

**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**  
**FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA**



**INSTITUTO NACIONAL DE TECNOLOGÍA AGROPECUARIA**



**Evaluación de proteínas de una isla de  
patogenicidad y de envolturas bacterianas de  
*Escherichia coli* O157:H7 como vacunas para  
reducir su incidencia en bovinos**

Tesista: Daniel Alejandro Vilte

Director de Tesis: Ángel Adrián Cataldi

Directora Adjunta de Tesis: Elsa Cristina Mercado

Consejero de Estudios: Pablo César Baldi

**2015**

Daniel Alejandro Vilte  
Tesista

Ángel Adrián Cataldi  
Director de Tesis

Elsa Cristina Mercado  
Directora Adjunta de Tesis

Pablo César Baldi  
Consejero de Estudios

## Resumen

*Escherichia coli* enterohemorrágico (EHEC) es un patógeno que puede causar diarrea, colitis hemorrágica, y síndrome urémico hemolítico (SUH), una enfermedad sistémica grave que afecta principalmente a los niños. En Argentina el SUH se considera endémico, y se observa la mayor incidencia anual en niños menores de 5 años entre los países con sistema de registro; se estiman aproximadamente 500 casos por año. El serotipo prototípico de EHEC es O157:H7 debido a que es el más frecuentemente encontrado en pacientes. El ganado bovino es el reservorio primario de EHEC O157:H7, y la principal fuente de infección para los humanos. La vacunación del ganado bovino puede ser una estrategia de intervención pre-faena para reducir la excreción fecal de EHEC O157:H7 y disminuir, en consecuencia, el riesgo de infección en humanos. La inoculación con una vacuna contra EHEC O157:H7 compuesta por estructuras de la superficie bacteriana podría inducir una respuesta inmune capaz de reducir la colonización intestinal del ganado. En este estudio se evaluaron dos tipos de vacunas. Por una parte, se diseñó una vacuna a partir de la selección de factores de colonización reconocidos, como las proteínas Intimina y EspB, que se produjeron en forma recombinante. Por otra parte, se evaluó una vacuna consistente en envolturas bacterianas de *Escherichia coli* O157:H7 libres de ADN. Para poder evaluar la eficacia de las vacunas propuestas fue necesario desarrollar un modelo de inoculación experimental en bovinos. A continuación se llevó a cabo un ensayo de vacunación con desafío posterior para cada vacuna. Nuestros resultados indican que la inmunización sistémica con dos dosis de una vacuna que contiene Intimina y EspB recombinantes podría reducir la colonización y la excreción de EHEC O157:H7 en terneros. También se pudo reducir la colonización y excreción en terneros por la inmunización subcutánea d envolturas bacterianas de O157:H7. Se necesitarían ensayos adicionales a campo para evaluar la eficacia de las vacunas para reducir la portación de *Escherichia coli* O157:H7 en terneros en condiciones naturales.

## Abstract

Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) is a pathogen that can cause diarrhea, hemorrhagic colitis, and hemolytic uremic syndrome (HUS), severe systemic disease that primarily affects children. In Argentina, HUS is considered endemic, and shows the highest annual incidence in children less than five years among the countries with registration system; and approximately 500 cases per year are estimated. Prototypical EHEC serotype is O157:H7 because it is most often found in patients. Cattle are the primary reservoir of EHEC O157:H7, and the main source of infection for humans. Vaccination of cattle can be an intervention strategy for reducing pre-slaughter fecal excretion of EHEC O157:H7 and decrease the risk of human infection. Inoculation with a vaccine against EHEC O157:H7 composed of bacterial surface structures may induce an immune response capable of reducing the intestinal colonization of cattle. In this study two types of vaccines were evaluated. On one hand, a vaccine was designed based on the selection of recognized colonization factors as Intimin and EspB proteins, which were produced in recombinant form. Furthermore, we evaluated a vaccine consisting of DNA free bacterial envelopes of *Escherichia coli* O157:H7. In order to evaluate the efficacy of the vaccines, a model of experimental inoculation in cattle was necessary to develop. Subsequently, a vaccination trial with a challenge to each vaccine was conducted. Our results indicate that systemic immunization with two doses of a vaccine containing recombinant EspB and Intimin could reduce the excretion and colonization of EHEC O157:H7 in calves. Subcutaneous immunization with *Escherichia coli* O157:H7 envelopes also could reduce colonization and excretion in calves. It would be required additional field trials to assess the effectiveness of vaccines to reduce the carriage of *Escherichia coli* O157:H7 in calves under natural conditions.

A Gabi, Marga y Marcelo.

## **Agradecimientos**

Estimo necesario agradecer a toda la gente que colaboró con este trabajo, algunos en su realización efectiva, y otros propiciando un ambiente agradable para el desarrollo de las labores diarias.

A mis directores Elsa y Ángel.

A mi consejero Pablo.

A mis amigos-compañeros de lab: Mariano y Bettina primero y luego, en orden de aparición Yanil, Leandro, Johana, Luisina y Jesica.

A mis compañeras de lab: Ana y Lori.

A mis compañeros del Instituto de Patobiología: Sergio, Pablo, Fernando, Félix, Carlos, Mariana, Natalia, Claudia, Dora, José, Adriana, Victoria, María C, Sandra, Bibiana, Mara, Raquel, Javier, Gabriel, Mirta, Antonio, Estela, Ignacio, Matías, Enzo, Mariano, Winston, María E, Liliana, Luis, Irma, Norma y...alguno que me estoy olvidando. Considérese incluido/a si lo merece, por favor.

Todas estas personas han brindado su tiempo, ayuda y alegría. Muchas gracias.

# Tabla de Contenidos

<b>Resumen .....</b>	<b>i</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>iii</b>
<b>Agradecimientos.....</b>	<b>v</b>
<b>Tabla de Contenidos .....</b>	<b>vi</b>
<b>1.0 Antecedentes.....</b>	<b>1</b>
1.1 <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágico.....	2
1.1.1 Las toxinas Shiga .....	4
1.1.2 La isla de patogenicidad LEE .....	6
1.1.3 El plásmido pO157 .....	7
1.2 Patogénesis .....	7
1.3 Situación del SUH en Argentina .....	13
1.4 Exposición, vías de entrada.....	17
1.5 Reservorios de <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágico.....	19
1.6 Prevalencia de EHEC en el ganado bovino en Argentina .....	20
1.7 Colonización en el bovino .....	22
1.8 Opciones de control.....	25
1.8.1 Estrategias.....	26
1.8.2 Vacunación.....	29
1.9 Fundamentos del enfoque metodológico.....	32
<b>2.0 Hipótesis, Objetivo General y Objetivos Específicos.....</b>	<b>35</b>
2.1 Hipótesis:.....	36
2.2 Objetivo General: .....	36
2.2.1 Objetivo Específico 1:.....	36
2.2.2 Objetivo Específico 2:.....	36
2.2.3 Objetivo Específico 3:.....	36
2.2.4 Objetivo Específico 4:.....	36
2.2.5 Objetivo Específico 5:.....	36
<b>3.0 Producción de las Proteínas Recombinantes .....</b>	<b>37</b>
3.1 Introducción.....	38
3.2 Materiales y Métodos.....	40

3.2.1 Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento .....	40
3.2.2 Medios de cultivo .....	40
3.2.3 Clonado de EspA, EspB, e Int- $\gamma$ 280.....	40
3.2.4 Preparación de células competentes de <i>Escherichia coli</i> y transformación .....	42
3.2.5 Extracción de plásmidos de <i>Escherichia coli</i> .....	43
3.2.6 Subclonado en el vector de expresión y producción de EspA, EspB e Int- $\gamma$ 280 recombinantes .....	44
3.2.7 Expresión y purificación de las proteínas recombinantes .....	46
3.2.8 <i>Western blot</i> .....	48
3.3 Resultados.....	49
3.3.1 Amplificación y clonado de las secuencias de ADN de las proteínas.....	49
3.3.2 Expresión y purificación de las proteínas recombinantes .....	49
3.4 Discusión .....	51
<b>4.0 Producción de Suero Policlonal contra EspA, EspB e Int-<math>\gamma</math>280 Recombinantes en Ratones</b> .....	<b>53</b>
4.1 Introducción .....	54
4.2 Materiales y Métodos .....	54
4.2.1 Animales e instalaciones .....	54
4.2.2 Diseño experimental .....	54
4.2.3 Preparación de suero de ratón .....	55
4.2.4 Enzimoimmunoensayo (ELISA) para suero.....	55
4.2.5 <i>Western blot</i> .....	56
4.3 Resultados.....	56
4.4 Discusión .....	58
<b>5.0 Ensayo de Respuesta Inmune en Bovinos .....</b>	<b>60</b>
5.1 Introducción .....	61
5.2 Materiales y Métodos .....	62
5.2.1 Animales e instalaciones .....	62
5.2.2 Preparación de la vacuna .....	63
5.2.3 Diseño experimental .....	63
5.2.4 Preparación de suero bovino .....	64
5.2.5 ELISA para suero bovino.....	64
5.2.6 <i>Western blot</i> .....	65



5.2.7 Análisis estadístico .....	65
5.3 Resultados .....	65
5.4 Discusión .....	68
<b>6.0 Ensayos de Inoculación Experimental de <i>Escherichia coli</i> O157:H7 en Bovinos.....</b>	<b>70</b>
6.1 Introducción .....	71
6.2 Materiales y Métodos .....	72
6.2.1 Animales e instalaciones .....	72
6.2.2 Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento .....	73
6.2.3 Diseño experimental .....	74
6.2.4 Toma de muestras.....	75
6.2.5 Procesamiento de las muestras .....	75
6.2.6 Análisis estadístico .....	77
6.3 Resultados.....	77
6.4 Discusión .....	79
<b>7.0 Ensayo Vacuna IB-D3 en Bovinos con Desafío.....</b>	<b>82</b>
7.1 Introducción.....	83
7.2 Materiales y Métodos .....	83
7.2.1 Animales e instalaciones .....	83
7.2.2 Preparación de la vacuna .....	84
7.2.3 Diseño experimental .....	84
7.2.4 Toma y procesamiento de las muestras para medir la respuesta inmune .....	85
7.2.5 Ensayo de inhibición de la hemólisis de glóbulos rojos ovinos.....	87
7.2.6 Ensayo de inhibición de la adherencia a células Hep-2 .....	88
7.2.7 Toma de muestras y procesamiento para medir la excreción de <i>Escherichia coli</i> O157:H7 438/99NaI <sup>R</sup> .....	89
7.2.8 Estudios histológicos .....	89
7.2.9 Análisis estadístico .....	90
7.3 Resultados.....	90
7.3.1 Respuesta inmune .....	90
7.3.2 Efecto de la inmunización en la excreción de <i>Escherichia coli</i> 438/99NaI <sup>R</sup> .....	94
7.3.3 Efecto del suero de los animales vacunados en la inhibición de la hemólisis de GRO por parte de EHEC O157:H7 .....	96
7.3.4 Efecto del suero de los animales vacunados en la inhibición de la adherencia de EHEC O157:H7 a células Hep-2 .....	96

7.4 Discusión .....	97
<b>8.0 Ensayo Vacuna de Envolturas Bacterianas (EBs) de <i>Escherichia coli</i> O157:H7 en Bovinos</b> .....	<b>101</b>
8.1 Introducción .....	102
8.2 Materiales y Métodos .....	102
8.2.1 Animales e instalaciones .....	102
8.2.2 Producción de las EBs.....	103
8.2.3 Preparación de vacuna EBs .....	103
8.2.4 Diseño experimental .....	104
8.2.5 Toma y procesamiento de muestras para medir la respuesta inmune .....	104
8.2.6 Ensayo de inhibición de la adherencia a células Hep-2 .....	106
8.2.7 Toma y procesamiento de muestras para medir la excreción de <i>Escherichia coli</i> 438/99NaI <sup>R</sup> .....	106
8.2.8 Estudios histológicos .....	106
8.2.9 Análisis estadístico .....	106
8.3 Resultados.....	107
8.3.1 Respuesta inmune.....	107
8.3.2 Efecto de la inmunización en la excreción de <i>Escherichia coli</i> 438/99NaI <sup>R</sup> .....	109
8.3.3 Efecto del suero de los animales vacunados en la inhibición de la adherencia de EHEC O157:H7 a células Hep-2 .....	111
8.4 Discusión .....	112
<b>9.0 Conclusiones .....</b>	<b>116</b>
<b>10.0 Bibliografía.....</b>	<b>119</b>
<b>Anexo.....</b>	<b>131</b>

## **1.0 Antecedentes**

### 1.1 *Escherichia coli* enterohemorrágico

*Escherichia coli* (*E. coli*) es una especie bacteriana habitual de la microbiota colónica de humanos y animales homeotermos. Se trata de bacilos Gram negativos, anaerobios facultativos y pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*. Muy versátiles fisiológicamente, pueden crecer en medios que contengan glucosa como único constituyente orgánico. El primero en describir a este microorganismo fue el médico austro-alemán Theodor Escherich en su tesis posdoctoral de 1885; en ese momento era conocida como *Bacterium coli commune*.

La clasificación serológica de *E. coli* se utiliza para denominar a los serogrupos y serotipos, y tiene como fundamento a tres tipos de antígenos: somático O, flagelar H y capsular K. El serogrupo se basa únicamente en el antígeno O, mientras que el serotipo se define como una combinación específica de los antígenos O, H, y algunas veces K [1,2]. El principal antígeno de la pared celular de *E. coli* (figura 1) es el antígeno O, un lipopolisacárido (LPS), formado por tres componentes: la región polisacárida externa variable, la región polisacárida central conservada entre todas las Enterobacterias, y el lípido A. Este último componente constituye la endotoxina cuando se libera en la lisis bacteriana.

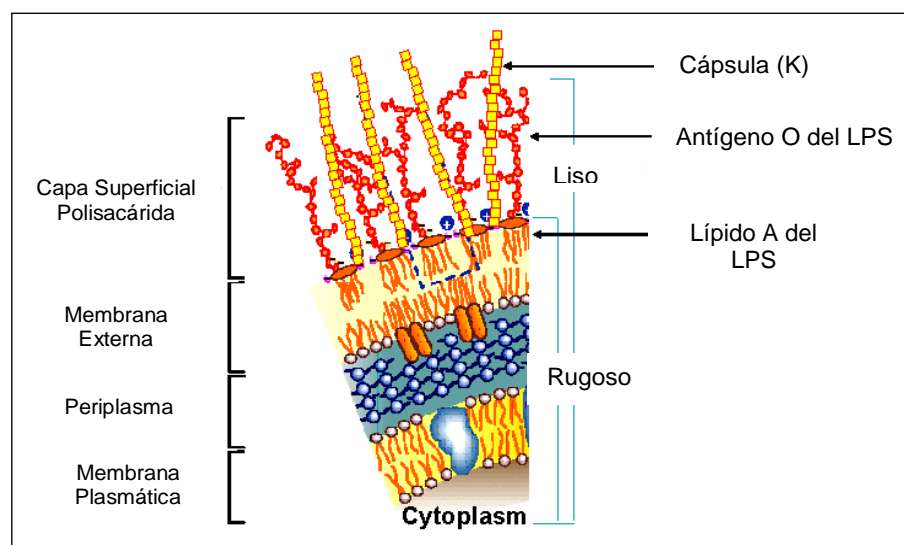


Fig. 1: Principales componentes de la pared de *Escherichia coli*.

*E. coli* se utiliza como indicador de contaminación fecal debido a su abundancia en heces humanas y de animales, y puede ser fácilmente detectada por su capacidad de fermentar lactosa; aunque debido a que las muestras pueden contener otras bacterias entéricas (que también fermentan lactosa) como *Citrobacter*, *Klebsiella* y *Enterobacter*, se acuñó el término “coliforme” para referirse a este grupo. La detección y enumeración de coliformes, se utiliza como indicador de calidad sanitaria del agua o como indicador general de condición higiénica en el procesamiento de alimentos.

Si bien *E. coli* es una bacteria comensal del tracto digestivo, puede adquirir información genética que la convierte en un patógeno intestinal o extraintestinal [3]. Se han reconocido diversas categorías de *E. coli* que poseen capacidad para generar enfermedad a través de un conjunto común de factores de virulencia, constituyendo lo que se denominan patotipos. Los patotipos tradicionales de *E. coli* son: *E. coli* enteropatógeno (EPEC), *E. coli* enterohemorrágico (EHEC), *E. coli* enterotoxigénico (ETEC), *E. coli* enteroagregativo (EAEC), *E. coli* enteroinvasivo (EIEC), *E. coli* difusamente adherente (DAEC) y *E. coli* patógeno extra-intestinal (ExPEC). Los seis primeros tipos corresponden a patógenos intestinales y el último agrupa a los causantes de infecciones extra-intestinales [2].

Otros dos patotipos han surgido recientemente: *E. coli* adherente invasivo (AIEC), que está presuntamente asociado con la enfermedad de Crohn, pero no causa infección diarreagénica; y *E. coli* enteroagregativo productor de toxina Shiga (STEAEC), responsable del brote de *E. coli* en Alemania en el año 2011 [4].

Aunque más de 200 serotipos de *E. coli* pueden producir toxina Shiga, la mayoría de estos serotipos no está asociado con enfermedad humana. La denominación *E. coli* productor de toxina Shiga (STEC) o *E. coli* productor de verocitotoxina (VTEC) es utilizada para cualquier cepa de *E. coli* capaz de producir toxina Shiga, aunque presente también otros factores de virulencia. De este modo, el patotipo EHEC, está comprendido en el amplio grupo STEC [2].

El patotipo EHEC, y su serotipo modelo O157:H7, se definen por la presencia de 3 factores: al menos un tipo de toxina Shiga, una isla de patogenicidad denominada LEE (*Locus of Enterocyte Effacement*), y un plásmido de entre 92 y 104 kb (pO157) [3,5].

### 1.1.1 Las toxinas Shiga

Las toxinas Shiga, codificadas por un profago lambdaoide, son el principal factor de virulencia de EHEC. Pueden ser de tipo 1 o tipo 2; y dentro de estas dos clases se pueden encontrar diversas variantes (como se muestra en la tabla 1) [6]. Los dos tipos de toxina comparten cerca de un 55 % de homología a nivel de aminoácidos [2]. Se pueden encontrar cepas de *E. coli* que producen un solo tipo de toxina, mientras que otras pueden expresar una combinación de variantes de uno o ambos tipos [7].

Tabla 1: Tipos de toxinas Shiga de *E. coli* y sus variantes. La nomenclatura sigue los lineamientos propuestos por Scheutz *et al* en 2009 [6].

Toxina	Fuente	Sinónimos
<b>Toxina Shiga 1a</b>	<i>E. coli</i> O157:H7	SLTI, VT1, Stx1a
<b>Toxina Shiga 1c</b>	<i>E. coli</i> O128:H2	SLTIc, VT1c, Stx1c
<b>Toxina Shiga 1d</b>	<i>E. coli</i> ONT:H19	SLTId, VT1d, Stx1d
<b>Toxina Shiga 2a</b>	<i>E. coli</i> O157:H7	SLTII, VT2, Stx2, Stx2a
<b>Toxina Shiga 2b</b>	<i>E. coli</i> O118:H12	SLTIIb, VT2b, Stx2b
<b>Toxina Shiga 2c</b>	<i>E. coli</i> O157:H7	SLTIIc, VT2c, Stx2c
<b>Toxina Shiga 2d</b>	<i>E. coli</i> O91:H21	SLTII d, VT2d, Stx2d
<b>Toxina Shiga 2e</b>	<i>E. coli</i> O139	SLTIIe, VT2e, Stx2e
<b>Toxina Shiga 2f</b>	<i>E. coli</i> O128:H2	SLTII f, VT2f, Stx2f
<b>Toxina Shiga 2g</b>	<i>E. coli</i> O2:H25	SLTII g, VT2g, Stx2g

Las toxinas Shiga pertenecen a la familia de proteínas  $AB_5$ , que tiene un motivo A enzimáticamente activo y un motivo B no tóxico responsable de la unión a estructuras celulares. El motivo B consiste en cinco subunidades B idénticas que forman un anillo pentamérico con un poro central en el que se ubica el extremo C-terminal del motivo A (figura 2). Cada subunidad B posee tres sitios de unión al receptor glucolípidos globotriaosilceramida (Gb3) de la célula blanco. El motivo A puede clivarse en dos fragmentos, el activo A1 y uno más pequeño, A2.

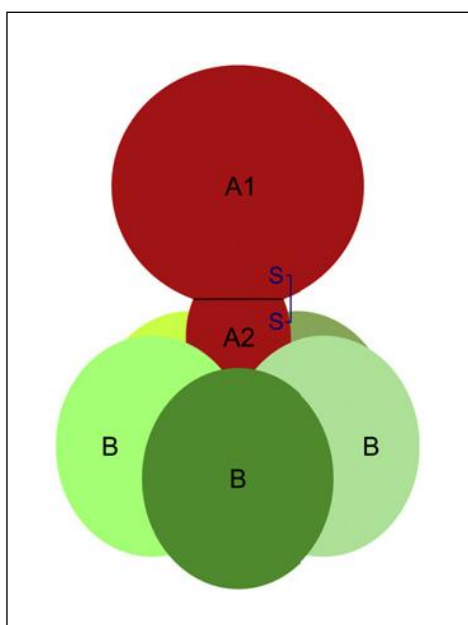


Fig. 2: Representación esquemática de la toxina Shiga. Pueden observarse las subunidades B que conforman el motivo pentamérico B, y la subunidad A con sus partes clivables A1 y A2.

La acción de la toxina Shiga consiste en la inactivación catalítica de la subunidad ribosómica 60S, lo que ocasiona el cese de la síntesis de proteínas en la célula. Básicamente, lo que realiza la subunidad A1 activada es remover una adenosina particular del ARNr 28S. Para alcanzar este objetivo citoplasmático, la toxina es transportada de modo retrógrado a través del aparato de Golgi y el retículo endoplasmático, desde donde A1 es translocada al citoplasma. Además de bloquear la síntesis proteica, un efecto a más largo plazo de la toxina en diversos tipos celulares es la inducción de apoptosis [7].

### 1.1.2 La isla de patogenicidad LEE

Una de las características de la patogénesis de EHEC es la lesión de adherencia-borrado (*attaching and effacing, A/E*) de las microvellosidades de los enterocitos. Los genes que codifican para los factores de virulencia responsables de esta lesión están ubicados en la isla de patogenicidad denominada *Locus of Enterocyte Effacement* (LEE) [8]. El LEE, que también está presente en el patotipo EPEC, tiene entre 35,6 y 60,0 kb y un contenido promedio G+C del 38 %, bastante inferior al del ADN cromosómico de 50,8 %. Se encuentra insertado generalmente a nivel de la secuencia del ARNt de la selenocisteína [8–10].

El locus consta de 41 genes organizados en 5 operones policistrónicos conocidos como LEE1, LEE2, LEE3, TIR/LEE5, y LEE4 (figura 3) que codifican los factores estructurales Esc (*E. coli secretion component*) de un sistema de secreción de tipo III (SSTT), proteínas efectoras como las Esp (*E. coli secreted protein*), Intimina, Tir (*translocated Intimin receptor*) y Map (*mitochondrial associated protein*); y otras que pueden tener funciones efectoras o en el SSTT, las Sep (*secretion of EPEC protein*). También son codificadas las chaperonas Ces (*chaperone of E. coli-secreted protein*) y reguladoras, siendo la principal *ler* (*LEE-encoded regulator*), ubicada en el operón LEE1 [11]. Además se postulan dos reguladores, uno positivo (*orf10/GrlA*) y otro negativo (*orf11/GrlR*) [12,13].

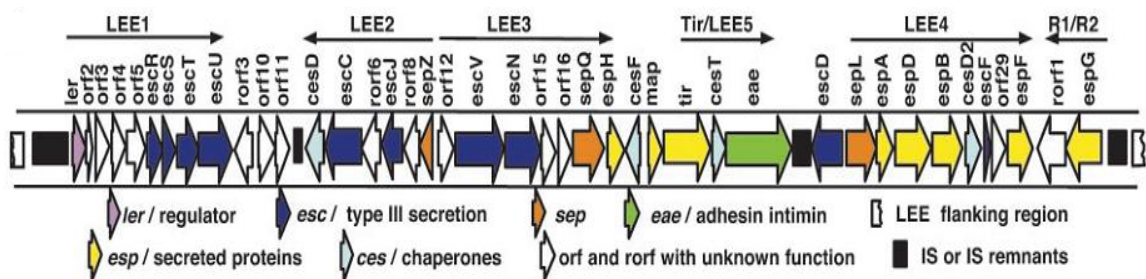


Fig. 3: Organización genética del LEE. Tomado de Deng *et al.*, 2004 [12].



### 1.1.3 El plásmido pO157

*E. coli* O157:H7 posee un plásmido altamente conservado, no conjugativo, de la familia F, denominado pO157. Su tamaño varía entre 92 y 104 kb. En su secuencia completa se encuentran 100 marcos de lectura abiertos (ORFs, *open reading frames*). Entre ellos, 43 ORFs muestran suficiente similitud con proteínas conocidas, sugiriendo alguna función. Otros 22 ORFs no tienen similitud suficiente con ninguna proteína conocida. Aunque 35 proteínas están presumiblemente involucradas en la patogénesis, sólo 19 genes se han caracterizado, incluyendo una hemolisina (*ehxA*), una catalasa-peroxidasa (*katP*), un aparato de secreción de tipo II (*etp*), una proteasa de serina (*espP*), una adhesina putativa (*toxB*), una metaloproteasa de Zinc (*stcE*), y un fragmento conservado *eae* (*ecf*). A pesar de esto, el papel biológico de pO157 en la patogénesis no está completamente dilucidado [5,14].

## 1.2 Patogénesis

En humanos, los efectos de las infecciones por EHEC se manifiestan en un rango muy variable que va desde pacientes asintomáticos hasta casos fatales. En niños, EHEC causa diarrea, colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico (SUH). *E. coli* O157:H7 es el serotipo reconocido mundialmente como responsable de la mayoría de los grandes brotes y casos aislados de colitis hemorrágica y SUH; aunque no es el único serotipo asociado a enfermedad severa en el hombre, ya que también poseen potencial patogénico similar otros serotipos conocidos como no-O157. En nuestro país, trabajos realizados por diferentes grupos, nos indican que los serotipos productores de toxina Shiga no-O157 encontrados son: O2:H11, O8:H19, O15:H27, O25:H-, O26:H11, O58:H40, O91:H7, O111:H-, O103:H2, O103:H25, O113:H21, O121:H19, O145:H-, O145:H25, O171:H2, y O174:H21 [15,16].

La asociación entre serotipos específicos de *E. coli* productores de toxina Shiga con la ocurrencia y severidad de la enfermedad en humanos llevó, en el año 2003, a Karmali *et al.* a proponer una clasificación que agrupó a los serotipos en cinco seropatotipos, de acuerdo a su incidencia, ocurrencia de brotes y asociación con los casos severos de enfermedad, tal como se observa en la tabla 2 [17].

Tabla 2: Clasificación de *E. coli* productor de toxina Shiga en seropatotipos, según Karmali *et al.*, 2003 [17].

Seropatotipos	Incidencia Relativa	Frecuencia de ocurrencia de brotes	Asociación con enfermedad severa	Serotipos
A	Alta	Común	Sí	O157:H7, O157:NM
B	Moderada	No común	Sí	O26:H11, O103:H2, O111:NM, O121:H19, O145:NM
C	Baja	Rara	Sí	O91:H21, O104:H21, O113:H21, otros
D	Baja	Rara	No	Varios
E	Nula en humanos	Nula	Nula	Varios

Con el tiempo, la clasificación original de Karmali *et al.* mostró algunas limitaciones. Dado que estaba basada en información epidemiológica, le costó seguir el comportamiento dinámico de los riesgos asociados a las *E. coli* productoras de toxina Shiga. Se puede observar que el serotipo O104:H4, responsable del grave brote de SUH en Alemania en 2011 no está específicamente mencionado. Para tratar de mejorar esta clasificación, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) propuso en el año 2013, una modificación de la clasificación de Karmali. En este esquema, los serotipos de los grupos A, B, y C se combinaron con aquellos serotipos asociados con casos de SUH entre los años 2007-2010 y se denominaron “serotipos asociados a SUH” (HAS); mientras que los serotipos no asociados a SUH se agruparon como grupo D (que incluye a la mayoría de los seropatotipos D y E de Karmali) [18]. Bajo este nuevo esquema, el grupo HAS incluye ahora a los serotipos causantes de la mayoría (86 %) de los decesos, del 71 % de las hospitalizaciones, del 100 % de los casos de SUH, y del 86 % de los

casos de diarrea con sangre. Más aún, a medida que nueva información esté disponible, los serotipos podrían ser reclasificados y el modelo actualizado [18].

Algunos de los brotes asociados a EHEC O157:H7 se muestran en la tabla 3, mientras que en la tabla 4 se observan brotes causados por EHEC no-O157 [19–21].

Tabla 3: Brotes asociados a EHEC O157:H7.

Año	Lugar	N° de Casos	N° SUH (%)	Mortalidad	Tipo de Brote	Fuente
1982	Oregón/EE. UU.	26	0	0	Comunidad	Hamburguesas
1982	Michigan/EE. UU.	21	0	0	Comunidad	Hamburguesas
1984	Nebraska/EE. UU.	34	1 (2,9)	4 (11,8)	Geriátrico	Hamburguesas
1985	Ontario/Canadá	73	12 (16,4)	19 (26)	Geriátrico	Sándwiches
1986	Ontario/Canadá	30	3 (10)	0	Escuela	Leche cruda
1987	Utah/EE. UU.	51			Cárcel	Carne molida
1989	Missouri/EE. UU.	243	2 (0,8)	4 (1,6)	Comunidad	Agua
1992/1993	Washington, Idaho, California, Nevada /EE. UU.	559	41 (7,3)	4 (0,7)	Comunidad/ Multiestado	Hamburguesas
1994	Washington/EE. UU.	20	1 (5)	0	Comunidad	Embutido seco
1995/1996	Suecia	99	24 (24,2)	0	Comunidad	Carne
1996	Washington, California, Colorado, Columbia Británica /EE. UU.-Canadá	45	12 (26,7)	0	Comunidad/ Multiestado	Jugo de manzana no pasteurizado
1996	Escocia	496	0	19 (3,8)	Comunidad	Carne
1996	Japón	9451	101 (1,1)	12 (0,1)	Escuela	Vegetales, carne y pescado
2000	España	158	6 (3,8)	0	Escuela	Salchichas
2004	Argentina	4	1	0	Jardín de Infantes	Agua de recolección
2006	EE. UU.	250	30 (12)	3 (1,2)	Comunidad/ Multiestado	Espinaca
2007	EE. UU./Canada	45	1 (2)	0	Comunidad	Hamburguesas
2007	Países Bajos/Islandia	50	0	0	Comunidad	Lechuga
2008	EE. UU.	23	0	0	Universidad	Lechuga
2013	EE. UU.	9	0	0	Comunidad	Pepinos

Las características típicas de la gastroenteritis causada por *E. coli* O157:H7 son dolor abdominal, diarrea no sanguinolenta que progresa a sanguinolenta después de 1-4 días, y ausencia de fiebre. Datos recolectados en Europa entre 2007 y 2008, donde son comunes las cepas no-O157, muestran que la presentaciones clínicas con diarrea sanguinolenta fueron mucho más comunes con *E. coli* O157:H7 (39 % de los casos) en comparación con cepas no-O157 (7 % de los casos) [22].

Tabla 4: Brotes asociados a EHEC no-O157:H7

Año	País	N° de casos	SUH	Serotipos
1984	Japón	100	0	O145:NM
1986	Japón	22	1	O111:NM
1988	Checoslovaquia	5	5	O26:H11/NM O1:HNT O157:H7
1991	Japón	234	0	O111:NM
1991	Japón	89	0	ONT:H19
1992	Italia	9	9	O111:NM
1994	EE. UU.	7	0	O104:H21
1995	Australia	200	22	O111:NM
1995	España	13	13	O111:NM
1996	Japón	3	0	O103:H2
1999	EE. UU.	55	2	O111:H8
1999	EE. UU.	11	3	O121:H19
2000	Alemania	11	0	O26:H11
2002	Francia	10	2	O148:H8
2003	Argentina	80	1	O26:H11 O103:H2
2006	Noruega	17	10	O103:H25
2007	Dinamarca	20	0	O26:H11
2009	Francia	2	1	O123:HNM
2010	EE. UU.	3	0	O26

El SUH es más común en niños menores de 5 años. Una proporción del 10-15 % de los pacientes infectados con *E. coli* O157:H7 desarrolla SUH entre 5 y 13 días después de la aparición de la diarrea. Se define un caso de SUH por la aparición aguda de insuficiencia renal con oliguria o anuria y altas concentraciones de urea y creatinina, anemia hemolítica microangiopática con un nivel de hemoglobina menor de 10 g/dl, recuento de plaquetas inferior a  $15 \times 10^9$  células/l, y la fragmentación de los glóbulos rojos al ser observados en un frotis de sangre periférica. Los efectos extrarenales incluyen aumento de las enzimas pancreáticas y edema, necrosis de la pared del colon, rabdomiólisis, daño miocárdico con altas concentraciones de troponina 1 y, en aproximadamente el 25% de los casos, daño del sistema nervioso central con convulsiones, parálisis y coma. Los decesos se asocian generalmente con graves complicaciones extrarenales [22].

