0,836	0,883	0,685	0,741
N°2	0,901	0,910	0,742	0,659
N°3	0,889	0,838	0,811	0,728

ERN/ERO RIF	CTS (UFC/ml)	CIM/8 (UFC/ml)	CIM (UFC/ml)	CIMX100 (UFC/ml)
N°1	0,836	0,814	0,715	0,688
N°2	0,901	0,797	0,851	0,963
N°3	0,889	0,776	0,804	0,789

3.4 Formación de biofilms y estrés celular en cepas STEC en presencia de ciprofloxacina y antioxidantes

Se estudió el efecto de antioxidantes exógenos sobre los biofilms de cepas STEC agregados en forma conjunta con diferentes concentraciones de CIP, una subCIM (CIM/4), la concentración de la CIM y una concentración supraCIM (CIMx1000) seleccionándose este antibiótico por ser el que presentó un mayor estímulo de estrés de acuerdo a los resultados presentados anteriormente.

Antioxidantes tales como Tirón (50 mM), glutatión (10 mM) y ácido ascórbico (10 mM) fueron utilizados sobre los biofilms de cada una de las cepas estudiadas para favorecer la inhibición de los metabolitos oxidativos y evaluar la relación entre la formación del biofilms y el estrés celular. Estos antioxidantes fueron seleccionados teniendo en cuenta que Tirón es un secuestrante de $O_2^{\bullet-}$ mientras que glutatión, actúa contra varias ERO en su conjunto como H_2O_2 y OH^{\bullet} entre otros y está preformado en las células. El ácido ascórbico (AA) o vitamina C por su parte, es también considerado un antioxidante debido a su acción como secuestrante o “scavenger” de radicales libres.

3.4.1 Efecto de Tirón sobre biofilms de cepas STEC tratado con CIP

En presencia de Tirón fue posible observar un aumento en la formación de biofilms al comparar estos valores de UBB con los obtenidos en ausencia de Tirón tanto en la condición basal como en todas las concentraciones de CIP (figura 3.18 (A)). Siguiendo con este análisis, las ERO (figura 3.18 (B)) presentaron una marcada disminución en presencia de Tirón, mientras que la concentración de nitritos se vio aumentada en esta condición (figura 3.18 (C)) en todas las concentraciones estudiadas presentando un valor máximo a la concentración de la

CIM para las tres cepas. En la figura 1D es posible observar bajos valores de SOD cuando el antioxidante fue incorporado al medio de cultivo. Esto podría indicar que la actividad de la enzima estaría menos inducida por la presencia del secuestrante.

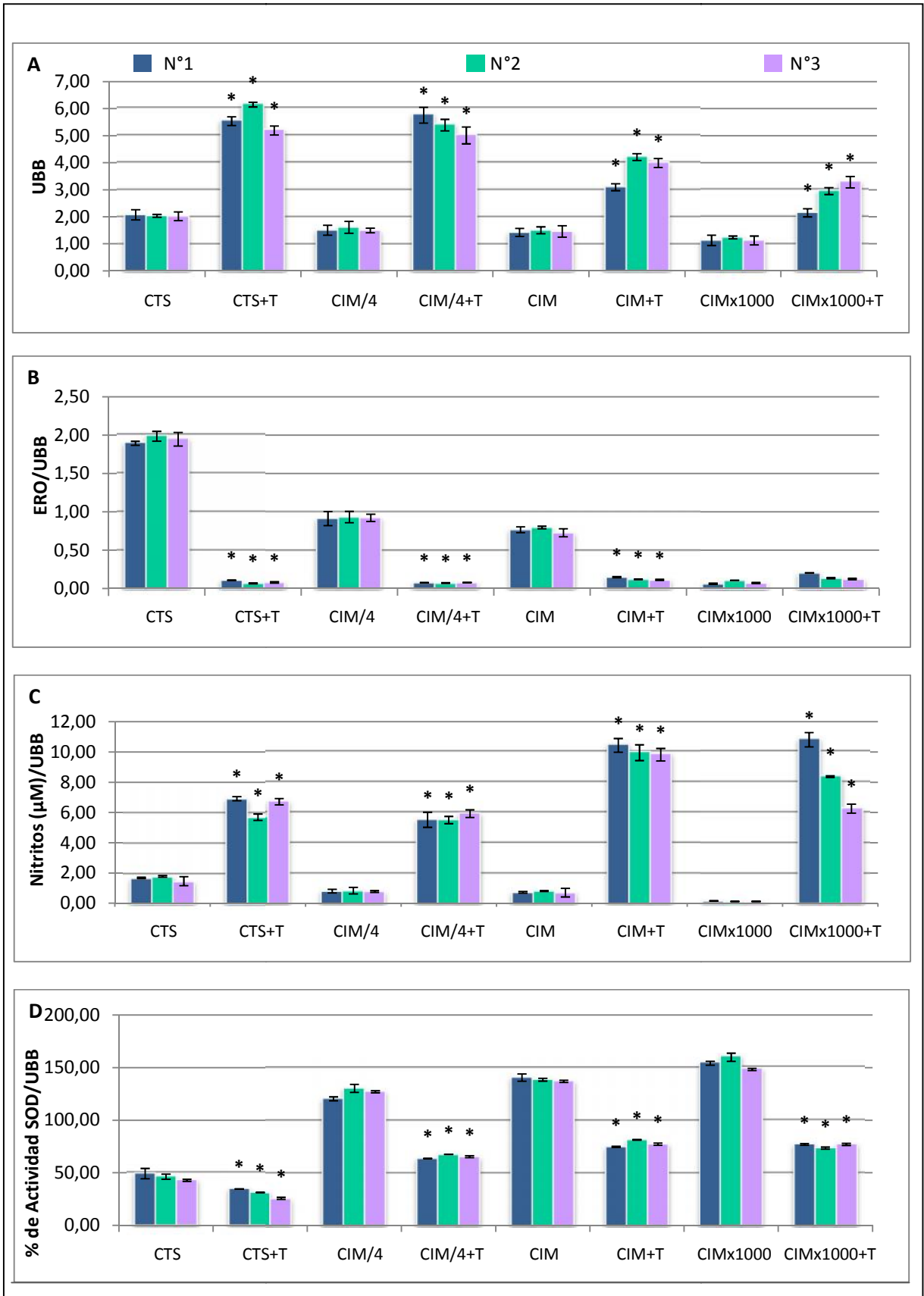


Figura 3.18: Cuantificación de UBB (A), ERO/UBB (B), Nitritos (μM)/UBB (C) y determinación del % de actividad SOD/UBB (D) en biofilm de cepas STEC en CTS con y sin agregado de Tirón 50 mM. * $p < 0,005$ respecto de la muestra sin tratar con Tirón.

3.4.2 Efecto de glutatión y CIP sobre biofilms de cepas STEC

Se seleccionó glutatión por ser un antioxidante no enzimático preformado en las células que actúa frente a una gran variedad de compuestos oxidantes. El biofilm de cepas STEC fue incubado con concentraciones subCIM, CIM y supraCIM de CIP administrada con o sin glutatión 10 mM.

Con el agregado de glutatión al medio conteniendo las diferentes concentraciones de CIP fue posible observar un aumento en la formación de los biofilms de las dos cepas clínicas estudiadas y la cepa de referencia comparando estos valores de biomasa con los obtenidos en ausencia de glutatión (figura 3.19 (A)) mientras que en las ERO (figura 3.19 (B)) fue posible visualizar una importante disminución. Por el contrario, la concentración de nitritos se vio aumentada en todas las condiciones ensayadas mostrando valores máximos a la concentración supraCIM (figura 3.19 (C)). Por su parte, SOD presentó valores muy bajos, menores aún que los obtenidos en presencia de Tirón (figura 3.18 (D)).

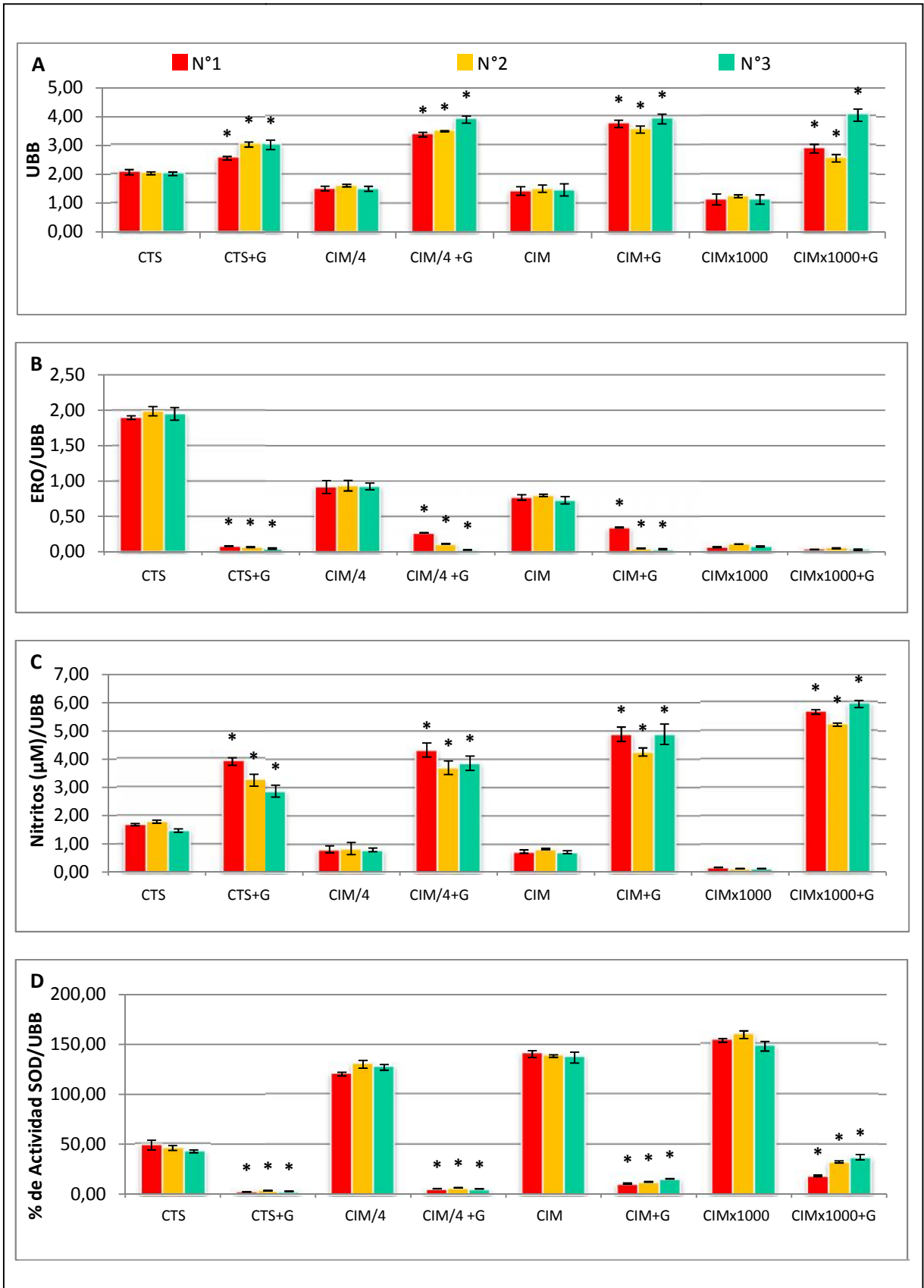


Figura 3.19: Cuantificación de UBB (A), ERO/UBB (B), Nitritos (μM)/UBB (C) y determinación del % de actividad SOD/UBB (D) en biofilm de cepas STEC en CTS con y sin agregado de glutatión 10 mM. * $p < 0,005$ respecto de la muestra sin tratar con glutatión

3.4.3 Impacto del ácido ascórbico y diferentes concentraciones de CIP sobre biofilms de cepas STEC

Otro compuesto que se utilizó para evaluar el efecto sobre la formación de biofilms y el estrés celular fue el AA ya que al oxidarse cede sus electrones evitando de ese modo la oxidación de otros compuestos. Para llevar a cabo el estudio, las cepas fueron incubadas con concentraciones crecientes de CIP y agregado de 10 mM de AA.

En presencia del antioxidante se observó un incremento en la biomasa de los biofilms de todas las cepas en todas las concentraciones ensayadas comparando estos valores con las UBB obtenidas en ausencia de AA (figura 3.20 (A)).

En relación a las ERO (figura 3.20 (B)), en presencia de AA se observó una notable disminución en comparación con los cultivos sin agregado de AA mientras que la concentración de nitritos se vio aumentada mayormente en condiciones basales (sin agregado de CIP) y en concentraciones subCIM para las tres cepas en estudio (figura 3.20 (C)).

Un comportamiento similar al obtenido con glutatión, fue observado para la actividad de la enzima SOD en presencia de AA (figura 3.20 (D)).