Las toxinas Shiga, principales causantes de la diarrea sanguinolenta y SUH, se unen al receptor Gb3, se internalizan por endocitosis dependiente de clatrina y actúan específicamente sobre el ARNr 28S, inhibiendo la síntesis proteica. Esto provoca una respuesta de estrés ribotóxico que

puede llevar a una liberación de citoquinas y apoptosis. En los riñones, Gb3 está presente en las células endoteliales glomerulares, podocitos, y varios tipos de células epiteliales tubulares [22]. Las toxinas son producidas por las bacterias a nivel del colon y viajan por la sangre hasta los riñones, donde dañan a las células endoteliales renales y ocluyen los microvasos por la combinación de citotoxicidad directa y producción local de citoquinas y quimioquinas que causan inflamación renal. Este perjuicio puede originar insuficiencia renal aguda y SUH [2].

Aunque la toxina Shiga es el factor más importante para la generación del SUH, la respuesta inflamatoria interviene en el desarrollo de este síndrome; en especial se ha estudiado el rol de los linfocitos polimorfonucleares (PMN), los monocitos (Mo) y la fractalquina (FKN) [23].

Los PMN constituyen uno de los primeros mecanismos de defensa ante una infección y tienen actividad microbicida y citotóxica. Se ha observado que los pacientes con mayor recuento de PMN evolucionan a formas más graves SUH, que los PMN de niños en el período agudo de la enfermedad muestran mayor adhesividad a los endotelios, que se encuentran niveles aumentados de elastasa en plasma (reflejo de la degranulación de los PMN), y que la interleuquina-8 (IL-8), principal quimioquina activadora de los PMN, está elevada en los sueros de los niños con SUH [23].

Los PMN circulantes de pacientes en período agudo de SUH presentan alteraciones fenotípicas y funcionales. Esto sugiere que tienen baja respuesta porque fueron activados previamente, lo que ocasionaría su estado desactivado o exhausto. Esta activación de los linfocitos no estaría dada directamente por las toxinas Shiga, sino más bien indirectamente ya sea por células endoteliales, células renales y monocitos; las que sí pueden ser afectadas por la unión de las mismas. La liberación de diversas quimioquinas y citoquinas incrementa la susceptibilidad endotelial y activa plaquetas y neutrófilos, produciéndose daños en el endotelio, con alteraciones en el estado hemostático e inflamación, que se va profundizando. La unión de los PMN al endotelio puede ser patológica. También está el hecho de que el estado funcional de

los PMN en la etapa aguda del SUH está inversamente relacionado con la severidad del daño renal; los pacientes con alto grado de insuficiencia renal, muestran PMN deficientes. El estímulo activador inicial induce una fuerte activación de los PMN seguida por un consecuente deterioro, lo que deriva en un curso clínico más severo [24].

Los Mo también cumplen un rol trascendental en los mecanismos de inflamación e inmunidad. Se sugiere que podrían estar involucrados en la patogénesis del SUH: en el modelo murino, la toxicidad de la toxina Shiga está significativamente disminuida en ausencia de monocitos/macrófagos; los Mo son capaces de responder a la toxina Shiga secretando TNF e IL-1; los pacientes con SUH presentan altos niveles de TNF sérico y varias quimioquinas, y la presencia de TNF sensibiliza los endotelios a los efectos tóxicos de la toxina Shiga. Los Mo presentan alteraciones fenotípicas y funcionales en niños en el período agudo del SUH relacionadas con haber sufrido una marcada respuesta inflamatoria, y en forma coincidente con lo hallado en los PMN [23].

La FKN, una quimioquina, es una proteína transmembrana presente en células endoteliales y epiteliales que funciona como molécula de adhesión o, en su forma soluble, como quimioattractante. Su receptor (CX3CR1) se expresa en los Mo, las células *Natural Killer* (NK) y una subpoblación de linfocitos T citotóxicos. Se ha descrito la presencia de Mo que expresan el receptor para FKN en pacientes con glomerulopatías. Analizando los leucocitos periféricos de pacientes con SUH, se encontró una marcada disminución de los Mo y células NK que expresan el receptor para FKN. Hay una correlación negativa entre el número de leucocitos que expresan el CX3CR1 y la severidad del cuadro clínico del SUH. Los datos sugieren que células con alto potencial citotóxico que expresan el receptor para FKN quedan retenidas en los endotelios. Este fenómeno podría potenciar la injuria endotelial provocada por la Stx [23].

Finalmente, cuando *E. coli* O157:H7 coloniza la mucosa intestinal, induce una lesión histopatológica característica, la ya mencionada adherencia-borrado (A/E). La lesión A/E se

evidencia por la adherencia de la bacteria a la membrana de la célula epitelial y la desaparición de las microvellosidades. La bacteria adherida estimula la polimerización de actina que resulta en un elevado pedestal de adherencia. Intimina, codificada por el LEE, es necesaria para ocasionar esta lesión [25]. Esta característica patogénica se trata con mayor detalle en la sección 3.0 Producción de las Proteínas Recombinantes (página 38).

### **1.3 Situación del SUH en Argentina**

En Argentina el SUH se considera endémico, y es de denuncia obligatoria a partir del año 2000 (Resolución Nº 346/00 del Ministerio de Salud de la Nación). Actualmente, la mortalidad en la etapa aguda es del 2-4 %. Luego del período agudo, el 60 % se cura sin secuelas, el 25 % persiste con proteinuria y/o hipertensión arterial, con función renal normal; el 15 % desarrolla una enfermedad renal progresiva con disminución del filtrado glomerular y posibilidad de requerir diálisis crónica y/o trasplante renal [26]. Se estima en 10% la incidencia de SUH entre los niños con diarrea en los que se aísla *E. coli* O157:H7 [27].

En la década de 1960, Carlos Gianantonio y sus colaboradores en el Hospital de Niños “Dr. Ricardo Gutiérrez” de Buenos Aires fueron de los primeros en advertir que esta enfermedad se presentaba principalmente en niños pequeños, y propusieron el tratamiento por medio de diálisis peritoneal, lo que redujo la mortalidad del 50 % al 5 % en el período agudo [28].

Nuestro país tiene una tasa de incidencia anual de SUH de 1 caso cada 100000 habitantes, con 300–500 casos nuevos por año. Esta enfermedad sindrómica es la primera causa de insuficiencia renal aguda pediátrica y la segunda de insuficiencia renal crónica. También es responsable del 20% de los trasplantes renales en niños y adolescentes [15]. Tomando en cuenta el período 2005-2013, se produjo un máximo de 543 casos en 2008 y un mínimo de 319 en 2013 (figura 4). La incidencia tendió a aumentar hasta 2010, a partir de ese año se observa

una disminución que puede estar relacionada con el desconocimiento etiológico que imperó hasta hace relativamente poco tiempo. Por otra parte, la letalidad ha disminuido en el mismo período, debido al diagnóstico precoz de la enfermedad, la instauración temprana de la diálisis en los casos con oliguria severa o anuria y al manejo de la anemia hemolítica [19,29].

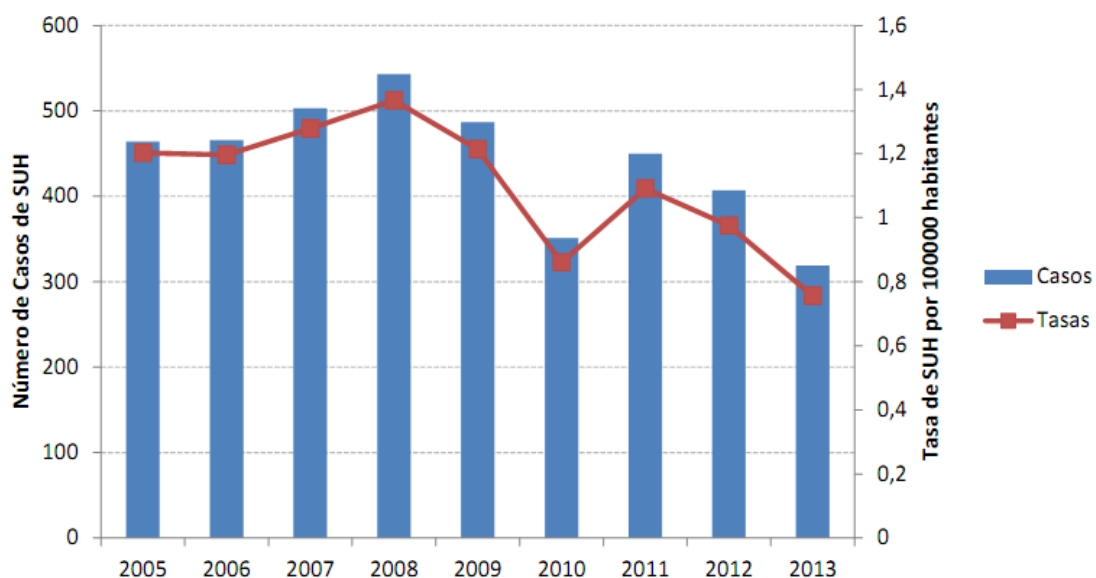


Fig. 4: Casos y tasas de SUH en Argentina (2005-2013). Tomado del Boletín Integrado de Vigilancia N° 222 [29]

El grupo etario más afectado corresponde a niños menores de 5 años. Según datos del Boletín Integrado de Vigilancia N° 222 SE 30 del año 2014 emitido por el Ministerio de Salud (período 2010-2013), del total de casos notificados en los 4 años analizados, el 81% (1238) pertenecen al grupo de menores de 5 años [29].

Si bien el SUH está distribuido en todo el país, la región Sur cuenta con las tasas más elevadas, aunque en franco descenso desde 2011. La región Centro acompaña las tasas del total país debido a que la mayor cantidad de casos proviene de las jurisdicciones de esta zona. A pesar de que Argentina en conjunto muestra un leve descenso en la notificación, para el último año (2013) las regiones de Cuyo y NEA mostraron un leve incremento. No obstante, todo el norte del país presenta las tasas con menor notificación [29]. En la tabla 5 se muestran los casos



totales y en niños menores de 5 años por regiones y por provincias en el período 2010-2013.

Teniendo en cuenta este período, el año con mayor notificación fue 2011. En los dos años siguientes los casos totales disminuyeron casi un 30%, pasando de 450 a 319. El mismo porcentaje de disminución se verifica para el grupo de menores de 5 años [29].

Tabla 5: Casos de SUH según provincia de residencia, población y año de fecha de inicio de síntomas. Argentina (2010-2013). Tomado del Boletín Integrado de Vigilancia N° 222 [29]

Provincia / Región	Casos totales				Casos menores de 5 años			
	2010	2011	2012	2013	2010	2011	2012	2013
Buenos Aires	129	161	167	111	101	122	121	91
CABA	47	57	38	39	33	44	33	26
Córdoba	50	47	47	31	45	41	44	28
Entre Ríos	4	13	17	14	4	13	15	11
Santa Fe	17	37	23	15	15	29	22	12
<b>Centro</b>	<b>247</b>	<b>315</b>	<b>292</b>	<b>210</b>	<b>198</b>	<b>249</b>	<b>235</b>	<b>168</b>
Mendoza	23	20	24	19	20	18	20	15
San Juan	4	4	7	10	3	4	4	10
San Luis	5	7	3	5	4	6	3	5
<b>Cuyo</b>	<b>32</b>	<b>31</b>	<b>34</b>	<b>34</b>	<b>27</b>	<b>28</b>	<b>27</b>	<b>30</b>
Corrientes	2	5	3	5	2	3	3	5
Chaco	1	1	0	3	1	1	0	3
Formosa	0	0	0	0	0	0	0	0
Misiones	0	8	3	7	0	6	1	6
<b>NEA</b>	<b>3</b>	<b>14</b>	<b>6</b>	<b>15</b>	<b>3</b>	<b>10</b>	<b>4</b>	<b>14</b>
Catamarca	1	3	3	1	1	3	3	1
Jujuy	2	6	3	2	1	6	3	2
La Rioja	0	2	1	0	0	2	1	0
Salta	8	10	13	12	6	10	11	10
Santiago del Estero	1	5	6	4	1	5	6	4
Tucumán	4	6	5	3	4	6	5	3
<b>NOA</b>	<b>16</b>	<b>32</b>	<b>31</b>	<b>22</b>	<b>13</b>	<b>32</b>	<b>29</b>	<b>20</b>
Chubut	7	17	18	12	7	17	14	8
La Pampa	8	8	8	5	8	7	5	4
Neuquén	13	9	3	5	13	6	1	3
Río Negro	11	11	6	5	7	7	5	5
Santa Cruz	10	9	1	5	9	6	1	3
Tierra del Fuego	3	4	8	6	3	2	8	3
<b>Sur</b>	<b>52</b>	<b>58</b>	<b>44</b>	<b>38</b>	<b>47</b>	<b>45</b>	<b>34</b>	<b>26</b>
DESCONOCIDO	1							
<b>Total Argentina</b>	<b>351</b>	<b>450</b>	<b>407</b>	<b>319</b>	<b>288</b>	<b>364</b>	<b>329</b>	<b>258</b>

En la figura 5 pueden observarse las tasas anuales de SUH en la población de niños menores de 5 años en todo el país. Las mayores tasas en este grupo etario también se observan en las

provincias de la región Sur, presentando La Pampa, Chubut y Santa Cruz las tasas más altas durante el período analizado [29].

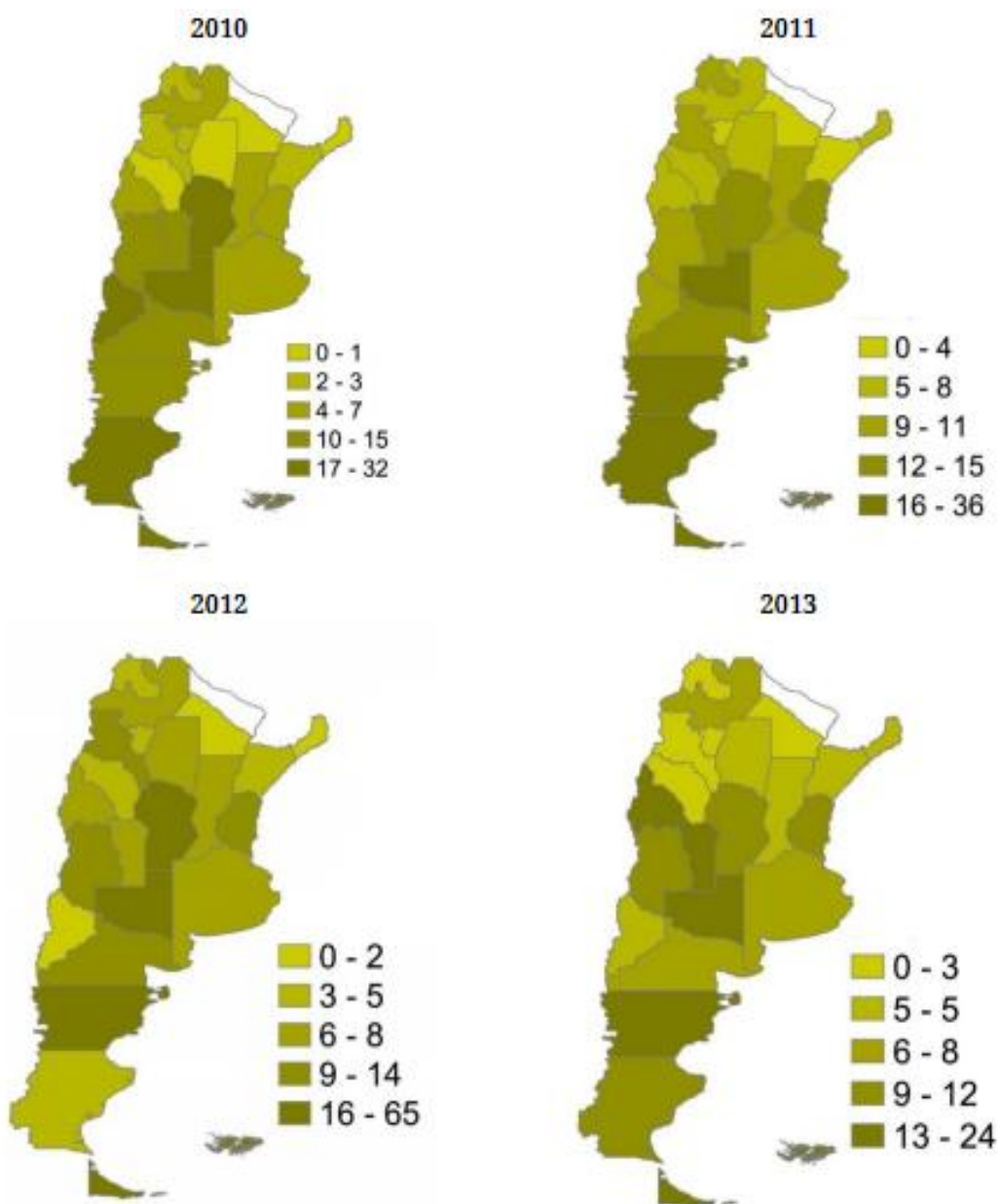


Fig: 5: Tasas de SUH en menores de 5 años por 100.000 habitantes según provincia. 2010-2013. Tomado del Boletín Integrado de Vigilancia N° 222 [29]

En el período 2004-2010, de un total de 1245 de cepas de *E. coli* productoras de toxina Shiga aisladas de casos de SUH (597), diarrea sanguinolenta (353), diarrea no sanguinolenta (167), portadores sanos (74), e infecciones no especificadas (72), los serotipos más frecuentemente

encontrados fueron O157:H7 (74,6 % de los casos) y O145:H- (13,3 % de los casos). El genotipo prevalente de O157:H7 fue: *stx2a-stx2c, eae, ehxA* [30].

Una característica adicional de las cepas *E. coli* O157 prevalentes en el país es que el 80 % de los aislamientos clínicos de origen humano y el 50 % de aislamientos de origen bovino pertenecen al denominado clado 8 hipervirulento [31]. El clado 8 (hay 9 definidos hasta ahora) refiere al grupo filogenético de una variante de *E. coli* O157 que puede ser distinguido mediante un análisis de Polimorfismo de Nucleótido Único (*Single Nucleotide Polymorphism*, SNP) y se conoce como hipervirulento porque que ocasiona síntomas más severos de enfermedad, a la vez que está altamente asociado al desarrollo del SUH cuando se lo compara con los otros clados de O157:H7 [32].

En un intento por cuantificar los costos asociados al SUH, en el año 2005 Caletti *et al.* clasificaron a los mismos como directos e indirectos. Los costos directos son aquellos vinculados directamente con la atención médica, los indirectos son los gastos sufridos por la familia del paciente, las Obras Sociales y el Estado en el proceso de atención del paciente. Se llegó a la conclusión de que el costo directo por paciente en el período agudo fue de us\$ 1.500, y de us\$ 15.399,53 por año, incluyendo su seguimiento; mientras que el costo indirecto por paciente en el período agudo fue de us\$ 3.004,33, y por año de us\$ 7.354,98. En el año 2005 el costo total de atención de los 464 casos denunciados fue de us\$ 2.170.447, 37, con un costo de us\$ 17.553,59 por paciente [26].

#### **1.4 Exposición, vías de entrada**

La infección se produce generalmente por el consumo de alimentos contaminados con materia fecal que contiene EHEC. Los comestibles constituyen la principal ruta de transmisión, siendo la más importante la ingestión de hamburguesas mal cocidas y demás productos de carne

molida. La leche cruda, y productos lácteos como queso, manteca y helados también son fuente de infección. A partir de 1991, algunos productos, como lechuga, jugos sin pasteurizar, melones, ensaladas y brotes de semillas, han adquirido importancia en la transmisión. Los episodios suelen ocurrir a partir de la contaminación cruzada en la elaboración de comidas. La transmisión persona a persona por la vía fecal-oral es también importante, sobre todo en lugares como guarderías infantiles y escuelas. Los brotes de O157:H7 asociados al agua que se utiliza de modo recreativo, como lagos, piscinas, y el agua potable contaminada, se han informado con más asiduidad desde 1990. Los brotes asociados al agua contaminada tienden a ser mayores en número y se han atribuido a sistemas locales de agua de pozo y a agua mineral. Desde 1996, se han conocido brotes resultantes de una nueva modalidad de transmisión, el contacto directo entre humanos y vacas o terneros en las granjas y ferias [33]. La figura 6 nos muestra un resumen de las vías de entrada de EHEC a nuestro organismo.

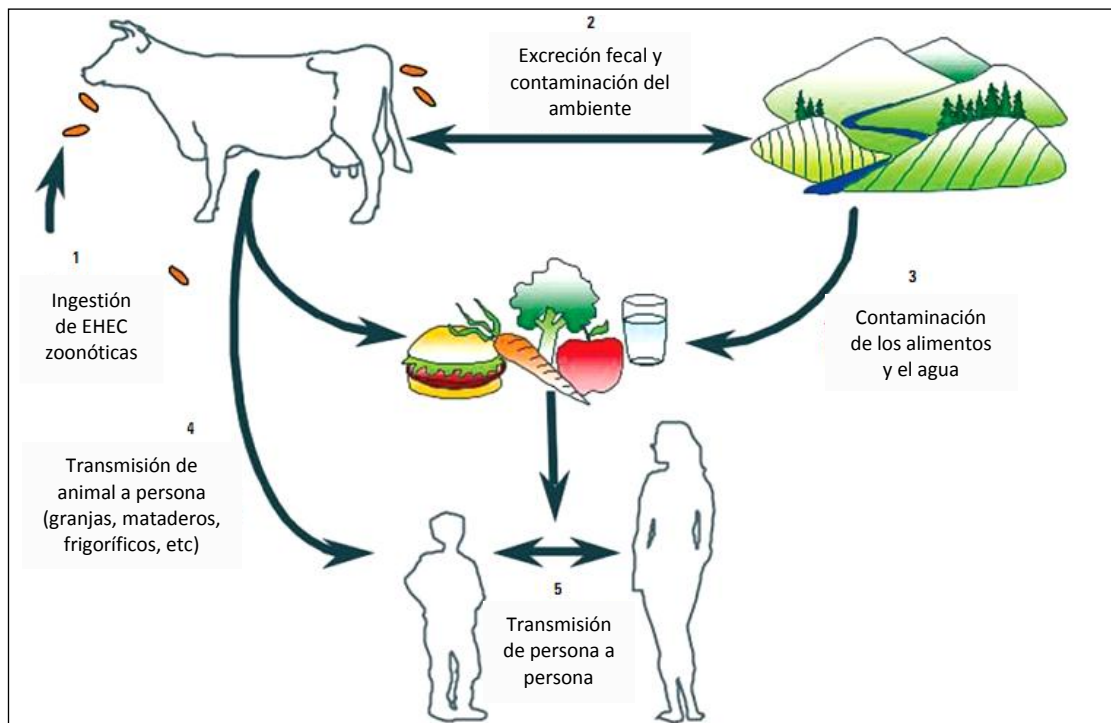


Fig.6: Vías de entrada de EHEC a los seres humanos. Tomado de <http://www.ecl-lab.ca>

### 1.5 Reservorios de *Escherichia coli* enterohemorrágico

EHEC se encuentra en el tracto intestinal y se elimina en las heces de una gran variedad de especies animales, incluyendo ganado vacuno, ovejas, cabras, cerdos, búfalos, y algunas especies salvajes de rumiantes [33]. Los rumiantes son el reservorio más importante EHEC, en particular el ganado bovino, que es considerado el principal reservorio, y donde la excreción puede darse en picos de forma intermitente [34].

La excreción fecal parece ocurrir por períodos más largos y con un número mayor de bacterias eliminadas en terneros jóvenes y al destete que en animales adultos. Se ha informado en distintos trabajos que la excreción aumenta, tanto en animales jóvenes como adultos, en los meses de verano [33]; aunque Hovde *et al.* no hallaron diferencias estacionales en el número de bacterias excretadas por animales infectados experimentalmente con *E. coli* O157:H7 [35]. Se ha encontrado EHEC O157:H7 en el ganado lechero y en el ganado de carne, tanto de pastoreo como de *feedlot* [33,36].

En este punto, se debe reparar en que los estudios de prevalencia de EHEC O157:H7 tienen una dependencia crítica de la metodología utilizada para el procesamiento de las muestras y los procedimientos de identificación. Mayor información acerca de los métodos para aislamiento e identificación se puede encontrar en una sección posterior de este trabajo (6.0 Ensayo de Inoculación Experimental de *Escherichia coli* O157:H7 en Bovinos, página 71). En general, los muestreos para detectar EHEC O157:H7 tienen resultados paradójicos; a pesar de su distribución mundial, esta bacteria muchas veces no es identificada en diversos estudios de prevalencia. Las razones para esto son complejas y podrían reflejar tanto la escasez del microorganismo en las excreciones y en el ambiente, que resulta de la naturaleza esporádica de la portación, el bajo número de bacterias que residen en animales colonizados, o la sensibilidad insuficiente en el muestreo y cultivo [37].

La prevalencia de *E. coli* O157:H7 en bovinos de carne, según distintos estudios, va de 0,3 % a 19,7 % en *feedlots*, y de 0,7 % a 27,3 % en pastoreo; mientras la prevalencia de no-O157 es de 4,6 % a 55,9 % y 4,7 % a 44,8 %, respectivamente [36]. Para el ganado lechero también hay rangos amplios de de tasas de prevalencia para *E. coli* O157:H7 (0,2 % a 48,8 %) y no-O157 (0,4 % a 74 %)[38]. No se ha determinado si la persistencia de estas cepas se debe a una portación de largo término en los rumiantes, a una persistencia en reservorios ambientales, o la existencia de otros reservorios animales aún no identificados que podrían ser más persistentemente infectados que los rumiantes. La prevalencia también es algunas veces difícil de evaluar porque en muchos estudios la detección se basa sólo en la presencia de la toxina Shiga, y no se determina el serotipo de los aislamientos. Los estudios en los cuales se ha realizado el serotipado han encontrado EHEC pertenecientes a los serogrupos O26, O103, O111, y O145, entre muchos otros STEC. Cuando se ha determinado, la prevalencia de estos serotipos fue usualmente entre 1 % y 2 %. Sin embargo, esta prevalencia puede estar subestimada con relación a la de O157, para el que se utilizan técnicas que concentran la muestra con el fin de detectar la bacteria [33].

### **1.6 Prevalencia de EHEC en el ganado bovino en Argentina**

En Argentina se han realizado diversos estudios sobre la prevalencia de EHEC, tanto O157:H7 como no-O157, en el ganado bovino y sus productos. Uno de los primeros trabajos publicados [39] nos permite conocer, en una muestra de animales en campo, a la entrada de frigorífico o en muestras de carne, la presencia de serotipos asociados a SUH, como O26:H11, O103:H2, O111:H-,O113:H21, y O171:H2.

Las tasas son variables, lo que puede deberse a la diferencia en los métodos de detección, el tipo de alimentación, la época del año, la edad de los animales, la raza de los animales, y la excreción intermitente. También varía la metodología de los trabajos; algunas investigaciones

[40–45] nos permiten obtener información de porcentajes de serotipos sobre el total de animales muestreados, como se observa en la tabla 6. Según estos autores, la prevalencia del serotipo O157:H7 varía entre 0,2 % y 6,8 % del ganado muestreado. Entre los serotipos no-O157 que pueden causar SUH se ha encontrado como más frecuentes a O145:H- (15,2 %), O8:H19 (12,9 %), O171:H2 (8,5 %), O26:H11 (5,3 %), y O174:H21 (5 %).

Tabla 6: Prevalencias en ganado bovino de serotipos de *E. coli* asociados a SUH según distintos estudios realizados en Argentina.

Serotipo	Origen	Prevalencia	Referencias
<b>O8:H19</b>	Animales pastoreo	12,9 %; 2,5 %	[41,45]
<b>O26:H11</b>	Animales pastoreo	5,3 %; 0,6 %	[42,45]
<b>O103:H2</b>	Animales <i>feedlot</i> ; Animales pastoreo	1,7 %; 2,5 %	[40,41]
<b>O111:H-</b>	Animales pastoreo	2,6 %	[42]
<b>O113:H21</b>	Animales pastoreo; Animales tambo	2,5 %; 1,4%	[41,44]
<b>O121:H19</b>	Animales pastoreo	0,5 %	[41]
<b>O145:H-</b>	Animales <i>feedlot</i> ; Animales pastoreo	15,2 %, 0,5 %	[40,41]
<b>O157:H7</b>	Animales <i>feedlot</i> ; Animales pastoreo; Animales tambo	6,8 %; 0,5 %; 3,8 %; 0,2 %	[40,41,43,44]
<b>O171:H2</b>	Animales <i>feedlot</i> ; Animales pastoreo; Animales tambo	8,5 %; 1,5 %; 0,14 %	[40,41,44]
<b>O174:H21</b>	Animales <i>feedlot</i>	5 %	[40]

En otras publicaciones se realiza un muestreo previo, a partir del mismo se toman únicamente los aislamientos que posean alguna característica particular (por ejemplo que sean *stx*<sup>+</sup>) y sobre este universo más acotado, se proporciona la información de prevalencia que se aprecia en la tabla 7. Si nos atenemos a los datos proporcionados por este tipo de artículos [46–48] tenemos que O157:H7 constituye entre el 3,0 % y 3,6 % de los serotipos recuperados cuando buscamos entre *E. coli* productores de toxina Shiga. De este conjunto de serotipos, los más frecuentemente recuperados son: O103:H2 (10,6 %), O113:H21 (8,0 %), O171:H2 (7,9 %), y O145:H- (7,2 %).

Tabla 7: Prevalencias de serotipos de *E. coli* productores de toxina Shiga asociados a SUH en aislamientos *stx+* provenientes de muestreos en ganado bovino, productos y ambiente según distintos estudios realizados en Argentina.

Serotipo	Origen	Prevalencia	Referencias
<b>O8:H19</b>	Animales <i>feedlot</i> y carne; Animales pastoreo y agua; Animales pastoreo, carne y ambiente.	0,6 %; 0,90 %; 2 %	[46–48]
<b>O15:H27</b>	Animales pastoreo y agua	0,90 %	[47]
<b>O26:H11</b>	Animales <i>feedlot</i> y carne; Animales pastoreo, carne y ambiente.	4,6 %; 5 %	[46,48]
<b>O103:H2</b>	Animales <i>feedlot</i> y carne; Animales pastoreo y agua	1,76 %; 10,6 %	[46,47]
<b>O111:H-</b>	Animales <i>feedlot</i> y carne	0,6 %	[46]
<b>O113:H21</b>	Animales <i>feedlot</i> y carne; Animales pastoreo y agua; Animales pastoreo, carne y ambiente.	3,3 %; 2 %; 8 %	[46–48]
<b>O145:H-</b>	Animales <i>feedlot</i> y carne; Animales pastoreo, carne y ambiente.	7,2 %; 3 %	[46,48]
<b>O157:H7</b>	Animales <i>feedlot</i> y carne; Animales pastoreo, carne y ambiente.	3,3 %; 3 %	[46,48]
<b>O171:H2</b>	Animales <i>feedlot</i> y carne; Animales pastoreo, carne y ambiente.	7,9 %; 5 %	[46,48]
<b>O174:H21</b>	Animales <i>feedlot</i> y carne	6,5 %	[46]

Finalmente, en un estudio realizado en frigoríficos de exportación para estimar la presencia de *E. coli* O157 productor de toxina Shiga [49], se encontró una prevalencia promedio de 4,1 % en muestras de contenido fecal y un 2,6 % en carcasas; e incluso se han detectado cepas EHEC en trabajos realizados con muestras de carne picada de carnicerías en la provincias de Tucumán y Buenos Aires [50–52].

### 1.7 Colonización en el bovino

Al investigar los mecanismos que posibilitan la colonización del bovino por parte de EHEC, se encontró que la proteína Intimina es necesaria para colonizar el intestino de terneros neonatos



y causar diarrea y lesiones A/E. Esta adherencia a la mucosa intestinal es crítica para generar enterocolitis fibrinohemorrágica y diarrea [25], aunque los mecanismos moleculares que posibilitan la colonización y la virulencia de EHEC en los bovinos aún no están completamente dilucidados. Un factor clave que media la adherencia de EHEC *in vitro* y la formación de lesiones A/E *in vivo* es el LEE. Otro factor es Efa1 (EHEC *factor for adherence*); los mutantes para *efa1* tienen disminuida su capacidad para colonizar terneros y muestran una adherencia reducida a la mucosa intestinal. Sin embargo, el modo de acción de esta proteína no está del todo claro, ya que sus mutaciones afectan de modo indirecto la expresión y secreción de EspA y Tir [53,54]. Efa1 está presente en algunos serogrupos como O111 y O5. *E. coli* O157:H7 carece de *efa1*, pero posee un homólogo, *toxB*, codificado por el plásmido pO157, y una versión truncada *efa1'*. Ambos genes están implicados en la adherencia a tejidos *in vitro* y a la expresión y secreción de factores del SSTT codificado por el LEE. No obstante esto, estudios posteriores mostraron que estos genes no influyen en la colonización de *E. coli* O157:H7 en terneros y corderos [53,54].

Recientemente, Dziva *et al.*, utilizando la técnica de mutagénesis de marcaje (*signature tagged mutagenesis*), identificaron distintas categorías de genes necesarios para la colonización por parte de *E. coli* O157:H7 EDL933: (i) asociados al SSTT (excluidos *eae* y *tir*), (ii) codificantes de estructuras de superficie, (iii) pertenecientes a otras islas-O, (iv) genes reguladores, (v) involucrados en el metabolismo intermediario central, y (vi) genes hipotéticos. En cuanto a los asociados al SSTT, las mutaciones que interfirieron con la colonización fueron las de elementos estructurales como *escC*, *escV*, *escN*, *sepQ*; proteínas secretadas/chaperonas como *cesF*, *espD*, y *map*. Los más importantes fueron los relacionados con el LEE, pero quedó en evidencia que la colonización del intestino del bovino también requiere de múltiples elementos codificados por fuera de este *locus* que podrían generar fimbrias *per se* o contribuir a la expresión o composición de fimbrias codificadas por otros *loci*. [54].

Un estudio similar realizado con EHEC O26:H- demostró que en estas cepas también los genes fundamentales que posibilitan la colonización del bovino forman parte del SSTT, como las proteínas estructurales *espD*, *escN*, *st22*, *escC*, y *espA*. De modo interesante, en este serotipo se ha encontrado que la expresión de citotoxinas como *pssA* (serina proteasa), *ehxA* (enterohemolisina), y el factor *efa-1*, pueden influenciar la colonización. Aparentemente, distintos serotipos de EHEC difieren en su dependencia de citotoxinas para colonizar el intestino de los terneros; y esta diferencia podría deberse a una disímil interacción por parte de *E. coli* O157:H7 o *E. coli* O26:H- con el intestino de los bovinos. EHEC O26:H-, a diferencia de O157:H7, interactúa íntimamente en gran número con las células epiteliales intestinales. Esto es consistente con la mayor enteropatogenicidad de O26:H- con respecto a O157:H7 en terneros; y se asocia con una mayor respuesta inflamatoria aguda, por lo que O26:H- deberá resistir la actividad bactericida de las células inflamatorias durante la colonización. Tal vez esto lo lleve a necesitar de varias citotoxinas que inactiven la respuesta del hospedador para producir una infección eficaz. [55].

El sitio principal de colonización de *E. coli* O157:H7 en el bovino es la parte terminal del recto, la denominada unión recto-anal (URA). Se ha demostrado el tropismo de la bacteria por esta zona mucosa rica en folículos linfoides [56]. Los factores de virulencia que cumplen un papel importante en la colonización de este sitio específico son el plásmido pO157 y las proteínas Intimina y Tir; no siendo aparentemente necesarias para esto las toxinas Shiga [57].

Por otra parte, se ha sugerido la existencia de terneros “superexcretores”. Un superexcretor se puede definir como un individuo que, por un período, excreta muchos más organismos infecciosos que otros individuos de la misma especie. [58]. En el caso de EHEC O157:H7, una excelente revisión de Chase-Topping *et al.* permite tener una visión amplia de las distintas opciones para definir operativamente a un animal de esta categoría. Algunas veces se define por simple recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) liberadas; donde el punto de

corte varía entre  $\geq 10^3$  o  $\geq 10^4$ . En otras ocasiones se toma en cuenta no sólo la excreción sino su persistencia en el tiempo, por ejemplo  $\geq 10^4$  UFC y  $\geq 4$  muestreos positivos cuando se toman dos muestras por semana, durante 14 semanas [58]. Esta situación de los superexcretores estaría relacionada con el fenómeno de colonización de la URA, y colabora con la amplia variación de la prevalencia de EHEC O157:H7 entre grupos de bovinos. Se ha observado que estos animales superexcretores tendrían una colonización persistente de la URA con números altos de O157:H7 [59]. Matthews *et al.*, propusieron un modelo de dinámica de transmisión de *E. coli* O157:H7 en el cual la presencia de estos animales en los corrales se ajusta con los datos de prevalencia observados, constituyendo el mayor riesgo para el mantenimiento de la bacteria dentro de la población bovina [60].

Una característica importante de la infección/colonización bovina por *E. coli* en general, que probablemente sea similar para EHEC, es el papel del ganado en la amplificación de la bacteria. Por ejemplo, la infección experimental de bovinos con EHEC O157:H7 implica típicamente la administración de una única dosis oral de la bacteria ( $10^9$ - $10^{10}$  UFC) que resulta en un período inicial de excreción fecal muy alta (por ejemplo, más de  $10^5$  UFC/g de materia fecal en los primeros días después del desafío), que a menudo representa la mayor parte de la excreción de los animales durante la infección experimental [61]. Cuando se corrigen estos números para la masa fecal, teniendo en cuenta que un bovino evacúa aproximadamente 10 kg/día, es evidente que se ha producido un grado muy alto de amplificación de la dosis de desafío. Esta alta excreción fecal no se mantiene, sino que pronto desciende al nivel de una infección natural ( $<10^4$  UFC/g) [62].

### 1.8 Opciones de control

Con la intención de reducir los niveles de EHEC O157:H7 que ingresan en la cadena alimentaria humana, se ha buscado intervenir en su principal reservorio, el ganado bovino, de tal forma de

reducir su incidencia. Debe tenerse presente que para que esto resulte factible hay que considerar dos eventos asociados: el número de animales excretores, y la magnitud de la excreción.

Una intervención prefaena podría generar una reducción significativa, tanto en la cantidad de EHEC O157:H7 excretada, como en el número de animales excretores, disminuyendo la prevalencia de la bacteria en los bovinos y la contaminación del medio ambiente. Se han planteado varias estrategias consideradas viables.

### **1.8.1 Estrategias**

La eliminación completa de EHEC O157:H7 es un objetivo poco realista dadas las características epidemiológicas y ecológicas de este patógeno. Su amplia distribución, su persistencia en fuentes ambientales y su capacidad de reinfectar a los bovinos dificultan la implementación de planes de control.

Las distintas estrategias de las intervenciones prefaena se pueden agrupar en tres grandes categorías: 1) estrategias de reducción de la exposición; 2) estrategias de exclusión; y 3) estrategias directas antipatógeno [63].

**Estrategias de reducción de la exposición:** tienen que ver con las distintas fuentes que pueden infectar al ganado, dado que es lógico suponer que reduciendo la exposición de los animales a las mismas puede haber una reducción la prevalencia de EHEC O157:H7. Se fundan básicamente en prácticas de manejo, por ejemplo buena calidad de agua, higiene alimentaria, higiene del ambiente, densidad adecuada de los animales, y exclusión de otros animales tanto domésticos como silvestres de los establecimientos [63].

**Estrategias de exclusión:** se basan en la modificación del microambiente gastrointestinal del bovino para prevenir el establecimiento, o causar el desplazamiento de una bacteria particular. Los métodos más comunes incluyen manipulación de la dieta y probióticos. El manejo de los

componentes alimentarios tiene como objetivo influenciar las condiciones ambientales en el tracto gastrointestinal de tal forma que modifiquen la competitividad o supervivencia de *E. coli* O157:H7. Esto generalmente tiene que ver con el alimento que reciben los animales, desde la década de 1990 se han hecho diversos estudios con resultados no siempre repetibles y en ocasiones contradictorios sobre el tipo de forraje consumido y el nivel de excreción de la bacteria [64–66]. Díez-González *et al.* encontraron que cambiando el tipo de dieta de animales alimentados con grano a heno poco antes del ingreso al matadero se reducía en 1000 veces la población fecal de *E. coli* [67]. Estudios posteriores no pudieron confirmar del todo estos hallazgos pero hay coincidencia general en que la alimentación a base de granos aumenta el número de *E. coli* (incluyendo EHEC O157:H7) excretadas y su resistencia ácida [68–71]. Hay muchas posibles razones por las cuales un alimento podría influenciar la microbiota intestinal (por ejemplo alterando la concentración de los ácidos grasos volátiles, cambiando el pH, o modificando la composición de las bacterias residentes), pero dado el insuficiente conocimiento que se posee sobre las complejas relaciones que regulan la ecología microbiana intestinal bovina, es muy difícil predecir con adecuada certeza el impacto de un determinado alimento sobre EHEC O157:H7.

Los probióticos se definen como “preparaciones que contienen microorganismos viables, definidos, en número suficiente, capaces de alterar la microflora en un compartimento del hospedador y que ejercen efectos beneficiosos para la salud del mismo” [72]. Pueden ser especies bacterianas únicas o mezclas de bacterias y hongos, incluyendo generalmente bacterias lácticas. Se han aislado diversas cepas de *E. coli* de bovinos que son capaces de producir colicinas que mostraron potencial para desplazar *E. coli* O157:H7 de ganado en pie, reducir la excreción fecal de EHEC en terneros neonatos [73] y también en terneros destetados [74]. Otra especie que ha demostrado efectividad al reducir EHEC O157:H7 hasta un 50 % en ganado de carne es *Lactobacillus acidophilus* [75–78]. Un producto de este tipo (Bovamine®)

es comercializado en EE. UU., y uno de similares características (Micro-Cell LA®) puede ser adquirido en el mercado brasileño.

**Estrategias directas antipatógeno:** tienen como fin ubicar y eliminar las bacterias patógenas. Se pueden mencionar el uso de antimicrobianos, bacteriófagos, manipulación de la fisiología animal con compuestos seleccionados, y vacunación.

El uso de compuestos antimicrobianos, como por ejemplo el sulfato de neomicina, se basa en que la mayoría de los aislamientos de *E. coli* O157:H7 son sensibles a este antibiótico [79–81] y se ha demostrado que puede reducir su población fecal y excreción en terneros [63,82]. Pero como la neomicina está estrechamente relacionada con otros antibióticos de la familia de los aminoglucósidos (estreptomicina, kanamicina y gentamicina) que se utilizan en humanos, el riesgo de desarrollo de resistencias hace controversial su uso en el ganado.

El clorato de sodio es una alternativa no antibiótica. Cuando se administra en la comida y el agua, reduce la población de *E. coli* O157:H7 en las heces y en el intestino de terneros [83] y cerdos [84] bajo condiciones experimentales. Se atribuye el efecto del clorato de sodio a su conversión en clorito, un metabolito bactericida, por parte de la nitrato reductasa. Se sugiere el tratamiento con clorato de sodio como una intervención perifaena, es decir poco tiempo antes de la entrada del animal a la planta de faena.

La utilización de bacteriófagos para la eliminación selectiva de *E. coli* O157:H7 en rumiantes tiene como antecedentes ensayos realizados en modelos murinos [85,86]. En experiencias de inoculación experimental en modelos ovinos, se ha logrado reducir el nivel de EHEC O157:H7 excretadas por medio de la administración oral de bacteriófagos [87,88]. En otro trabajo, Sheng *et al.*, a través de una aplicación continua de bacteriófagos vía rectal y en el agua de consumo, pudieron reducir la excreción de EHEC O157:H7 en bovinos [86]. Por otro lado, Rivas *et al.* no encontraron diferencias significativas en la excreción entre bovinos tratados y no

tratados con fagos por vía oral después de una desafío con EHEC O157:H7 [89]. Si bien la utilización de la terapia fágica como tratamiento requiere mayor estudio y está sujeta a la aprobación de estamentos reguladores, existen algunos productos ya aprobados en EE. UU., como EcoShield™, que puede utilizarse sólo en superficie de cortes de carnes rojas.

### 1.8.2 Vacunación

La vacunación contra infecciones zoonóticas o transmitidas por los alimentos tiene como objetivo fundamental reducir o eliminar el riesgo para el consumidor, y en algunos casos busca mejorar la productividad [90]. En este caso, la vacunación tiene como objetivo generar una respuesta del sistema inmune del animal contra antígenos expresados por *E. coli* O157:H7 para reducir la colonización del tracto gastrointestinal. En un modelo de estudio de simulación estocástica en el que se evaluaron distintas medidas para reducir la contaminación de las carcasas de bovinos de carne con EHEC O157, se llegó a la conclusión de que el mayor impacto estaría dado ya sea por la vacunación o por la introducción de un agente que redujese *per se* la excreción fecal [91].

Muchos factores de virulencia de *E. coli* O157:H7 son capaces de inducir una respuesta inmune durante una infección natural o experimental en bovinos. Se ha observado que la inoculación oral experimental de terneros y novillos con *E. coli* O157:H7 promueve e incrementa los títulos de anticuerpos contra el LPS de *E. coli* O157 e incluso contra las toxinas Shiga [92], aunque en un trabajo posterior sólo se encontraron anticuerpos contra el LPS [93]. En otro trabajo se ha demostrado que los terneros reaccionan serológicamente contra proteínas del LEE de *E. coli* O157:H7 como Intimina, EspA y EspB, a partir de una infección experimental [94]. También se han encontrado anticuerpos contra estas proteínas en personas infectadas con EHEC y EPEC [95,96], e incluso en leche de mujeres saludables y en calostro de vacas sanas [97–101].

Por otra parte, ratones infectados con *Citrobacter rodentium*, una bacteria que muestra algunos determinantes de virulencia comunes a EHEC y EPEC, y provoca efectos patológicos muy similares a los que promueve EPEC en humanos, desarrollan una respuesta inmune contra las proteínas codificadas por el LEE que los hace resistentes a una reinfección [102].

Una de las dificultades planteadas para la estrategia de vacunación es generar una respuesta inmune específica a nivel de la mucosa intestinal. Se han desarrollado distintas vacunas experimentales, muchas de ellas basadas en componentes del LEE, como algunas de las proteínas secretadas de *E. coli* (Esps), Tir e Intimina; también se han ensayado el lipopolisacárido de O157 y receptores de sideróforos y porinas [103–111]. En estos ensayos se logró obtener respuesta de anticuerpos contra los antígenos elegidos, pero resultados variables en cuanto a la protección contra EHEC O157:H7. La vacunación de cerdas con Intimina permitió que los lechones amamantados con calostro hiperinmune no tuvieran colonización efectiva ni daño intestinal luego de una inoculación de  $10^6$  UFC de *E. coli* O157:H7 no productora de toxina Shiga [104]. La vacunación con un sobrenadante que contenía Esps y Tir, logró reducir la magnitud y la duración de la excreción de EHEC O157:H7 en una inoculación experimental de bovinos, aunque cuando se amplió la experiencia y se hizo a campo, no se pudo obtener una reducción significativa de la colonización [105,112]. Esta misma vacuna fue posteriormente ensayada bajo condiciones controladas con un régimen de tres dosis, los animales fueron sometidos a una inoculación experimental de EHEC O157:H7 y se obtuvo una reducción en la excreción bacteriana, aunque no en su duración [113]. Cuando se inmunizaron bovinos con EspA o flagelina H7 únicamente, se produjeron respuestas específicas de anticuerpos, pero no hubo reducción en la excreción ante una inoculación experimental [107,108]. La vacuna con receptores de sideróforos y porinas se ha probado en bovinos en ensayos con infección experimental y en condiciones naturales de *feedlot*; en la primera situación se produjo una respuesta inmune específica y un decrecimiento en la



excreción fecal de EHEC O157:H7, mientras que en situación de *feedlot* sin inoculación experimental pudo observarse una reducción en la probabilidad de detección de la bacteria y en su concentración fecal luego de la aplicación de tres dosis [109,110].

De estas vacunas, dos han logrado ser aprobadas para uso comercial, una preparación que combina proteínas producidas por el SSTT (Espes y Tir) con el adyuvante VSA3 [105] y la que se compone de receptores de sideróforos y porinas [109,110]. Al momento de escribirse esta tesis, la primera vacuna (Econiche™), que había conseguido autorización en Canadá y el Reino Unido, se ha dejado de fabricar debido a que la empresa canadiense que la fabricaba (Bioniche) vendió su división de Salud Animal y los nuevos dueños discontinuaron su producción; mientras que la segunda (*Escherichia coli* Bacterial Extract Vaccine with SRP® Technology) tiene una aprobación condicional en EE. UU. y se le están realizando las pruebas de potencia.

Dado que *E. coli* O157:H7 es un patógeno que ingresa por vía oral, la mejor defensa contra éste sería una vacuna que genere una respuesta inmune tanto sistémica como mucosa.

Sin embargo, deben conciliarse varios factores para que una vacuna, además de generar una respuesta inmune adecuada, pueda ser efectivamente utilizada en el ganado. Debe ser fácil de administrar en una manga; no debe ocasionar lesiones en el músculo o cuero, ni modificar las propiedades de la carne, ni de la leche; además debe utilizar un adyuvante autorizado.

**Adyuvantes:** La iniciación de la respuesta inmune requiere la activación de mecanismos específicos de defensa, resultando en una respuesta pro-inflamatoria. Las citoquinas y quimioquinas liberadas activan y dirigen la respuesta inmune adaptativa. Cuando el antígeno utilizado no es lo suficientemente inmunogénico para producir esta respuesta pro-inflamatoria, necesita la asistencia de un adyuvante para potenciar su inmunogenicidad. Se han evaluado distintas clases de adyuvantes en animales, como puede ser observado en la tabla 8; donde se encuentran listados los comúnmente ensayados en vacunas veterinarias.

Puede notarse que la mayoría son utilizados para inmunización sistémica, dado que los adyuvantes mucosos deben estimular el tejido linfoide asociado a la mucosa sin interferir en la función de barrera de la misma [114,115].

Tabla 8: Lista selectiva de diferentes clases de adyuvantes evaluados para potenciar la respuesta inmune a vacunas veterinarias. Tomado de Singh y O'Hagan [115].

<b>Sales Minerales</b>	Hidróxido de Aluminio, Fosfato de Aluminio, Fosfato de Calcio
<b>Adyuvantes Inmunoestimulatorios</b>	Citoquinas (IL-2, IL-12), Saponinas, ADN bacteriano (oligos CpG), LPS, Lipopéptidos
<b>Partículas Lípidas</b>	Emulsiones (Freund), Liposomas, Virosomas, ISCOMS, Cocleatos
<b>Adyuvantes Particulados</b>	Micropartículas de PLG, Partículas de Poloxamero, Partículas <i>Virus-like</i>
<b>Adyuvantes Mucosos</b>	Toxina Termolábil (LT), Toxina Colérica (CT), Micropartículas, Polisomas Polimerizados, Chitosan, Calcitriol

## 1.9 Fundamentos del enfoque metodológico

Se ha descrito que diversos factores median la colonización del intestino bovino por parte de EHEC O157:H7, siendo los principales aquellos localizados en la isla de patogenicidad LEE. Intimina, Tir y las proteínas EspA, EspB y EspD son responsables de la adherencia íntima de *E. coli* a la célula [25,54,116–118]. Esto, junto a los antecedentes de ensayos de otros investigadores, nos condujeron a la posibilidad de diseñar una vacuna con combinaciones no probadas aún utilizando proteínas recombinantes del LEE .

Continuando con la idea de que la vacunación con factores de colonización bacteriana constituye una estrategia válida para prevenir la infección con *E. coli* O157: H7, decidimos ampliar la búsqueda de opciones factibles. Dentro de esta temática, un enfoque novedoso constituye el uso de envolturas bacterianas (EBs) libres de ADN como vacunas inactivadas, es decir la utilización de envoltura de células enteras. En ellas se exhiben todos los componentes de la superficie de forma no desnaturalizada, y son capaces de inducir una fuerte respuesta

inmune en mucosas [119,120]. Teniendo en cuenta que las estructuras superficiales están probablemente involucradas con la adherencia y colonización bacteriana, y contando con la posibilidad de obtener EBs de *E. coli* O157:H7, se procedió también a probarlas como una vacuna experimental en terneros.

Para que exista posibilidad de utilización efectiva de una vacuna en este tipo de animales es muy importante la facilidad del procedimiento de vacunación debido a los problemas que plantea el manejo de los rodeos. La vía de inoculación tuvo que ser una que permitiera una aplicación sencilla a un bovino en una manga, a campo o corral, por ejemplo la vía intramuscular o subcutánea. Se propusieron estas vías de inoculación porque son las más convenientes por su practicidad, y porque la mayoría de las vacunas en uso para el ganado bovino son de inoculación sistémica: las utilizadas para el complejo respiratorio, para el complejo reproductivo, para el complejo queratoconjuntivitis, y para el complejo entérico neonatal.

Dado que el patógeno ingresa en el animal por vía oral, y es capaz de colonizar el intestino, se buscará obtener una respuesta de IgA secretora a nivel de las mucosas afectadas. Esto tal vez nos hubiera llevado a la búsqueda de una vacuna oral, intranasal o intrarrectal, como ya fue experimentado por otros investigadores. Sin embargo, se vió que la respuesta IgA en la mucosa intestinal no fue suficiente para reducir la excreción de *E. coli* O157:H7 luego de una infección experimental [108,111]. Por otra parte, la inmunización sistémica de terneros con flagelina H7 indujo la producción de anticuerpos IgG e IgA en suero y secreciones nasal y rectal [108] mientras que la inmunización sistémica con las adhesinas Intimina y Efa ( Van Diemen *et al.* (2005)) también indujo una respuesta específicas de IgG sérica e IgA en secreción salival. Si bien IgA es el isotipo predominante en mucosas, cantidades significativas de IgG sistémica pueden ser secretadas al lumen intestinal mediante transudación, e incluso puede haber una

producción local [121]. Se ha sugerido recientemente que la IgG en mucosas podrían actuar como neutralizantes de toxinas, adhesinas o virus [122].

Por lo descrito, se pensó que una inmunización parenteral realizada con los componentes adecuados sería capaz de generar una fuerte respuesta sérica de IgG que contribuiría a la inmunidad de mucosas, y probablemente IgA secretorios específicos protectores.

## **2.0 Hipótesis, Objetivo General y Objetivos Específicos**

**2.1 Hipótesis:** La hipótesis de este estudio consiste en que el diseño de una vacuna basada en factores de colonización puede disminuir la excreción de EHEC O157:H7 en el ganado bovino.

**2.2 Objetivo General:** Este trabajo tiene como objetivo general diseñar, obtener y evaluar vacunas formuladas con proteínas codificada por una isla de patogenicidad y con envolturas de *Escherichia coli* O157:H7 que puedan disminuir la incidencia de esta bacteria en el ganado bovino, a fin de reducir el riesgo de contaminación de la carne y del ambiente por parte de animales excretores.

**2.2.1 Objetivo Específico 1:** Seleccionar candidatos vacunales antigénicos entre las proteínas codificadas por la isla de patogenicidad LEE (*Locus of Enterocyte Effacement*) de *Escherichia coli* O157:H7, obtener las proteínas seleccionadas de modo recombinante y evaluar su actividad inmunógena en un modelo murino.

**2.2.2 Objetivo Específico 2:** Evaluar la respuesta inmune humoral sérica y en mucosas contra los antígenos vacunales seleccionados en el modelo bovino.

**2.2.3 Objetivo Específico 3:** Establecer una metodología para determinar la colonización intestinal de bovinos experimentalmente infectados con *Escherichia coli* O157:H7.

**2.2.4 Objetivo Específico 4:** Evaluar la producción de una vacuna constituida por envolturas bacterianas de *Escherichia coli* O157:H7 libres de ADN.

**2.2.5 Objetivo Específico 5:** Inmunizar terneros con las formulaciones y evaluar el desempeño de las mismas en la disminución de la excreción de *Escherichia coli* O157:H7 luego de un desafío experimental con la bacteria.

### **3.0 Producción de las Proteínas Recombinantes**

### 3.1 Introducción

Es conocido que la colonización de EHEC O157:H7 en el ganado bovino, y más precisamente la capacidad de adherencia que posibilita esta colonización, se debe principalmente a factores como la adhesina Intimina y su receptor Tir. Como ya se ha mencionado, ambas proteínas son codificadas por el LEE.

Intimina, que se ha demostrado fundamental para la adherencia y la formación de la típica lesión A/E [25], es una proteína de aproximadamente 94 kDa, con dos dominios claramente definidos; el N-terminal conservado y el C-terminal variable, lo que da lugar a un número de 21 tipos y subtipos, denominados con letras griegas [123]. Así, el tipo de Intimina que caracteriza a EHEC O157:H7 es el  $\gamma$  (gamma). Su receptor es Tir, constituido por 558 aminoácidos. Se lo denomina receptor translocado (*Tir, translocated Intimin receptor*) porque, si bien es producido en la bacteria, se transloca vía el SSTT a la célula eucariota afectada. Cuando Tir ingresa al citoplasma, se dirige a la membrana celular y se inserta en forma de horquilla dejando sus extremos N y C terminales hacia el citoplasma y su dominio central expuesto a la superficie. Este dominio central se une a Intimina y produce una adherencia ajustada entre la bacteria y la célula. Otro factor, no codificado por LEE, EspFu, es también secretado dentro de la célula y trabaja cooperativamente con Tir para reclutar proteínas celulares. EspFu recluta al factor promotor de la nucleación de la actina N-WASP (*Wiskott-Aldrich syndrome protein*) y a IRSp53 (*Insulin receptor tyrosine kinase substrate p53*), que es un factor importante que regula la reorganización de la actina del citoesqueleto. Esto resulta en el rearreglo y acumulación de la actina por debajo de la bacteria adherida, formando la característica estructura tipo pedestal que lleva a las células intestinales a perder sus microvellosidades, formándose la lesión A/E [124,125]. En la figura 7 se esquematiza este fenómeno.



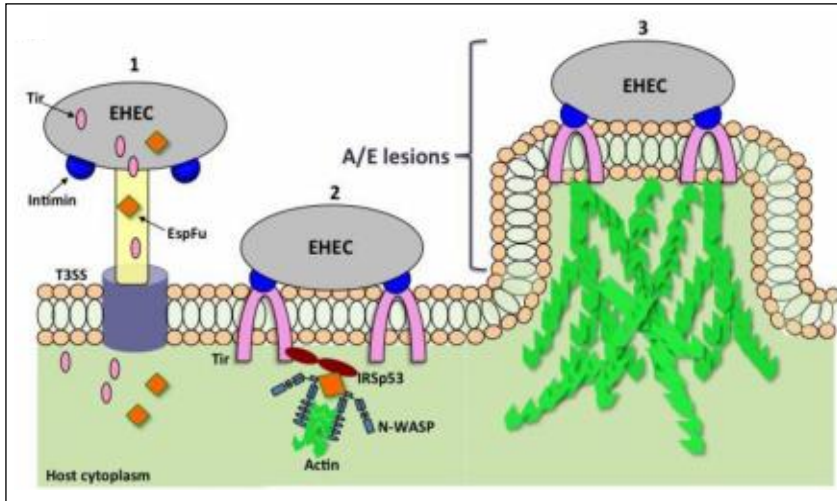


Fig. 7: Esquema de la formación de la lesión A/E. 1) EHEC inyecta, a través del SSTT, factores bacterianos, entre ellos Tir. 2) Tir se dirige a la membrana celular y se ubica en ella para poder interactuar con Intimina y se produce la adherencia. 3) Se desencadenan una serie de reacciones promovidas por los factores bacterianos que producen la polimerización de la actina celular y el borrado de las microvellosidades con la formación de un pedestal característico.

Tir puede penetrar en la célula gracias al SSTT. El SSTT forma lo que se puede llamar una “jeringa molecular” que inyecta factores bacterianos en la célula eucariota. Esta estructura está formada por distintas proteínas codificadas en el LEE, como se puede ver en el gráfico 8. EspA es el componente estructural de la aguja a través de la cual se trasladan distintas proteínas bacterianas, mientras que EspB y EspD se ubican en la punta y forman el poro en la membrana celular eucariótica [126].

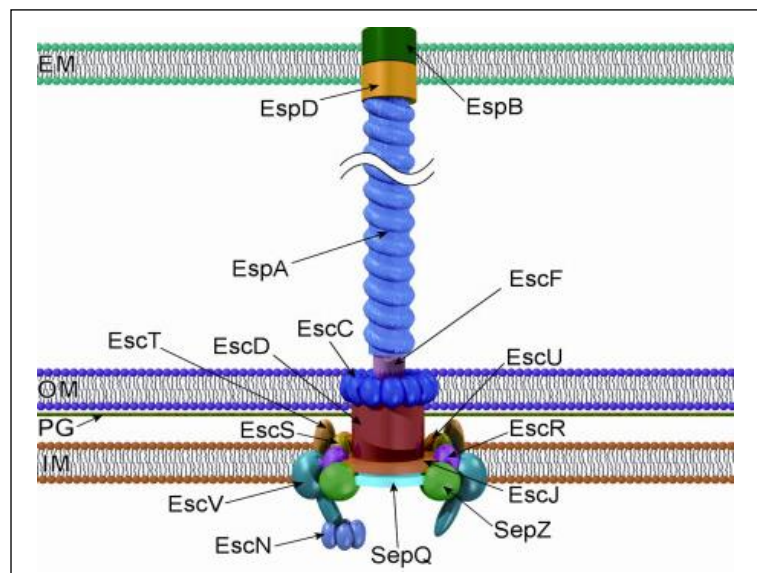


Fig. 8: Representación del SSTT de EHEC O157:H7. Se observa la gran cantidad de proteínas codificadas por el LEE que son necesarias para ensamblarlo. Entre ellas EspA, que forma el filamento hueco por donde pasan factores a la célula eucariota, y EspB, que junto a EspD forman el poro en la membrana celular. EM: membrana eucariota; OM: membrana externa; PG: peptidoglicano; IM: membrana interna. Tomado de Pallen *et al.* [126].

El papel desempeñado por Intimina, EspA y EspB, junto a los antecedentes ya expuestos la sección 1.8.2 (Vacunación, página 29), nos llevó a seleccionarlos como integrantes potenciales de la vacuna a ensayar. Más exactamente lo que se propuso utilizar fue el segmento C-terminal variable de 280 aminoácidos de Intimina y (Int- $\gamma$ 280), y las secuencias completas de EspA y EspB.

## 3.2 Materiales y Métodos

### 3.2.1 Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento

Las cepas bacterianas utilizadas fueron: *E. coli* DH5 *alpha* y *E. coli* XL-1 *Blue* para el clonado en general, y *E. coli* BL21 (DE3) pLysS (Invitrogen, EE. UU.) para la producción de proteínas recombinantes. Se crecieron en caldo LB o agar LB, con el antibiótico apropiado cuando fue necesario, a 37 °C por 18 h.

**Genotipo *E. coli* XL1-Blue:** *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' *proAB lacI qZ*ΔM15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>)].

**Genotipo *E. coli* DH5 *alpha*:** *fhuA2* Δ (*argF-lacZ*) U169 *phoA glnV44* Φ80 Δ (*lacZ*) M15 *gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17*.

**Genotipo *E. coli* BL21 (DE3)/pLysS:** F<sup>-</sup>, *ompT, hsdSB (rB<sup>-</sup>, mB<sup>-</sup>), dcm, gal, λ* (DE3), pLysS, Cm<sup>r</sup>.

Todas las cepas de *E. coli* se conservaron a -70 °C en caldo LB-glicerol 30 %.

### 3.2.2 Medios de cultivo

**Caldo/Agar LB [127]:** Triptona 10 g, extracto de levadura 5 g, NaCl 5 g, agua destilada csp. 1000 ml. Cuando fue necesario el medio agarizado, se agregó Agar 15 g.

### 3.2.3 Clonado de EspA, EspB, e Int- $\gamma$ 280

Las secuencias de EspA (579 pb), EspB (945 pb), y del fragmento C-terminal de 280 aminoácidos de Intimina y (Int-γ280; 843 pb) se obtuvieron por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de la cepa 146N (EHEC O157:H7) aislada de terneros. Los cebadores diseñados y las condiciones de amplificación se muestran en la tabla 9.

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 50 µl compuesto por 5 µl de ADN templado, Tris-HCl (pH 9.0) 10mM, KCl 50mM, Triton X-100 0,1%, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, 0,2 mM de cada desoxinucleósido trifosfato, 30 pmol de cada cebador, y 1,5 U de Taq polimerasa (Invitrogen, Brasil).

Tabla 9: Secuencias, *primers*, posiciones y condiciones de amplificación para el clonado de las proteínas elegidas. Los sitios para las enzimas de restricción *Bam*HI e *Hind*III aparecen subrayados.

Gen o fragmento	N° Acceso GenBank	Secuencias cebadores (5'→3')	Posición	Condiciones de amplificación
<b>EspA</b>	AY223511	espAfor <u>GGATCC</u> ATGGATACATCAACTGCAACATC espArev <u>AAGCTT</u> TATTATTACCAAGGGATATTGCTG	1–579	94 °C, 2 min (1 ciclo); 94 °C, 1 min; 55 °C, 1 min; 72 °C, 1 min (30 ciclos)
<b>EspB</b>	U65681	espBup2 <u>GGATCC</u> ATGAATACTATTGATTATAC espBrev <u>AAGCTT</u> TAAACCAGCTAAGCGAACCG	1–945	94 °C, 2 min (1 ciclo); 94 °C, 1 min; 50 °C, 1 min; 72 °C, 1 min (30 ciclos)
<b>Intimina y (Fragmento C-terminal)</b>	Z11541	cteraeaup <u>GGATCC</u> CAAACCAAGGCCAGCATTAC Grev <u>AAGCTT</u> TATTCTACACAAACCGCATAGA	1962–2804	94 °C, 1 min; 53 °C, 1 min; 72 °C, 1 min (30 ciclos)

Posteriormente, las secuencias se clonaron en el vector pGEM T Easy (Promega, EE. UU.). Este vector (figura 9) está abierto y contiene una T agregada en sus extremos 3', lo que permite aprovechar las A protruientes que deja la *Taq* polimerasa en los extremos 3' de los amplicones, para ligarlos siguiendo las instrucciones del fabricante. Las construcciones así generadas se utilizaron para amplificar y extraer los fragmentos de ADN que fueron secuenciados y posteriormente subclonados en un vector de expresión.

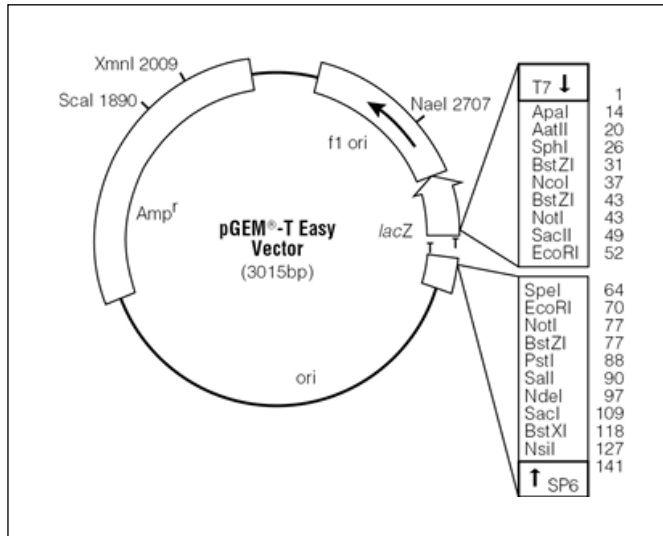


Fig. 9: El vector pGEM T Easy, utilizado para el clonado de las secuencias EspA, EspB e Int-γ280.