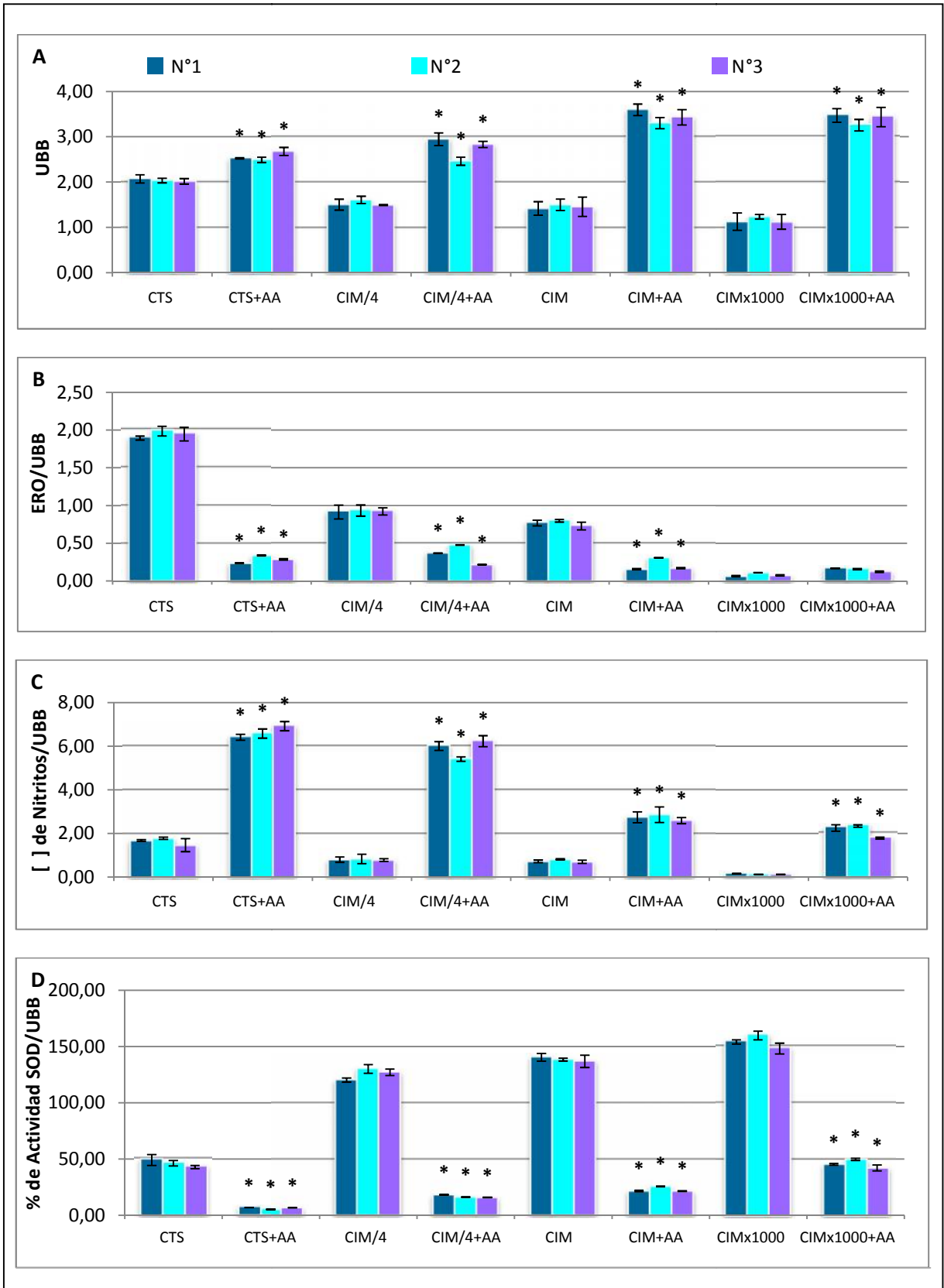


Figura 3.20: Cuantificación de UBB (A), ERO/UBB (B), Nitritos (μM)/UBB (C) y determinación del % de actividad SOD/UBB (D) en biofilm de cepas STEC en CTS con y sin agregado de AA 10 mM. * $p < 0,005$ respecto de la muestra sin tratar con AA.

RESULTADOS

Capítulo 3: SECCIÓN 3

CAPÍTULO 3

SECCIÓN 3: Evaluar factores que modifican la liberación de toxina Shiga desde el biofilm de STEC y la citotoxicidad sobre células sensibles del huésped.

3.5 Liberación de toxina Shiga desde el biofilm en diferentes condiciones de estrés

Se realizó el ensayo de citotoxicidad sobre células Vero que es considerada la técnica “gold standard”. Estas células poseen en su membrana plasmática una gran cantidad de receptores Gb3 y Gb4 que utiliza la toxina en su mecanismo de acción, lo que permite detectar Stx1, Stx2 y sus variantes. Para el análisis se utilizó la siguiente escala de efecto citotóxico:

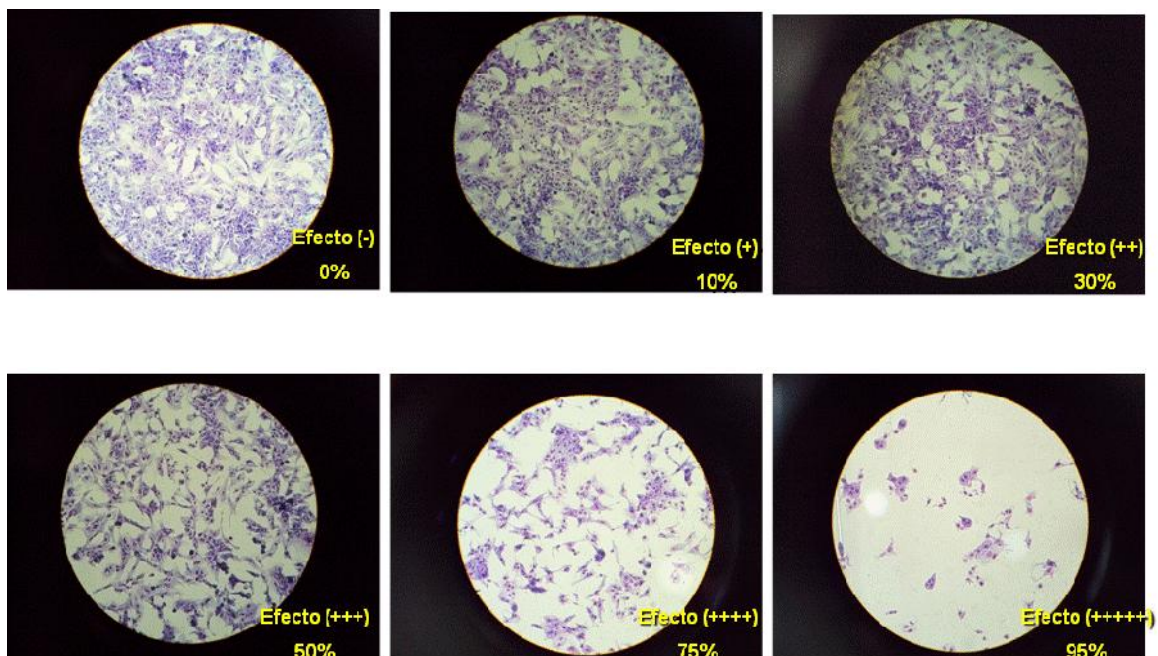


Figura 3.21: Porcentaje de efecto citotóxico de Stx sobre monocapa de células Vero. Titulación con Stx2 purificada (Control +).

Con el objetivo de evaluar si existe liberación de Stx desde los biofilms de STEC y el efecto del estrés sobre la liberación de la toxina se determinó el efecto citotóxico sobre monocapa de células Vero de las condiciones ensayadas en los capítulos anteriores (agregado de glúcidos, agente reductor, presencia de ATBs, etc). Para ello, los sobrenadantes correspondientes luego de una filtración con membrana de 0,22 μm fueron colocados sobre la monocapa y se realizó la lectura de las células Vero a las 72 h mediante el recuento de 50 campos con un microscopio óptico invertido y aumento de 100x. Los resultados se expresaron como % de efecto citotóxico/UBB.

En la figura 3.22 es posible observar un efecto citotóxico inducido por Stx liberada desde los biofilms en las tres cepas estudiadas en los medios de cultivo CTS y tioglicolato con y sin agregado de glucosa al 0,5%. Las cepas presentaron el máximo efecto cuando fueron incubadas con CTS (Nº1= $66,67 \pm 1,740$; Nº2 $64,39 \pm 0,950$ y Nº3: $66,89 \pm 3,220$) mientras que un menor efecto se observó cuando las cepas se incubaron con tioglicolato (Nº1= $41,670 \pm 2,910$; Nº2= $53,410 \pm 2,570$; Nº3= $53,570 \pm 1,880$). Los porcentajes más bajos fueron obtenidos cuando ambos medios de cultivo (CTS y tioglicolato) fueron adicionados con glucosa en una concentración del 0,5%. Este resultado correlaciona con las diferencias de estrés que sufren las células al ser expuestas a distintas condiciones de cultivo.

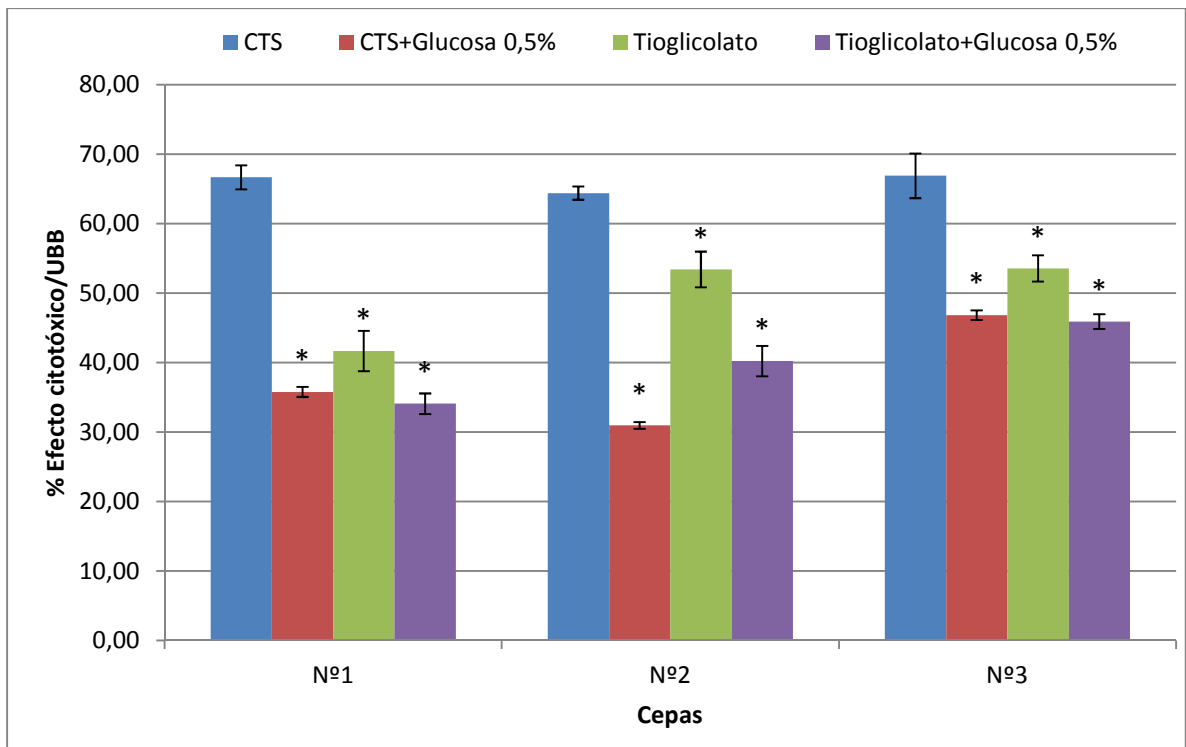


Figura 3.22. Ensayo de citotoxicidad en células Vero. Determinación del porcentaje de efecto citotóxico inducido por la Stx liberada desde el biofilms de cepas STEC en diferentes condiciones de cultivo mediante cuantificación microscópica luego de la tinción de las células (Efecto citotóxico/UBB) * $p < 0,005$ vs. CTS.

3.5.1 Liberación de toxina Shiga desde el biofilm de STEC en presencia de antibióticos

Se realizó también un análisis para evaluar el efecto citotóxico inducido por Stx liberada desde los biofilms tratados con antibióticos. Los resultados expresados en la tabla 3.12 indican que se observó efecto citotóxico a partir de los biofilms sin tratar con un promedio de un 50% de daño citotóxico. Para el caso de FOS y RIF el efecto citotóxico observado resultó similar cuando los biofilms fueron tratados con las diferentes concentraciones subCIM, CIM y supraCIM con un promedio de 58% a la máxima concentración de ATB ensayada. Cuando los biofilms fueron incubados con CIP se observó un aumento dosis dependiente en el efecto citotóxico observándose un efecto máximo (mayor a un 85%) a la concentración supraCIM. En

todos los casos CIP presentó mayores valores de citotoxicidad que los demás antibióticos.

Tabla 3.12: Ensayo de citotoxicidad en células Vero: Determinación del porcentaje de efecto citotóxico inducido por la Stx liberada desde el biofilm de cepas STEC tratadas con diferentes concentraciones de FOS, RIF y CIP. (Efecto citotóxico/UBB). *p<0,005 vs. CTS.

% Efecto citotóxico/UBB				
		Cepa N°1	Cepa N°2	Cepa N°3
Basal (sin ATB)		48,54 ± 1,78	50,42 ± 2,25	48,03 ± 1,99
CIP (µg/ml)	(CIM/4)	66,76 ± 2,03 *	62,07 ± 1,02 *	63,08 ± 2,76 *
	CIM	68,49 ± 1,72 *	66,53 ± 1,64 *	70,27 ± 1,37 *
	(CIMx1000)	88,76 ± 2,15 *	86,71 ± 2,37 *	88,50 ± 1,20 *
FOS (µg/ml)	(CIM/4)	50,51 ± 2,43	50,76 ± 2,58	51,55 ± 1,33
	CIM	52,63 ± 1,23	51,72 ± 1,70	53,89 ± 1,38
	(CIMx1000)	58,82 ± 2,45	57,99 ± 1,98	59,92 ± 2,75
RIF (µg/ml)	(CIM/4)	54,28 ± 2,23	52,77 ± 1,12	53,01 ± 2,55
	CIM	54,01 ± 1,79	53,68 ± 1,66	52,95 ± 1,45
	(CIMx1000)	58,11 ± 2,19	56,78 ± 2,16	55,75 ± 1,28

3.5.2 Influencia de antioxidantes incubados con CIP sobre la liberación de toxina Shiga desde los biofilms de STEC

Se analizó sobre las dos cepas clínicas STEC y la cepa de referencia, la influencia de antioxidantes exógenos sobre la liberación de Toxina Shiga. También se evaluó el efecto de cada uno de los antioxidantes (Tirón 50 mM, glutatión 10 mM y AA 10 mM) incubados con diferentes concentraciones de CIP (una subCIM (CIM/4), la concentración de la CIM y una concentración supraCIM (CIMx1000)). Para ello, los sobrenadantes de los biofilms tratados fueron filtrados y colocados

sobre monocapas de células Vero para determinar el daño citotóxico producido por Stx. En la figura 3.23 se representan los valores de UBB para la cepa N°2 en condiciones basales sin agregado de antibiótico y en concentraciones crecientes del mismo en presencia y ausencia de tirón. Por otro lado, en el mismo gráfico es posible visualizar el % de efecto citotóxico/UBB para esas mismas condiciones. Se pudo observar una correlación entre la UBB y la liberación de toxina desde los biofilms de STEC. En presencia del antioxidante se ve un marcado aumento de la biomasa del biofilms con un efecto citotóxico que va desde un 18 a un 33% de daño mientras que en ausencia del mismo, las UBB son significativamente menores con valores de citotoxicidad en aumento partiendo de un 50% de efecto para el control sin antibiótico alcanzando valores de un 88% en concentraciones supraCIM de CIP.