**Preparación del templado:** El ADN molde se obtuvo de un cultivo o una colonia.

**ADN obtenido de cultivo:** Se sembró una colonia en 5 ml de caldo LB. Se dejó crecer a 37 °C por 16 h. Se tomó 1 ml del cultivo, se centrifugó 2 min a 10000 rpm, se eliminó el sobrenadante. Se resuspendió el *pellet* en 200 µl de agua destilada estéril, se llevó a 100 °C por 7 min. Se centrifugó 2 min a 10000 rpm, y se recuperó el sobrenadante con el ADN.

**ADN obtenido de colonia:** Se tomó una colonia y se resuspendió en 50 µl de agua destilada estéril. Se llevó a 100 °C por 7 min. Se centrifugó 2 min a 10000 rpm, se recuperó el sobrenadante con el ADN.

### 3.2.4 Preparación de células competentes de *Escherichia coli* y transformación

Se siguió el método de Nishimura *et al.* [128]. Se tomaron 0,5 ml de un cultivo de 16 h y se inocularon en 50 ml de medio A (Caldo LB suplementado con MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 10 mM y glucosa 0,2 %). Se dejó crecer en aireación a 37 °C hasta fase logarítmica media.

Se colocó el cultivo en hielo 10 min, posteriormente se centrifugó 10 min a 1500 x g, 4 °C.

Se resuspendieron suavemente las células en 0,5 ml de medio A previamente enfriado en hielo, se agregó 2,5 ml de solución de almacenamiento B [Caldo LB suplementado con glicerol 36 %, polietilenglicol (PM 7500) 12 %, MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 12 mM y esterilizado por filtración] y se mezcló bien, sin agitación. Se guardaron las células competentes en alícuotas de 0,1 ml a -70 °C hasta su utilización.

Para la transformación, se descongelaron las células en hielo, se mezclaron inmediatamente con 5 µl de ADN y se incubaron a 4 °C por 15-30 min. Luego se dio un choque térmico a 42 °C durante 60 seg; y se dejó en hielo 1-2 min. Posteriormente se agregaron 0,9 ml de caldo LB y se incubó 1 h a 37 °C, con agitación. Se sembró en placas de agar LB con el agregado de los reactivos adecuados para seleccionar las bacterias transformadas. Para el clonado en pGEM T Easy se utilizaron placas con 100 µg/ml de ampicilina, sobre la cuales se habían esparcido 100 µl de una solución 100 mM de IPTG (isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido; Promega, EE. UU.) y 20 µl de una solución 50 mg/ml de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido; Promega, EE. UU.).

### **3.2.5 Extracción de plásmidos de *Escherichia coli***

Esta técnica [129], conocida también como lisis alcalina, se basa en un cambio brusco de pH pasando de una etapa de ruptura celular y desnaturalización del ADN (con una solución de lisis a pH 12,5), a una de neutralización y precipitación del ADN cromosómico desnaturalizado junto a proteínas y restos celulares (con una solución de acetato de potasio a pH 4,8). Las dos hebras de ADN plasmídico desnaturalizadas permanecen enlazadas una con la otra. En un paso posterior de centrifugación, el ADN plasmídico, ya renaturalizado, se mantiene en solución mientras que el resto forma un *pellet*.

Se tomó 1,5 ml de un cultivo de 18 h, se centrifugó 2 min a 13000 rpm y se descartó el sobrenadante. Se resuspendió con 100 µl de TEG (Tris 25 mM, EDTA 10 mM, Glucosa 50 mM) y se dejó 5 min a temperatura ambiente. Se adicionaron 200 µl de solución de lisis (NaOH 0,2 N, SDS 1%) y se mezclaron con movimientos suaves. Se dejó en hielo 5 min. Se agregaron 150 µl de acetato de potasio 3 M pH 4,8; se invirtieron hasta obtener una mezcla homogénea y se llevó a hielo 5 min. Se centrifugó 10 min a 13000 rpm a 4 °C y se pasó el sobrenadante a un tubo nuevo. Se agregó un volumen de alcohol isopropílico al sobrenadante y se dejó a temperatura ambiente 20 min; con frecuentes inversiones. Se centrifugó 10 min a 13000 rpm a 4 °C, se lavó con etanol 70 %; se centrifugó a 13000 rpm 3 min y se dejó secar. Se resuspendió en 100 µl de TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1mM, pH 8) o agua.

Cuando fue necesaria una extracción de plásmidos o productos de PCR purificados, por ejemplo para secuenciación o ligación, se recurrió a *kits* comerciales como *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega, EE. UU.) o *QIAprep Spin Miniprep* (Quiagen, EE. UU.).

**Electroforesis en Geles de Agarosa:** Las corridas electroforéticas de los plásmidos provenientes de *E. coli* se realizaron a  $65 \text{ V/cm}^2$  durante 90 min utilizando una concentración de agarosa de 0,75 % en *buffer* TAE 1X y los geles fueron teñidos con BrEt 10 mg/ml [130]. Se emplearon cubas de electroforesis (Bio-Rad, EE. UU.) y fuente de poder (Bio-Rad, EE. UU.).

Para productos de PCR se utilizaron geles de agarosa 1 %, en *buffer* TAE 1X y las corridas electroforéticas se realizaron a  $75 \text{ V/cm}^2$ .

Los resultados se analizaron con el sistema de documentación de geles UVIdoc (Uvitec, Reino Unido).

**Composición del *buffer* de corrida TAE (50X)** [127]: Tris base 242 g, ácido acético glacial 57,1 ml, EDTA 0.5M (pH 8) 40 ml, agua destilada esterilizada csp. 1000 ml. La solución 1X se preparó diluyendo el *buffer* 50X en agua destilada.

**Marcadores de Peso Molecular:** Para determinar el tamaño de plásmidos y fragmentos de PCR en geles de agarosa, se utilizaron dos marcadores de peso molecular: Ladder 100 pb y Ladder 1 kpb (Productos Bio-Lógicos, Argentina).

### **3.2.6 Subclonado en el vector de expresión y producción de EspA, EspB e Int- $\gamma$ 280 recombinantes**

Los fragmentos de ADN clonados en el vector pGEM T Easy se cortaron con las endonucleasas de restricción *HindIII* y *BamHI* (Fermentas, Lituania) en los sitios específicos presentes en los *primers* diseñados, luego se unieron al vector pRSET A (figura 10) cortado con las mismas enzimas.

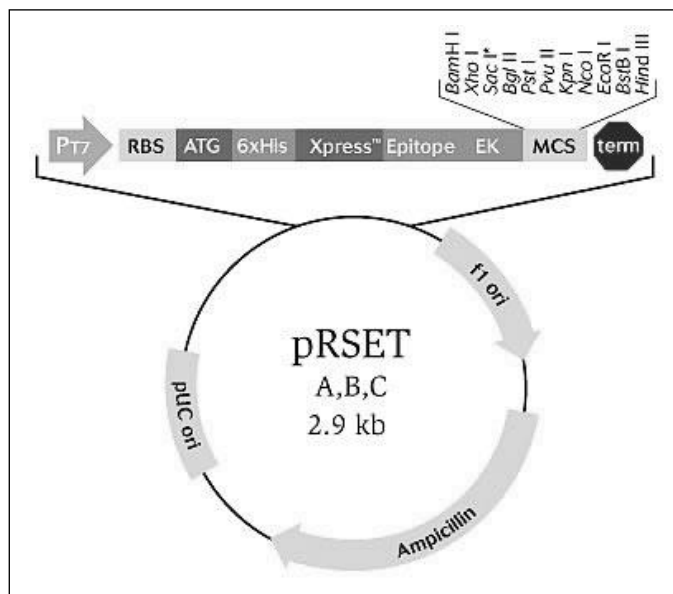


Fig. 10: El vector pRSET A, empleado para expresión de proteínas en *E. coli* BL21.

Este vector tiene, entre sus características, la capacidad de generar una alta producción de proteínas, controlada por el promotor del bacteriófago T7; y el agregado, en el extremo N-terminal de la proteína producida, de un segmento de 6 histidinas consecutivas. Este segmento de polihistidinas sirve luego para la purificación del producto logrado. Con las construcciones resultantes se transformaron células competentes de *E. coli* BL21 (D3)/pLysS siguiendo el protocolo de transformación química ya descrito (página 42). Las colonias que resultaron positivas para el subclonado, fueron confirmadas por PCR, digestión con enzimas de restricción y secuenciación.

**Digestión con Enzimas de Restricción** [130]: Para un volumen final de 20  $\mu$ l, los reactivos detallados en la Tabla 10 se colocaron en un tubo de 1,5 ml. Se incubó 1 a 2 h a la temperatura óptima de cada enzima. Para el caso de *Hind*III y *Bam*HI, es posible hacer tanto digestiones sucesivas como una doble digestión a 37 ° C.

**Ligación:** Para unir los fragmentos de ADN y el vector pRSET A cortados con *Hind*III y *Bam*HI se utilizó la ligasa del bacteriófago T4 (Promega, EE. UU.) tomado en cuenta las recomendaciones del fabricante en cuanto a la relación molar vector:inserto.

Tabla 10: Reactivos y volúmenes sugeridos para la digestión con Enzimas de Restricción

Reactivos	Volumen
Buffer de la enzima (10X)	2 $\mu$ l (1/10 de vol. final)
ADN <sup>a</sup>	0,5 a 1 $\mu$ l
Albúmina sérica bovina <sup>b</sup>	0,2 ml
Enzima de restricción	0,5 a 1 $\mu$ l
Agua destilada estéril	csp. 20 $\mu$ l

<sup>a</sup>: según la concentración en que se encuentre el ADN.

<sup>b</sup>: según lo prescrito en las indicaciones del proveedor de la enzima.

### 3.2.7 Expresión y purificación de las proteínas recombinantes

Para la expresión y purificación de las proteínas recombinantes se siguieron las indicaciones de los proveedores de los reactivos y el trabajo de McKee y O'Brien [131].

Se sembró una colonia de *E. coli* BL21 transformada con el plásmido indicado en 5 ml de caldo LB con ampicilina (100  $\mu$ g/ml) y cloranfenicol (50  $\mu$ g/ml). Se dejó toda la noche en agitación a 37 °C. Se inocularon 250  $\mu$ l del cultivo por cada 25 ml de caldo LB (precalentado a 37 °C) sin antibióticos y se dejaron crecer las bacterias en agitación hasta una DO<sub>600</sub> 0,6-0,8. Se indujeron con IPTG 1 mM y se dejaron 4 h en agitación vigorosa a 37 °C. Se centrifugó el cultivo (300 x g, 10 min, 4 °C) y se descartó el sobrenadante.

#### Preparación del lisado celular

Se equilibró el *buffer* A (cloruro de guanidina 6 M; fosfato de sodio 20 mM; NaCl 500mM; pH 7,8) a 37 °C. Se lisaron las bacterias con *buffer* A en agitación suave, 1 h a temperatura ambiente. Se utilizaron 5ml de *buffer* A por cada g de peso húmedo del pellet. Se sonicó el lisado celular, en hielo, con tres pulsos de 5 seg a intensidad alta. Se centrifugó el lisado celular (10000 x g, 15 min, 4 °C). Se descartó el precipitado.

#### Preparación de la columna

Se resuspendió bien la resina ProBond® (resina quelante de níquel, Invitrogen EE. UU.) invirtiendo suavemente, varias veces, su envase contenedor. Se colocaron 2 ml de resina en una columna de purificación de 10 ml y se dejó que se asentara por gravedad (5-10 min). Se extrajo cuidadosamente el sobrenadante. Se agregaron 6 ml de agua destilada estéril y se resuspendió la resina por inversión suave de la columna. Se permitió que la resina se asentara y se eliminó el sobrenadante. Se agregaron 6 ml de *buffer* de desnaturalización (urea 8 M,



fosfato de sodio 20 mM, NaCl 500mM, pH 7,8) Se resuspendió la resina. Se permitió que la resina se asentara y se eliminó el sobrenadante. Se repitió el lavado con *buffer* de desnaturalización una vez más.

### **Purificación**

Se agregaron 8 ml de lisado celular procesado a una columna preparada. Se permitió la unión del lisado y la resina, con agitación suave, 15-30 min a temperatura ambiente.

Se dejó que la resina se asentara y se eliminó el sobrenadante. Se lavó la columna con 4 ml de *buffer* de desnaturalización. Se dejó que la resina se asentara y se eliminó el sobrenadante. Se repitió este paso una vez más.

Se lavó la columna con 4 ml de *buffer* de lavado (urea 8 M, fosfato de sodio 20 mM, NaCl 500mM, pH 6). Se dejó que la resina se asentara y se eliminó el sobrenadante. Se repitió este paso una vez más.

Se lavó la columna con 4 ml de *buffer* de lavado pH 5,3. Se dejó que la resina se asentara y se eliminó el sobrenadante. Se repitió este paso una vez más.

Se colocó la columna en posición vertical y se quitó la tapa del extremo inferior. Se eluyó la proteína con 5 ml de *buffer* de elución (urea 8 M, fosfato de sodio 20 mM, NaCl 500 mM) pH 4. Para evaluar el proceso de purificación se tomó una alícuota en cada paso y se la sometió a una electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE). Las bandas se visualizaron por tinción con azul de Coomassie.

La detección de las bandas de proteínas en un gel se basa en la unión del azul de Coomassie a las mismas. El límite de detección es de 0,3 a 1 µg de proteína por banda. En este procedimiento, las proteínas separadas en un gel de poliacrilamida se precipitan con una solución fijadora. La ubicación de las proteínas precipitadas se detecta mediante la aplicación de solución de tinción, seguida de solución de desteñido. Las proteínas aparecen azules contra un fondo claro. El gel puede ser guardado en agua, secado, o fotografiado según convenga para su uso posterior.

**Solución de tinción Azul de Coomassie** [127]: azul brillante de Coomassie R-250 0,006 % (p/v), ácido acético 10 % (v/v), H<sub>2</sub>O 90 %.

**Componentes de un gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) [130]**

Gel concentrador 5% (2 ml)
H <sub>2</sub> O
Acrilamida-Bisacrilamida 30 % - 0,8 %
Tris 1,0 M (pH 6,8)
SDS 10 %
Persulfato de amonio 10 %
TEMED

Gel de resolución 12% (5 ml)
H <sub>2</sub> O
Acrilamida-Bisacrilamida 30 % - 0,8 %
Tris 1,5 M (pH 8,8)
SDS 10 %
Persulfato de amonio 10 %
TEMED

**Buffer de carga 2X [130]:** Tris-Cl (pH 6,8) 50 mM, SDS 4% (p/v), azul de bromofenol 0,1 %, ditiotretitol 0,2 M ó 2-mercaptoetanol 0,2 %, glicerol 20%.

**Solución fijadora:** isopropanol 25 % (v/v), ácido acético 10 % (v/v).

**Solución de desteñido:** metanol 5 % (v/v), ácido acético 7 % (v/v).

Para remover la urea de las eluciones, y renaturalizar las proteínas, se las sometió a diálisis en *buffer* fosfato salino (PBS) pH 7,4. Para ello se utilizó una membrana Spectra/Por 2 (Spectrum Laboratories, EE. UU.) con un corte de 12000-14000 Da.

**Buffer fosfato salino pH 7,4 (PBS, phosphate-buffered saline) [130]:** NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mM, Agua destilada csp. 1000 ml.

Para medir la concentración de la proteína purificada se utilizó el método de Bradford, por medio del *kit Bio-Rad Protein Assay* (Bio-Rad, EE. UU.) siguiendo las indicaciones del fabricante. Cuando fue necesario estimar cantidades en SDS-PAGE, se recurrió a densitometría utilizando los programas ImageJ (*National Institutes of Health*, EE. UU.) y UviDoc (UviTec, Reino Unido).

### 3.2.8 Western blot

Para evaluar la presencia de las polihistidinas en las proteínas recombinantes producidas, y ver si las mismas se corresponden con el tamaño esperado, se recurrió a un *western blot*.

Luego de realizar un SDS-PAGE en condiciones reductoras, cargando 2,5 µg de proteína recombinante por pocillo, se transfirieron las proteínas del gel a una membrana de

nitrocelulosa de 0,45  $\mu\text{m}$  (Amersham-Pharmacia, Alemania). La membrana se bloqueó 2 h con leche descremada 5 % en TBS (Tris-HCl 100 mM, pH 7,5; NaCl 150 mM) con agitación. Se lavó tres veces con TBST (TBS pH 7,5 - 0,05 % Tween-20), y se incubó por 2 h con el anticuerpo primario, en este caso una dilución 1:5000 de anti-His producido en ratón (Invitrogen, EE. UU.). Luego se lavó tres veces con TBST y se incubó de nuevo 2 h con el anticuerpo secundario, en este caso anti-ratón conjugado con fosfatasa alcalina (Sigma-Aldrich, EE. UU.) diluido 1:30000 en TBST. Finalmente, luego de tres últimos lavados con TBST, se reveló con el sistema de detección colorimétrica BCIP/NBT (5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato/nitrozul de tetrazolio; Promega, EE. UU.) según instrucciones del fabricante.

### 3.3 Resultados

#### 3.3.1 Amplificación y clonado de las secuencias de ADN de las proteínas

En la figura 11 se observa el producto de las amplificaciones por PCR de las secuencias seleccionadas (EspA, EspB e Int- $\gamma$ 280) a partir del templado de ADN de la cepa EHEC 146N.

Las secuencias de ADN se purificaron y se utilizaron para ligarlas al vector pGEM T Easy; posteriormente se subclonaron en el vector pRSET A y se expresaron en la cepa de *E. coli* BL21 (DE)/pLysS. Los resultados de la secuenciación de los amplicones producidos pueden encontrarse en el anexo al final de esta tesis.

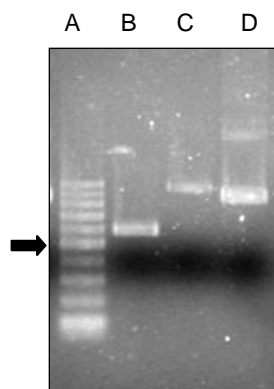


Fig. 11: Resultado de la amplificación de las secuencias para clonado. A) Marcador de peso molecular de 100 pb, la flecha indica 500 pb. B) Fragmento EspA/579 pb. C) Fragmento EspB/945 pb. D) Fragmento Int- $\gamma$ 280/843 pb.

#### 3.3.2 Expresión y purificación de las proteínas recombinantes

Las proteínas recombinantes se expresaron cuando fueron inducidas con 1 mM de IPTG, como se puede ver para el caso de Int- $\gamma$ 280 en la figura 12.

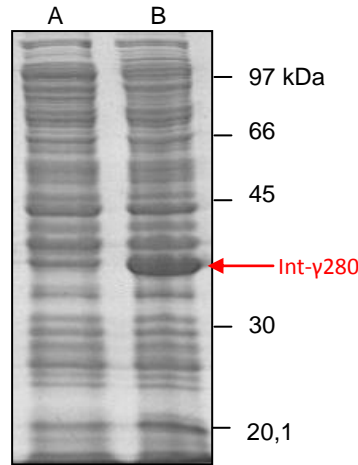


Fig. 12: SDS-PAGE de extractos de cultivos de *E.coli* BL21/pRSET A::Int- $\gamma$ 280 analizados en un SDS-PAGE teñido con Azul de Coomassie. A) *E. coli* sin Inducir. B) *E. coli* inducido con IPTG. La flecha indica la posición de la proteína recombinante.

La purificación de las proteínas se realizó como se describió anteriormente; pueden observarse los resultados para Int- $\gamma$ 280, EspA y EspB en la figura 13.

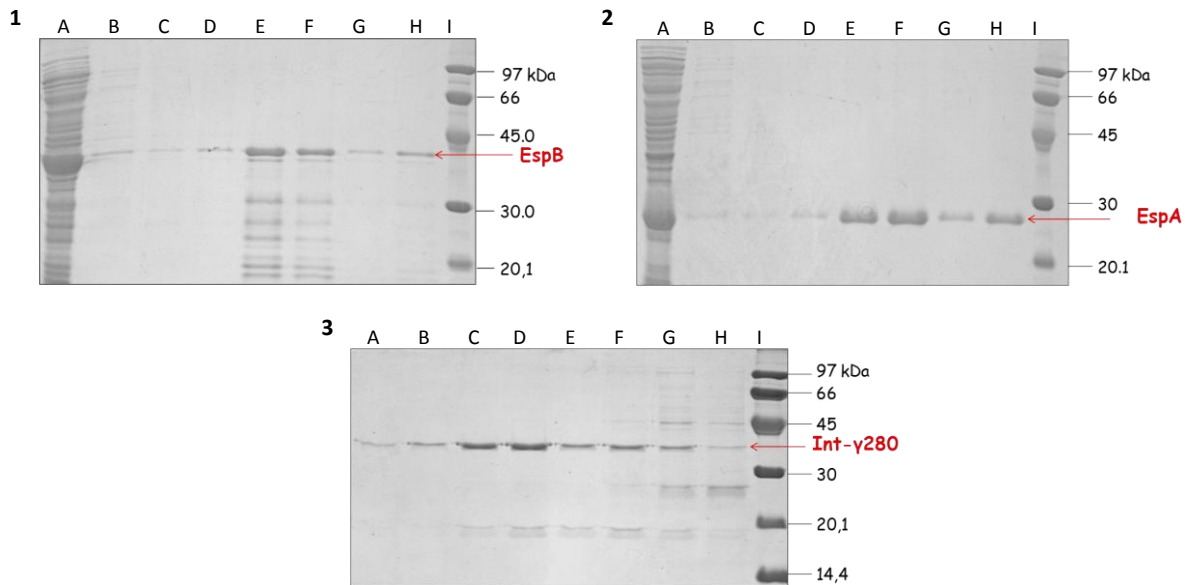


Fig. 13: SDS-PAGE que muestran la secuencia de purificación de las proteínas recombinantes en condiciones desnaturalizantes.  
 1- EspB: A) Extracto crudo de cultivo de *E.coli* BL21/pRSET A::EspB inducido; B) 1° lavado; C) 2° lavado; D) 3° lavado; E-H) Distintas eluciones, I) Marcador de peso molecular.  
 2- EspA: A) Extracto crudo de cultivo de *E.coli* BL21/pRSET A::EspA inducido; B) 1° lavado; C) 2° lavado; D) 3° lavado; E-H) Distintas eluciones, I) Marcador de peso molecular.  
 3- Int- $\gamma$ 280: A-D) Distintas eluciones E-H) Distintos lavados, I) Marcador de peso molecular.

Para la confirmación de la presencia de la secuencia de 6-His en los productos recombinantes, se realizó un *western blot*, como se muestra en la figura 14. Los pesos moleculares resultantes fueron: 26 kDa (EspA), 42 kDa (EspB) y 36 kDa (Int-γ-280).

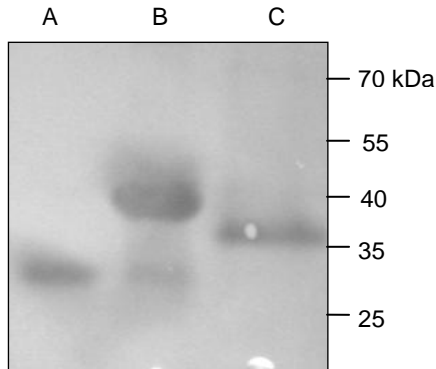


Fig. 14: *Western blot* de las proteínas recombinantes purificadas utilizando como anticuerpo primario Anti-His. A) EspA. B) EspB. C) Int-γ280.

Por cada 100 ml de cultivo bacteriano inducido se obtuvieron los parámetros de producción que se observan en la tabla 11.

Tabla 11: Parámetros de producción de las proteínas recombinantes obtenidas en un cultivo de 100 ml de *E. coli* BL21 (transformada con el plásmido correspondiente) y purificadas por cromatografía de afinidad.

Proteína	Nivel de Expresión	Prot. Total en 100 ml	Rendimiento	Peso Húmedo	mg en 100 ml	mg por g de Peso Húmedo
EspA	33,6 %	14,2 mg	17,5 %	0,5 g	0,830	1,7
EspB	5,41 %	14,1 mg	45 %	0,5 g	0,334	0,7
Int-γ280	20,58 %	11 mg	42 %	0,6 g	0,971	1,6

### 3.4 Discusión

Se seleccionaron 3 proteínas que están involucradas en la adherencia y colonización de EHEC O157:H7: el tercio C-terminal de Intimina (Int-γ280), EspA y EspB. Las secuencias se clonaron y amplificaron, utilizando como templado el ADN de la cepa local 146N (O157:H7), en el plásmido pGEM T Easy, y luego se subclonaron en el vector de expresión pRSET A para producir las proteínas recombinantes EspA, EspB, e Int-γ280. Las proteínas, con un segmento

de 6 histidinas en su extremo N-terminal, se purificaron en condiciones de desnaturalización por cromatografía de afinidad en columnas de agarosa Ni-NTA. Los productos purificados reaccionaron con anticuerpos comerciales anti-His, lo que confirmó que los mismos contenían la secuencia 6-His. La secuenciación mostró que, efectivamente, se habían amplificado las secuencias correctas de EspA, EspB e Intimina correspondientes a cepas de EHEC O157. De la misma manera, el peso molecular se correspondió con lo esperado para estas proteínas. El nivel de expresión alcanzado fue de entre 5 % y 33 % de la proteína total presente en los lisados. Los rendimientos de proteínas recombinantes variaron desde 0,7 mg hasta 1,7 mg por gramo de células en peso húmedo. De la misma manera que McKee y O'Brien [131], no observamos efecto tóxico de las proteínas recombinantes expresadas, y decidimos realizar la purificación en condiciones desnaturalizantes con la adición de urea en todos los pasos para evitar que las proteínas quedaran en el *pellet* insoluble luego de la sonicación. Pero a diferencia de estas autoras, que obtuvieron entre 100 y 200 µg de proteína recombinante por cada ml de cultivo inducido, se obtuvo aproximadamente 10 µg en el mismo volumen en el mejor de los casos. Esta es una diferencia notable, y tal vez se deba a la utilización de un vector de expresión (pQE32) y cepas de *E. coli* (M15 y SG13009) distintos a los empleados en este trabajo. De todas maneras, es evidente que se pueden realizar ajustes para aumentar el nivel de expresión de Int-γ280, EspA y EspB, que presenta variaciones entre las mismas.

Las proteínas purificadas de la manera descrita se utilizaron en todos los ensayos posteriores.

## **4.0 Producción de Suero Policlonal contra EspA, EspB e Int-γ280 Recombinantes en Ratones**

## 4.1 Introducción

Para evaluar la inmunogenicidad de las proteínas recombinantes generadas en un modelo animal, y generar anticuerpos contra ellas que nos sirvieran para pruebas posteriores, se procedió a inocular ratones con EspA, EspB, e Int- $\gamma$ 280.

## 4.2 Materiales y Métodos

### 4.2.1 Animales e instalaciones

Se utilizaron ratones de 6 semanas de la cepa BALB/c. Los animales fueron alojados en el bioterio del Instituto de Biotecnología del Centro de Investigaciones en Ciencias Veterinarias y Agronómicas (CICVyA). Todos los ensayos se realizaron siguiendo los lineamientos de Comité de Bienestar Animal del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA).

### 4.2.2 Diseño experimental

Se utilizaron 2 ratones por cada proteína recombinante. Se inocularon EspA, EspB e Int- $\gamma$ 280 por vía intraperitoneal (IP), según el siguiente esquema (figura 15):

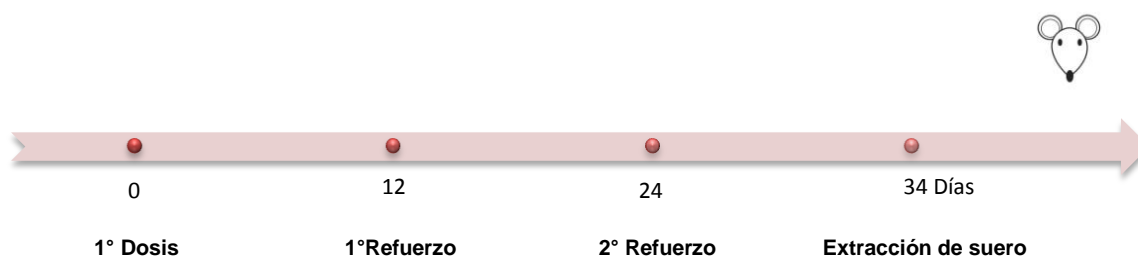


Fig. 15: Esquema del ensayo de producción de anticuerpos policlonales contra las proteínas EspA, EspB e Int- $\gamma$ 280 en ratones.



- 1º Dosis: 25 µg de proteína recombinante con adyuvante completo de Freund (Sigma Chemical, EE. UU.).
- 1º Refuerzo: a los 12 días; 10 µg de proteína con adyuvante incompleto de Freund (Sigma Chemical, EE. UU.).
- 2º Refuerzo: a los 24 días; 10 µg de proteína con adyuvante incompleto de Freund.
- Sangrado de ratones y obtención de suero: a los 10 días del último refuerzo.

#### 4.2.3 Preparación de suero de ratón

La sangre se obtuvo por medio en una pequeña incisión de la vena lateral de la cola. Se la dejó a temperatura ambiente 4 h para que se formase un coágulo, luego fue llevada a 4 °C por 16 h. Se centrifugó 10 min a 2700 x g, 4 °C. Se extrajo y guardó el suero en alícuotas a –20 °C hasta su utilización.

#### 4.2.4 Enzimoimmunoensayo (ELISA) para suero

Las muestras de suero fueron analizadas para detectar la presencia y el nivel de los anticuerpos IgG generados contra las proteínas recombinantes (EspA, EspB e Int-γ280).

Se cubrieron los pocillos de una placa de microtitulación de 96 pocillos MaxiSorp (Nunc, Dinamarca), de poliestireno, ópticamente clara y fondo plano, con 100 µl de la proteína purificada (1 µg) en PBS. Se dejó *overnight* a 4 °C. Se descartó la solución con la proteína no adherida mediante un giro rápido de la placa sobre un recipiente adecuado. Se bloquearon los sitios inespecíficos de los pocillos con una solución de bloqueo (PBS-leche descremada 5 %). Se lavó la placa tres veces con 300 µl de PBST (PBS pH 7,4 - Tween-20 0,05 %).

Se prepararon diluciones seriadas del antisuero específico en PBST. Se agregaron 100 µl de muestra a cada pocillo y se incubó 1 h con agitación, a temperatura ambiente. Se lavaron los pocillos tres veces con PBST.

Se agregaron 100 µl del anticuerpo secundario, anti-ratón conjugado con peroxidasa (Cayman Chemical Company, EE. UU.), diluido en PBST (1:3000). Se incubó 1 h con agitación, a temperatura ambiente. Se lavaron los pocillos tres veces con PBST.

Se agregaron 100 µl de solución sustrato para peroxidasa [ABTS, ácido 2,2'-azino-di (3-etil-benzotiazolin-6-sulfónico); Amresco, EE. UU.] a una concentración de 20 mg/ml con 0,03 % de

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y se incubó hasta desarrollo de color (10-15 min) a temperatura ambiente y con agitación. La reacción se detuvo con 100 µl de SDS 5 %. Se midió la densidad óptica a 405 nm (DO<sub>405</sub>) con un lector ELx808 BioTek (BioTek Instruments, EE. UU.). Todas las determinaciones se hicieron por triplicado.

#### **4.2.5 Western blot**

Se realizó para comprobar la especificidad y funcionalidad de los anticuerpos generados contra las proteínas recombinantes. También se examinó el reconocimiento de las proteínas nativas por parte de las IgG séricas obtenidas.

Para las proteínas recombinantes se siguió el protocolo descrito en la página 48, con algunas variaciones. Se sembró un gel SDS-PAGE con 2,5 µg de cada una de ellas. Luego de la corrida electroforética se realizó una transferencia a una membrana de nitrocelulosa. La membrana se bloqueó con PBS-leche descremada 5 %. Se lavó con PBST, y se incubó el anticuerpo primario, en este caso una dilución de suero de ratón (1:1000 para EspB e Int-γ280 y 1:300 para EspA). Luego se lavó con PBST y se incubó de nuevo con el anticuerpo secundario, en este caso anti-ratón conjugado con fosfatasa alcalina diluido 1:30000 en PBST. Finalmente, se reveló con el sistema de detección colorimétrica BCIP/NBT según instrucciones del fabricante.

Para las proteínas nativas producidas se siguieron las indicaciones de Stevens *et al.* [132]. Básicamente, se hicieron crecer las bacterias (cepa *E. coli* 146N y cepa *E. coli* DH5 *alpha* como control negativo) en medio esencial Dulbecco modificado con alta glucosa y piruvato (DMEM, Gibco EE. UU.) sin rojo fenol hasta fase logarítmica media. Se tomó 1 ml del cultivo, se centrifugó 3 min a 10000 rpm, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet con 50 µl de *buffer* de carga y se sembró 10 µl en un gel SDS-PAGE. Luego de la transferencia a una membrana de nitrocelulosa, se siguió el mismo procedimiento que el descrito para las proteínas recombinantes en el párrafo anterior.

### **4.3 Resultados**

Se obtuvo suero hiperinmune murino con anticuerpos IgG contra las tres proteínas ensayadas.

El nivel de respuesta pudo ser determinado mediante un ELISA, que mostró el

comportamiento de las IgG séricas generadas para cada una de las proteínas recombinantes en distintas diluciones (figura 16).

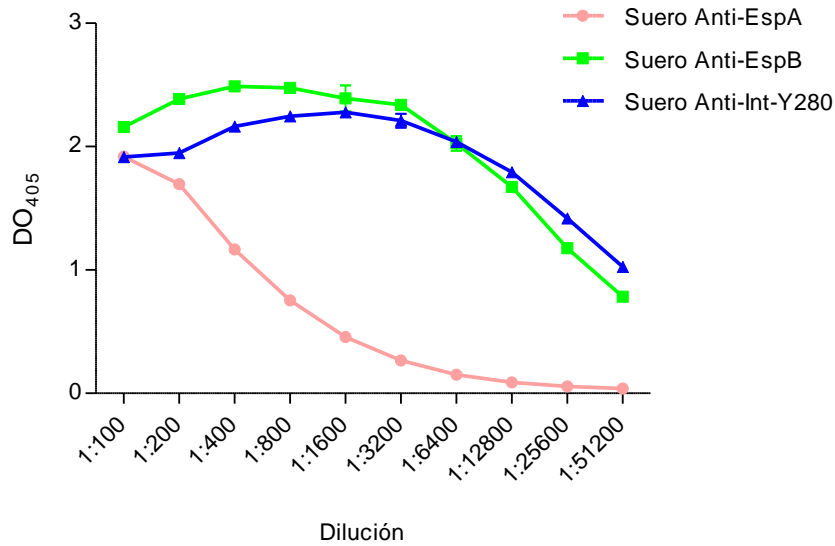


Fig. 16: ELISA de sueros de ratones inmunizados con las proteínas recombinantes EspA, Esp e Int-γ280. En el eje Y se observa la DO<sub>405</sub>, mientras que en el eje X se ven las distintas diluciones de los sueros.

La realización de *western blots* permitió ver la especificidad de las respuestas de los anticuerpos generados contra las proteínas recombinantes purificadas y también el reconocimiento de las proteínas nativas en lisados bacterianos de EHEC 146N. En el primer caso se observó el reconocimiento de las proteínas purificadas, y hubo una reacción altamente específica para EspA, EspB e Int-γ280 (figura 17) Mientras que para el caso de los lisados de

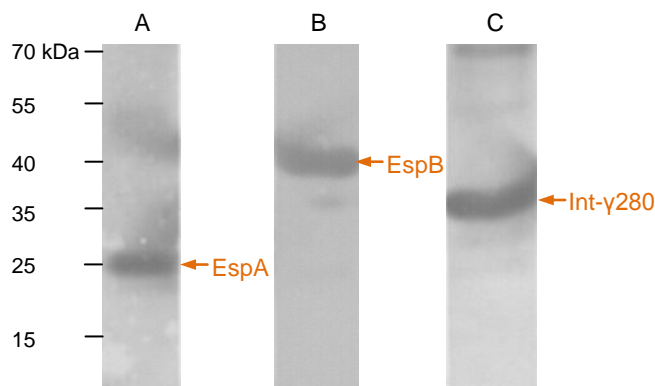


Fig. 17: *Western blot* realizado con suero de ratones inmunizados con las proteínas recombinantes EspA, EspB e Int-γ280 contra las proteínas purificadas. A) Suero de ratón vacunado con EspA contra EspA recombinante. B) Suero de ratón vacunado con EspB contra EspB recombinante. C) Suero de ratón vacunado con Int-γ280 contra Int-γ280 recombinante.

EHEC O157:H7 fue posible el reconocimiento, por parte del suero hiperinmune correspondiente, de las proteínas nativas producidas a la altura de sus pesos moleculares esperados de 24 kDa (EspA), 37 kDa (EspB) y 94-97 kDa (Intimina). No ocurrió lo mismo con los lisados de la cepa control DH5 *alpha* (figura 18).

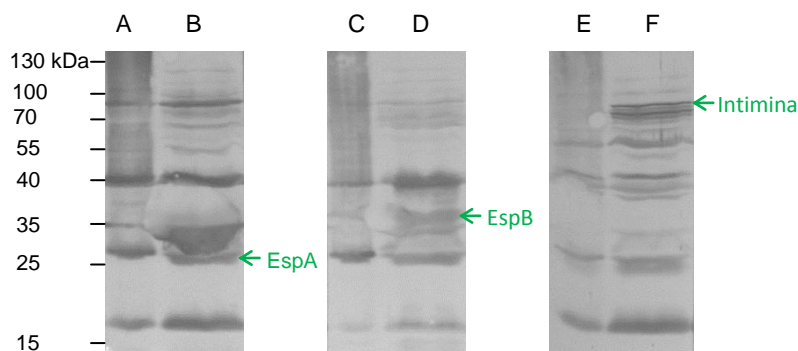


Fig. 18: *Western blot* con suero de ratones inmunizados con las proteínas recombinantes contra los lisados bacterianos. A) Suero de ratón vacunado con EspA contra lisado DH5 *alpha*. B) Suero de ratón vacunado con EspA contra lisado 146N. C) Suero de ratón vacunado con EspB contra lisado DH5 *alpha*. D) Suero de ratón vacunado con EspB contra lisado 146N. E) Suero ratón vacunado con Int- $\gamma$ 280 contra lisado DH5 *alpha*. F) Suero de ratón vacunado con Int- $\gamma$ 280 contra lisado 146N. Las flechas indican la posición de las proteínas nativas.

#### 4.4 Discusión

Se observó que los ratones inmunizados con EspA, EspB e Int- $\gamma$ 280 produjeron anticuerpos IgG que fueron capaces de reconocer a las proteínas recombinantes y a las proteínas nativas producidas por una cepa de EHEC O157:H7. Se pudo constatar que, si bien hubo respuesta para EspA, la misma no fue de la intensidad que se obtuvo para EspB e Int- $\gamma$ 280 sino bastante menor. Esto se puede apreciar en el resultado del ELISA al cotejar las distintas diluciones de los sueros con la  $DO_{405}$  resultante. Algo similar ocurrió cuando fueron ensayadas estas mismas proteínas, en ratones, con el adyuvante de mucosas MALP-2; la menor respuesta inmune correspondió a EspA (comunicación personal del Dr. Carlos Guzmán, *Department of Vaccinology and Applied Microbiology, Helmholtz Centre for Infection Research, Braunschweig, Alemania*), mientras que EspB e Int- $\gamma$ 280 fueron capaces de generar títulos significativos de

anticuerpos IgG e IgA [133]. También en un trabajo realizado por nuestro grupo [101] se detectó un menor nivel de reconocimiento de EspA comparado con EspB e Int- $\gamma$ 280 por parte de IgG de calostro de vacas no inmunizadas experimentalmente. Bretschneider *et al.*, luego de una infección experimental de terneros con EHEC O157:H7, informaron que los títulos de IgG anti-Intimina y EspB se incrementaron significativamente antes y en mayor nivel que EspA, al tiempo que la respuesta anti-EspB demostró ser la de mayor magnitud y duración [94].

Por otra parte, en pacientes humanos, Li *et al.* encontraron mayor respuesta para EspA que para Intimina y EspB recombinantes [95]. En otro estudio se vio que, si bien los pacientes produjeron anticuerpos contra Intimina, EspA y EspB, la mayor sensibilidad y especificidad estuvo dada por las IgG, IgA e IgM contra EspB [134].

Teniendo en cuenta los resultados variables en humanos, y lo observado en terneros y ratones por nuestro grupo y otros investigadores, se decidió utilizar las proteínas recombinantes EspB e Int- $\gamma$ 280 en la composición de una vacuna experimental para ser ensayada en bovinos con el fin de disminuir la colonización de EHEC O157:H7.

## **5.0 Ensayo de Respuesta Inmune en Bovinos**

## 5.1 Introducción

Con la intención de evaluar la inmunogenicidad de las proteínas seleccionadas (EspB e Int- $\gamma$ 280) en bovinos, se procedió a realizar un ensayo que permitiera estimarla. Para la formulación de la vacuna se eligió como adyuvante uno que está autorizado para vacunas veterinarias en Argentina, Montanide™ ISA 206, fabricado por Seppic (Puteaux, Francia). Éste pertenece a la categoría de adyuvantes oleosos minerales y consiste en una emulsión tipo agua-aceite-agua. Las emulsiones (figura 19) pueden ser, dependiendo del surfactante, agua-aceite (la fase antigénica está compuesta de gotitas de agua dispersas en una fase continua oleosa), aceite-agua (la fase continua es el agua y la fase dispersada es el aceite), y agua-aceite-agua (la fase continua es acuosa y la fase dispersada es aceite; pero dentro de las gotitas de aceite hay atrapada una fase acuosa) [135].

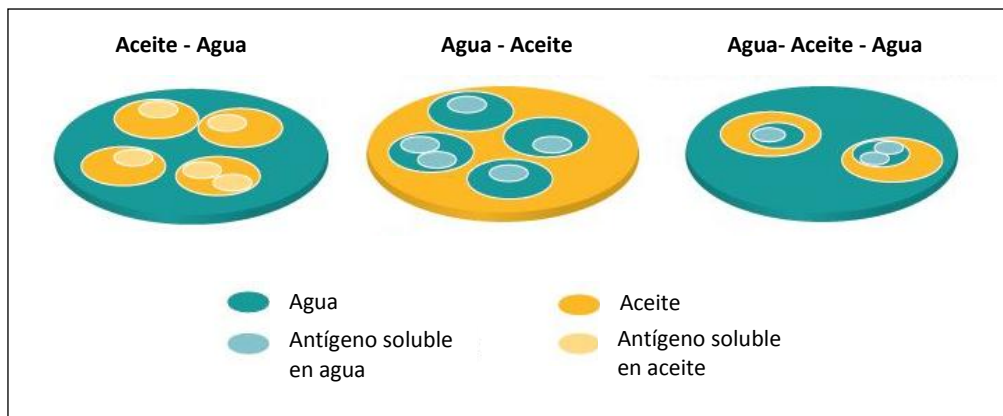


Fig. 19: Los distintos tipos de emulsiones, según el balance hidrofílico/lipofílico. El adyuvante utilizado en este trabajo pertenece al tipo agua-aceite-agua.

Por otra parte, para potenciar la probable respuesta inmune mucosa, se consideró el agregado de calcitriol como inmunomodulador a la formulación. El calcitriol, también conocido como 1- $\alpha$ , 25-dihidroxicolecalciferol [1,25-(OH) $_2$ D $_3$ ], es el metabolito activo de la vitamina D $_3$ . Daynes *et al.* observaron que, al ser agregado como inmunomodulador junto una vacuna subcutánea en ratones se produjo una respuesta aumentada en IgG e IgA en suero y en secreciones

mucosas, como así también un incremento en las células generadoras de IgG e IgA en los tejidos linfáticos sistémicos y los asociados a mucosas [136]. En experiencias con cerdos, Van der Stede *et al.* notaron que, como respuesta a una vacuna vía IM, aumentaron transitoriamente las IgA e IgM séricas, los títulos de IgA en saliva, materia fecal y secreciones nasales, y las IgA específicas junto a las IgG-ASC (Células Secretoras de Anticuerpos) de los ganglios linfáticos locales [137]. En otro ensayo, donde se inmunizaron lechones con fimbrias de ETEC, los animales mostraron una respuesta de IgA específica en suero y una reducción en la excreción fecal de *E. coli* luego de un desafío [138].

El calcitriol ejerce sus efectos en el sistema inmune al unirse a un receptor nuclear (nVDR), presente en linfocitos Th activados, linfocitos T citotóxicos y linfocitos B activados. Esta unión modula la producción de citoquinas reduciendo la producción de, entre otras, IFN- $\gamma$  (Interferón Gamma), IL-2, IL-8, IL-12 y GM-CSF (Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos y Macrófagos). Por otra parte, favorece la inducción de linfocitos T reguladores CD4+CD25+ y aumenta la producción de citoquinas Th2 tales como IL-4 e IL-10. También estimula el TGF- $\beta$  (Factor de Crecimiento Transformante Beta) que está involucrado en la inmunidad mucosa y en el cambio de isotipo hacia IgA e IgG2b. Por lo descripto, esta hormona esteroide puede clasificarse como un adyuvante modulador hacia Th2 [114].

En este ensayo se evaluaron los niveles de anticuerpos generados por dos composiciones vacunales con el fin de determinar si existían diferencias significativas entre la utilización o no de calcitriol.

## **5.2 Materiales y Métodos**

### **5.2.1 Animales e instalaciones**



Los terneros, de entre 6 y 8 meses de edad y raza Holando-Argentino, se adquirieron en el establecimiento San Juan, Luján, provincia de Buenos Aires. Cuando ingresaron al predio del INTA se albergaron en los corrales que posee el CICVyA, y permanecieron allí para su aclimatamiento. Posteriormente, en este mismo predio, se realizó la inmunización de los mismos.

### 5.2.2 Preparación de la vacuna

La formulaciones vacunales se prepararon con las proteínas recombinantes, el adyuvante Montanide® ISA206 y, cuando correspondió, calcitriol (provisto gentilmente por la Bioq. Cynthia Fiorenzo, Delta Biotech SA, Argentina).

De acuerdo a las recomendaciones del fabricante, se llevó el adyuvante a 30 °C. Las proteínas disueltas en PBS se mezclaron con el calcitriol a temperatura ambiente. Para combinar los componentes se agitaron las proteínas con o sin calcitriol en vórtex y se fue agregando de a gotas el adyuvante hasta que se obtuvo una emulsión homogénea.

#### Dosis

**Vacuna IB-D3** (compuesta por las proteínas recombinantes Int- $\gamma$ 280 y EspB, calcitriol y adyuvante)

1 ml Montanide® ISA206 + 1 ml PBS con 100  $\mu$ g de EspB, 100  $\mu$ g de Int- $\gamma$ 280, y 2  $\mu$ g calcitriol. Volumen final 2 ml.

**Vacuna IB** (compuesta por las proteínas recombinantes Int- $\gamma$ 280 y EspB y adyuvante)

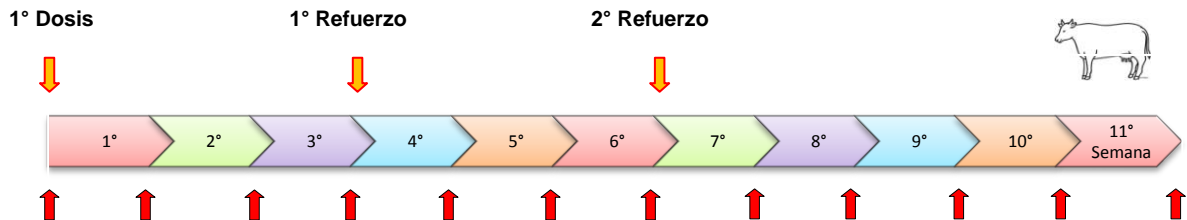
1 ml Montanide® ISA206 + 1 ml PBS con 100  $\mu$ g de EspB y 100  $\mu$ g de Int- $\gamma$ 280. Volumen final 2 ml.

**Control:** 2 ml PBS

Se aplicó 1 ml en cada lado del cuello, en la denominada tabla del cuello de los terneros, vía intramuscular (IM).

### 5.2.3 Diseño experimental

Se utilizaron 6 terneros. Se inocularon 2 con la vacuna IB, 2 con la vacuna IB-D3 y 2 con PBS, según el esquema de la figura 20. Se tomaron muestras de sangre y saliva para seguir el desarrollo de la respuesta inmune de anticuerpos.



1º Dosis: el día 0 del ensayo.

1º Refuerzo: el día 21 del ensayo.

2º Refuerzo: el día 42 del ensayo

↑ Días de obtención de muestras de sangre y saliva, una vez por semana.

Fig. 20: Curso del ensayo de respuesta inmune en bovinos a las vacunas IB e IB-D3.

## 5.2.4 Preparación de suero bovino

Se extrajo por punción venosa 10 ml de sangre y se colocó en un tubo de vidrio. Se dejó a temperatura ambiente 4 h para la formación de un coágulo, luego fue llevada a 4 °C por 16 h. Se removió cuidadosamente el coágulo. Se transfirió el suero a otro tubo y se centrifugó 10 min a 2700 x g y 4 °C. Se guardó el sobrenadante en alícuotas a -20 °C.

## 5.2.5 ELISA para suero bovino

Las muestras de suero fueron analizadas para determinar el nivel de anticuerpos IgG e IgA generados contra las proteínas recombinantes. El protocolo es el mismo descrito en la página 55, con algunas pequeñas variantes.

Se cubrieron los pocillos de la placa con 100 µl de proteína purificada (1 µg) en PBS. Se dejó *overnight* a 4 °C. Se descartó la solución con proteína no adherida. Se bloquearon los sitios inespecíficos con solución de bloqueo (PBS-leche descremada 5 %). Se agregaron 100 µl de la

dilución de suero en PBST (1:2000 para IgG; 1:100 para IgA) a cada pocillo y se incubó 90 min con agitación, a temperatura ambiente. Se agregaron 100 µl del anticuerpo conjugado con peroxidasa (Anti-IgG y Anti-IgA bovinas Bethyl Laboratories, EE. UU.) diluido en PBST 1:8000 y 1:3000, respectivamente. Se incubó 90 min con agitación, a temperatura ambiente. Se agregaron 100 µl de ABTS-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y se incubó hasta desarrollo de color (10-15 min). La reacción se detuvo con 100 µl de SDS 5 %. Se midió la densidad óptica a 405 nm en un lector ELx808 BioTek.

### **5.2.6 Western blot**

Se realizó para confirmar la presencia y especificidad de los anticuerpos contra las proteínas recombinantes en suero (IgG) y saliva (IgA). Se siguió el protocolo ya descrito (página 48), con algunas variaciones inherentes a los distintos tipos de muestra.

Para el suero, básicamente, la membrana de nitrocelulosa se bloqueó con PBS-leche descremada 5 %. Se lavó con PBST, y se incubó con una dilución 1:2000 de suero bovino. Luego se lavó con PBST y se incubó con el anticuerpo secundario, en este caso anti-IgG bovino conjugado con peroxidasa (Bio-yeda, Israel) diluido 1:1000 en PBST. Finalmente, se reveló con 4-Cl-1-naftol/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Pierce, EE. UU.) según instrucciones del fabricante.

En el caso de las muestras de saliva, se utilizó esta secreción a una dilución 1:4. La presencia de anticuerpos IgA específicos se detectó con anti-IgA bovina conjugada con peroxidasa (Bethyl Laboratories, EE. UU.) diluida 1:2000, y finalmente se reveló con el sustrato 4-Cl-1-naftol/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### **5.2.7 Análisis estadístico**

Los datos generados por el ensayo de ELISA fueron analizados por la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, seguida de la prueba de Dunn para comparar los distintos grupos entre sí.

## **5.3 Resultados**

A lo largo del ensayo se observó una respuesta IgG sérica aumentada en los animales vacunados con respecto a los animales control (figura 21). Los análisis estadísticos muestran

diferencias significativas entre las medianas de los animales vacunados ya sea con IB o con IB-D3 con respecto al grupo control (para EspB,  $P= 0,0001$ ; y para Int- $\gamma$ 280,  $P= 0,0002$ ).

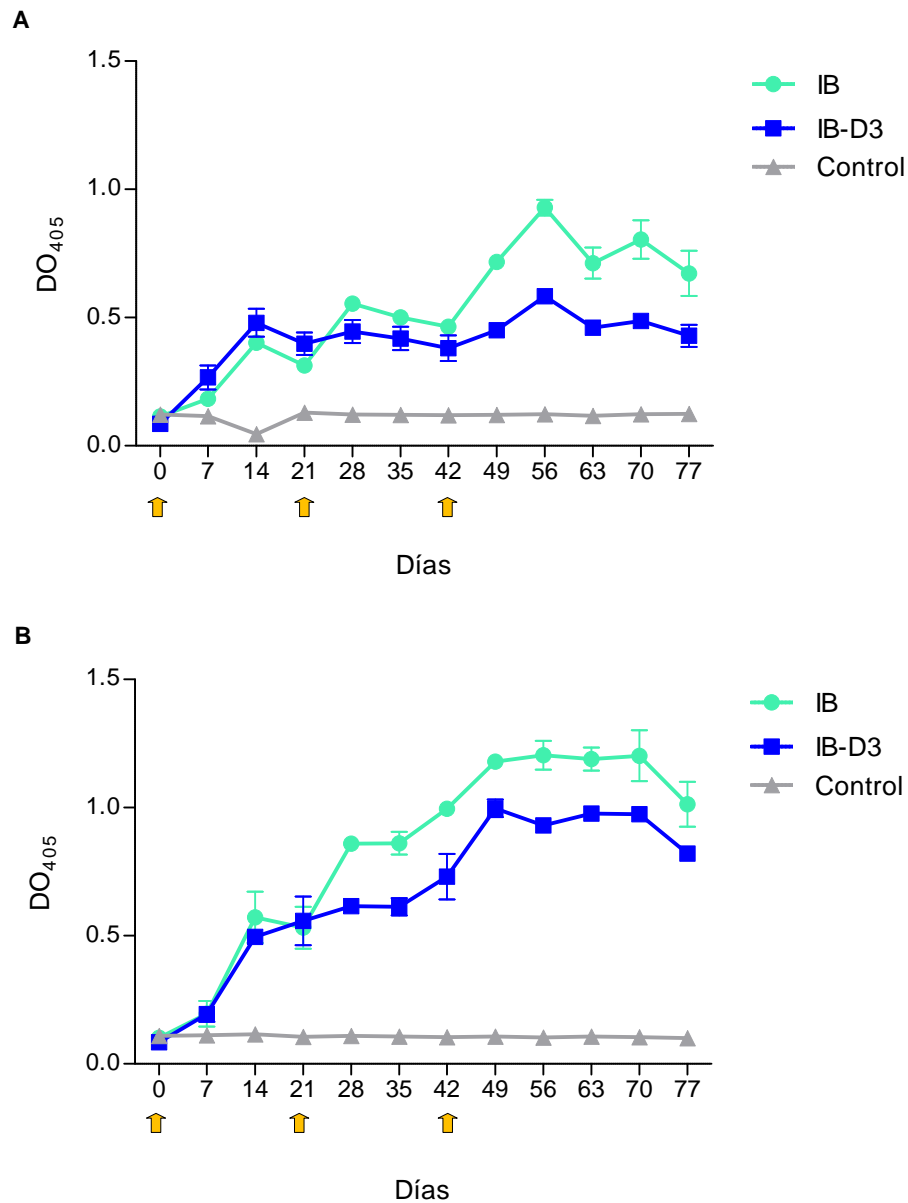


Fig. 21: Respuesta de IgG sérica contra EspB e Int- $\gamma$ 280 recombinantes medida por ELISA. A) Respuesta de las vacunas IB e IB-D3 contra EspB. B) Respuesta de las vacunas IB e IB-D3 contra Int- $\gamma$ 280. Las flechas indican inmunización y refuerzos en los días 0, 21 y 42 de la experiencia.

No sucedió lo mismo con la respuesta IgA sérica, para la cual no se pudo distinguir una respuesta diferencial entre los grupos (figura 22).

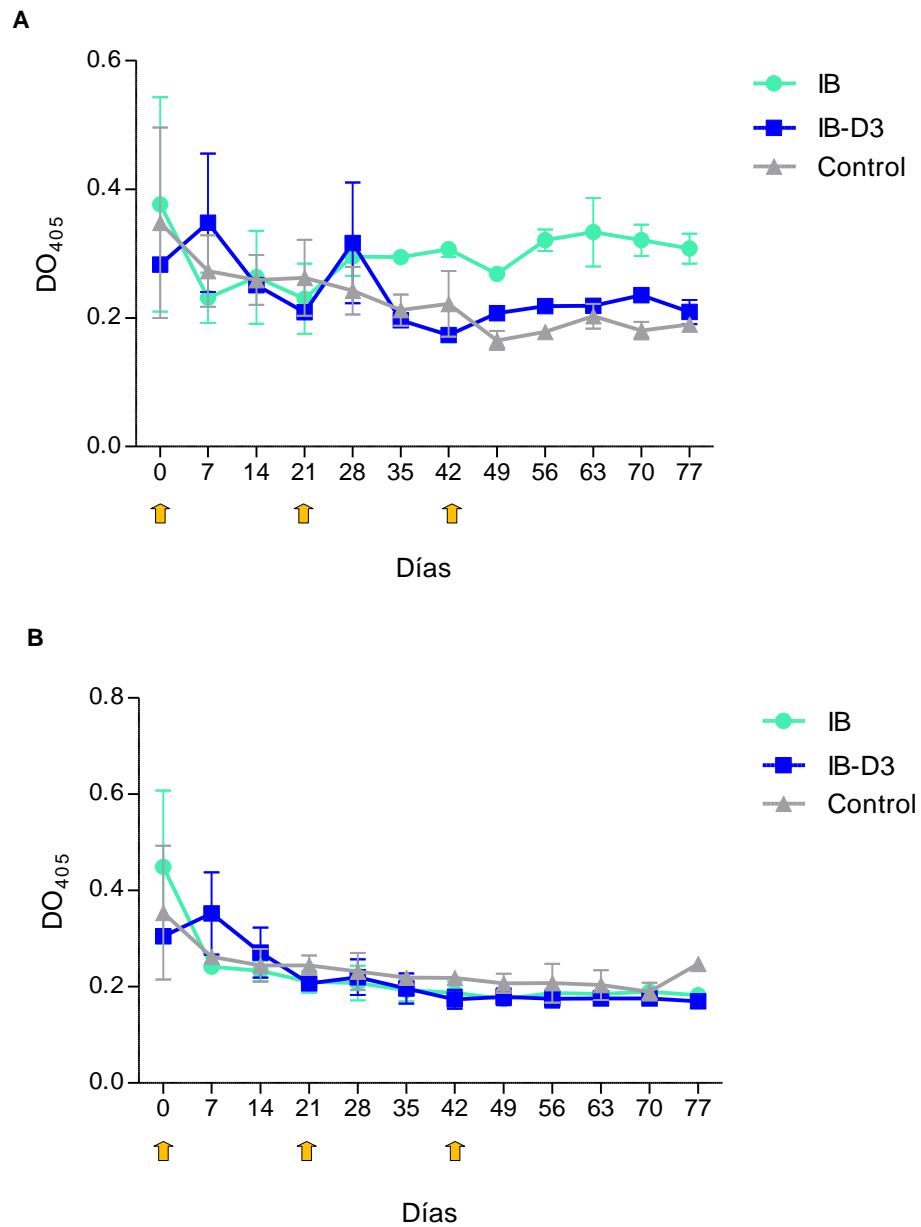


Fig. 22: Respuesta de IgA sérica contra EspB e Int-γ280 recombinantes medida por ELISA. A) Respuesta de las vacunas IB e IB-D3 contra EspB. B) Respuesta de las vacunas IB e IB-D3 contra Int-γ280. Las flechas indican inmunización y refuerzos en los días 0, 21 y 42 de la experiencia.

Se pudo detectar, mediante *western blot*, la presencia de anticuerpos IgG séricos específicos contra las proteínas recombinantes en los animales inmunizados; tanto para el grupo vacunado con IB, como para en grupo vacunado con IB-D3 (figura 23). En cambio, los animales control no produjeron respuesta a los antígenos.

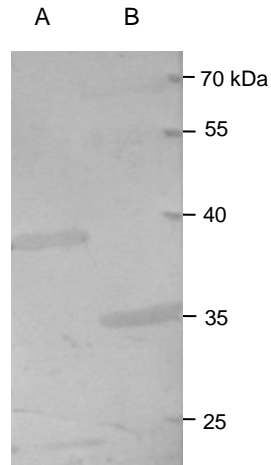


Fig. 23: *Western blot* de los sueros de animales inoculados con la vacuna IB. A) Suero contra EspB purificada. B) Suero contra Int- $\gamma$ 280 purificada.

No fue posible detectar la presencia de anticuerpos IgA contra Int- $\gamma$ 280 o EspB en la saliva de los animales de ninguno de los grupos.

#### 5.4 Discusión

Con las dos formulaciones se observó un aumento significativo en los niveles de IgG sérica específica contra Int- $\gamma$ 280 y EspB, detectable en las primeras semanas posvacunación. La respuesta para Int- $\gamma$ 280 fue mayor que para EspB. Los comportamientos fueron muy parecidos para las dos vacunas, como se observa en la figura 21 A y B. Los niveles de IgG sérica específica tendieron a incrementarse luego de cada una de las dosis de vacuna. Después de la primera dosis hubo un aumento pronunciado que nos está indicando que tal vez los animales ya tuvieron un encuentro con estos antígenos o alguno relacionado. Los niveles de IgG anti-EspB comenzaron a disminuir el día 56 del ensayo, mientras que los de IgG anti-Int- $\gamma$ 280 se mantuvieron altos hasta el día 70. Este tipo de respuesta, donde el máximo nivel de anticuerpos se alcanza alrededor de la 7<sup>ª</sup> semana, es consistente con trabajos realizados anteriormente, donde se pone de manifiesto la que tanto EspB como Intimina son capaces de producir un aumento específico de IgG luego de su inoculación vía IM [105,111].

El nivel de la respuesta de anticuerpos IgG específicos dependió fundamentalmente del antígeno y no de la formulación vacunal, dado que se observan perfiles similares tanto en la vacuna IB como en la IB-D3; mas allá de que existe la posibilidad de que la composición haya causado algunas diferencias observables de manera gráfica, pero no estadísticamente significativas, en la respuesta a las proteínas recombinantes.

Varios autores han ensayado en bovinos, con diferentes resultados, distintas formulaciones vacunales que contienen proteínas, recombinantes o nativas, codificadas por LEE [105,111,113,139]. En nuestro caso, podemos decir que Int- $\gamma$ 280 y EspB recombinantes co-administradas por vía IM con el adyuvante Montanide® ISA206 solo, o con el agregado extra de calcitriol, produjeron una elevada y sostenida repuesta humoral en terneros de 6 meses sin reacciones adversas locales. Por otra parte, si bien no fue posible detectar la presencia de IgA en saliva, debemos tener en cuenta que se trató de un ensayo realizado en un número limitado de animales que no nos permitió descartar la posibilidad de que la presencia de calcitriol pudiera ayudar en la generación de anticuerpos a nivel de mucosas; por lo que decidimos emplearlo en la formulación de la vacuna sistémica a ser ensayada con posterioridad.

**6.0 Ensayos de Inoculación Experimental de *Escherichia coli* O157:H7 en Bovinos**



## 6.1 Introducción

Con el propósito de evaluar vacunas experimentales contra este patógeno, se ensayó un modelo de colonización intestinal en terneros. Se buscó definir la magnitud y duración de la excreción del patógeno en animales sometidos a una inoculación experimental con un número conocido de microorganismos.

La colonización de los animales por parte de EHEC O157:H7 resulta difícil de detectar, ya que este serotipo no causa enfermedad en bovinos. No ocurre lo mismo con otros serogrupos de EHEC como por ejemplo O26, O111, u O5; que muchas veces causan patologías entéricas.

La mucosa del recto terminal de los bovinos es el principal sitio de colonización de EHEC O157:H7 [56], y hay estudios que indican que el ganado colonizado en este sitio está asociado con altos niveles de excreción fecal y una mayor duración de la misma [59,140]. Teniendo en cuenta la similitud clonal de aislamientos de *E. coli* O157:H7 utilizando electroforesis de campo pulsante en gel (PFGE), se ha sugerido que *E. coli* O157 presente en materia fecal proviene de dos fuentes: bacterias que colonizan el recto terminal o bacterias que están de forma transitoria en el tracto gastrointestinal [141]. Esto fue confirmado por un estudio de colonización de larga duración, donde la bacteria se recuperó solamente de la unión recto-anal y de ninguna otra parte del intestino [142]. Para este trabajo, tomamos la definición operativa de que los animales no colonizados son aquellos que excretan EHEC O157:H7 por menos de una semana, mientras que los colonizados pueden expelerla por semanas o meses [142,143].

Para el diseño de estos ensayos se tuvieron en cuenta el comportamiento de EHEC O157:H7 en el tracto gastrointestinal, y la sensibilidad de los métodos utilizados. Para tener un registro de la cantidad de bacterias que los animales estaban eliminando en la materia fecal durante las experiencias, se realizó un recuento directo en materia fecal para expresarlas como UFC/g. Adicionalmente, se realizó también un hisopado a nivel de la unión recto-anal de los animales,

que fue sometido a enriquecimiento y posterior aplicación de la técnica de separación inmunomagnética (SIM) para *E. coli* O157 e identificación mediante PCR. Estos últimos pasos de hisopado-enriquecimiento-SIM se realizaron para reducir al mínimo el error en la detección de animales portadores de la bacteria y que, por restricciones del límite de detección del recuento directo, pudieran considerarse negativos. Se ha descrito que la utilización del hisopado de la mucosa recto-anal tiene más sensibilidad en la detección de EHEC O157H:7 que el cultivo directo de materia fecal [143,144], y que el enriquecimiento selectivo seguido de SIM permite detectar hasta 1 UFC/10 g de materia fecal [145]. Es más, dado que la unión recto-anal es el principal sitio de colonización de EHEC O157:H7, el hisopado de esa región estaría examinando la colonización efectiva de los terneros [56,144].

Se realizaron dos estudios:

Ensayo A: en este ensayo se buscó evaluar el potencial de colonización de dos cepas de *E. coli* O157:H7 aisladas de bovinos para estimar si había diferencia entre ellas.

Ensayo B: este ensayo se efectuó para optimizar el modelo de colonización con la cepa elegida con los resultados del ensayo A, buscando confirmar su capacidad de colonización, aumentando a la vez el tiempo de seguimiento de la excreción bacteriana.

## **6.2 Materiales y Métodos**

### **6.2.1 Animales e instalaciones**

Los terneros, de entre 6 y 8 meses de edad y raza Holando Argentino, se adquirieron en el establecimiento Los Nogales, Navarro, provincia de Buenos Aires. Los animales se albergaron en corrales ubicados en el predio del INTA y permanecieron allí mientras duró su aclimatamiento. El CICVyA posee tanto corrales como instalaciones de Nivel de Bioseguridad Tipo 2 (NBT2). El ensayo de desafío con *E. coli* O157:H7 se realizó únicamente en NBT2. Los

bovinos se alimentaron con forraje y tuvieron acceso al agua a voluntad durante toda la experiencia.