Este comportamiento se observó para las tres cepas y con los tres antioxidantes utilizados.

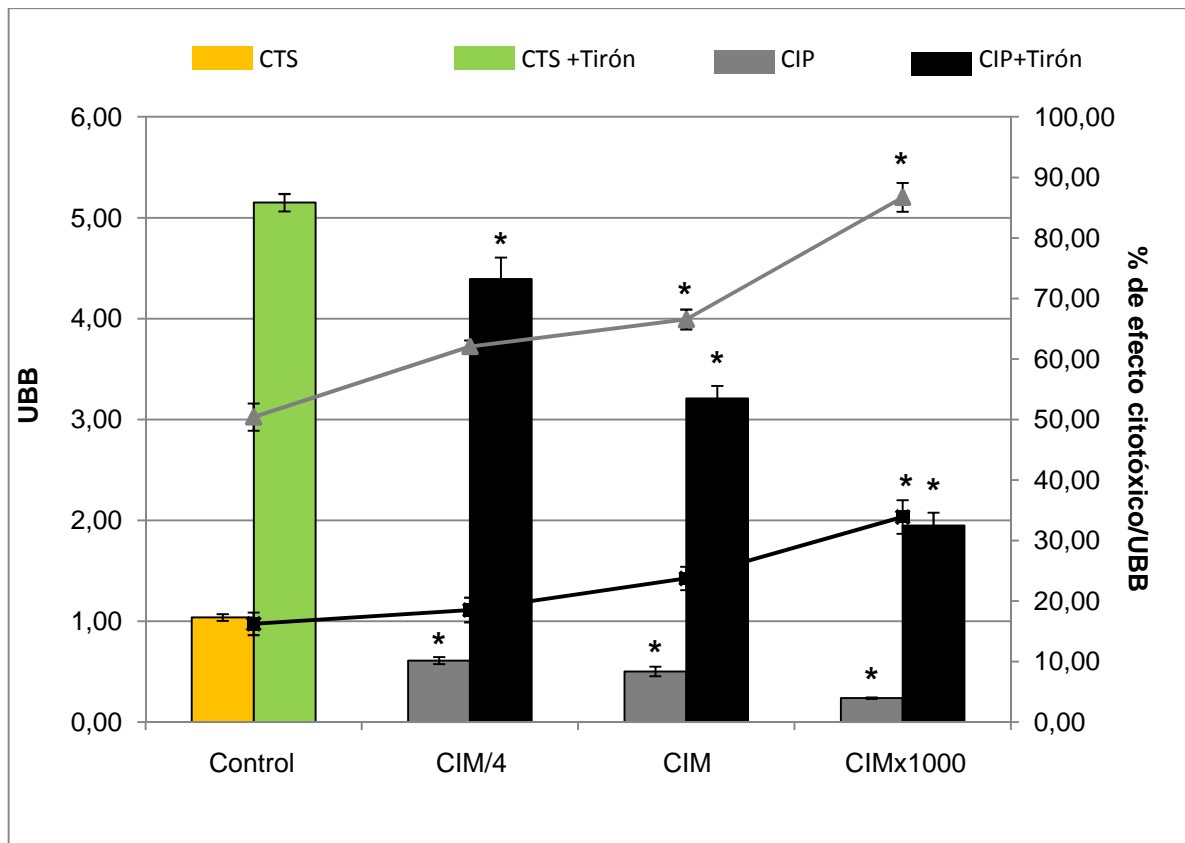


Figura 3.23: Efecto de un antioxidante exógeno (Tirón) en presencia de CIP sobre biofilms de la cepa N°2. La barras expresan las UBB y las líneas, el % de efecto citotóxico/UBB en presencia y ausencia del antioxidante (Tirón - - o sin Tirón - -) determinado por microscopía óptica.

3.5.3 Títulación de la toxina Shiga en biofilms de cepas STEC en presencia de antibióticos

Se determinó sobre una monocapa de células Vero, el título de la actividad citotóxica de los sobrenadantes de tres cepas STEC expuestas a concentraciones subCIM, CIM y supraCIM de CIP, RIF y FOS (tabla 3.13). El título se definió como la inversa de la dilución más alta que presentó destrucción en el 50% de la monocapa.

Se pudo observar un aumento dosis dependiente en el título del daño citotóxico para las tres cepas expuestas a CIP siendo este aumento más marcado en la cepa N°2 con un valor de 3200 para la concentración supraCIM y un valor de 100 en la condición basal. En la cepa N°3 el valor máximo a esa misma concentración fue de 800 con un basal de 100 mientras que en la cepa N°1 el valor

solo alcanzó los 320 con un basal de 40. Esto podría deberse a que esta cepa presenta sólo el gen que codifica para la Stx1 mientras que las cepas restantes presentan los genes para ambas toxinas Stx1 y Stx2.

Las cepas expuestas a RIF no presentaron mayores modificaciones en la liberación de toxina desde los biofilms tratados y sin tratar salvo en las concentraciones de la CIM para la cepa N°2 y N°3 donde se observó una disminución respecto al basal.

El título de la toxina para las cepas tratadas con FOS se vio disminuido con el aumento de la concentración del antibiótico alcanzando valores de 20 para la cepa N°1 y 10 para las cepas N°2 y N°3.

Tabla 3.13: Título de la toxina Shiga liberada desde el biofilms de cepas STEC expuestas a CIP, FOS y RIF; expresado como la Inversa de dilución más alta que provocó el 50% de daño citotóxico.

Título de la toxina Shiga				
		Cepa N°1	Cepa N°2	Cepa N°3
Basal (sin ATB)		40	100	100
CIP (µg/ml)	(CIM/4)	80	200	100
	CIM	160	1600	400
	(CIMx1000)	320	3200	800
FOS (µg/ml)	(CIM/4)	40	40	20
	CIM	40	20	10
	(CIMx1000)	20	10	10
RIF (µg/ml)	(CIM/4)	40	100	100
	CIM	40	20	20
	(CIMx1000)	80	80	80

3.5.4 Título de la toxina Shiga en biofilm de cepas STEC en presencia de antioxidantes y CIP

Se determinó cuantitativamente, el título de la actividad citotóxica sobre células Vero de los sobrenadantes de cepas *E.coli* expuestas a concentraciones crecientes de CIP en presencia de Tirón 50 mM, glutatión 10 mM y AA 10 mM (tabla 3.14).

Se observó un aumento en el título del daño citotóxico para las tres cepas expuestas a concentraciones subCIM (CIM/4), CIM y supraCIM (CIMx1000) de CIP en presencia de los antioxidantes siendo este aumento más marcado en las concentraciones supraCIM.

Para el caso de CIP con agregado de Tirón, los basales de las tres cepas presentaron un título de 40 mientras que en la máxima concentración del antibiótico y en presencia del antioxidante presentaron títulos de 320, 640 y 80 para las cepas N°1, N°2 y N°3, respectivamente.

Cuando la CIP se administró junto con glutatión los basales presentaron un título de 8 para la cepa N°2 y un valor de 4 para la cepa N°1 y N°3 mientras que esta misma condición en la concentración supraCIM presentó un valor de 20 para la cepa N°3 y un título de 16 para la cepa N°1 y N°2.

En presencia de ácido ascórbico se obtuvieron títulos basales equivalentes a 4 para la cepa N°2 y 2 para la cepa N°1 y N°3 que mostraron un aumento en función de la dosis de CIP alcanzando valores de 20 para la cepa N°1 y 16 para las cepas N°2 y N°3 en concentraciones supraCIM.

Comparando los resultados presentados en la tabla 3.13 y 3.14 se observó una notable disminución en el efecto citotóxico cuando CIP actuó en presencia de los tres antioxidantes ensayados.

Una citotoxicidad 5 y 10 veces menor fue obtenida para la cepa N°2 y N°3 respectivamente con agregado de Tirón en concentración supraCIM mientras que en la cepa N°1 no se observó diferencia en esta concentración en presencia o ausencia del antioxidante. Con agregado de glutatión y AA la disminución del efecto citotóxico fue más marcada aún, en todas las concentraciones estudiadas presentando una citotoxicidad en promedio de 20, 200 y 40 veces menor para las concentraciones supraCIM de la cepa N°1, N°2 y N°3 respectivamente.

Tabla 3.14: Título de la toxina Shiga liberada desde el biofilms de cepas STEC expuestas a concentraciones subCIM, CIM y supraCIM de CIP en presencia de 50 mM de tirón, 10 mM de glutatión y 10 mM de AA, expresado como la inversa de dilución más alta que provocó el 50% de daño citotóxico.

Título de la toxina Shiga				
		Cepa N°1	Cepa N°2	Cepa N°3
Basal+Tirón		40	40	40
CIP+Tirón (µg/ml)	(CIM/4)	40	160	40
	CIM	160	160	40
	(CIMx1000)	320	640	80
Basal+glutatión		4	8	4
CIP+glutatión (µg/ml)	(CIM/4)	8	8	8
	CIM	8	16	8
	(CIMx1000)	16	16	20
Basal+AA		2	4	2
CIP+AA (µg/ml)	(CIM/4)	16	8	4
	CIM	20	8	8
	(CIMx1000)	20	16	16

Capítulo 4: DISCUSIÓN

Escherichia coli productor de toxina Shiga (STEC) es un patógeno emergente transmitido por alimentos, asociado frecuentemente a casos de Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) (Rivas y col, 2008). Esta enfermedad es una de las causas más comunes de insuficiencia renal aguda y una causa importante de enfermedad renal crónica adquirida en los niños (Grisaru, 2014). Hasta el presente no existe una terapia específica para el tratamiento de las infecciones por STEC (Goldwater y Bettelheim, 2012) y aunque es susceptible a los antibióticos usados comúnmente, la aplicación de una terapia antimicrobiana es controversial (Bielaszewska y col., 2012). Es de destacar que el uso de antibióticos en SUH parece aumentar la gravedad de la infección, no estando esclarecida la causa de esta contraindicación (Lawson, 2004).

En la actualidad existen pocos estudios en biofilms de STEC, no hay reportes donde se observe liberación de Stx desde los mismos y no está esclarecida la acción de los ATB sobre su liberación. Por lo que se planteó como objetivo principal de esta tesis doctoral esclarecer aspectos metabólicos y fisiológicos en relación al estrés celular que sufren las células del biofilms de cepas STEC al ser cultivadas en diferentes condiciones. Además, se propuso evaluar la acción de antibióticos bactericidas (CIP y FOS) y bacteriostático (RIF) sobre células sésiles del biofilm de cepas STEC; incluyendo la evaluación de factores que modifican la liberación de toxina Shiga desde el biofilm y su acción sobre células sensibles.

La selección de cepas se efectuó teniendo en cuenta que aunque *E. coli* serotipo O157:H7 sigue siendo la causa más común de SUH, cepas no-O157:H7 han sido cada vez más aisladas de casos clínicos y asociadas con frecuencia a brotes epidémicos (Bergan y col., 2012; Bustamante y col., 2012; Joris y col., 2011).

En base a la caracterización feno-genotípica, de las ocho cepas estudiadas en esta tesis, se observó la presencia de dos serotipos; una cepa clínica O111:H- y siete cepas clínicas O157:H7 al igual que la cepa de referencia. Estos serotipos presentan de moderada a alta asociación con SUH y han sido asociados a casos en Argentina (Rivas y col., 2008) y en el resto del mundo (Bettelheim, 2007, Piérard y col., 2012).

Los perfiles de factores de virulencia obtenidos fueron *stx2*, *eae* y *hly* para 6 cepas clínicas de serotipo O157:H7; *stx1*, *eae* y *hly* para el serotipo O111:H- y *stx1*, *stx2*, *eae* y *hly* para una cepa clínica y la cepa de referencia EDL933 en concordancia con los perfiles prevalentes en las cepas O157 y no-O157 aisladas de casos de enfermedad en humanos en Argentina. Sin embargo el serotipo y genotipo de SUH más frecuentemente aislado en Argentina es O157:H7 *stx2*, *eae* y *hly* (Rivas y col., 2008).