Se seleccionaron animales no excretores de EHEC O157:H7, que se evaluaron mediante un análisis de hisopado, enriquecimiento y SIM, con posterior aislamiento en agar MacConkey Sorbitol suplementado con cefixima y telurito de potasio (AMCS-CT) e identificación de colonias presuntivas mediante PCR.

### 6.2.2 Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento

Para el ensayo A se utilizaron 2 cepas de *E. coli* O157:H7 aisladas de terneros de la región pampeana: la cepa 438/99 (*eae-γ, stx<sub>2</sub>, rfbO<sub>157</sub>*), cedida gentilmente por la Dra. Marta Rivas del Servicio Fisiopatogenia, Departamento de Bacteriología, INEI-ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”, y la cepa 146N (*eae-γ, stx<sub>1</sub>, stx<sub>2</sub>, rfbO<sub>157</sub>*), aislada en un muestreo por nuestro grupo de trabajo. Estas bacterias se crecieron en caldo o agar LB para propósitos generales, en caldo Tripticasa Soja cuando fue necesario realizar un enriquecimiento, y en agar MacConkey Sorbitol suplementado con cefixima y telurito de potasio para hacer aislamiento y recuento; siempre a 37 °C, 18 h. El agar MacConkey Sorbitol es una variante del agar MacConkey en el que el sorbitol reemplaza a la lactosa y se recomienda para el aislamiento de *E. coli* O157:H7 porque este serotipo es incapaz de fermentar este polialcohol produciendo características colonias grises, mientras que la mayoría de los otros serotipos puede fermentarlo y generan colonias rosadas. El telurito de potasio y la cefixima aumentan la selectividad del medio para *E. coli* O157: H7 ya que inhiben a la mayoría de las bacterias contaminantes.

**Caldo Tripticasa Soja (CTS)** (Oxoid, Inglaterra): Triptosa 17 g, peptona de soja 5 g, glucosa 2,5 g, NaCl 5 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2,5 g, agua destilada csp. 1000 ml.

**Agar MacConkey Sorbitol con Cefixima y Telurito de Potasio (AMCS-CT)** (Oxoid, Inglaterra): Peptona 20 g, sorbitol 10 g, sales biliares N° 3 1,5 g, NaCl 5 g, rojo neutro 0,03 g, cristal violeta

0,001 g, agar 15 g, agua destilada csp. 1000 ml. El suplemento cefixima-telurito de potasio (Oxoid, Inglaterra) se agregó para llegar a una concentración final de 0,05 mg/l y 2,5 mg/l, respectivamente.

La cepa 438/99 resistente al ácido nalidíxico (438/99NaI<sup>R</sup>), utilizada en el ensayo B, fue obtenida luego de ser seleccionada una colonia resistente espontánea. Este marcador se utilizó para su aislamiento selectivo. Se creció en caldo LB y CTS con el agregado de ácido nalidíxico (25 µg/ml). Cuando se cultivó en AMCS, este medio se suplementó con telurito de potasio (2,5 µg/ml) y ácido nalidíxico (25 µg/ml) (AMCS-TN).

### 6.2.3 Diseño experimental

**Ensayo A:** se utilizaron 4 terneros. Dos animales se inocularon con la cepa 146N, y los otros 2 con la cepa 439/99 por vía intragástrica, mediante una sonda. El inóculo fue de 10<sup>8</sup> UFC para cada una de las cepas. Se hizo según el esquema de la figura 24.

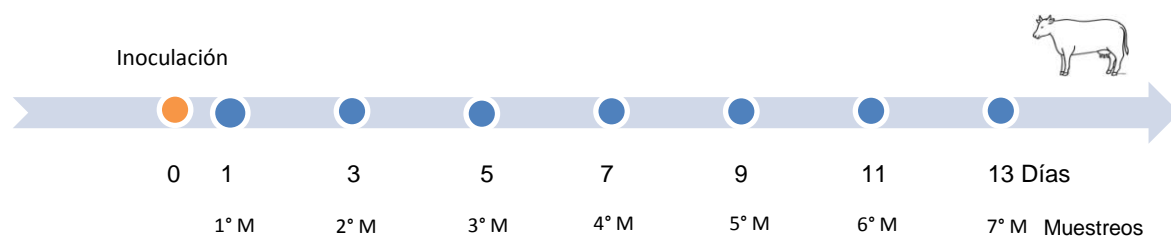


Fig. 24: Ensayo A, primera experiencia de inoculación experimental. Se utilizaron dos cepas de *E. coli* O157:H7 (146N y 438/99). La inoculación con 10<sup>8</sup> UFC se realizó el día 0 y las muestras de materia fecal se tomaron cada 2 días.

**Ensayo B:** se utilizaron 3 terneros que se inocularon con la cepa 439/99NaI<sup>R</sup>; vía intragástrica, por medio de una sonda. El inóculo fue de 10<sup>8</sup> UFC y se hizo según el esquema de la figura 25.

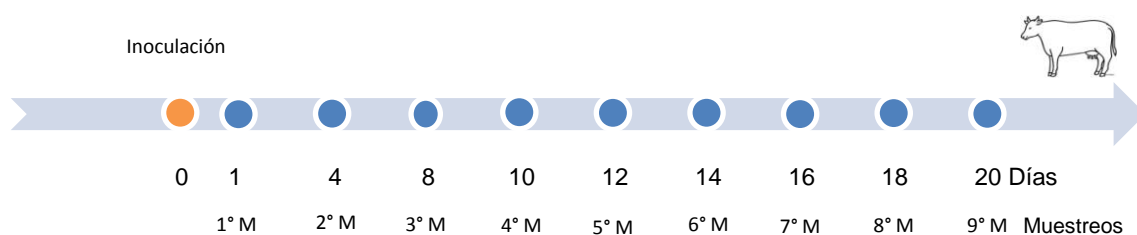


Fig. 25: Ensayo B: segunda experiencia de inoculación experimental. Se utilizó la cepa 438/99Nal<sup>R</sup>. La inoculación con 10<sup>8</sup> UFC se realizó el día 0 y las muestras de materia fecal se tomaron los días señalados.

### 6.2.4 Toma de muestras

Para medir la duración y magnitud de la excreción se tomaron muestras de materia fecal (MF) e hisopado de mucosa recto-anal (HMRA). Se hicieron en el siguiente orden, cuando fue posible: MF libre; HMRA, MF obtenida por palpación rectal.

Las muestras de MF (aproximadamente 15 g) se tomaron con guantes, se depositaron en bolsas plásticas rotuladas y se guardaron refrigeradas hasta su procesamiento.

Los HMRA se tomaron introduciendo un hisopo aproximadamente 5 cm dentro del ano del animal y realizando un movimiento circular que abarcó el perímetro de la unión recto-anal. Se trató que no queden muy cargados con MF. Los hisopos se colocaron en tubos que contenían 3 ml de CTS solo o con ácido nalidíxico. El CTS estuvo en hielo antes de colocar en él la muestra y luego todo permaneció refrigerado hasta el procesamiento; que debe tener lugar dentro de las 6 h de realizado el muestreo.

### 6.2.5 Procesamiento de las muestras

Las muestras se procesaron para hacer recuento de colonias (MF) y confirmación de la presencia de *E. coli* O157:H7 (HMRA) ante la posibilidad de que haya un número de UFC por debajo del nivel de detección del recuento directo. Cuando en una muestra de MF no se recuperó ninguna UFC, se tomó en cuenta el procesamiento de los HMRA; si estos dieron positivos por SIM se le asignó a dicha muestra un valor de 10 UFC/g, si dieron negativos se

consideró 1 UFC/g. Esta fue una decisión arbitraria que se utilizó para facilitar el procesamiento de los datos.

**Cultivo directo de MF:** Se colocaron 10 g de MF en 90 ml de CTS y se mezcló bien. Se hicieron diluciones seriadas y se sembraron 1, 10 y 100 µl en placas de agar AMCS-CT o AMCS-TN. Se incubaron 18 h a 37 °C.

**Cultivo enriquecido de HMRA:** Las muestras se agitaron (150 rpm) y se incubaron 18 h a 37 °C. Se realizó la SIM y se sembraron en placas de AMCS-CT o AMCS-TN por 18 h a 37 °C.

### **Separación inmunomagnética (SIM)**

1. Se retiró la placa magnética del concentrador de partículas (Dynal MPC-S, Invitrogen, EE. UU.) y se colocó la cantidad necesaria de tubos de microcentrífuga de 1,5 ml.
2. Se resuspendieron muy bien las inmunoperlas anti-*E. coli* O157 (Dynabeads anti-*E. coli* O157, Invitrogen, EE. UU.) en vórtex. Se colocó 20 µl en cada tubo.
3. Se agregó 1 ml del medio de cultivo enriquecido de HMRA al tubo de 1,5 ml.
4. Se invirtió el concentrador 5 veces. Se incubó a temperatura ambiente 15 min con agitación suave.
5. Se insertó la placa magnética en la parte posterior del concentrador. Se esperó 5 min. Se volvió a invertir 5 veces para concentrar las perlas en un lado del tubo.
6. Se aspiró cuidadosamente todo el sobrenadante, tratando de no afectar el *pellet*.
7. Se agregó 1 ml del *buffer* de lavado estéril PBST.
8. Se quitó la placa magnética del concentrador y se agitó bien por 5 seg.
9. Se repitieron los pasos 5 a 8 dos veces más (3 lavados en total).
10. Al final del tercer lavado, se eliminó el sobrenadante como en el paso 6.
11. Se resuspendió el *pellet* en 100 µl PBST. Se mezcló con vórtex.
12. Se transfirieron 50 µl a una placa de AMCS-CT o AMCS-TN y se esparció con un ansa en una zona de la placa para que se desarmen los complejos inmunoperlas-*E. coli*. A partir de esta siembra, se continuó por todos los cuadrantes.
13. Se incubaron las placas a 35-37 °C por 18-20 h. Se picaron y confirmaron las colonias sospechosas mediante PCR.

### **PCR múltiple para la detección de *eae*, *stx*<sub>1</sub>, *stx*<sub>2</sub>, *rfbO*<sub>157</sub>**

Se diseñó una reacción de PCR que permite detectar las secuencias génicas de: la región constante de Intimina (*eae*), las toxinas Shiga 1 y 2 (*stx*<sub>1</sub> y *stx*<sub>2</sub>), y el responsable de la síntesis del antígeno O (*rfbO*<sub>157</sub>). Se llevó a cabo en un volumen final de 25 µl que constó de los siguientes reactivos: 2,5 µl de ADN templado, Tris-HCl (pH 8,4) 20 mM, KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, 0,6 µM de cada *primer*, 0,2 mM de cada desoxinucleósido trifosfato, y 2 U de Taq Polimerasa (Invitrogen, Brasil). En la tabla 12 se muestran los *primers*, amplicones, y las condiciones de ciclado.

Tabla 12: *Primers* y condiciones de amplificación para la PCR múltiple de factores de virulencia.

Primer	Secuencia 5'-3'	Amplicón (pb)	Condiciones	Referencia
EAE-1	GGAACGGCAGAGGTTAATCTGCAG	345	94 °C, 2 min (1 ciclo); 94 °C, 60 s; 57 °C, 60 s; 72 °C, 60 s (30 ciclos)	[146]
EAE-2	GGCGCTCATCATAGTCTTTC			
Vt1-a	CAGTTAATGTGGTGGCGAAG	894		[147]
Vt1-b	CTGCTAATAGTTCTGCGCATC			
Vt2-a	CTTCGGTATCCTATTCCCGG	478		
Vt2-b	GGATGCATCTCTGGTCATTG			
O157F	CGGACATCCATGTGATATGG	258		[148]
O157R	TTGCCTATGTACAGCTAATCC			

### 6.2.6 Análisis estadístico

Las diferencias de los niveles de excreción entre las cepas del ensayo A se analizaron mediante la prueba no paramétrica de Mann-Whitney.

## 6.3 Resultados

**Ensayo A:** la excreción se evaluó por dos semanas utilizando las cepas 146N y 438/99. Luego de la inoculación experimental se tomaron muestras de MF e HMRA que permitieron seguir el curso de la eliminación del patógeno con el transcurso del tiempo, como se observa en la

figura 26. Para 146N se observó un aumento sostenido de la excreción hasta el día 7, llegando a un máximo de  $2 \times 10^4$  UFC/g de MF, para luego bajar a  $2,7 \times 10^3$  UFC/g hacia el día 9 y posteriormente subir, llegando a un nivel cercano al inicial de  $6 \times 10^3$  UFC/g. Por otra parte, el comportamiento de 438/99, si bien fue parecido en la primera semana, llegando el día 7 a una emisión bacteriana de  $4 \times 10^4$  UFC/g, posteriormente la excreción bacteriana siguió subiendo hasta el último día del ensayo, donde se contabilizaron  $4,5 \times 10^4$  UFC/g.

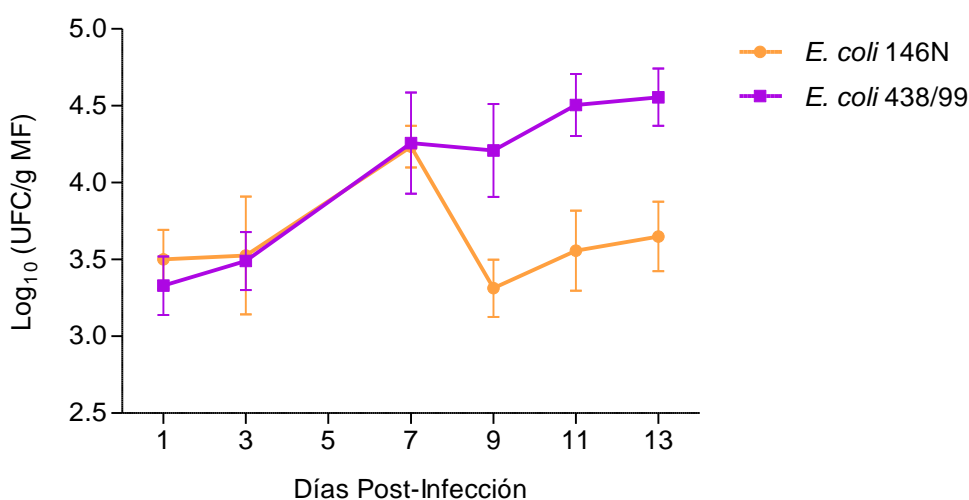


Fig. 26: Excreción de las dos cepas de *E. coli* O157:H7 (146N y 438/99) luego de la inoculación experimental de  $10^8$  UFC.

El número total de bacterias aisladas a partir de las muestras fecales fue significativamente menor en el grupo inoculado con 146N en comparación con el grupo que recibió 438/99 ( $P = 0,04$ )

**Ensayo B:** conocidos y analizados los resultados del ensayo A, se procedió con la segunda experiencia. Para 438/99NaI<sup>R</sup>, la excreción se prolongó durante 11-18 días dependiendo del animal, y llegó a un máximo de  $1,6 \times 10^4$  UFC/g de MF. El gráfico 27 muestra el curso de la excreción de la cepa 438/98NaI<sup>R</sup> de *E. coli* O157:H7 durante los 22 días que duró el ensayo.



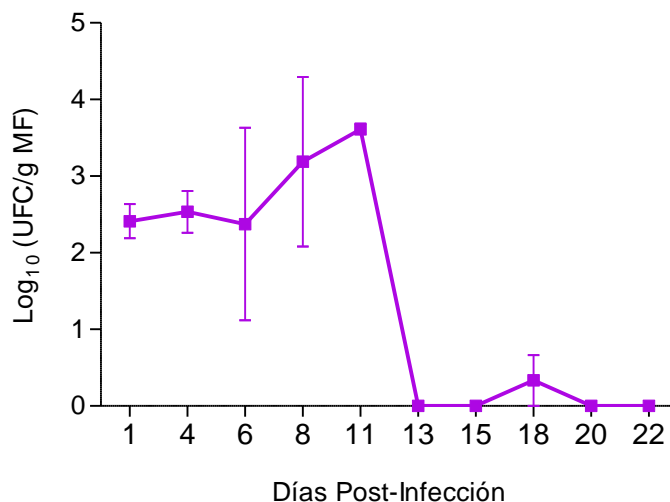


Fig. 27: Excreción de la cepa 438/99Nal<sup>R</sup> de *E. coli* O157:H7 luego de la inoculación experimental de 10<sup>8</sup> UFC.

La confirmación de las colonias se realizó mediante una PCR múltiple para diversos factores de virulencia: *rfbO157*, *stx*<sub>1</sub>, *stx*<sub>2</sub>, *eae*. En la figura 28 se muestra la imagen de un gel de agarosa y los perfiles obtenidos para distintos tipos de cepas.

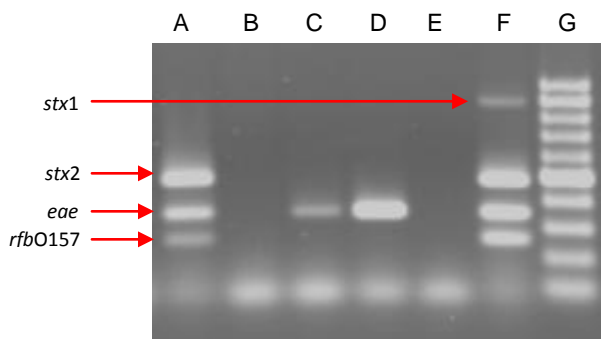


Fig. 28: PCR múltiple de factores de virulencia de *E. coli* O157:H7. A) Cepa positiva para *stx*<sub>2</sub>, *eae*, *rfbO157* (438/99); B) Cepa negativa; C y D) Cepas positivas para *eae*; E) Cepa negativa; F) Cepa positiva para *stx*<sub>1</sub>, *stx*<sub>2</sub>, *eae*, *rfbO157* (146N); G) Marcador de 100 pb.

### 6.4 Discusión

En esta sección se evaluó un modelo de inoculación experimental y colonización de cepas nativas de EHEC O157:H7 en terneros.

La excreción de 146N y 438/99 se mantuvo en todos los animales durante todo el tiempo que duró el ensayo A. Con los datos de la excreción podemos decir que las dos cepas fueron

capaces de colonizar a los terneros. Existió una diferencia significativa ( $P= 0,04$ ) entre el número total de bacterias aisladas en los dos grupos. Pudo establecerse que los bovinos inoculados con EHEC 438/99 excretaron una cantidad significativamente mayor de bacterias en el período considerado. No fue posible demostrar mayor duración de la colonización de ninguna de ellas debido a que las dos se siguieron recuperando al finalizar el ensayo. Durante el desarrollo de esta experiencia se pudo comprobar la dificultad que supuso el conteo de las colonias de EHEC O157:H7 en las placas de AMCS-CT. Si bien son distinguibles por su fenotipo característico (colonias grises con centro más oscuro, no fermentadoras de sorbitol), pudo observarse que los animales portaban otras bacterias que podían desarrollarse en este medio selectivo, algunas de las cuales producían colonias que podían llegar a confundirse con O157:H7, haciendo muy engorroso el trabajo de recuento y teniendo que recurrir constantemente a la confirmación de colonias sospechosas por PCR.

Para mejorar el modelo de colonización de los terneros, y disminuir las dificultades operativas en el recuento bacteriano, se procedió a aislar una colonia mutante espontánea resistente al ácido nalidíxico de la cepa que obtuvo mejor resultado en la primera etapa del ensayo (438/99NaI<sup>R</sup>). Un procedimiento similar se ha seguido en varios trabajos, donde se comprobó que la cepa resistente tiene características similares de crecimiento, adherencia y colonización, que la cepa salvaje [55,107,113,139,149–153]. Con esta *E. coli* O157:H7 438/99NaI<sup>R</sup> se realizó el ensayo B, para confirmar capacidad de colonización de los terneros; al mismo tiempo se aumentó el tiempo de seguimiento de la excreción bacteriana. El recuento fue notablemente más sencillo que en la primera inoculación. La excreción no se extendió más allá de los 18 días, coincidiendo con lo observado por otros autores para terneros de similar tiempo de vida [61,154]. La edad de los bovinos se relaciona con la duración y magnitud de la excreción, mientras más jóvenes son, aumentan ambos indicadores [61,154]. En este caso existieron dos fechas (los días 13 y 15) en las cuales no se recuperó EHEC O157:H7 y luego se volvió a

detectar, a pesar de estar los animales juntos en el mismo recinto. Esto pudo estar motivado por la conocida intermitencia en la excreción tanto en animales infectados naturalmente como de forma experimental [61,144,155]. La detección por recuento directo en materia fecal varió entre los animales, coincidiendo con lo informado en trabajos anteriores donde la excreción puede variar hasta en un 80% dentro del mismo grupo [156,157].

Estos resultados nos permiten concluir que la cepa EHEC O157:H7 438/99NaI<sup>R</sup>, si bien tuvo un nivel de excreción un tanto menor que la cepa parental, fue capaz de colonizar a los terneros. Esta diferencia se notó ya desde el primer día posdesafío, y tomando en cuenta lo discutido hasta ahora, probablemente esto haya sido causado principalmente por la variabilidad de excreción de los animales, provenientes de distintos muestreos, y en alguna medida a la cepa resistente al ácido nalidíxico. De todas maneras, concluimos que esta bacteria puede ser utilizada en ensayos de inoculación experimental debido a que demostró capacidad para colonizar a los terneros y pudo ser detectada sin mayores complicaciones en los recuentos.

## **7.0 Ensayo Vacuna IB-D3 en Bovinos con Desafío**

## 7.1 Introducción

Hasta ahora, en las secciones precedentes, se ha seguido una secuencia de diseño, producción y evaluación de una vacuna compuesta por Int- $\gamma$ 280 y EspB recombinantes. También se ha desarrollado un modelo de infección experimental de terneros con cepas aisladas en el medio local, para que sirva de referencia en el ensayo de la vacuna IB-D3 con desafío.

Ya se ha enunciado que la vacunación con factores de colonización ha sido una de las estrategias propuestas para prevenir la infección de bovinos por EHEC O157:H7. Es conocida la condición de Intimina como antígeno principal en las bacterias que producen lesiones de A/E y como factor clave que permite la fuerte unión de EHEC a la mucosa rectal de terneros [25,117,158]. Por ello, tanto Intimina como otras proteínas del LEE, incluyendo Tir, se han ensayado como antígenos componentes de vacunas en terneros tanto en bovinos [105,107,108,111,139,159] como en otros modelos animales [104,106,133,160–163], con resultados variables. En cuanto a EspB, si bien tiene un papel demostrado en la colonización del epitelio intestinal [164,165], todavía no había sido empleada como componente de una vacuna para bovinos.

En esta sección se va a evaluar la eficacia de la vacuna sistémica IB-D3 en la reducción de la colonización de EHEC O157:H7 en un modelo de infección experimental de terneros.

## 7.2 Materiales y Métodos

### 7.2.1 Animales e instalaciones

Los terneros, de entre 6 y 8 meses de edad, raza Holando Argentino, y negativos para EHEC O157:H7, se adquirieron en el establecimiento Los Nogales, Navarro, provincia de Buenos Aires. Los animales se albergaron en los corrales del CICVyA cuando ingresaron y

permanecieron allí para su aclimatamiento y para la vacunación. Se alimentaron con forraje y tuvieron acceso al agua a voluntad durante toda la experiencia. Para prevenir la posible acción de parásitos que pudieran interferir con el desarrollo del ensayo, se les aplicó una dosis de Ivermectina (Biogénesis SA, Argentina) cuando ingresaron al predio de INTA. El desafío con *E. coli* O157:H7 se realizó en NBT2.

### 7.2.2 Preparación de la vacuna

La vacuna IB-D3 y el control se prepararon como ya fue descrito en la página 63; las dosis fueron las mismas y se aplicaron de idéntica manera.

### 7.2.3 Diseño experimental

Se utilizaron 8 terneros. Se inocularon 4 con la vacuna IB-D3 y 4 con PBS (Control) vía IM, según el esquema de la figura 29.

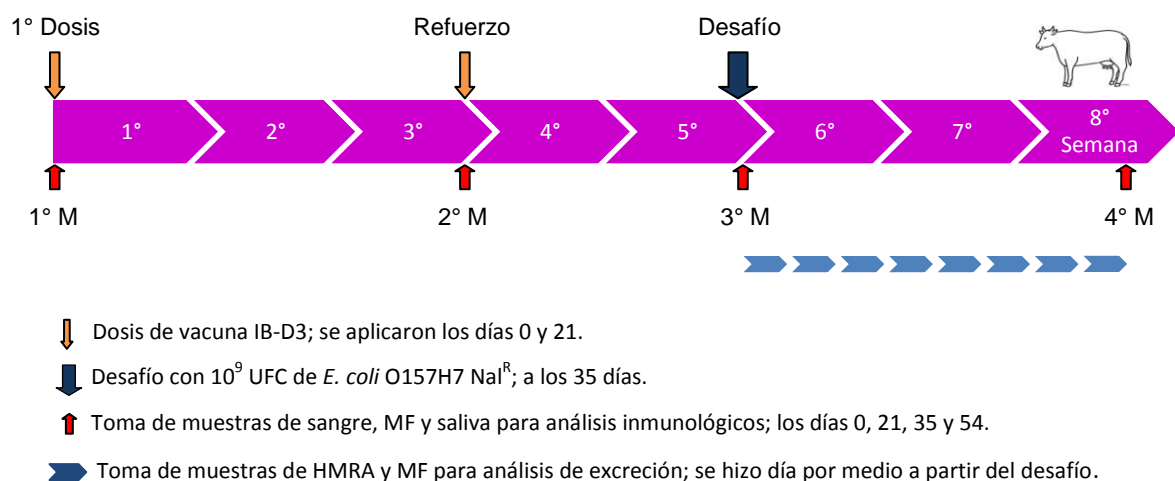


Fig. 29: Curso del ensayo de la vacuna IB-D3 en bovinos.

Se tomaron muestras de sangre, saliva y MF los días en los cuales se aplicó una dosis de vacuna, el día del desafío y 19 días posteriores al desafío. Las muestras de HMRA y MF para

recuento directo y enriquecimiento se tomaron día por medio luego de realizada la inoculación experimental con *E. coli* 438/9Na<sup>R</sup>.

#### **7.2.4 Toma y procesamiento de las muestras para medir la respuesta inmune**

Para medir la respuesta de anticuerpos, las muestras de sangre se tomaron y procesaron como se indica en la página 64 (5.2.4 Preparación de suero bovino).

La saliva se recolectó en un recipiente estéril, se puso en hielo, y se guardó a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Antes de su utilización se centrifugó 10 min a  $400 \times g$ ,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  y se recuperó el sobrenadante [166].

Las muestras de MF fueron resuspendidas 1:2 (p/v) en *buffer* acetato de sodio 10 mM (pH 4,5) que contenía un inhibidor de proteasas al 0,1 % (p/v) (*Protease Inhibitor Cocktail*; Sigma-Aldrich, EE. UU.). La mezcla fue centrifugada primero a  $2500 \times g$ , 20 min a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  para sedimentar partículas grandes y luego a  $15000 \times g$ , 30 min a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . El sobrenadante fue colectado y guardado a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su uso [94].

El ensayo ELISA para suero fue el mismo que el descrito en el punto 5.2.5 de la sección 5.0, página 64, con la siguiente variante: dado que esta vez buscamos conocer los títulos de los anticuerpos, como anticuerpo primario se utilizaron diluciones seriadas de suero. Esto se hizo por duplicado para cada muestra. El título de los anticuerpos se expresó como el recíproco del punto final de la dilución que resultó en una  $\text{DO}_{405}$  por encima del valor de corte. El valor de corte se calculó como el promedio de las densidades ópticas medidas el día 0 de la experiencia, más el doble del desvío estándar.

Las muestras de saliva y sobrenadante de MF se sometieron a ELISA de captura para conocer el contenido total de IgG o IgA; y a ELISA indirecto para estimar el nivel de anticuerpos IgG e IgA específicos contra Int- $\gamma$ 280 y EspB. Luego se expresaron las concentraciones de los anticuerpos específicos en referencia a  $1\text{ }\mu\text{g}$  de IgG o IgA totales [133].

Para determinar IgG o IgA totales se utilizó el siguiente protocolo:

Se cubrieron los pocillos de una placa con 100 µl de anti-IgG o anti-IgA (1:3000 en PBST) de bovino producido en cabra (Bethyl Laboratories, EE. UU.). Se incubó *overnight* a 4 °C. Se bloquearon los sitios inespecíficos con solución de bloqueo (PBS-leche descremada 5 %). Se lavó la placa tres veces con 300 µl de PBST.

Se prepararon las muestras de saliva (dilución 1:4 en PBST) y sobrenadante de MF (dilución 1:8 en PBST). También se prepararon diluciones seriadas de suero bovino de referencia (Bethyl Laboratories, EE. UU.), que tiene concentraciones definidas de inmunoglobulinas. Se agregó 100 µl de muestra a cada pocillo y se incubó 90 min a 37 °C con agitación. Se lavaron los pocillos tres veces.

Se agregó 100 µl de anticuerpo conjugado con peroxidasa (anti-IgG 1:8000 y anti-IgA 1:3000; Bethyl Laboratories, EE. UU.). Se incubó 90 min a 37 °C con agitación. Se lavaron los pocillos tres veces.

Se agregó 100 µl de solución sustrato para peroxidasa (ABTS-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y se incubó hasta desarrollo de color (10-15 min) a 37 °C y con agitación. La reacción se detuvo con 100 µl de SDS 5 %. Se midió la densidad óptica a 405 nm con un lector ELx808 BioTek. El suero bovino de referencia se utilizó para realizar una curva de calibración. Con los datos de la curva generada se pudo calcular la concentración de IgG o IgA totales de la muestra.

Para determinar el nivel de IgG o IgA específicos para cada una de las proteínas recombinantes, se efectuó un ELISA indirecto [166].

Se cubrió una placa con 100 µl de la proteína purificada (1 µg por pocillo) en PBS. Se incubó *overnight* a 4°C. Se bloquearon los sitios inespecíficos con solución de bloqueo (PBS-leche descremada 5 %). Se lavó la placa tres veces con 300 µl de PBST.

Se prepararon las muestras de saliva (diluciones a partir de 1:4) y sobrenadante de MF (dilución 1:2) en PBST. También se prepararon controles positivos (suero bovino de referencia). Se agregaron 100 µl de muestra a cada pocillo y se incubó 90 min a 37 °C con agitación. Se lavaron los pocillos tres veces.

Se agregó 100 µl del anticuerpo conjugado con peroxidasa (anti-IgG y anti-IgA bovinas Bethyl Laboratories, EE. UU.) diluido en PBST 1:8000 y 1:3000, respectivamente. Se incubó 90 min a 37 °C con agitación. Se lavaron los pocillos tres veces.

Se agregaron 100 µl de solución sustrato para peroxidasa (ABTS-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y se incubó hasta desarrollo de color (10-15 min) a 37 °C, con agitación. La reacción se detuvo con 100 µl de una



solución de SDS 5 %. Se midió la densidad óptica a 405 nm con un lector ELx808 BioTek. Estos datos se utilizaron para compararlos con los de IgG o IgA totales.

La especificidad de la respuesta inmune se examinó mediante *western blot* de un *pool* de sueros y uno de muestras de saliva de los grupos de animales vacunados y control. El procedimiento para el suero fue el mismo que se detalla en el punto 5.2.6 de la sección 5.0 (Ensayo de Respuesta Inmune en Bovinos) página 65, con la salvedad de que la dilución sérica fue de 1:4000. Para el procesamiento de saliva las diferencias fueron que se utilizó esta secreción como anticuerpo primario a una dilución 1:4. Con posterioridad, se empleó anti-IgA bovina conjugada con peroxidasa (Bethyl Laboratories, EE. UU.), y se reveló con el sustrato 4-Cl-1-naftol - H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### **7.2.5 Ensayo de inhibición de la hemólisis de glóbulos rojos ovinos**

La presencia del SSTT en *E. coli* O157:H7 hace posible la hemólisis de glóbulos rojos ovinos (GRO) cuando son puestos en contacto con la bacteria. Esto se debe a la acción de las proteínas secretadas EspA, EspB, y EspD. Para verificar la actividad de las inmunoglobulinas G producidas por la respuesta a EspB, se realizó un ensayo de inhibición de la hemólisis de GRO con el siguiente protocolo [167]. Este ensayo se hizo por triplicado.

Se obtuvo un cultivo *E. coli* O157:H7 438/99NaI<sup>R</sup> luego de un crecimiento de 18 h, sin agitación, en caldo LB, a 37 °C. Para conocer la concentración se hicieron diluciones seriadas y se sembraron en placas de agar LB. El cultivo diluyó 1:100 en 2 ml de medio esencial Dulbecco modificado con alta glucosa y piruvato (DMEM) sin rojo fenol. El inóculo así preparado se juntó con una dilución final de 1:40 de suero (inactivado a 56 °C por 30 min), ya sea hiperinmune o control. Se dejó interactuar por una hora en una estufa a 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub>. Se agregaron los eritrocitos al 5 % en PBS (2 ml) y se incubaron 3 h a 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub>. Como control positivo de hemólisis se dejaron pocillos con la cepa 438/99NaI<sup>R</sup> sin suero en contacto con GRO en las mismas condiciones. Finalmente se removió con mucho cuidado la suspensión y se centrifugó 1 min a 12000 rpm; luego se extrajo el sobrenadante y se estimó la concentración de hemoglobina midiendo la DO<sub>543</sub> en un espectrofotómetro Cecil CE2021 (Cecil Instruments, Inglaterra).

La inhibición de la capacidad hemolítica de la cepa EHEC 438/99NaI<sup>R</sup> tratada con sueros de animales vacunados y no vacunados se expresó como:

$$\% \text{ Inhibición de la Hemólisis} = 100 \% - n \%$$

Donde el 100 % estuvo dado por la cepa sin tratamiento y n es el porcentaje de hemólisis producido por el tratamiento.

### **7.2.6 Ensayo de inhibición de la adherencia a células Hep-2**

La presencia de la isla LEE le confiere a EHEC la capacidad de producir lesiones A/E en cultivos de células epiteliales y en el intestino de animales inoculados experimentalmente. La histopatología A/E es, fundamentalmente, producto de la adherencia íntima entre la bacteria y la célula, que resulta de la interacción de dos productos de LEE: Intimina y Tir. Para comprobar la acción de inhibición de la adherencia de EHEC a células en cultivo por parte de los anticuerpos generados fundamentalmente por Int-γ280, se realizó un ensayo con la línea celular epitelial Hep-2 [168,169]. Este ensayo se hizo por triplicado.

Se sembraron  $2,5 \times 10^5$  células Hep-2 en placas de 12 pozos hasta 70 % de confluencia. La monocapa celular se lavó con medio de adherencia (Medio mínimo esencial de Eagle, EMEM - manosa 1 % y NaHCO<sub>3</sub> 0,4 %) para eliminar los restos de antibiótico. Por otra parte, se tomó una colonia de *E. coli* O157:H7 cepa 438/99NaI<sup>R</sup> y se dejó crecer 18 h a 37 °C en caldo infusión cerebro-corazón con NaHCO<sub>3</sub> 44 mM y ácido nalidíxico 25 µg/ml sin agitación. Se tomaron 20 µl del cultivo y se resuspendieron en 300 µl de medio de adherencia con ácido nalidíxico (25 µg/ml). El medio de adherencia tiene ya incorporado el suero inactivado 30 min a 56°C (hiperinmune y control) en concentración 1:50; también se agregó un control sin suero. Se llevó todo a 37 °C por 30 min. Se agregó esta mezcla a las células ya lavadas y se dejó en estufa a 37°C, CO<sub>2</sub> 5 % por 3 h. Se lavaron los pocillos con PBS y se volvieron a agregar 300 µl de medio de adherencia con el suero correspondiente. Se dejó por 3 h más. Se lavó con PBS para eliminar las bacterias no adheridas; posteriormente las células se homogeneizaron con 1 ml de Tritón X100 0,1 % por 15 min. Esta suspensión se diluyó serialmente y se sembró en placas de LB con 25 µg/ml de ácido nalidíxico para realizar el recuento. Para estimar el porcentaje de

adherencia también se hizo recuento de la cantidad de UFC presentes en el inóculo al inicio del ensayo.

La capacidad de adherencia de la cepa EHEC 439/99NaI<sup>R</sup> a las células Hep-2 se calculó como porcentaje de adherencia:

$$\% \text{ Adherencia} = \frac{\text{EHEC adheridas a Hep-2}}{\text{EHEC totales}} \times 100$$

Mientras que para determinar la diferencia entre EHEC sometidas a diferentes tratamientos, el porcentaje relativo de adherencia se calculó como:

$$\% \text{ Adherencia Relativo} = \frac{\text{UFC por ml de tratamiento}}{\text{UFC por ml de infección}} \times 100$$

### **7.2.7 Toma de muestras y procesamiento para medir la excreción de *Escherichia coli* O157:H7 438/99NaI<sup>R</sup>**

Se tomaron muestras de MF y HMRA. La MF se utilizó para el recuento directo de UFC en placas; mientras que los HMRA se utilizaron para enriquecer las muestras y aumentar la sensibilidad de detección al utilizar SIM. Las muestras se tomaron y procesaron como ya fue descrito en la sección 6.0 (Ensayo de Inoculación Experimental de *Escherichia coli* O157:H7 en Bovinos; páginas 75 y 76). Las colonias sospechosas fueron confirmadas, además de PCR múltiple, por un *kit* de aglutinación de látex para O157 (*E. Coli* O157 *Latex Test Kit*, Oxoid, Inglaterra) siguiendo las indicaciones del fabricante.

### **7.2.8 Estudios histológicos**

Se hicieron estudios histológicos de los animales al final de la experiencia. Se tomaron muestras de íleon, ciego, colon y unión recto-anal. Los tejidos fueron fijados en formol 10 %, incluidos en parafina, seccionados, y teñidos con hematoxilina-eosina.

### 7.2.9 Análisis estadístico

Los datos de recuento de excreción fecal se analizaron según un diseño de medidas repetidas con el procedimiento *Proc Mixed* del programa estadístico SAS (SASv.9.1; SAS Institute Inc., EE. UU.). Los valores de cada tratamiento y la diferencia entre los tratamientos por día se calcularon como contrastes lineales estimables [170]. Se utilizó un procedimiento similar para probar la diferencia entre animales vacunados y control con el logaritmo de la excreción durante el ensayo completo [171]. Para corregir los grados de libertad de todas las hipótesis lineales se utilizó el procedimiento de Kenward y Roger [172]. Los datos de ELISA se analizaron con la prueba t de Student, mientras que para los datos de inhibición de hemólisis de GRO e inhibición de adherencia se empleó el test no paramétrico de Mann-Whitney. En todos los casos los valores  $P < 0,05$  se consideraron significativos.

## 7.3 Resultados

### 7.3.1 Respuesta inmune

La inmunización sistémica de los terneros con dos dosis de la vacuna IB-D3 indujo un fuerte y significativo aumento en los títulos de IgG en suero contra las dos proteínas recombinantes después de la primera inmunización ( $P < 0,05$ ); los títulos de IgG mostraron un incremento de 13 veces el día 21 y se mantuvieron en el mismo nivel durante todo el experimento (figura 30). Se observó un pequeño incremento, aunque no significativo, en los títulos de IgG específicos para las proteínas recombinantes en el grupo control luego del desafío oral con *E. coli* 438/99NaI<sup>R</sup>. En cuanto a IgA sérica, no se pudo detectar respuesta a ninguno de los antígenos.

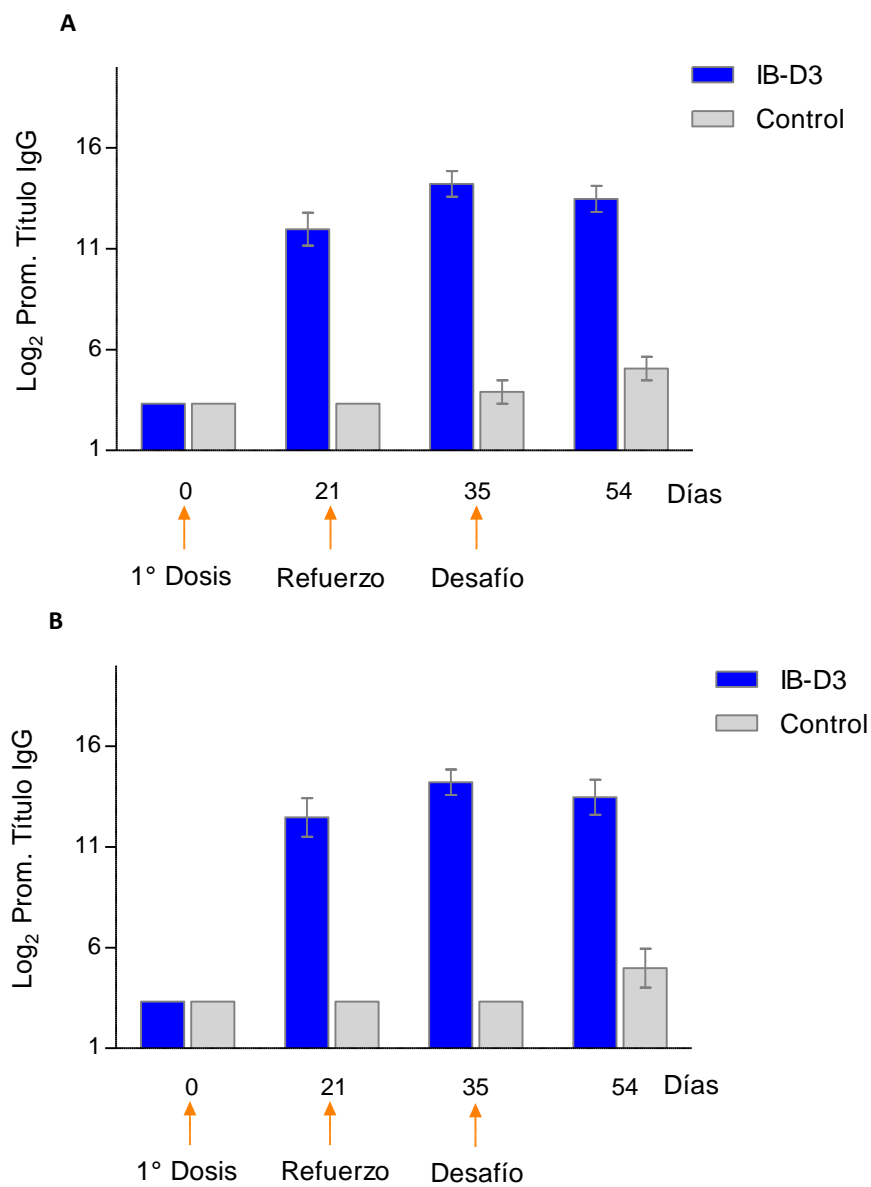


Fig. 30: Respuesta de anticuerpos IgG séricos medida por ELISA en terneros inmunizados con la vacuna IB-D3. A) Títulos de IgG contra EspB. B) Títulos de IgG contra Int- $\gamma$ 280. Los resultados se expresan como el valor medio del  $\log_2$  de los títulos, el error estándar (ES) se indica con líneas verticales. Se observa un incremento significativo del título contra ambos antígenos al momento de la segunda inmunización ( $P < 0,05$ ).

Los anticuerpos salivales IgA específicos contra ambas proteínas mostraron un incremento significativo de 4-7 veces después de la primera inmunización ( $P < 0,05$ ), pero no fueron detectables a partir del día 19 posterior al desafío (figura 31). No se detectó respuesta a ninguno de los antígenos en MF.

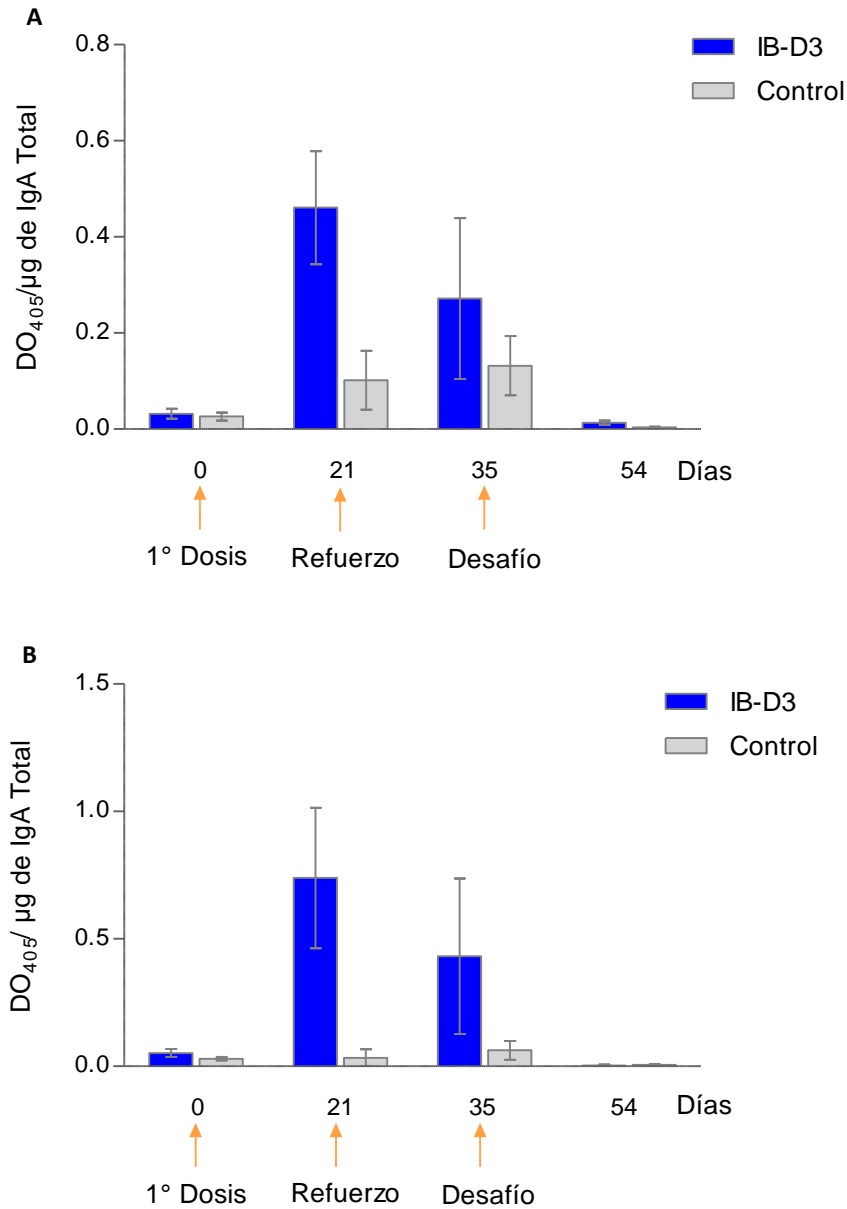


Fig. 31: Respuesta de anticuerpos IgA de saliva medida por ELISA en terneros inmunizados con la vacuna IB-D3. A) Respuesta de IgA contra EspB. B) Respuesta de IgG contra Int- $\gamma$ 280. Los resultados se expresan como el valor medio de la DO<sub>405</sub> de las muestras sin diluir normalizadas a 1  $\mu$ g de IgA total, el error estándar (ES) se indica con líneas verticales. Se observa un incremento significativo del título contra ambos antígenos al momento de la segunda inmunización ( $P < 0,05$ ).

También se detectó un aumento de las IgG salivales anti-EspB y anti-Int- $\gamma$ 280 después de la vacunación; pero no fue significativa (figura 32). El desafío bacteriano no dio lugar a ningún aumento detectable en la respuesta específica de IgG o IgA a los antígenos en saliva en el grupo control.

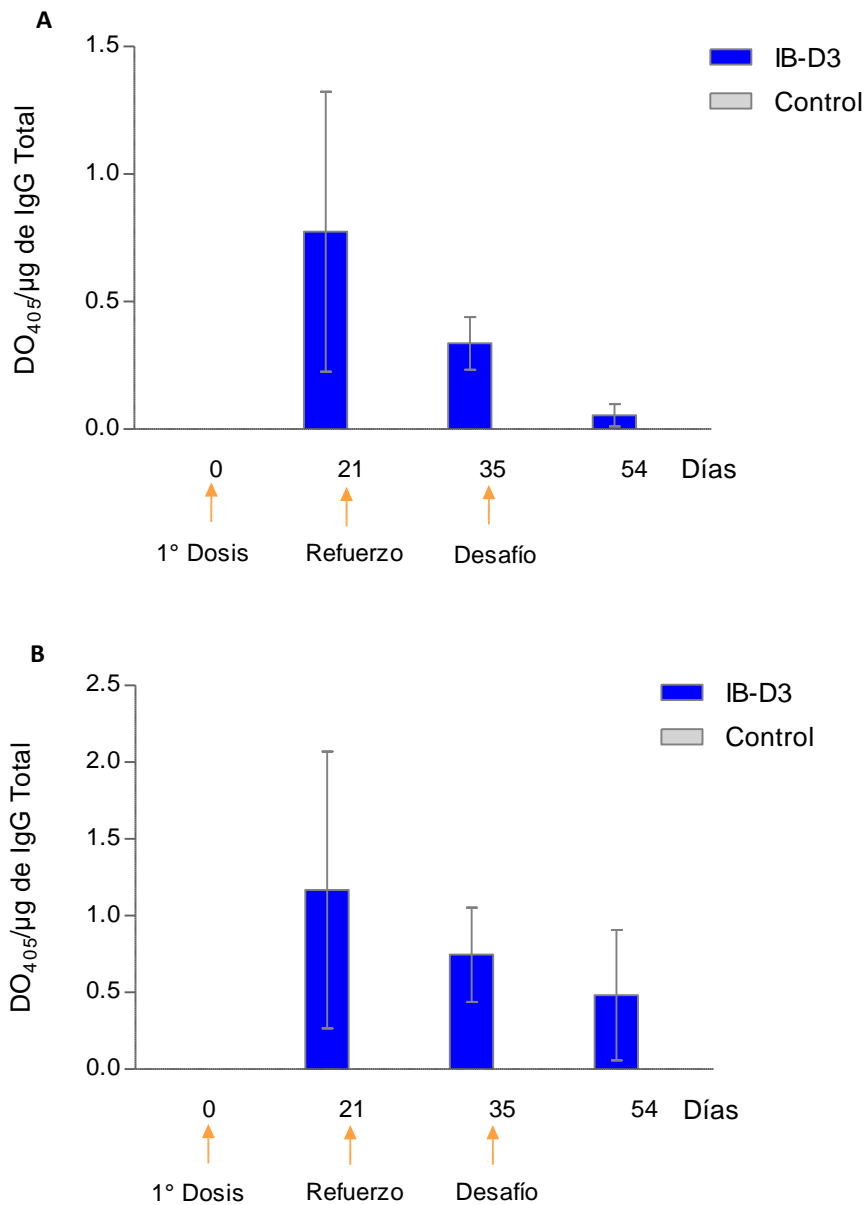


Fig. 32: Respuesta de anticuerpos IgG de saliva medida por ELISA en terneros inmunizados con la vacuna IB-D3. A) Respuesta de IgG contra EspB. B) Respuesta de IgG contra Int- $\gamma$ 280. Los resultados se expresan como el valor medio de la DO<sub>405</sub> de las muestras normalizadas a 1  $\mu$ g de IgG total, el error estándar (ES) se indica con líneas verticales. Si bien se observa un incremento contra ambos antígenos al momento de la segunda inmunización, el mismo no es significativo.

La especificidad de la respuesta inmune en suero y saliva se confirmó mediante *western blot*, como se ve en la figura 33. No se detectó respuesta a ninguno de los antígenos ensayados en IgG o IgA de MF.

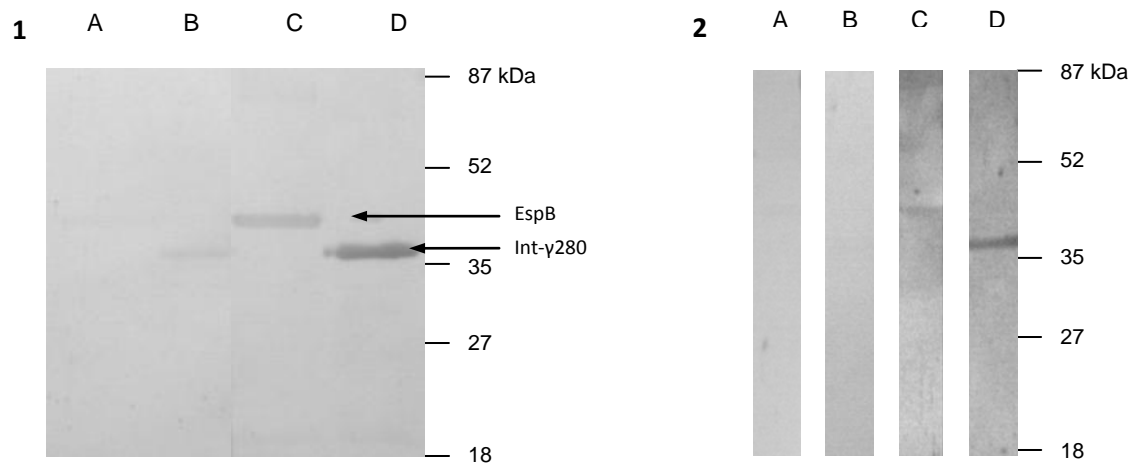


Fig. 33: *Western blot* de Int- $\gamma$ 280 y EspB con muestras de suero y saliva que muestra la especificidad de la respuesta inmune medida por ELISA. 1) Ensayo realizado para IgG de suero. 2) Ensayo realizado para IgA de saliva. En las calles A y B se observa las muestras pre-inmunización contra EspB e Int- $\gamma$ 280, respectivamente; las calles C y D se observan las muestras post-inmunización contra EspB e Int- $\gamma$ 280, respectivamente. Las mezclas de suero y saliva se diluyeron 1:4000 y 1:4, respectivamente.

### 7.3.2 Efecto de la inmunización en la excreción de *Escherichia coli* 438/99NaI<sup>R</sup>

Dos semanas después del refuerzo, los animales fueron desafiados con  $10^9$  UFC de *E. coli* O157:H7. La excreción bacteriana posterior a este desafío se calculó cuantitativamente durante un período de 19 días. Ninguno de los animales sufrió diarrea luego de la inoculación.

En la figura 34 A se observa la tendencia de las estimaciones de nivel en  $\log_{10}$  (UFC/g MF) de los grupos IB-D3 y control para todo el período del ensayo. En la figura 34 B pueden verse los valores individuales de excreción; en la mayoría de los animales de ambos grupos no se detectaron bacterias luego del día 17 posterior al desafío. Los animales del grupo control mostraron un mayor valor de excreción bacteriana. Las diferencias entre los grupos fueron significativas ( $P < 0,05$ ) hasta el día 13; posteriormente la diferencia se volvió menor y no significativa. La excreción bacteriana total, expresada como área bajo la curva fue estimada como 22,2 para los animales vacunados y 35,7 para los animales control; y esta diferencia fue significativa ( $P < 0,05$ ). En el momento de la necropsia, *E. coli* O157:H7 no fue recuperada de ninguna de las muestras intestinales de ambos grupos.



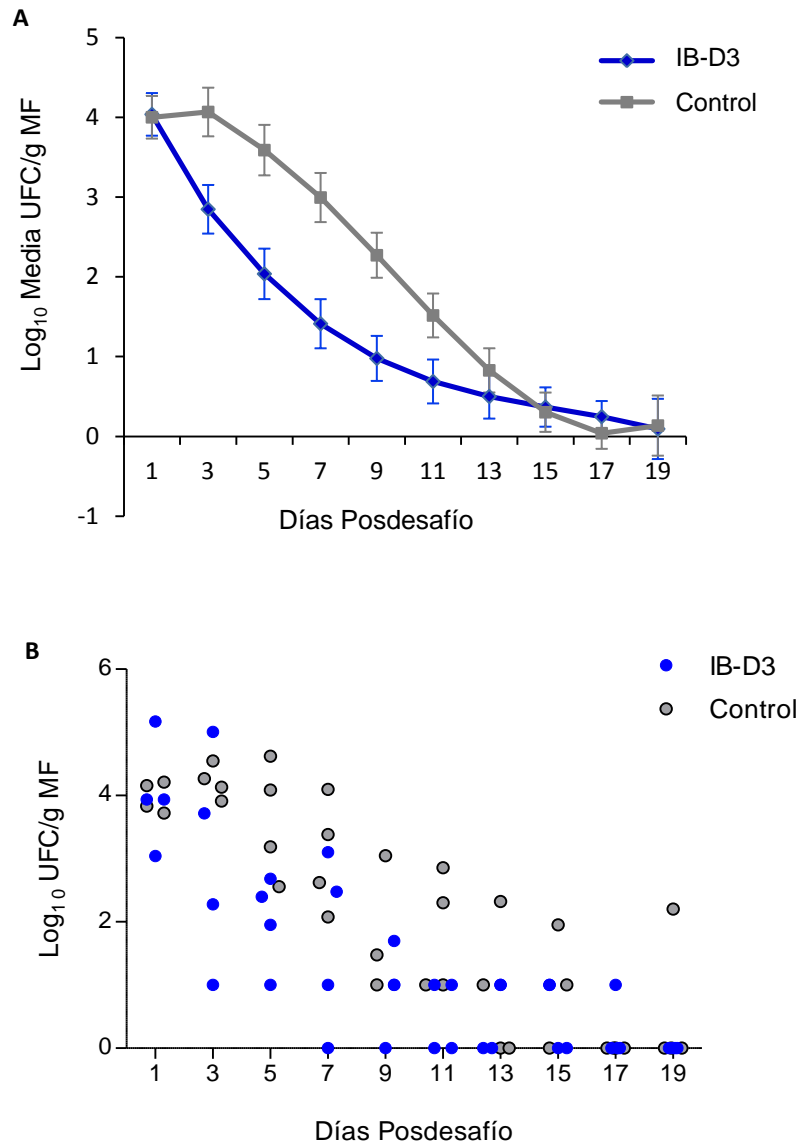


Fig. 34: Excreción fecal de EHEC O157:H7 NaI<sup>R</sup> de terneros inmunizados con la vacuna IB-D3. A) Modelado de la excreción de EHEC O157:H7 que muestra la tendencia de las estimaciones en log<sub>10</sub> de las UFC/g ± ES de los grupos IB-D3 y Control. Los animales del grupo Control exhibieron el mayor valor de excreción bacteriana. Las diferencias entre los animales de los grupos IB-D3 y Control fueron significativas ( $P < 0.05$ ) hasta el día 13. Luego la diferencia se volvió menor y no significativa. B) Gráfico de puntos de los datos de la excreción de EHEC O157:H7 en log<sub>10</sub> de UFC/g de cada ternero a lo largo de todo el ensayo.

En cuanto a la histopatología, no se observaron cambios histológicos compatibles con las lesiones de adherencia-borrado de las microvellosidades o agrupaciones de bacterias adheridas en las secciones intestinales de ninguno de los animales de ambos grupos.

### 7.3.3 Efecto del suero de los animales vacunados en la inhibición de la hemólisis de GRO por parte de EHEC O157:H7

Se produjo una inhibición promedio de la hemólisis del 57,75 % cuando se enfrentó la bacteria con el suero de los terneros control, mientras que cuando se trató la cepa EHEC con el suero de animales vacunados, la inhibición de la hemólisis fue del 80,75 %, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ( $P = 0,01$ ) como puede verse en la figura 35.

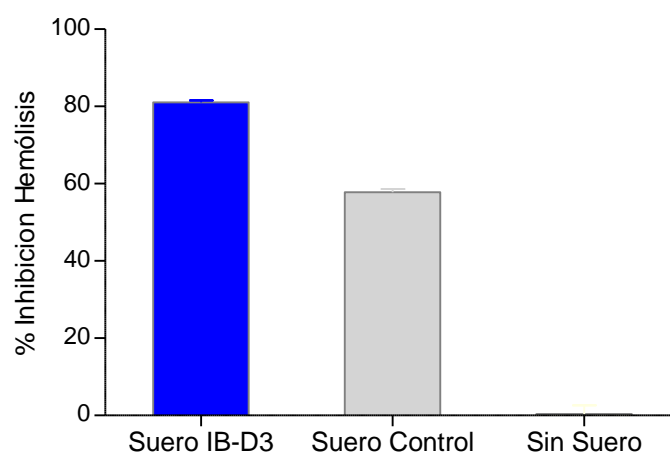


Fig. 35: Porcentajes de inhibición de la hemólisis de GRO por parte de HEHEC O157:H7, producida por los anticuerpos presentes en el suero de animales del grupo vacunados con IB-D3, grupo Control y control positivo de hemólisis (sin suero). Los resultados de presentan como el promedio de las mediciones y las líneas verticales indican el ES.

### 7.3.4 Efecto del suero de los animales vacunados en la inhibición de la adherencia de EHEC O157:H7 a células Hep-2

El porcentaje de adherencia de EHEC 438/99Na<sup>R</sup> fue, en promedio, del 2 % para las bacterias tratadas con el suero de los animales vacunados con IB-D3, 21 % para las tratadas con el suero de los animales control, y 35 % para las que no fueron tratadas (figura 36 A). El porcentaje de adherencia relativo fue, considerando 100 % para las EHEC sin tratar, del 24 % para las tratadas con suero de terneros vacunados y 70 % para las tratadas con suero de los terneros control (figura 36 B).

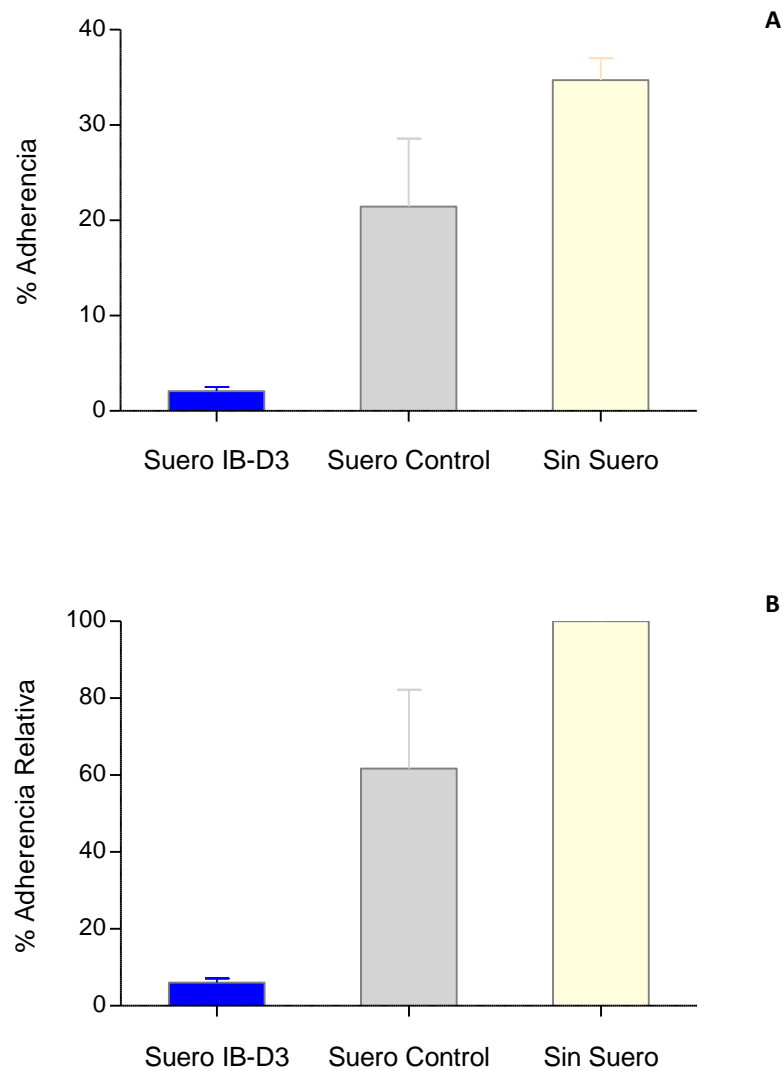


Fig. 36: Resultados de los ensayos de inhibición de la adherencia de EHEC O157:H7 a células Hep-2. A) Porcentaje de adherencia total de EHEC O157:H7 a células Hep-2 cuando fueron tratadas con suero IB-D3, control o sin suero. B) Porcentaje relativo de adherencia de las bacterias incubadas con los sueros IB-D3 y control, considerando al tratamiento sin suero como el 100 %. Los resultados se presentan como el promedio de las mediciones y las líneas verticales indican el ES. Hay diferencia significativa entre los sueros de los animales vacunados y los del grupo control ( $P=0,02$ ).

## 7.4 Discusión

Se ha demostrado que con dos dosis de una vacuna sistémica que contiene el dominio C-terminal de Intimina y EspB se redujo la colonización y excreción bacteriana en terneros después de un desafío con *E. coli* O157:H7. La inmunización también indujo, para ambos antígenos, títulos altos de IgG en suero y una respuesta de IgA e IgG en mucosas.

Se podría explicar la reducción de la excreción como debida a la presencia de IgG e IgA en la mucosa intestinal. Dado que, aunque no se pudo detectar coproanticuerpos, la presencia de los anticuerpos IgG e IgA específicos para los antígenos recombinantes en saliva estaría relacionada con su presencia a nivel de mucosas. Los estudios de vacunas donde las muestras para determinación de anticuerpos fueron tomadas por hisopado rectal revelaron que la inmunización sistémica del ganado bovino produjo respuestas similares en diferentes secreciones mucosas [108]. Según trabajos publicados, la eficacia de vacunas sistémicas para generar respuesta IgA es variable [106,107,111,139]. Aunque la respuesta IgA posterior a una inmunización intramuscular es inducida principalmente en los tejidos linfoides, se ha observado un *homing* incrementado de IgA-ASC al tejido linfoide asociado al intestino cuando el antígeno es suplementado con calcitriol [137]. Se ha demostrado que esta hormona esteroide puede mejorar la respuesta antígeno-específica de IgA en suero así como en secreciones mucosas después de una inmunización intramuscular [137]. En nuestro estudio, el agregado de calcitriol a la formulación de la vacuna podría haber desviado la respuesta inmune a EspB e Int- $\gamma$ 280, favoreciendo y estimulando una respuesta de anticuerpos a nivel de mucosas. También se puede pensar en que los terneros, dada su edad, podrían haber tenido un encuentro previo con ambas proteínas, dado que se ha señalado que, ante una inmunización sistémica, se requiere una imprimación de la mucosa para generar una respuesta intestinal específica de IgA [173,174]. En un estudio previo, nuestro grupo encontró que el 77 % de muestras de calostro de vacas de establecimientos de la provincia de Buenos Aires contenía anticuerpos IgG contra EspB e Int- $\gamma$ 280 [101]. Estos datos indican una alta exposición del ganado a *E. coli* O157:H7 u otras cepas de *E. coli* que codifican para EspB o Intimina altamente homólogas.

Observamos la mayor respuesta de anticuerpos al momento del desafío; sin embargo, a pesar de que el nivel de la IgG sérica se mantuvo durante todo el ensayo, los anticuerpos mucosos

decrecieron luego del refuerzo hasta volverse casi indetectables al día 54. Tal vez el tiempo transcurrido entre el refuerzo y el momento de la siguiente toma de muestra pudo haber sido demasiado largo para detectar un posible incremento en los anticuerpos mucosos.