Un aspecto menos estudiado es la formación de biofilms en STEC. Se evaluó la hidrofobicidad de las cepas STEC por ser un parámetro frecuentemente relacionado con la adherencia a superficies abióticas (Boyer y col., 2007; Patel y col., 2011; Rivas y col., 2005; 2006 y 2007). Las ocho cepas estudiadas exhibieron características hidrofílicas y baja capacidad para formar biofilms, pudiendo variar esta formación en diferentes condiciones de cultivo, lo cual indicaría que este factor no sería el único involucrado en el proceso de adherencia y formación del biofilm de STEC. En este sentido, dentro de los factores que regulan la formación de biofilm está la fimbria curli que se expresa típicamente bajo condiciones estresantes del medio ambiente como las bajas temperaturas, baja osmolaridad y crecimiento estacionario (Gerstel y col., 2003). Además, la fimbria curli suele ir acompañada de la producción de celulosa como componentes mayoritarios de la matriz extracelular de

los biofilms, tal es el caso de *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* y *E. coli* (Robbe-Saule y col., 2006). En STEC, la expresión de curli depende de los operones *csgABD* y *csgEFGH* y ocurre durante la fase estacionaria de crecimiento (Dyer y col., 2007; Robbe-Saule y col., 2006 y van Houdt y Michiels, 2005). Las ocho cepas analizadas en esta tesis presentaron los tres genes claves para la expresión de los operones de curli (*csgA*, *csgD* y *crl*). Esto implicaría que todas las cepas comparten la misma capacidad potencial de expresar la fimbria. Sin embargo, cuando se ensayó la expresión en placas de agar RC se observaron fenotipos diferentes. El fenotipo “rdar” sólo estuvo presente en la cepa clínica serotipo O111:H- mientras que las cepas clínicas serotipo O157:H7 presentaron fenotipos “saw” al igual que la cepa de referencia. Estos resultados son consistentes con lo informado por Cookson y col. (2002) quienes encontraron que 5 de 13 cepas no-O157 expresaron las fimbrias curli, y con el trabajo de Uhlich y col. (2001) en el que 41 cepas O157:H7 presentaron fenotipo “saw” en agar RC. En este último trabajo, dos cepas O157:H7, que raramente expresan la fimbria curli, presentaron colonias con los fenotipos “rdar” y “saw” debido a una mutación puntual en el promotor del gen *csgD* (Uhlich y col., 2001). Por otro lado, teniendo en cuenta que se ha comprobado que *csgD* no sólo interviene en la expresión de la fimbria sino también en la de celulosa, es posible pensar que las diferencias de las colonias “rdar” podrían deberse a una síntesis diferencial de este polisacárido (Ryu y Beuchat, 2005; Da Re y Ghigo, 2006 y Robbe-Saule y col., 2006). Sin embargo, ningún componente de la matriz del biofilm (adhesinas, fimbrias y/o celulosa) puede explicar por sí sólo la capacidad de una cepa para formar biofilms mientras que la expresión simultánea de varios de estos factores sí podría hacerlo (Reisner y col., 2006).

Numerosos trabajos demostraron la capacidad de *E.coli* para formar biofilms en distintas superficies utilizando una microtécnica en placas de 96 pocillos y posterior coloración con CV (Al Safadi y col., 2012; Chen y col., 2013; Kuczynska-Wisnik y col., 2010; Vacheva y col., 2012). Siguiendo estos antecedentes, se vio que las cepas STEC empleadas en este trabajo mostraron tener baja capacidad para formar biofilms sobre placas de poliestireno de 96 pocillos según escala descrita en Material y Métodos (Rivas y col. 2007). Sin embargo se plantearon diferentes estrategias como el agregado de glúcidos, la utilización de un agente reductor y la presencia de diferentes ATBs en las cuales esta capacidad se vio afectada.

A partir de la caracterización fenotípica, se seleccionaron dos cepas clínicas (O157:H7, O111:H-) y la cepa de referencia (EDL 933) para estudiar diferentes parámetros ambientales y nutricionales que podrían afectar la formación del biofilm y la relación con el estrés de las células sésiles. La exposición de los microorganismos a diferentes condiciones de cultivo como la presencia de glúcidos, condiciones reductoras y disponibilidad de oxígeno fueron analizadas; así como marcadores de estrés oxidativo, teniendo en cuenta que estudios previos han relacionado a células planctónicas con la generación de ERO y ERN (Aiassa y col., 2010; Páez y col., 2010). Sin embargo, la producción de estos metabolitos y la liberación de toxina Shiga desde el biofilm de STEC no han sido investigadas y podría ser útil para realizar aportes al estudio de la patogenicidad y el tratamiento del SUH.

Los resultados obtenidos son reforzados por algunos informes que han demostrado que la formación de biofilms de cepas STEC se vio significativamente afectada por una serie de condiciones ambientales (Dourou y col., 2011; Marouani-

Gadri y col., 2009; Rivas y col., 2007; Ryu y col., 2004; Skandamis y col., 2009; Wang y col., 2012) pero no se había estudiado el estrés de las células sésiles del biofilms (Villegas y col., 2013). El presente estudio mostró la formación de biofilms de dos cepas clínicas y una cepa de referencia productoras de toxina Shiga expuestas a diferentes condiciones de cultivo y se observó que la óptima formación de biofilms se produjo con un inóculo de 1×10^{11} UFC/ml, a las 48 h de cultivo en condiciones de microaerofilia y a 37°C, variando en las cepas estudiadas la capacidad de formar biofilms en las distintas condiciones.

Muchas investigaciones han revelado que la presencia de una fuente de azúcar apropiado contribuye a la producción de una matriz de polisacárido. Se ha informado en trabajos previos que la glucosa en determinadas concentraciones es capaz de aumentar la formación de biofilms. (Aiassa y col., 2012; Arce Miranda y col., 2011; Kalivoda y col., 2008; Lim y col., 2004; Waldrop y col., 2014). Los resultados en STEC concuerdan con los de estos autores debido a que se observó un incremento de 2,5 veces en la formación de biofilms en la cepa clínica de *E. coli* O157:H7 (N°2). Con la cepa N°1 y N°2 también se observó un aumento en la formación de biofilms pero en menor medida. También se encontró que el agregado de glúcidos como manosa y maltosa aumentó el desarrollo de los biofilms. Por lo tanto los azúcares mencionados constituirían una factor favorecedor de la formación de biofilms y a la vez podrían ser protectores contra los agentes desinfectantes de acuerdo a los conceptos de otros autores; ya que se acepta que los biofilms pueden proteger a las STEC contra los desinfectantes utilizados para descontaminar y producir entornos de procesamiento (Ryu y Beuchat, 2005).

Se pudo observar una estrecha relación entre la formación de biofilm y el estrés tanto oxidativo como nitrosativo, al que fue sometido en las distintas

condiciones de cultivo, aspecto no publicado en el biofilms de STEC. La baja producción de ERO y ON obtenida con glucosa, manosa o maltosa, correlaciona con el aumento en la formación de biofilms que mostró STEC en presencia de estos azúcares. Es decir, que las células sésiles en estas condiciones favorables para la producción de la matriz, sufren menos estrés oxidativo. Cabe destacar que el efecto de la glucosa sobre la formación de biofilms y la reducción de ERO y ERN, se vio tanto en condiciones aeróbicas como con bajos niveles de oxígeno (en medio con Tioglicolato). Los resultados obtenidos correlacionan con los de otros autores (Aiassa y col., 2012; Arce Miranda y col., 2011; Zhu y col., 2007) que sugieren una fuerte relación entre la atmósfera de incubación y la formación de biofilms.

En esta tesis se encontró que los niveles de SOD y CAT se modificaron en diferentes condiciones estresantes y fueron bajos en condiciones favorables, debido a que los niveles de ERO son también bajos en estas células del biofilm.

Existen estudios en los cuales se ha reportado una disminución en la formación de biofilms, por acción de un oxidante exógeno, como es el H_2O_2 (Toté y col., 2010; Zmantar y col., 2010). Mai-Prochnow y col. (2008) han sugerido que el H_2O_2 permite directa o indirectamente eliminar a una subpoblación de células y que la actividad CAT desdobla H_2O_2 impidiendo la penetración en los biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* a una concentración de 50 mM. Al respecto, los resultados obtenidos en esta tesis mostraron que el agregado de H_2O_2 al medio produjo una disminución del biofilms en las tres cepas estudiadas a las distintas concentraciones del oxidante ensayadas con una disminución tanto de las ERO como de las ERN, por lo cual podríamos decir que el desarrollo del biofilm de STEC está influenciado por la producción de metabolitos oxidantes y que los niveles de defensas antioxidantes pueden ser variables en diferentes condiciones ambientales.

Sugerimos que cuando este equilibrio se altera por las condiciones desfavorables, un aumento en la producción de ERO induce una situación de estrés celular, resultando en niveles más altos de SOD y CAT capaces de detoxificar las ERO generadas por H₂O₂.

Los resultados logrados con H₂O₂ como estresor exógeno contribuyen a entender el aumento en los niveles de las defensas antioxidantes, como una respuesta protectora contra el estrés que redujo las UBB del biofilm.

Al utilizar antibióticos como CIP, RIF y FOS, se observó que la biomasa de los biofilms disminuyó con el aumento de la concentración de los tres ATB ensayados, pero no se apreciaron diferencias significativas entre las cepas. CIP reduce los biofilms en todas las concentraciones ensayadas en comparación con RIF y FOS que tienen un efecto menos marcado. Sin embargo no se encontró una concentración de CIP capaz de erradicar los biofilms.

Las pruebas de sensibilidad a antibióticos permiten evaluar la actividad contra organismos planctónicos y los datos de CIM que proveen sirven como referencia para el tratamiento de infecciones agudas. Sin embargo, la aplicación de estas CIM en infecciones que implican biofilms bacterianos es a menudo ineficaz (Brown y col., 1988; Paraje, 2011), con numerosos estudios que han demostrado que los microorganismos crecidos en forma de biofilms tienen reducida susceptibilidad a los antibióticos, no así los cultivos planctónicos (Ryu y Beuchat, 2005; Costerton y col., 2003). Esto podría deberse a algunas de las teorías de resistencia que se plantean en la actualidad (Paraje, 2011).

En las células planctónicas, la inducción de ERO tras el tratamiento de las bacterias con ATBs ha sido ampliamente descrito en el caso de las quinolonas

(Albesa y col., 2004; Goswami y col., 2006; Dwyer y col., 2007), ampicilina (Kohanski y col., 2007), aminoglucósidos (Kolodkin-Gal y Engelberg-Kulka, 2008; Kohanski y col., 2007), cloranfenicol (Albesa y col., 2004; Paéz y col., 2013; Kolodkin-Gal y Engelberg-Kulka, 2008), trimetoprima y rifampicina (Kolodkin-Gal y Engelberg-Kulka, 2008) y ciprofloxacina (Aiassa y col., 2012; Becerra y Albesa 2002; Becerra y col., 2006; Páez y col., 2013). Todos estos ATBs antes mencionados inducen estrés oxidativo independientemente de sus sitios blancos específicos (Paez y col., 2011), y la formación de ERO mediada por ATB ya ha sido descrita en parte. Kohanski y col. (2007) demostraron que en general, el mecanismo letal de OH^{\bullet} producido en presencia de un ATB bactericida implica la depleción transitoria de NADH debido a cambios en el metabolismo del ciclo del ácido tricarbóxico y desestabilización de las agrupaciones hierro-azufre, proponiendo que los antibióticos aminoglucósidos inducen mala traducción y mal plegamiento de las proteínas asociadas a la membrana, provocando la activación de la respuesta de estrés y del sistema de señales de dos componentes, que a su vez se traduce en la producción de OH^{\bullet} (Kohanski y col., 2007). El papel de las ERO en la muerte celular mediada por antibiótico también es apoyado por el hecho de que las mutaciones en los genes que codifican para sistemas de defensa de las ERO incrementan la sensibilidad al fármaco. Kuczynska-Wisnik y col. (2010) describieron, que el estrés oxidativo promovido por H_2O_2 , Cu^{2+} o la falta de proteínas de choque térmico IbpA/B pueden inhibir la formación de biofilms de *E. coli* sin afectar el crecimiento de las células planctónicas. Aunque las respuestas de adaptación contra el estrés oxidativo causado por estas ERO se han estudiado ampliamente en las células planctónicas, se sabe relativamente poco acerca de las respuestas de las células agrupadas en biofilms.

El desequilibrio oxidativo se debe a una sobreproducción de ERO o a una reducción de las defensas oxidativas que serían insuficientes para eliminar los radicales libres; por lo tanto el sistema antioxidante juega un papel muy importante en el control de este proceso. En esta tesis, en función de la CIM de cada ATB, fueron seleccionadas diferentes concentraciones subCIM y supraCIM para llevar a cabo estudios que permitan determinar las relaciones entre el estrés oxidativo celular y la liberación de Stx por alteración del equilibrio prooxidante-antioxidante en el biofilm. Patrones similares de metabolitos del estrés (ERO y ERN) fueron encontrados en los biofilms de las 3 cepas, con la existencia de una disminución de los niveles de estas especies a medida que aumentaban las concentraciones de los antibióticos y se observó una importante reducción en las concentraciones supra-CIM. Además, como respuesta al estrés celular, el nivel de actividad de las enzimas antioxidantes aumentó significativamente en concentraciones supra-CIM mostrando una correlación con los bajos niveles de ERO.

Para confirmar que las ERO contribuyeron a la inhibición del crecimiento de los biofilms causado por los ATBs, se realizaron ensayos con CIP y la adición de diferentes antioxidantes como Tirón, AA y glutatión. Este ATB fue seleccionado por ser el que generó la mayor alteración en el equilibrio prooxidante-antioxidante. Se encontró que estos antioxidantes aumentaban la biomasa de los biofilms, con menos desequilibrio de estrés oxidativo y mínima liberación de Stx. Con Tirón que actúa como un secuestrante de O_2^- , se observó un aumento significativo en las biomasas de los biofilms de las tres cepas en todas las concentraciones estudiadas. Como resultado de la adición de Tirón las ERO mostraron una disminución marcada pero los niveles de ERN se vieron incrementados. El agregado de este antioxidante aumentó la producción basal de NO_2^- y más aún en presencia de las diferentes

concentraciones de CIP. Se encontró que podría existir una relación inversa entre la generación de ERO y la producción de NO_2^- y esta relación fue evidenciada mediante el agregado del secuestrante. Con glutatión y AA también se demostró la existencia de una relación inversa entre la generación de ERO y la producción de NO_2^- .

Boles y Singh mostraron que el estrés oxidativo endógeno en los biofilms promueve la resistencia a los ATBs (Boles y Singh, 2008). El aumento de las ERN observado junto con una disminución de las UBB a concentraciones supra-CIM concuerda con lo informado por otros autores. Barraud y col. (2006) detectaron NOO^- dentro de microcolonias en el biofilms de *P. aeruginosa*, sólo en presencia de ERO (Barraud y col., 2006). Schlag y col. (2007) han caracterizado la respuesta de *S.aureus* al estrés inducido por NO_3^- demostrando que se trataba de la alteración de la síntesis de polisacáridos de adhesión intercelular y la formación de biofilms (Schlag et al, 2007). También han proporcionado datos que sugieren que el ON ampliamente utilizado como defensa o molécula de señalización en los sistemas biológicos, está directa o indirectamente participando en la inhibición de la formación de biofilms de *S. aureus* (Schlag y col., 2007). En esta tesis, se observó que el estrés nitrosativo podría producirse dentro de los biofilms, afectando su crecimiento.

La liberación de factores de virulencia como la toxina Shiga en presencia de antibióticos, juega un papel muy importante en la patogenicidad de cepas STEC. El uso de ATB en el tratamiento de las infecciones causadas por *STEC* en estado planctónico es controvertido debido a las preocupaciones por la activación del SUH mediante el aumento de la producción de Stx (Bielaszewska y col., 2012). Los efectos de los ATBs sobre la producción de Stx difieren y son dependientes de la

concentración de ATB y la naturaleza de la cepa STEC (Mc Gannon y col., 2010, Ochoa y col., 2007, Zhang y col., 2009). En este sentido, estudios realizados con *E.coli* O157:H7 y fluoroquinolonas, trimetoprim/sulfametoxazol y ampicilina han revelado un aumento significativo en la producción de Stx2 (Kimmitt y col., 2000, Lee y Stein, 2009, Mc Gannon y col., 2010, Zhang y col., 2009), mientras que los macrólidos (Mc Gannon y col., 2010, Zhang y col., 2009), carbapenems (Kimmitt y col., 2000, Lee y Stein, 2009), aminoglucósidos (Kimmitt y col., 2000, Mc Gannon y col., 2010), rifampicina (Rahal y col., 2011), y fosfomicina (Kimmitt y col., 2000, Mc Gannon y col., 2010) o bien no tuvieron efecto sobre la producción de Stx2 o incluso la suprimieron. RIF, que está autorizado en muchos países para el tratamiento de la diarrea del viajero, podría considerarse (en contraste con CIP) una opción para el tratamiento de la diarrea de etiología poco clara, ya que no induce la replicación de los fagos *stx* ni la producción de toxina (Ochoa y col., 2007; Bielaszewska y col., 2012) y por lo tanto no tendría efecto en la infección sistémica por STEC. Estos ensayos *in vitro* concuerdan con los experimentos en modelos animales (Rahal y col., 2011, Zhang y col., 2009).

Los resultados logrados en esta tesis muestran que existe liberación de Stx desde los biofilms de STEC y ésta difiere según las condiciones de cultivo a las cuales son expuestas las células (Villegas y col., 2013). Se encontró una relación entre la expresión de estos factores de virulencia y el estrés presente en las células sésiles ya que se pudo evidenciar que el desarrollo del biofilm fue influenciado por la producción de oxidantes (ERO y ERN); y los niveles de las defensas antioxidantes (SOD y CAT) fueron afectados por las condiciones ambientales, lo que tuvo un efecto sobre la liberación de Stx. Este desequilibrio oxidativo producido por la alteración del entorno de los biofilms puede tener un papel importante en la

patogénesis de las infecciones causadas por cepas *E. coli* productoras de toxinas Shiga.

Cabe destacar que cuando las cepas clínicas O157 y no O157 obtenidas de niños con SUH fueron incubadas con distintos antibióticos bactericidas y bacteriostático, con el fin de investigar los efectos de diferentes concentraciones sobre la liberación de la Stx de biopelículas, se observó que CIP aumentó significativamente la liberación de Stx, en cambio, FOS y RIF han mostrado tener menos influencia en la liberación de toxinas desde los biofilms, sin diferencias significativas entre las distintas concentraciones de estos últimos dos antibióticos. CIP produjo el mayor desequilibrio en el balance prooxidante-antioxidante con un marcado aumento en la actividad antioxidante y un alto nivel de producción de Stx liberado desde los biofilms. Sin embargo, FOS y RIF produjeron menos alteraciones en este equilibrio oxidativo celular, mostrando efectos citotóxicos menores sobre las células Vero.

La liberación de las toxinas, disminuyó significativamente con la adición de antioxidantes exógenos a los cultivos con CIP y esto mostró una relación con las ERO. La alteración en el equilibrio prooxidante-antioxidante para CIP causó un marcado estrés oxidativo en los biofilms y tuvo un efecto sobre la producción y liberación de Stx. Estos hallazgos podrían contribuir a una mejor comprensión de la relevancia de los biofilms en la patogénesis de la infección por STEC.

CONCLUSIONES Y
PERSPECTIVAS FUTURAS

Conclusiones parciales

En el presente trabajo de tesis doctoral se estudiaron aspectos en relación al estrés celular que sufren las células sésiles de STEC al ser sometidas a diferentes condiciones de cultivo y se evaluaron factores que podrían modificar la liberación de toxina Shiga desde el biofilm. A partir de los resultados obtenidos fue posible concluir lo siguiente:

- Las cepas estudiadas exhibieron características hidrofílicas y si bien todas las cepas presentaron genes que codifican para la fimbria curli (*csgA*, *csgD* y *crf*), la expresión en placas de agar RC evidenció fenotipos diferentes. A su vez, estas cepas mostraron baja capacidad para formar biofilms, pudiendo variar esta formación en diferentes condiciones de cultivo, lo cual indicaría que los factores antes mencionados no serían los únicos involucrados en el proceso de adherencia y formación del biofilm de STEC.
- En condiciones de cultivo que resultaron favorables para la formación del biofilms, como el agregado de glúcidos (glucosa, manosa y maltosa) o un medio reductor (con y sin agregado de nutrientes), hubo disminución de ERO y ERN con niveles de SOD y CAT bajos, lo que indicaría que los mismos tuvieron influencia sobre la formación del biofilms. Esta disminución del estrés estuvo estrechamente relacionada con el aumento en la producción de matriz exopolisacárida. En condiciones de cultivo desfavorables como el uso de un agente estresor exógeno, la biomasa del biofilms disminuyó. También hubo una disminución en las ERO y ERN con aumentos marcados en la actividad de las enzimas SOD y CAT por lo que el desarrollo del biofilm de STEC

estaría influenciado por la producción de metabolitos oxidantes y la respuesta de las defensas antioxidantes.

- En presencia de ATBs, se afectó la formación de biofilms, observándose una disminución dosis dependiente de la biomasa con los tres ATBs utilizados; siendo CIP capaz de reducir la misma en mayor medida, mientras que FOS fue el ATB que provocó la menor disminución. El estado redox de los biofilms varió con los ATBs utilizados, puesto que se observó que los metabolitos del oxígeno y del nitrógeno disminuían a medida que aumentaba la concentración de ATBs siendo más marcada esta disminución con CIP. Las actividades de SOD y CAT correlacionaron con los valores obtenidos para los metabolitos del oxígeno en función de las diferentes concentraciones utilizadas. Los tres ATBs utilizados mostraron diferencias significativas tanto en la reducción del biofilm como en el desbalance oxidativo.
- El uso de secuestrantes, utilizados para evaluar el estrés oxidativo causado por CIP en los biofilms de STEC, permitió observar una variación dosis dependiente de la biomasa del biofilm. En presencia de un secuestrante específico de anión superóxido (Tirón), se evidenció un aumento significativo en la formación del biofilm en todas las concentraciones de CIP estudiadas con respecto al basal sin agregado de antioxidante. Glutación y AA también disminuyeron los niveles de $O_2^{\cdot-}$ generados por CIP y la utilización de estos tres antioxidantes permitió ver un aumento en los niveles de ON lo cual indicaría que las ERN también estarían involucradas en la generación del estrés oxidativo inducido por CIP. Estos resultados permitieron reforzar el concepto que los ATB estimulan tanto ERO como ERN, evidenciándose una

interacción entre ambos tipos de especies reactivas en el biofilm. Fue evidente una relación inversa entre la formación de ERO y ERN lo que podría explicarse por el hecho que el ON reacciona con $O_2^{\bullet-}$, y en general es conveniente para las células un equilibrio en la proporción de ERO y ERN.

- En esta tesis se evidenció que el biofilm de STEC fue capaz de liberar Stx y esto se vio incrementado cuando el biofilms fue expuesto a una condición estresante (agregado de CIP) ya que el efecto citotóxico sobre células Vero, aumentó significativamente con el incremento del estrés oxidativo. Se observó una diferencia en la liberación de toxina entre los ATB utilizados, siendo mayor la liberación con CIP, mientras que RIF y FOS no modificaron la liberación de toxina desde el biofilm o incluso en algunas concentraciones la disminuyeron. La liberación de toxinas pudo ser revertida, al menos parcialmente por agentes exógenos secuestrantes o inhibidores de ERO.

Conclusión final

De acuerdo a la hipótesis planteada en este proyecto de tesis doctoral se puede concluir que se evidenció una relación entre la formación de biofilms, el estrés celular y la liberación de toxina Shiga. Se ha podido correlacionar el efecto de la alteración del equilibrio celular oxidativo (metabolitos oxidativos/enzimas antioxidantes) sobre la producción y liberación de Stx desde el biofilm de STEC. Este desbalance oxidativo podría tener un papel importante en las infecciones causadas por esta bacteria, por lo que, el estudio de los mecanismos implicados en la liberación de toxinas durante la formación de biofilms podría contribuir a una mejor comprensión de la patogénesis de STEC.

APENDICE I



MEDIOS DE CULTIVO, SOLUCIONES Y GELES

Agar Müeller Hinton (MH)-Britania

Infusión de carne	300,0 g
Peptona ácida de caseína	17,5 g
Almidón	1,5 g
NaCl	5,5 g
Agar	15,0 g
Agua destilada c.s.p.	1000 ml

pH: $7,3 \pm 0,1$

Preparación: Suspender 37 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada. Dejar embeber de 10 a 15 minutos. Calentar con agitación frecuente y hervir durante 1 minuto. Esterilizar a 121 °C durante 15

Caldo Müeller Hinton (MH)-Britania

Infusión de carne	300,0 g
Peptona ácida de caseína	17,5 g
Almidón	1,5 g
Agua destilada c.s.p.	1000 ml

pH: $7,3 \pm 0,2$

Preparación: Suspender 22 g del medio en un litro de agua destilada y dejar embeber 10 minutos, agitando periódicamente. Calentar con agitación frecuente y hervir durante 1 minuto. Esterilizar a 121 °C por 15 minutos.

Agar Tripteína Soya (ATS)-Britania

Tripteína	15,0 g
Peptona de soya	5,0 g
Glucosa	1,0 g
NaCl	5,5 g
Agar-agar (ausente en el caldo)	2,5 g
Agua destilada c.s.p.	1000 ml

pH: $7,3 \pm 0,2$

Preparación: Disolver 40 g de polvo deshidratado en un litro de agua destilada. Mezclar y dejar reposar 5 minutos. Calentar suavemente agitando y hervir durante 1 o 2 minutos hasta su disolución. Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121 °C.

Caldo Tripteína Soya (CTS)-Britania

Tripteína	17,0 g
Peptona de soya	3,0 g
NaCl	5,0 g
K ₂ HPO ₄	2,5 g
Glucosa	2,5 g
Agua destilada c.s.p.	1000 ml

pH: 7,3 ± 0,2

Preparación: Suspender 30 g del polvo en un litro de agua destilada. Mezclar y calentar hasta disolver. Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Agar MacConkey Sorbitol (SMAC)-Britania

Peptona de carne	3 g
Sorbitol	10 g
ClNa	5 g
Mezcla de sales biliares	1,5 g
Rojo neutro	0,03 g
Cristal violeta	0,001 g
Agar	15 g

Preparación: Suspender 51,5g del polvo en un litro de agua destilada. Dejar reposar 5 minutos, mezclar y calentar hasta disolver. Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Buffer Fosfato Salino (PBS)

NaCl	8,0 g
KCl	0,2 g
Na ₂ HPO ₄	1,15 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
Agua destilada c.s.p.	1000 ml

pH: 7,2 ± 0,2

Agar Luria Bertani rojo Congo

Para preparar 1 litro:

“Bacto-tryptone” (Difco) 10 g

“Bacto-yeast extract” (Difco) 5 g

Reservar 20 ml para disolver los colorants.

Agar 13,5 g

Ajustar el pH a 7,5 con NaOH y esterilizar por autoclave a 121°C, 15 min

Colorante rojo Congo (Merk) 40 mg

Colorante azul brillante de Coomassie 20 mg

Preparación: Disolver los colorantes en el caldo, esterilizar por filtrado en membrana de 0,22 µm y agregar al agar tibio. Fraccionar en placas en ambiente estéril.

Cristal violeta al 1 %

Solución A:

Cristal violeta 1 g

Etanol (95%) 20 ml

Solución B:

Oxalato de amonio 0,8 g

Agua destilada 80 mL

Preparación: Mezclar cada uno de los solutos en su disolvente respectivo. Dejar la solución de oxalato de amonio en reposo durante una noche o calentar ligeramente hasta que se solubilice. Mezclar las dos soluciones y filtrar.

Buffer de corrida (TBE):

89 mM Tris

89 mM ácido bórico

1mM EDTA

pH 8

Gel de agarosa al 2%:

8 g de agarosa

63 ml de TBE 1x

0,8 µg ml⁻¹ de bromuro de etidio

PUBLICACIONES

1. Publicaciones científicas

- 1.1 **Villegas NA**, Baronetti J, Albesa I, Polifroni R, Parma A, Etcheverría A, Becerra M, Padola N, Paraje M. Relevance of biofilms in the pathogenesis of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* infection. **Scientific World Journal**. 2013 12;2013:607258.
- 1.2 Baronetti JL, **Angel Villegas N**, Aiassa V, Paraje MG, Albesa I. Hemolysin from *Escherichia coli* induces oxidative stress in blood. **Toxicon**. 2013 70, 15-20.
- 1.3 Baronetti JL, **Natalia Angel Villegas**, María Gabriela Paraje, Inés Albesa. Nitric oxide-mediated apoptosis in rat macrophages subjected to shiga toxin from *Escherichia coli*. **Microbiol Immunol** 2011; 00: 1–8.

2. Capítulo de libro

- 2.1 **Angel Villegas N**; Arce Miranda J; Becerra MC; Baronetti J; Ravetti S; Sotomayor C; Albesa I; Paraje MG. How different culture conditions affect cellular stresses in the biofilms. Microbes in Applied Research: Current Advances and Challenges. Editor: A. Mendez-Vilas - Publisher: World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd. - ISBN: 978-981-4405-03-4. 2012. Pag: 629-635

3. Distinciones y pasantías

3.1 Trabajo seleccionado por el Comité Científico para presentación oral.

Angel Villegas N, Polifroni R, Padola NL, Parma A, Etcheverría A, Albesa I, Becerra MC, Paraje MG. Factores de Virulencia asociados a *Escherichia coli* productor de toxina Shiga. XI Congreso Argentino de Microbiología. Octubre 2010.

- 3.2 Pasantías realizadas en la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Centro de la provincia de Buenos Aires bajo la dirección de la Dra. Nora Lía Padola y el Dr. Alberto Parma desde el 20 de septiembre hasta el 20 de octubre de 2010 y desde el 18 de noviembre hasta el 1

de diciembre de 2012. Institución otorgante: Proyecto de Cooperación Interinstitucional (Convocatoria **INTER-U**) entre Universidades Nacionales de la Secretaría de Políticas Universitarias del Ministerio de Educación, Ciencia y Tecnología de la Nación. Res.Dec. 637/10 y Res.Dec: 1590/2012.

4. Publicaciones en Congresos y Jornadas

Internacionales

4.1 **Angel Villegas N**, Becerra MC, Baronetti JL, Albesa I, Paraje MG. Biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7 under reducing conditions. 1° Reunión Internacional de Ciencias Farmacéuticas RICIFA. Córdoba, Argentina, junio 2010. Res. M4

4.2 **Angel Villegas N**, Becerra MC, Baronetti JL, Albesa I, Suárez ME, Paraje MG. 7th International Symposium on Shiga Toxin (Verocytotoxin) – Producing *Escherichia coli* Infections. Characterization of the ability of *Escherichia coli* O157:H7 to form biofilm. Buenos Aires, Argentina, mayo 2009. Res.N° P02.4.4.

4.3 **Angel Villegas N**, Paraje MG, Albesa I, Suárez ME, Becerra MC. Oxidative stress and susceptibility to ciprofloxacino in *Escherichia coli* O157:H7. 7th International Symposium on Shiga Toxin (Verocytotoxin) – Producing *Escherichia coli* Infections. Buenos Aires, Argentina, mayo 2009. Res. N° P04.4.3.

Nacionales

4.6 **Angel Villegas N**, Becerra MC, Polifroni R, Parma A, Etcheverría A, Padola N, Albesa I, Paraje M.G. Efecto de antibióticos sobre el biofilms, su relación con el estrés oxidativo y la liberación de Toxina Shiga. XII Congreso Argentino de la Sociedad Argentina de Infectología – SADI 2012. Córdoba, Argentina, mayo 2012. Res. N° 29537

4.8 **Angel Villegas N**, Arroyo G, Etcheverría AI, Padola NL, Parma AE, Albesa I, Becerra MC, Paraje MG. Relación entre formación de biofilms, estrés oxidativo y efecto citotóxico de cepas de *Escherichia coli* productoras de Toxina Shiga. 1^{er} Congreso Bioquímico Córdoba 2011. 8^a Jornadas de Actualización en Especialidades Bioquímicas. 2^a Jornada “El Rol del Bioquímico y la formación de los Futuros Profesionales”. Córdoba, Argentina, octubre de 2011. P 81

4.10 **Angel Villegas N**, Bongiovanni ME, Albesa I, Paraje MG, Becerra MC. Generación de Especies Reactivas del Oxígeno y Capacidad de defensa de cepas de *Escherichia coli* productoras de toxina Shiga. VII Jornadas de Bioquímica Clínica. Córdoba, Argentina, septiembre 2010.

BIBLIOGRAFIA

A

Aiassa V, Barnes AI, Albesa I. Resistance to ciprofloxacin by enhancement of antioxidant defenses in biofilm and planktonic *Proteus mirabilis*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010 Feb 26;393(1):84-8.

Aiassa V, Barnes AI, Smania AM, Albesa I. Sublethal ciprofloxacin treatment leads to resistance via antioxidant systems in *Proteus mirabilis*. *FEMS Microbiol Lett*. 2012 Feb;327(1):25-32.

Aiassa V, Baronetti JL, Paez PL, Barnes AI, Albrecht C, Pellarin G, Eraso AJ, Albesa I. Increased advanced oxidation of protein products and enhanced total antioxidant capacity in plasma by action of toxins of *Escherichia coli* STEC. *Toxicol In Vitro*. 2011 Feb; 25(1):426-31.

Albesa I, Becerra MC, Battán PC, Páez PL. Oxidative stress involved in the antibacterial action of different antibiotics. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 Apr 30;317(2):605-9.

Al Safadi R, Abu-Ali GS, Sloup RE, Rudrik JT, Waters CM, Eaton KA, Manning SD. Correlation between in vivo biofilm formation and virulence gene expression in *Escherichia coli* O104:H4. *PLoS One*. 2012;7(7):e41628.

Arce Miranda JE, Sotomayor CE, Albesa I, Paraje MG. Oxidative and nitrosative stress in *Staphylococcus aureus* biofilm. *FEMS Microbiol Lett*. 2011 Feb;315(1):23-9.

Arciola CR. New concepts and new weapons in implant infections. *Int J Artif Organs*. 2009 Sep;32(9):533-6.

B

Baldeck JD, Marquis RE. Targets for hydrogen-peroxide-induced damage to suspension and biofilm cells of *Streptococcus mutans*. *Can J Microbiol*. 2008 Oct;54(10):868-75.

Bales PM, Renke EM, May SL, Shen Y, Nelson DC. Purification and Characterization of Biofilm Associated EPS Exopolysaccharides from ESKAPE Organisms and Other Pathogens. *PLoS One*. 2013 Jun 21;8(6):e67950.

Barnhart MM, Chapman MR. Curli biogenesis and function. *Annu Rev Microbiol*. 2006;60:131-47. Review. PubMed PMID: 16704339.

Baronetti JL, Villegas NA, Aiassa V, Paraje MG, Albesa I. Hemolysin from *Escherichia coli* induces oxidative stress in blood. *Toxicon*. 2013 Aug;70:15-20. doi: 10.1016/j.toxicon.2013.03.014.

Baronetti JL, Villegas NA, Paraje MG, Albesa I. Nitric oxide-mediated apoptosis in rat macrophages subjected to Shiga toxin 2 from *Escherichia coli*. *Microbiol Immunol*. 2011 Apr;55(4):231-8.

Barraud N, Hassett DJ, Hwang SH, Rice SA, Kjelleberg S, Webb JS. Involvement of nitric oxide in biofilm dispersal of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*. 2006 Nov;188(21):7344-53.

Bartosz G. Reactive oxygen species: destroyers or messengers? *Biochem Pharmacol*. 2009 Apr 15;77(8):1303-15.

Becerra MC, Albesa I. Oxidative stress induced by ciprofloxacin in *Staphylococcus aureus*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002 Oct 4;297(4):1003-7.

Becerra MC, Páez PL, Laróvere LE, Albesa I. Lipids and DNA oxidation in *Staphylococcus aureus* as a consequence of oxidative stress generated by ciprofloxacin. *Mol Cell Biochem*. 2006 Apr;285(1-2):29-34.

Bentancor A., Rumi M.V., Gentilini M.V., Sardoy C., Irino K., Agostini A., Cataldi A. Shiga toxin producing and attaching and effacing *Escherichia coli* in cats and dogs in a high hemolytic uremic syndrome incidence region in Argentina. *FEMS Microbiol Lett*. 2007; 267:251-256.

Benzie, I.F.F.; Strain J.J.; 1999. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. En: *Methods Enzymol. Oxidants and antioxidants. Part A*. Packer L (ed.). California: Academic Press. Vol 299. Cap. 2. p. 15-27.

Bergan J, Dyve Lingelem AB, Simm R, Skotland T, Sandvig K. Shiga toxins. *Toxicon*. 2012 Nov;60(6):1085-107.

Bergholz TM, Wick LM, Qi W, Riordan JT, Ouellette LM, Whittam TS. Global transcriptional response of *Escherichia coli* O157:H7 to growth transitions in glucose minimal medium. *BMC Microbiol*. 2007 Oct 29;7:97.

Bettelheim KA. The non-O157 shiga-toxigenic (verocytotoxigenic) *Escherichia coli*; under-rated pathogens. *Crit Rev Microbiol*. 2007;33(1):67-87.

Bielaszewska M, Idelevich EA, Zhang W, Bauwens A, Schaumburg F, Mellmann A, Peters G, Karch H. Effects of antibiotics on Shiga toxin 2 production and bacteriophage induction by epidemic *Escherichia coli* O104:H4 strain. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012 Jun;56(6):3277-82

Blanco M, Padola NL, Krüger A, Sanz ME, Blanco JE, González EA, Dahbi G, Mora A, Bernárdez MI, Etcheverría AI, Arroyo GH, Lucchesi PM, Parma AE, Blanco J. Virulence genes and intimin types of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle and beef products in Argentina. *Int Microbiol*. 2004 Dec;7(4):269-76.

Bogdanov P, Gonzalez M, Sperandeo NR, Fidelio G, Albesa I. An "in vitro" system simulates in membranes the antibacterial mechanism postulated for the action of isoxazolylnaphthoquinoneimine in *Staphylococcus aureus*. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997 Oct 9;239(1):186-90.

Bogdanov PM, Bertorello MM, Albesa I. Oxidative stress in *Staphylococcus aureus* associated to the cleavage of an isoxazolylnaphthoquinoneimine with antibacterial capacity. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998 Mar 17;244(2):561-6.

Boles BR, Singh PK. Endogenous oxidative stress produces diversity and adaptability in biofilm communities. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Aug 26;105(34):12503-8.

Bougdour A, Lelong C, Geiselman J. Crl, a low temperature-induced protein in *Escherichia coli* that binds directly to the stationary phase sigma subunit of RNA polymerase. *J Biol Chem*. 2004 May 7;279(19):19540-50.

Boyer RR, Sumner SS, Williams RC, Pierson MD, Popham DL, Kniel KE. Influence of curli expression by *Escherichia coli* O157:H7 on the cell's overall hydrophobicity, charge, and ability to attach to lettuce. *J Food Prot*. 2007 Jun;70(6):1339-45.

Brown MR, Allison DG, Gilbert P. Resistance of bacterial biofilms to antibiotics: a growth-rate related effect? *J Antimicrob Chemother*. 1988 Dec;22(6):777-80.

Buchholz U, Bernard H, Werber D, Böhmer MM, Remschmidt C, Wilking H, Deleré Y, an der Heiden M, Adlhoch C, Dreesman J, Ehlers J, Ethelberg S, Faber M, Frank C, Fricke G, Greiner M, Höhle M, Ivarsson S, Jark U, Kirchner M, Koch J, Krause G, Lubber P, Rosner B, Stark K, Kühne M. German outbreak of *Escherichia coli* O104:H4 associated with sprouts. *N Engl J Med*. 2011 Nov 10;365(19):1763-70.

Bustamante AV, Sanso AM, Parma AE, Lucchesi PM. Subtyping of STEC by MLVA in Argentina. *Front Cell Infect Microbiol*. 2012 Aug 22;2:111.

C

Cabiscol E, Tamarit J, Ros J. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *Int Microbiol*. 2000 Mar;3(1):3-8.

Centers for Disease Control and Prevention. Preliminary FoodNet Data on the Incidence of Infection with Pathogens Transmitted Commonly Through Food—10 States, 2006. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2007; 56: 336-9.

Chen CL, Liu WT, Chong ML, Wong MT, Ong SL, Seah H, Ng WJ. Community structure of microbial biofilms associated with membrane-based water purification processes as revealed using a polyphasic approach. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2004 Jan;63(4):466-73.

Chen CY, Hofmann CS, Cottrell BJ, Strobaugh TP Jr, Paoli GC, Nguyen LH, Yan X, Uhlich GA. Phenotypic and genotypic characterization of biofilm forming capabilities in non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains. *PLoS One*. 2013 Dec 27;8(12):e84863.

Clinical and Laboratory Standards Institute (2010) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 20th Informational Supplement, M100-S20 and M100 S20 Supplement. Wayne, PA, EE.UU.

Cookson AL, Cooley WA, Woodward MJ. The role of type 1 and curli fimbriae of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in adherence to abiotic surfaces. *Int J Med Microbiol*. 2002 Sep;292(3-4):195-205.

Costerton JW, Cheng KJ, Geesey GG, Ladd TI, Nickel JC, Dasgupta M, Marrie TJ. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu Rev Microbiol*. 1987;41:435-64.

Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 1999 May 21;284(5418):1318-22.

Costerton W, Veeh R, Shirtliff M, Pasmore M, Post C, Ehrlich G. The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections. *J Clin Invest*. 2003 Nov;112(10):1466-77. Erratum in: *J Clin Invest*. 2007 Jan;117(1):278.

D

Danese PN, Pratt LA, Kolter R. Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture. *J Bacteriol.* 2000 Jun;182(12):3593-6.

Da Re S, Ghigo JM. A CsgD-independent pathway for cellulose production and biofilm formation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 2006 Apr;188(8):3073-87.

Day WA Jr, Sajecki JL, Pitts TM, Joens LA. Role of catalase in *Campylobacter jejuni* intracellular survival. *Infect Immun.* 2000 Nov; 68(11):6337-45.

Djordjevic SP, Ramachandran V, Bettelheim KA, Vanselow BA, Holst P, Bailey G, Hornitzky MA. Serotypes and virulence gene profiles of shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from feces of pasture-fed and lot-fed sheep. *Appl Environ Microbiol.* 2004 Jul;70(7):3910-7.

Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev.* 2002 Apr;15(2):167-93.

Dourou D, Beauchamp CS, Yoon Y, Geornaras I, Belk KE, Smith GC, Nychas GJ, Sofos JN. Attachment and biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7 at different temperatures, on various food-contact surfaces encountered in beef processing. *Int J Food Microbiol.* 2011 Oct 3;149(3):262-8.

Dwyer DJ, Kohanski MA, Hayete B, Collins JJ. Gyrase inhibitors induce an oxidative damage cellular death pathway in *Escherichia coli*. *Mol Syst Biol.* 2007;3:91.

Dyer JG, Sriranganathan N, Nickerson SC, Elvinger F. Curli production and genetic relationships among *Escherichia coli* from cases of bovine mastitis. *J Dairy Sci.* 2007 Jan;90(1):193-201.

F

Faulkner K, Fridovich I. Luminol and lucigenin as detectors for O₂⁻. *Free Radic Biol Med.* 1993 Oct;15(4):447-51.

Fernández-Brando RJ, Bentancor LV, Mejías MP, Panek AC, Cabrera GG, Exeni RA, Palermo MS. [Update on the treatment of endemic hemolytic uremic syndrome. Pathogenesis and treatment of the most severe systemic complication of infections by Shiga toxin-producing *Escherichia coli*]. *Medicina (B Aires).* 2011;71(4):383-9.

Fernández D, Krüger A, Polifroni R, Bustamante AV, Sanso AM, Etcheverría AI, Lucchesi PM, Parma AE, Padola NL. Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O130:H11 and O178:H19 isolated from dairy cows. *Front Cell Infect Microbiol*. 2013 Mar 8;3:9.

Flemming HC, Neu TR, Wozniak DJ. The EPS matrix: the "house of biofilm cells". *J Bacteriol*. 2007 Nov;189(22):7945-7.

G

Gannon VP, D'Souza S, Graham T, King RK, Rahn K, Read S. Use of the flagellar H7 gene as a target in multiplex PCR assays and improved specificity in identification of enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains. *J Clin Microbiol*. 1997 Mar;35(3):656-62.

Gasser C, Gautier E, Steck A, Siebenmann RE, Oechslin R. [Hemolytic-uremic syndrome: bilateral necrosis of the renal cortex in acute acquired hemolytic anemia]. *Schweiz Med Wochenschr*. 1955 Sep 20;85(38-39):905-9.

Gerstel U, Römling U. The *csgD* promoter, a control unit for biofilm formation in *Salmonella typhimurium*. *Res Microbiol*. 2003 Dec;154(10):659-67.

Gianantonio CA, Vitacco M, Mendilaharsu F, Gallo GE, Sojo ET. The hemolytic-uremic syndrome. *Nephron*. 1973;11(2):174-92.

Goldwater PN, Bettelheim KA. Treatment of enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) infection and hemolytic uremic syndrome (HUS). *BMC Med*. 2012 Feb 2;10:12.

Gómez D, Miliwebsky E, Fernández Pascua C, Baschkier A, Manfredi E, Zotta M, Nario F, Piquín A, Sanz M, Etcheverría A, Padola N, Parma A, Rivas M. [Isolation and characterization of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* from frozen hamburgers and soft cheeses]. *Rev Argent Microbiol*. 2002 Apr Jun;34(2):66-71.

Goswami M, Mangoli SH, Jawali N. Involvement of reactive oxygen species in the action of ciprofloxacin against *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006 Mar;50(3):949-54.

Griffin PM, Olmstead LC, Petras RE. *Escherichia coli* O157:H7-associated colitis. A clinical and histological study of 11 cases. *Gastroenterology*. 1990 Jul;99(1):142-9.

Grisaru S. Management of hemolytic-uremic syndrome in children. *Int J Nephrol Renovasc Dis*. 2014 Jun 12;7:231-9.

Gusarov I, Nudler E. NO-mediated cytoprotection: instant adaptation to oxidative stress in bacteria. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Sep 27;102(39):13855-60.

Gyles CL. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. J Anim Sci. 2007 Mar;85(13 Suppl):E45-62.

H

Hall-Stoodley L, Fen Ze Hu, Gieseke A, Nistico L, Nguyen D, Hayes J, Forbes M, Greenberg D P, Dice B, Burrows A, Wackym P A, Stoodley P, Post J C, Ehrlich G D, Kerschner J E. Direct Detection of Bacterial Biofilms on the Middle-Ear Mucosa of Children With Chronic Otitis Media. JAMA. 2007 July 12; 296(2): 202–211.

Hassan AN, Frank JF. Attachment of *Escherichia coli* O157:H7 grown in tryptic soy broth and nutrient broth to apple and lettuce surfaces as related to cell hydrophobicity, surface charge, and capsule production. Int J Food Microbiol. 2004 Oct 1;96(1):103-9.

Heffernan E, Chatur N, Zwirewich C. *Escherichia coli* O157 enterohaemorrhagic colitis associated with pyelonephritis: CT findings. Br J Radiol. 2009 Apr;82(976):e63-6.

Hoshino N, Kimura T, Hayakawa F, Yamaji A, Ando T. Bactericidal activity of catechin-copper (II) complexes against *Staphylococcus aureus* compared with *Escherichia coli*. Lett Appl Microbiol. 2000 Sep;31(3):213-7.

J

Jacewicz MS, Acheson DW, Mobassaleh M, Donohue-Rolfe A, Balasubramanian KA, Keusch GT. Maturation regulation of globotriaosylceramide, the Shiga-like toxin 1 receptor, in cultured human gut epithelial cells. J Clin Invest. 1995 Sep;96(3):1328-35.

Jenkins C, Perry NT, Cheasty T, Shaw DJ, Frankel G, Dougan G, Gunn GJ, Smith HR, Paton AW, Paton JC. Distribution of the saa gene in strains of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* of human and bovine origins. J Clin Microbiol. 2003 Apr;41(4):1775-8.

Joris MA, Vanrompay D, Verstraete K, De Reu K, De Zutter L, Cox E. Use of antibody responses against locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded antigens to monitor enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections on cattle farms. *Appl Environ Microbiol*. 2013 Jun;79(12):3677-83.

K

Kalivoda EJ, Stella NA, O'Dee DM, Nau GJ, Shanks RM. The cyclic AMP-dependent catabolite repression system of *Serratia marcescens* mediates biofilm formation through regulation of type 1 fimbriae. *Appl Environ Microbiol*. 2008 Jun;74(11):3461-70.

Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol*. 2004 Feb;2(2):123-40. Review. PubMed PMID: 15040260.

Karavolos MH, Horsburgh MJ, Ingham E, Foster SJ. Role and regulation of the superoxide dismutases of *Staphylococcus aureus*. *Microbiology*. 2003 Oct;149(Pt 10):2749-58. PubMed PMID: 14523108.

Karmali MA, Petric M, Lim C, Fleming PC, Steele BT. *Escherichia coli* cytotoxin, haemolytic-uraemic syndrome, and haemorrhagic colitis. *Lancet*. 1983 Dec 3;2(8362):1299-1300. PubMed PMID: 6139632.

Karmali MA. Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev*. 1989 Jan;2(1):15-38. Review. PubMed PMID: 2644022; PubMed Central PMCID: PMC358098.

Keskimäki M, Ikäheimo R, Kärkkäinen P, Scheutz F, Ratiner Y, Puohiniemi R, Siltonen A. Shiga toxin producing *Escherichia coli* serotype OX3:H21 as a cause of hemolytic-uremic syndrome. *Clin Infect Dis*. 1997 Jun;24(6):1278-9; discussion 1280-2. PubMed PMID: 9195109.

Kim H, Ryu JH, Beuchat LR. Attachment of and biofilm formation by *Enterobacter sakazakii* on stainless steel and enteral feeding tubes. *Appl Environ Microbiol*. 2006 Sep;72(9):5846-56. PubMed PMID: 16957203; PubMed Central PMCID: PMC1563662.

Kimmit PT, Harwood CR, Barer MR. Toxin gene expression by shiga toxin-producing *Escherichia coli*: the role of antibiotics and the bacterial SOS response. *Emerg Infect Dis*. 2000 Sep-Oct;6(5):458-65. PubMed PMID: 10998375; PubMed Central PMCID: PMC2627954.

Kives J, Orgaz B, Sanjosé C. Polysaccharide differences between planktonic and biofilm-associated EPS from *Pseudomonas fluorescens* B52. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2006 Oct 1;52(2):123-7. Epub 2006 May 7. PubMed PMID: 16757156.

Kohanski MA, Dwyer DJ, Hayete B, Lawrence CA, Collins JJ. A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. *Cell*. 2007 Sep 7;130(5):797-810. PubMed PMID: 17803904.

Kolodkin-Gal I, Engelberg-Kulka H. The extracellular death factor: physiological and genetic factors influencing its production and response in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 2008 May;190(9):3169-75.

Konowalchuk J, Dickie N, Stavric S, Speirs JI. Comparative studies of five heat-labile toxic products of *Escherichia coli*. *Infect Immun*. 1978 Dec;22(3):644-8.

Konowalchuk J, Speirs JI, Stavric S. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect Immun*. 1977 Dec;18(3):775-9. PubMed PMID: 338490; PubMed Central PMCID: PMC421302.

Krüger A, Lucchesi PM, Parma AE. Verotoxins in bovine and meat verotoxin-producing *Escherichia coli* isolates: type, number of variants, and relationship to cytotoxicity. *Appl Environ Microbiol*. 2011 Jan;77(1):73-9.

Kuczynska-Wisnik D, Matuszewska E, Laskowska E. *Escherichia coli* heat-shock proteins IbpA and IbpB affect biofilm formation by influencing the level of extracellular indole. *Microbiology*. 2010; 156, 148–157

Kulasekara BR, Jacobs M, Zhou Y, Wu Z, Sims E, Saenphimmachak C, Rohmer L, Ritchie JM, Radey M, McKevitt M, Freeman TL, Hayden H, Haugen E, Gillett W, Fong C, Chang J, Beskhlebnaya V, Waldor MK, Samadpour M, Whittam TS, Kaul R, Brittnacher M, Miller SI. Analysis of the genome of the *Escherichia coli* O157:H7 2006 spinach-associated outbreak isolate indicates candidate genes that may enhance virulence. *Infect Immun*. 2009 Sep;77(9):3713-21.

L

Lam MA, Pattison DI, Bottle SE, Keddie DJ, Davies MJ. Nitric oxide and nitroxides can act as efficient scavengers of protein-derived free radicals. *Chem Res Toxicol*. 2008 Nov;21(11):2111-9.

Lawson JM. Update on *Escherichia coli* O157:H7. *Curr Gastroenterol Rep*. 2004 Aug;6(4):297-301. Review. PubMed PMID: 15245697.

Lee JH, Stein BD. Antimicrobials effective for inhibition of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* strains O26, O111, and O157 and their effects on Shiga toxin releases. *J Microbiol Biotechnol.* 2009 Oct;19(10):1238-43.

Leotta GA, Miliwebsky ES, Chinen I, Espinosa EM, Azzopardi K, Tennant SM, Robins-Browne RM, Rivas M. Characterisation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 strains isolated from humans in Argentina, Australia and New Zealand. *BMC Microbiol.* 2008 Mar 17;8:46.

Lim JY, La HJ, Sheng H, Forney LJ, Hovde CJ. Influence of plasmid pO157 on *Escherichia coli* O157:H7 Sakai biofilm formation. *Appl Environ Microbiol.* 2010 Feb;76(3):963-6. doi: 10.1128/AEM.01068-09.

Lim Y, Jana M, Luong TT, Lee CY. Control of glucose- and NaCl-induced biofilm formation by rbf in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 2004 Feb;186(3):722-9.

López EL, Prado-Jiménez V, O’Ryan-Gallardo M, Contrini MM. Shigella and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* causing bloody diarrhea in Latin America. *Infect Dis Clin North Am.* 2000 Mar;14(1):41-65,viii.

M

Mai-Prochnow A, Lucas-Elio P, Egan S, Thomas T, Webb JS, Sanchez-Amat A, Kjelleberg S. Hydrogen peroxide linked to lysine oxidase activity facilitates biofilm differentiation and dispersal in several gram-negative bacteria. *J Bacteriol.* 2008 Aug;190(15):5493-501.

Marion R, Coëffier M, Leplingard A, Favennec L, Ducrotté P, Déchelotte P. Cytokine-stimulated nitric oxide production and inducible NO-synthase mRNA level in human intestinal cells: lack of modulation by glutamine. *Clin Nutr.* 2003 Dec;22(6):523-8.

Marouani-Gadri N, Chassaing D, Carpentier B. Comparative evaluation of biofilm formation and tolerance to a chemical shock of pathogenic and nonpathogenic *Escherichia coli* O157:H7 strains. *J Food Prot.* 2009 Jan;72(1):157-64.

Maurer JJ, Brown TP, Steffens WL, Thayer SG. The occurrence of ambient temperature-regulated adhesins, curli, and the temperature-sensitive hemagglutinin tsh among avian *Escherichia coli*. *Avian Dis.* 1998 Jan-Mar;42(1):106-18.

McGannon CM, Fuller CA, Weiss AA. Different classes of antibiotics differentially influence shiga toxin production. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010 Sep;54(9):3790-8.

Mercado EC, Gioffré A, Rodríguez SM, Cataldi A, Irino K, Elizondo AM, Cipolla AL, Romano MI, Malena R, Méndez MA. Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from diarrhoeic calves in Argentina. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* 2004 Mar;51(2):82-8.

Mukhopadhyay P, Zheng M, Bedzyk LA, LaRossa RA, Storz G. Prominent roles of the NorR and Fur regulators in the *Escherichia coli* transcriptional response to reactive nitrogen species. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Jan 20;101(3):745-50.

N

Nataro JP. Enteroaggregative *Escherichia coli* pathogenesis. *Curr Opin Gastroenterol.* 2005 Jan;21(1):4-8.

O

O'Brien AD, LaVeck GD, Thompson MR, Formal SB. Production of *Shigella dysenteriae* type 1-like cytotoxin by *Escherichia coli*. *J Infect Dis.* 1982 Dec;146(6):763-9.

Ochoa TJ, Chen J, Walker CM, Gonzales E, Cleary TG. Rifaximin does not induce toxin production or phage-mediated lysis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007 Aug;51(8):2837-41. Epub 2007 May 25.

O'Loughlin EV, Robins-Browne RM. Effect of Shiga toxin and Shiga-like toxins on eukaryotic cells. *Microbes Infect.* 2001 May;3(6):493-507.

O'Toole GA and Kolter R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signaling pathways: a genetic analysis. *Mol Microbiol.* 1998; 28: 449–461.

P

Pacheco AR, Sperandio V. Shiga toxin in enterohemorrhagic *E.coli*: regulation and novel anti-virulence strategies. *Front Cell Infect Microbiol*. 2012 Jun 7;2:81.

Padayatty SJ, Katz A, Wang Y, Eck P, Kwon O, Lee JH, Chen S, Corpe C, Dutta A, Dutta SK, Levine M. Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention. *J Am Coll Nutr*. 2003 Feb;22(1):18-35.

Padola NL, Sanz ME, Blanco JE, Blanco M, Blanco J, Etcheverria AI, Arroyo GH, Usera MA, Parma AE. Serotypes and virulence genes of bovine Shigatoxigenic *Escherichia coli* (STEC) isolated from a feedlot in Argentina. *Vet Microbiol*. 2004 May 20;100(1-2):3-9.

Páez PL, Becerra MC, Albesa I. Comparison of macromolecular oxidation by reactive oxygen species in three bacterial genera exposed to different antibiotics. *Cell Biochem Biophys*. 2011 Dec;61(3):467-72

Páez PL, Becerra MC, Albesa I. Effect of the association of reduced glutathione and ciprofloxacin on the antimicrobial activity in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett*. 2010 Feb;303(1):101-5.

Páez PL, Becerra MC, Albesa I. Impact of ciprofloxacin and chloramphenicol on the lipid bilayer of *Staphylococcus aureus*: changes in membrane potential. *Biomed Res Int*. 2013;2013:276524.

Page AV, Liles WC. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Infections and the Hemolytic-Uremic Syndrome. *Med Clin North Am*. 2013 Jul;97(4):681-95.

Pankey GA, Sabath LD. Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanisms of action in the treatment of Gram-positive bacterial infections. *Clin Infect Dis*. 2004 Mar 15;38(6):864-70.

Paraje MG. Antimicrobial resistance in biofilms, in: Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances (volume 2). Microbiology Book Series. Publisher: Formatex Research Center. 2011; 736-744.

Paton AW, Paton JC. Direct detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by multiplex PCR for stx1, stx2, eae, ehxA, and saa. *J Clin Microbiol*. 2002 Jan;40(1):271-4.

Paton AW, Woodrow MC, Doyle RM, Lanser JA, Paton JC. Molecular characterization of a Shiga toxinogenic *Escherichia coli* O113:H21 strain lacking eae responsible for a cluster of cases of hemolytic uremic syndrome. J Clin Microbiol. 1999 Oct;37(10):3357-61.

Paton JC, Paton AW. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. Clin Microbiol Rev. 1998 Jul;11(3):450-79.

Paton JC, Paton AW. Shiga toxin 'goes retro' in human primary kidney cells. Kidney Int. 2006 Dec;70(12):2049-51.

Patel J, Sharma M, Ravishakar S. Effect of curli expression and hydrophobicity of *Escherichia coli* O157:H7 on attachment to fresh produce surfaces. J Appl Microbiol. 2011 Mar;110(3):737-45.

Piérard D, De Greve H, Haesebrouck F, Mainil J. O157:H7 and O104:H4 Vero/Shiga toxin-producing *Escherichia coli* outbreaks: respective role of cattle and humans. Vet Res. 2012 Feb 13;43:13.

R

Rahal EA, Kazzi N, Sabra A, Abdelnoor AM, Matar GM. Decrease in Shiga toxin expression using a minimal inhibitory concentration of rifampicin followed by bactericidal gentamicin treatment enhances survival of *Escherichia coli* O157:H7-infected BALB/c mice. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2011 Sep 12;10:34.

Rangel JM, Sparling PH, Crowe C, Griffin PM, Swerdlow DL. Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks, United States, 1982-2002. Emerg Infect Dis. 2005 Apr;11(4):603-9.

Rasko DA, Webster DR, Sahl JW, Bashir A, Boisen N, Scheutz F, Paxinos EE, Sebra R, Chin CS, Iliopoulos D, Klammer A, Peluso P, Lee L, Kislyuk AO, Bullard J, Kasarskis A, Wang S, Eid J, Rank D, Redman JC, Steyert SR, Frimodt-Møller J, Struve C, Petersen AM, Krogfelt KA, Nataro JP, Schadt EE, Waldor MK. Origins of the *E. coli* strain causing an outbreak of hemolytic-uremic syndrome in Germany. N Engl J Med. 2011 Aug 25;365(8):709-17.

Reisner A, Krogfelt KA, Klein BM, Zechner EL, Molin S. In vitro biofilm formation of commensal and pathogenic *Escherichia coli* strains: impact of environmental and genetic factors. J Bacteriol. 2006 May;188(10):3572-81.

Riley LW, Remis RS, Helgerson SD, McGee HB, Wells JG, Davis BR, Hebert RJ, Olcott ES, Johnson LM, Hargrett NT, Blake PA, Cohen ML. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N Engl J Med*. 1983 Mar 24;308(12):681-5.

Rivas L, Dykes GA, Fegan N. A comparative study of biofilm formation by Shiga toxin-producing *Escherichia coli* using epifluorescence microscopy on stainless steel and a microtitre plate method. *J Microbiol Methods*. 2007 Apr;69(1):44-51.

Rivas L, Dykes GA, Fegan N. Attachment of shiga toxin-producing *Escherichia coli* to beef muscle and adipose tissue. *J Food Prot*. 2006 May;69(5):999-1006.

Rivas L, Fegan N, Dykes GA. Physicochemical properties of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *J Appl Microbiol*. 2005;99(4):716-27

Rivas M, Caletti MG, Chinen I, Refi SM, Roldán CD, Chillemi G, Fiorilli G, Bertolotti A, Aguerre L, Sosa Estani S. Home-prepared hamburger and sporadic hemolytic uremic syndrome, Argentina. *Emerg Infect Dis*. 2003 Sep;9(9):1184-6.

Rivas M, Miliwebsky E, Chinen I, et al. 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 Pathog Dis* 2006; 3: 88-96.

Rivas M, Miliwebsky E, Chinen I, Deza N, Leotta GA. La epidemiología del síndrome urémico hemolítico en la Argentina. Diagnóstico del agente etiológico, reservorios y rutas de transmisión. *Medicina (Buenos Aires)* 2006; 66 (Supl 3): 27-32.

Rivas M, Sosa-Estani S, Rangel J, Caletti MG, Vallés P, Roldán CD, Balbi L, Marsano de Mollar MC, Amoedo D, Miliwebsky E, Chinen I, Hoekstra RM, Mead P, Griffin PM. Risk factors for sporadic Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in children, Argentina. *Emerg Infect Dis*. 2008 May;14(5):763-71.

Rivas M, Voyer L, Tous M, Leardini N, de Mena MF, Wainsztein R, Callejo R, Prado V, Binsztein N. Hemolytic uremic syndrome: co-infection with two different serotypes of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli*. *Medicina (B Aires)*. 1993;53(6):487-90.

Robbe-Saule V, Jaumouillé V, Prévost MC, Guadagnini S, Talhouarne C, Mathout H, Kolb A, Norel F. Crl activates transcription initiation of RpoS-regulated genes involved in the multicellular behavior of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol*. 2006 Jun;188(11):3983-94.

Ryu JH, Beuchat LR. Biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7 on stainless steel: effect of exopolysaccharide and Curli production on its resistance to chlorine. *Appl Environ Microbiol.* 2005 Jan;71(1):247-54.

Ryu JH, Beuchat LR. Factors affecting production of extracellular carbohydrate complexes by *Escherichia coli* O157:H7. *Int J Food Microbiol.* 2004 Sep 1;95(2):189-204.

Ryu JH, Kim H, Beuchat LR. Attachment and biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7 on stainless steel as influenced by exopolysaccharide production, nutrient availability, and temperature. *J Food Prot.* 2004 Oct;67(10):212331.

S

Santos Mendonca RC, Morelli AMF, Pereira JAM, de Carvalho MM, de Souza N L, "Prediction of *Escherichia coli* O157:H7 adhesion and potential to form biofilm under experimental conditions," *Food Control*,vol.23,no.2,pp.389–396, 2012.

Sauer K, Camper AK, Ehrlich GD, Costerton JW, Davies DG. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J Bacteriol.* 2002 Feb;184(4):1140-54.

Scheutz F, Beutin L, Piérard D, Smith HR, 2001. Nomenclature of verocytotoxins, pp. 447-452 *En* : G. Duffy, P. Garvey y D.A. McDowell (Eds). *Verocytotoxigenic Escherichia coli*, Food & Nutrition Press, Trumbull.

Schlag S, Nerz C, Birkenstock TA, Altenberend F, Götz F. Inhibition of staphylococcal biofilm formation by nitrite. *J Bacteriol.* 2007 Nov;189(21):7911-9. Epub 2007 Aug 24.

Skandamis PN, Stopforth JD, Ashton LV, Geornaras I, Kendall PA, Sofos JN. *Escherichia coli* O157:H7 survival, biofilm formation and acid tolerance under simulated slaughter plant moist and dry conditions. *Food Microbiol.* 2009 Feb;26(1):112-9.

Smith KE, Wilker PR, Reiter PL, Hedican EB, Bender JB, Hedberg CW. Antibiotic treatment of *Escherichia coli* O157 infection and the risk of hemolytic uremic syndrome, Minnesota. *Pediatr Infect Dis J.* 2012 Jan;31(1):37-41.

Sperandio V, Torres AG, Girón JA, Kaper JB. Quorum sensing is a global regulatory mechanism in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. J Bacteriol. 2001 Sep;183(17):5187-97.

T

Tarr PI, Gordon CA, Chandler WL. Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome. Lancet. 2005 Mar 19-25;365(9464):1073-86.

Thorpe CM. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection. Clin Infect Dis. 2004 May 1;38(9):1298-303.

Toté K, Horemans T, Vanden Berghe D, Maes L, Cos P. Inhibitory effect of biocides on the viable masses and matrices of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Appl Environ Microbiol. 2010 May;76(10):3135-42.

Tyler JS, Mills MJ, Friedman DI. The operator and early promoter region of the Shiga toxin type 2-encoding bacteriophage 933W and control of toxin expression. J Bacteriol. 2004 Nov;186(22):7670-9.

U

Uhlich GA, Cooke PH, Solomon EB. Analyses of the red-dry-rough phenotype of an *Escherichia coli* O157:H7 strain and its role in biofilm formation and resistance to antibacterial agents. Appl Environ Microbiol. 2006 Apr;72(4):2564-72.

Uhlich GA, Keen JE, Elder RO. Mutations in the *csgD* promoter associated with variations in curli expression in certain strains of *Escherichia coli* O157:H7. Appl Environ Microbiol. 2001 May;67(5):2367-70.

Ullrich S, Bremer P, Neumann-Grutzeck C, Otto H, Rütger C, von Seydewitz CU, Meyer GP, Ahmadi Simab K, Röther J, Hogan B, Schwenk W, Fischbach R, Caselitz J, Puttfarcken J, Huggert S, Tiedeken P, Pober J, Kirkiles-Smith NC, Hagenmüller F. Symptoms and clinical course of EHEC O104 infection in hospitalized patients: a prospective single center study. PLoS One. 2013;8(2):e55278.

V

Vacheva A, Ivanova R, Paunova-Krasteva T, Stoitsova S. Released products of pathogenic bacteria stimulate biofilm formation by *Escherichia coli* K-12 strains. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2012 Jun;102(1):105-19.

Van Houdt R, Michiels CW. Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation. *Res Microbiol*. 2005 Jun-Jul;156(5-6):626-33.

Varelle M, de Sablet T, Hindré T, Martin C, Gobert AP. Nitric oxide inhibits Shiga-toxin synthesis by enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Jun 12;104(24):10199-204. Epub 2007 May 30. PubMed PMID: 17537918; PubMed Central PMCID: PMC1891265.

Villegas NA, Baronetti J, Albesa I, Polifroni R, Parma A, Etcheverría A, Becerra M, Padola N, Paraje M. Relevance of biofilms in the pathogenesis of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* infection. *Scientific World Journal*. 2013 Nov 12;2013:607258.

W

Wagner PL, Livny J, Neely MN, Acheson DW, Friedman DI, Waldor MK. Bacteriophage control of Shiga toxin 1 production and release by *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*. 2002 May;44(4):957-70.

Waldrop R, McLaren A, Calara F, McLemore R. Biofilm Growth Has a Threshold Response to Glucose in Vitro. *Clin Orthop Relat Res*. 2014 Mar 6.

Wang R, Bono JL, Kalchayanand N, Shackelford S, Harhay DM. Biofilm formation by Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 and Non-O157 strains and their tolerance to sanitizers commonly used in the food processing environment. *J Food Prot*. 2012 Aug;75(8):1418-28.

Z

Zhang Q, Donohue-Rolfe A, Krautz-Peterson G, Sevo M, Parry N, Abeijon C, Tzipori S. Gnotobiotic piglet infection model for evaluating the safe use of antibiotics against *Escherichia coli* O157:H7 infection. *J Infect Dis*. 2009 Feb 15;199(4):486-93.

Zhang T. "Modeling of biocide action against biofilm". Bull Math Biol. 2012; 74(6):1427–1447.

Zhang X, McDaniel AD, Wolf LE, Keusch GT, Waldor MK, Acheson DW. Quinolone antibiotics induce Shiga toxin-encoding bacteriophages, toxin production, and death in mice. J Infect Dis. 2000 Feb;181(2):664-70.

Zhu Y, Weiss EC, Otto M, Fey PD, Smeltzer MS, Somerville GA. *Staphylococcus aureus* biofilm metabolism and the influence of arginine on polysaccharide intercellular adhesin synthesis, biofilm formation, and pathogenesis. Infect Immun. 2007 Sep;75(9):4219-26.

Zmantar T, Kouidhi B, Miladi H, Mahdouani K, Bakhrouf A. A microtiter plate assay for *Staphylococcus aureus* biofilm quantification at various pH levels and hydrogen peroxide supplementation. New Microbiol. 2010 Apr;33(2):137-45.