La presencia de anticuerpos contra un componente principal del SSTT como EspB, fue capaz de aumentar significativamente el porcentaje de inhibición de la hemólisis comparado con un suero que no contenía este tipo de IgG. Esto podría deberse a que EspB forma parte de la estructura encargada directamente de la formación del poro en la membrana del eritrocito. Por otra parte, las IgG específicas para Intimina del suero de los animales vacunados fueron responsables de la disminución de la adherencia total y relativa de las EHEC a Hep-2. Esto sería producto de la interacción de los anticuerpos específicos contra Int-γ280 que interfieren con la unión entre la Intimina bacteriana y el receptor Tir transferido a la célula. Estos resultados están en línea con observaciones previas donde los anticuerpos anti-Intimina son capaces de bloquear la adherencia de *E. coli* O157:H7 a cultivos celulares [168,175]. Tanto el aumento en la inhibición de la lisis de glóbulos rojos como la reducción de la adherencia a células Hep-2 nos estarían indicando que los anticuerpos generados en terneros por la vacuna ensayada podrían disminuir el nivel de adherencia de EHEC a células epiteliales e interferir en la acción del SSTT bacteriano.

El curso temporal de la excreción mostró un incremento inicial seguido de una brusca caída en el recuento de bacterias. Un patrón de excreción similar se ha observado en terneros grandes o bovinos adultos [61,149,154] pero no en terneros muy pequeños (1-2 meses), en los cuales hay excreción de EHEC O157:H7 por períodos más largos de tiempo [61]. Un animal del grupo control tuvo un patrón de mediciones aleatorio, lo que contribuyó a incrementar la heterogeneidad de la variancia. La ausencia de lesiones histopatológicas en las muestras intestinales fue esperable si se considera que la bacteria inoculada fue recuperada de un solo

animal del grupo control en el día 19 posterior al desafío, lo que indicó bajo nivel intestinal de *E. coli* O157:H7, probablemente insuficientes para observar lesiones /AE.

Los terneros del grupo control fueron colonizados exitosamente por *E. coli* O157:H7. Esto fue respaldado por la observación de que la excreción bacteriana fue detectada al menos hasta el día 11 posterior a la inoculación oral en todos los animales.

**8.0 Ensayo Vacuna de Envolturas Bacterianas (EBs) de  
*Escherichia coli* O157:H7 en Bovinos**

## 8.1 Introducción

Las EBs de *Escherichia coli* O157:H7 son producidas por la expresión controlada del gen de lisis *E* PhiX174. La lisis de bacterias mediada por *E* resulta en la formación de envolturas celulares bacterianas vacías, que conservan la misma composición de superficie celular que sus homólogas viables. Incluso estructuras muy sensibles y frágiles como los *pili* se muestran bien conservadas por esta tecnología, como se ha demostrado para las EBs de *Vibrio cholerae* que son capaces de expresar los *pili* que están corregulados con la toxina colérica [176].

Se ha informado que las EBs de *Mannheimia haemolytica*, que inducen inmunidad en el ganado bovino, muestran en conejos un espectro más amplio de protección que *M. haemolytica* químicamente inactivada [177,178]. También se han realizado experiencias con dos vacunas de EBs de EPEC, cuya inoculación en ratones generaron respuestas inmunes que resultaron protectoras contra un desafío con una cepa virulenta y mostraron un 84% y un 90 % de supervivencia [179]. Si buscamos antecedentes para EHEC, encontramos que la inmunización oral de ratones con EBs de *E. coli* O157: H7 condujo al 86,6 % de protección contra un desafío realizado con una cepa de *E. coli* O157: H7 heteróloga letal después de una inmunización de refuerzo [180].

Teniendo en cuenta que las EBs conservan estructuras de superficie, probablemente ligadas a la adherencia y colonización, y que son capaces de generar una respuesta inmune protectora; se procedió al ensayo de una vacuna basada en EBs de *E. coli* O157:H7.

## 8.2 Materiales y Métodos

### 8.2.1 Animales e instalaciones



Los terneros, de entre 6 y 8 meses de edad, raza Holando Argentino, y negativos para EHEC O157:H7; se adquirieron en el establecimiento Los Nogales, Navarro, provincia de Buenos Aires. Se albergaron en los corrales del CICVyA al ingreso y permanecieron allí para su aclimatamiento y para la vacunación. El desafío con *E. coli* O157:H7 se realizó en NBT2. Los bovinos se alimentaron con forraje y tuvieron acceso al agua a voluntad durante toda la experiencia. Para prevenir la posible acción de parásitos que pudieran interferir con el desarrollo del ensayo, se les aplicó una dosis de Ivermectina cuando ingresaron al predio de INTA.

### **8.2.2 Producción de las EBs**

Las EBs bacterianas utilizadas en este trabajo fueron gentilmente cedidas por la Dra. Petra Lubitz (BIRD-C, Austria). Se obtuvieron, básicamente, según lo describen Mayr *et al.* [180], del siguiente modo:

Las EBs (cepa EHEC O157:H7 CIP 105282) se produjeron en un fermentador de 10 l, con una velocidad de agitación de 350 rpm y 3,5 l de aire por min. Los valores de pH se mantuvieron entre 6,5 y 7,5; necesarios para una lisis exitosa por parte de E. Para inducir la nucleasa, se agregó IPTG a un cultivo con una  $DO_{600}$  de 0,3. La lisis mediada por la proteína E se indujo 45 min después por un cambio de temperatura de 28 °C a 42 °C. Se agregaron  $MgCl_2$  y  $CaCl_2$  90 min después de la lisis. Las EBs se recolectaron por centrifugación y se lavaron tres veces con una solución de NaCl 0,85 % (con 1/3, 1/6, y finalmente 1/12 del volumen inicial del cultivo). El *pellet* final de EBs se resuspendió en 20 ml de agua destilada y se liofilizó por 24 h. Como control de viabilidad se inocularon 10 mg de la preparación liofilizada en placas de LB, se incubaron por una semana a 28 °C, y se analizaron por recuento de colonias.

### **8.2.3 Preparación de vacuna EBs**

Se resuspendieron 10 mg de envolturas celulares de *E. coli* O157:H7 en 5 ml de PBS el día previo a la vacunación y se guardó a 4 °C hasta su uso. Se debió mezclar muy bien para lograr una suspensión homogénea. Se agitó primero en vórtex, luego se pasó a través de una aguja

18 G con una jeringa, y si fue necesario, se sometió a la preparación a la acción de un sonicador.

**Dosis:** La dosis de 5 ml (10 mg EBs) se aplicó en distintos sitios de la parrilla costal, vía subcutánea (SC). El grupo control recibió sólo PBS.

### 8.2.4 Diseño experimental

Se utilizaron 10 terneros. Se inocularon 5 con la vacuna EBs y 5 con PBS, según el esquema de la figura 37. El desafío se realizó a los 35 días de iniciado el ensayo; se empleó un inóculo de  $10^9$  UFC de la cepa de *E. coli* O157:H7 438/99NaI<sup>R</sup>. Se tomaron muestras de sangre, saliva y MF los días en que se vacunó, el día del desafío y 14 días después. Las muestras de HMRA y MF para enriquecimiento y recuento se tomaron día por medio luego de realizado el desafío.

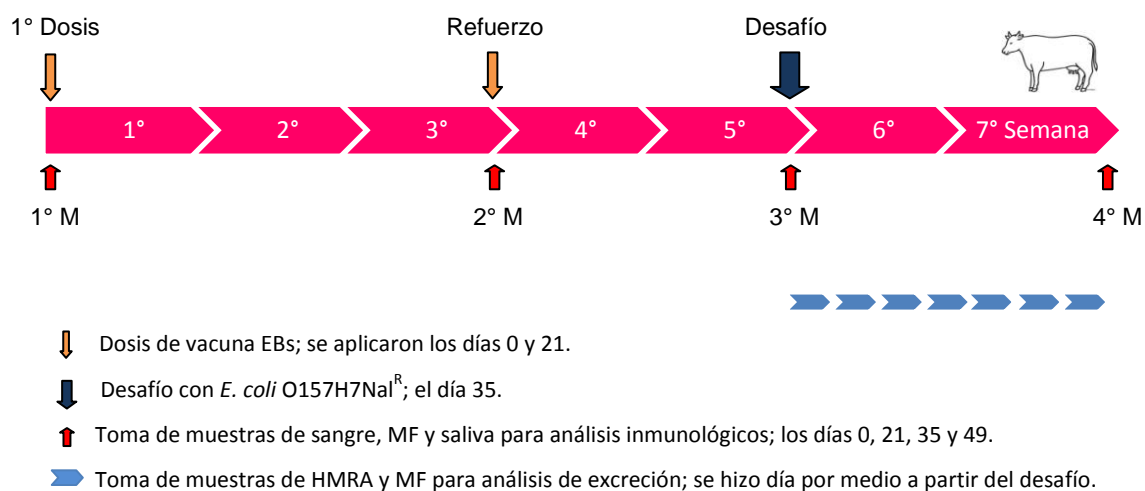


Fig. 37: Curso del ensayo.

### 8.2.5 Toma y procesamiento de muestras para medir la respuesta inmune

Para medir la respuesta de anticuerpos, las muestras de sangre se tomaron y procesaron como se describe en el punto 7.2.4 de la sección 7.0 (Ensayo Vacuna IB-D3 en Bovinos con Desafío),

página 85. La saliva y la MF recolectadas también fueron procesadas como se indica en el citado punto.

El ensayo ELISA para determinar los títulos de IgG e IgA séricos contra las EBs siguió los lineamientos referidos en la página 85 (sección 7.0), con la diferencia de que esta vez los pocillos de las placas se cubrieron con 1 µg de EBs en *buffer* carbonato-bicarbonato pH 9,6 (NaHCO<sub>3</sub> 0,05 M).

El nivel de los anticuerpos séricos contra el LPS bacteriano se determinó con un protocolo similar al del punto 5.2.6 de la sección 5.0 (Ensayo de Respuesta Inmune en Bovinos), página 64; sólo que en esta oportunidad los pocillos se cubrieron con 0,1 µg de LPS O157 (List Biological Laboratories, Inc., EE. UU.) en *buffer* carbonato-bicarbonato pH 9,6 y la dilución del suero fue 1:400.

En el caso de saliva y sobrenadante de MF, para compensar la variación de IgA o IgG en las muestras entre animales, los resultados se expresaron como IgA o IgG específicas normalizadas a 1 µg de IgG o IgA totales. Con tal fin se sometieron a ELISA de captura para conocer la cantidad de anticuerpos IgG e IgA totales según el protocolo ya descrito el punto 7.2.4 de la sección 7.0 (Ensayo Vacuna IB-D3 en Bovinos con Desafío), página 85. Mientras que para determinar el nivel de IgG o IgA específicos contra las EBs de O157:H7, se efectuó un ELISA indirecto similar al indicado en la página 86, sólo que esta vez los pocillos de las placas se cubrieron con 1 µg de EBs en *buffer* carbonato-bicarbonato, pH 9,6.

La especificidad de la respuesta inmune se valoró mediante *western blot* de un *pool* de antisueros y saliva de los grupos de animales vacunados y control. El procedimiento para los dos tipos de muestra fue similar al que se describe en el punto 7.2.4 de la sección 7.0, página 87; con la diferencia de que en el gel de poliacrilamida se sembraron 2,5 µg de EBs por calle, que con posterioridad a una corrida electroforética, fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa.

### **8.2.6 Ensayo de inhibición de la adherencia a células Hep-2**

Se hicieron ensayos para evaluar el nivel de inhibición de la adherencia de las EHEC a células HEp-2 provocada por los sueros de animales vacunados y control. Se siguieron los lineamientos del punto 7.2.6 de la sección 7.0, página 88.

### **8.2.7 Toma y procesamiento de muestras para medir la excreción de *Escherichia coli* 438/99NaI<sup>R</sup>**

Al igual que en el ensayo de la vacuna precedente, se tomaron muestras de MH y HMRA. La MF se utilizó para el recuento directo de UFC en placas; mientras que los HMRA se utilizaron para enriquecer las muestras y aumentar la sensibilidad de detección al utilizar SIM. Las muestras se tomaron y procesaron como ya fue descrito en el punto 6.2.5 de la sección 6.0 (Ensayo de Inoculación Experimental de *Escherichia coli* O157:H7 en Bovinos), página 75. Las colonias sospechosas fueron confirmadas, además de PCR, por el *kit* de aglutinación de látex para O157.

### **8.2.8 Estudios histológicos**

Se hicieron estudios histológicos de los animales al final de la experiencia. Se tomaron muestras de íleon, ciego, colon y unión recto-anal. Los tejidos fueron fijados en formol 10 %, incluidos en parafina, seccionados, y teñidos con hematoxilina-eosina.

### **8.2.9 Análisis estadístico**

Debido a las características similares del experimento, se utilizaron las mismas consideraciones para el análisis estadístico que se describen en la sección 7.0; y que se enuncian en la página 90.

### 8.3 Resultados

#### 8.3.1 Respuesta inmune

Luego de la segunda inmunización, los terneros mostraron un incremento significativo de IgG sérica específica para EBs de EHEC O157:H7 ( $P < 0,001$ ) pero no ocurrió lo mismo con IgA, cuya respuesta no se pudo detectar. Los títulos de IgG alcanzaron su máximo nivel después del refuerzo, y no cambiaron, en los animales vacunados, con posterioridad al desafío con *E. coli* O157:H7, como se muestra en la figura 38. Asimismo se observó un aumento leve de IgG posdesafío en los animales del grupo Control.

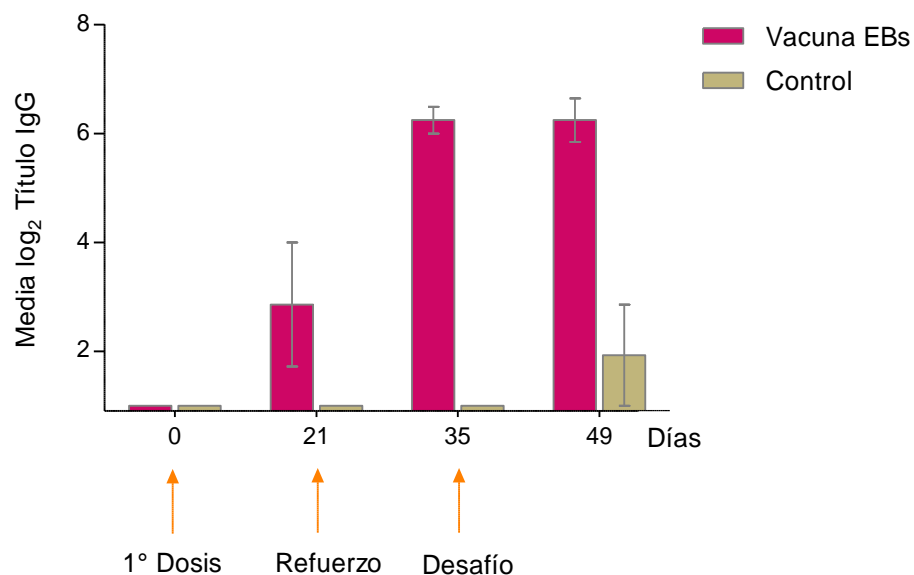


Fig. 38: Respuesta de anticuerpos IgG séricos específicos contra EBs, registrados por ELISA, de terneros inmunizados con dos dosis de 10 mg de EBs o PBS. Los resultados se muestran como la media en log<sub>2</sub> de los títulos y las líneas verticales representan el ES.

No hubo incremento de IgG sérica anti-LPS O157 durante el período de inmunización; pero después del desafío bacteriano fue observable un pequeño aumento en los dos grupos (Vacunados con EBs y Control) como se puede apreciar en la figura 39.

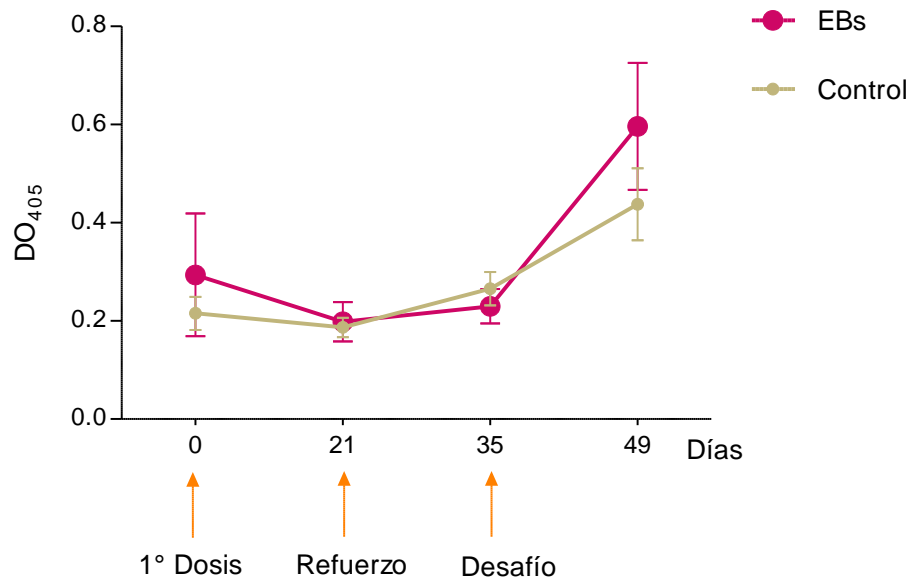


Fig. 39: Respuesta de anticuerpos IgG séricos contra LPS de O157, registrados por ELISA, de terneros inmunizados con dos dosis de 10 mg de EBs o PBS. Los resultados se muestran como la DO<sub>405</sub> media obtenida con una dilución 1:400, las líneas verticales representan el ES.

La respuesta inmune mucosa se midió en saliva y MF. La respuesta de IgA salival contra las EBs de *E. coli* O157:H7 mostró un incremento no significativo luego de la primera inmunización, y decreció con posterioridad al desafío en ambos grupos (figura 40).

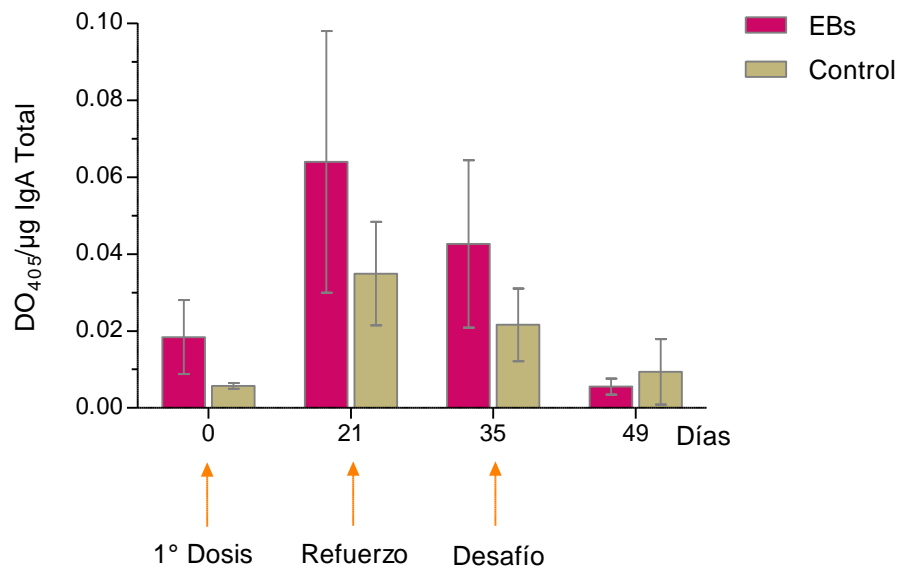


Fig. 40: Respuesta de anticuerpos específicos IgA de saliva contra las EBs, registrados por ELISA, de terneros inmunizados con dos dosis de 10 mg de EBs o PBS. Los resultados se presentan como el valor medio de la DO<sub>405</sub> de la IgA específica con respecto a 1 µg de IgA total; las líneas verticales representan el ES.

No se detectaron anticuerpos IgG en saliva mediante ELISA, aunque una leve respuesta pudo detectarse por *western blot* (figura 41). Todas las muestras de MF de ambos grupos fueron negativas para IgG e IgA anti-EBs de *E. coli* O157:H7 tanto por ELISA como por *western blot*.

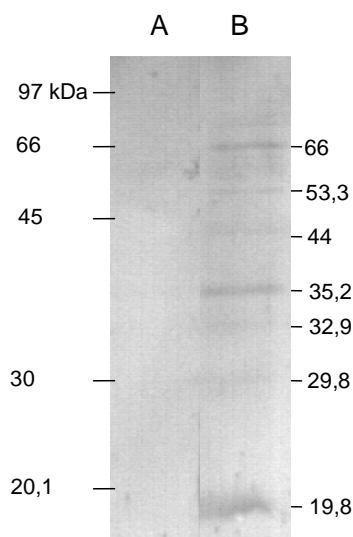


Fig. 41: *Western blot* de la respuesta de IgG de saliva contra EBs. Diluciones 1:2 de *pool*es de muestras obtenidas de terneros del grupo control (A) o del grupo vacunados EBs (B), 2 semanas posteriores a la última inmunización. Se observa reacción de las muestras de los animales inmunizados contra proteínas de distintos pesos moleculares de las EBs de O157:H7, marcadas en peso aproximado en kDa.

### 8.3.2 Efecto de la inmunización en la excreción de *Escherichia coli* 438/99NaI<sup>R</sup>

Dos semanas después del refuerzo, los terneros fueron desafiados con  $10^9$  UFC de *E. coli* 438/99NaI<sup>R</sup>. Se hicieron los cálculos de excreción bacteriana por recuento directo y enriquecimiento-SIM. Ningún ternero sufrió diarrea, ni se observaron rastros de sangre en las muestras de MF con posterioridad a la inoculación. La figura 42 A muestra la tendencia de las estimaciones de los niveles (recuentos UFC/g MF) en  $\log_{10}$  para ambos grupos de animales. Todas las diferencias entre los tratamientos después del día 9 fueron significativas ( $P < 0,05$ ). Más aún, el promedio estimado del total de la excreción durante los 15 días, expresado como área bajo la curva, fue 36,6 para el grupo control; mientras que para el grupo vacunado con las EBs fue 28,7, siendo significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ). En términos estimados de cantidad de bacterias excretadas por los dos grupos durante el período de 15 días, los animales vacunados mostraron una reducción del 52,3 %. En la figura 42 B se observan los

valores en  $\log_{10}$  del recuento bacteriano para todos los animales durante la etapa posterior a la inoculación experimental, puede notarse que en el grupo vacunado no se recuperaron bacterias luego del día 9, mientras que sí hubo presencia de EHEC O157:H7 en por lo menos dos animales del grupo control hasta la finalización del ensayo.

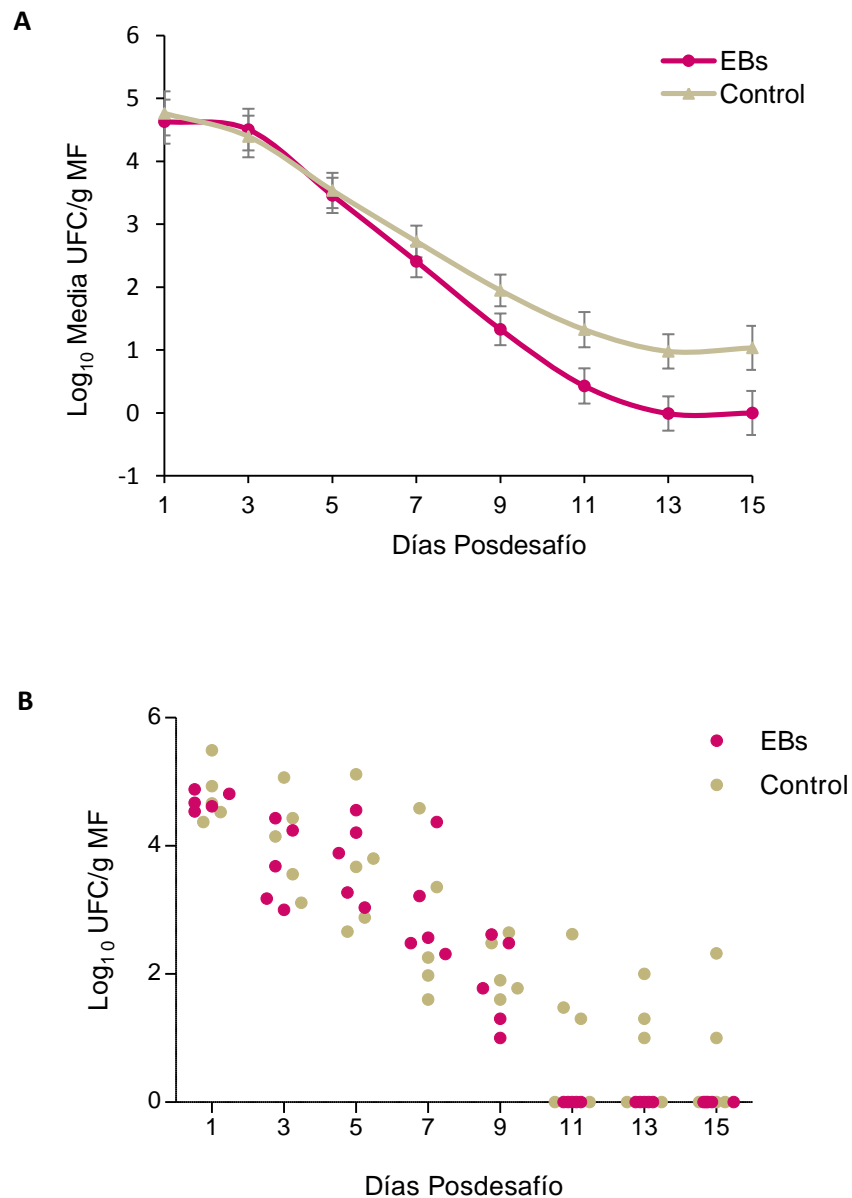


Fig. 42: Excreción fecal de EHEC O157:H7 hasta el día 15 posdesafío de los terneros vacunados y control. A) Gráfico de los estimados de la excreción por gramo de MF ( $\log_{10} \pm ES$ ). Se encontraron diferencias significativas los días 11 ( $P=0,03$ ), 13 ( $P=0,01$ ) y 15 ( $P=0,04$ ). Como representación de la excreción total de EHEC O157:H7 durante todo este período, las áreas bajo la curva de los grupos EBs y control fueron 28,7 y 36,6; resultando significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ). B) Gráfico de puntos que representan la excreción de todos los animales del ensayo después de realizada la inoculación experimental.



Al momento de la necropsia, se recuperó *E. coli* O157:H7 438/99NaI<sup>R</sup> de la unión recto-anal e íleon de un animal perteneciente al grupo Control. No se encontraron cambios histológicos que indicaran claramente lesiones A/E, ni fueron vistos grupos de bacterias adheridas a las secciones intestinales de ambos grupos de animales. Sin embargo, en todos los terneros se pudieron observar escasos neutrófilos en la lámina propia de diferentes secciones intestinales (figura 43).

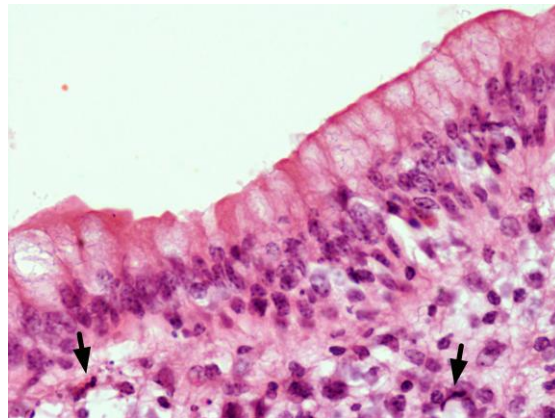


Fig. 43: Sección de la unión recto-anal de un ternero. Se observa infiltrado inflamatorio leve y escasos PNM en la lámina propia (indicados con flechas negras). Preparado teñido con hematoxilina-eosina, 400X.

### **8.3.3 Efecto del suero de los animales vacunados en la inhibición de la adherencia de EHEC O157:H7 a células Hep-2**

El porcentaje de adherencia de EHEC 438/99NaI<sup>R</sup> fue del 8 % para las bacterias tratadas con el suero de los animales vacunados con EBs de O157:H7, 47 % para las tratadas con el suero de animales control, y 53 % para las que no fueron tratadas (figura 44 A). El porcentaje de adherencia relativo fue, considerando 100 % de adherencia para las EHEC sin tratar, del 15 % para las tratadas con suero de terneros vacunados y 87 % para las tratadas con suero del grupo control (figura 44 B).

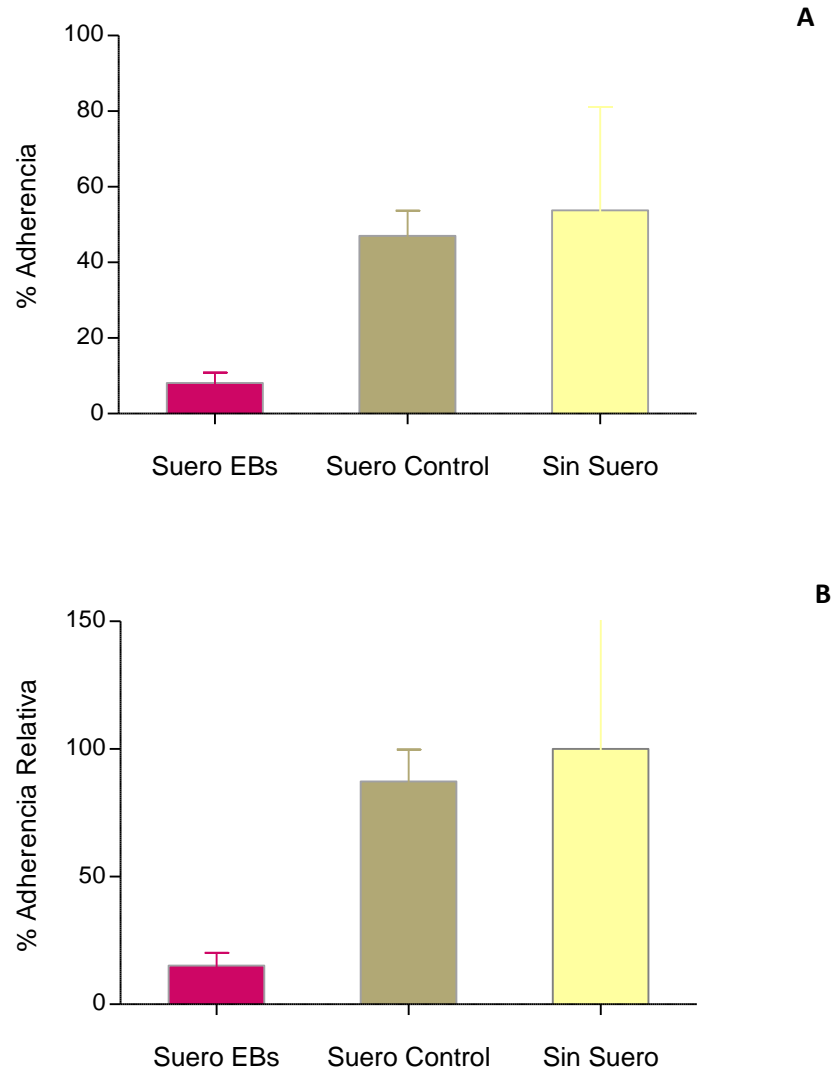


Fig. 44: Resultados de los ensayos de inhibición de la adherencia de EHEC O157:H7 a células Hep-2. A) Porcentaje de adherencia total de EHEC O157:H7 a células Hep-2 cuando fueron tratadas con suero EBs O157:H7, control o sin suero. B) Porcentaje relativo de adherencia de las bacterias incubadas con los sueros EBs y control, considerando al tratamiento sin suero como el 100 %. Los resultados se presentan como el promedio de las mediciones y las líneas verticales indican el ES. Hay diferencia significativa entre los sueros de los animales vacunados y los del grupo Control ( $P=0,02$ ).

#### 8.4 Discusión

Distintos autores han observado la reducción de la colonización o excreción de *E. coli* O157:H7 en el ganado bovino por administración de vacunas sistémicas, y algunos de estos estudios encontraron evidencias de respuesta sistémica y mucosa luego de la administración de antígenos de colonización [105,108,110,139]. En este ensayo, se demuestra que la vacunación subcutánea de terneros con EBs de *E. coli* O157:H7 puede reducir efectivamente la duración de

la excreción y también el total de bacterias excretadas. La ausencia de protección en corto término posdesafío probablemente se haya debido a una baja cantidad global de anticuerpos anti-*E. coli* O157:H7 en la mucosa intestinal que dio lugar a una reducción total de sólo el 50 % del total de la cantidad de bacterias excretadas por los animales vacunados.

Los resultados muestran que el inóculo utilizado en la infección experimental ( $10^9$  UFC) fue suficiente para establecer la colonización, evidenciada por la duración de la excreción fecal en la totalidad de los terneros no vacunados que continuó hasta el día 11 posdesafío; incluso 4 de ellos aún continuaron excretando el día 15, cuando concluyó el estudio. En contraste, ninguno de los terneros vacunados evidenció un nivel detectable de EHEC O157:H7 al día 11 posdesafío (figura 42 B).

El curso temporal de la excreción mostró inicialmente un alto nivel de eliminación, seguido de un pronunciado descenso a lo largo de las dos semanas de muestreo. En trabajos previos con terneros destetados [93,149,151] y animales adultos [61,154] infectados experimentalmente con *E. coli* O157:H7, se observó un patrón similar de excreción para los animales grandes, mientras que para los terneros destetados tuvieron una mayor y más prolongada excreción [61,107]. Estas respuestas a un desafío experimental son consistentes con estudios en establecimientos agropecuarios en los cuales las tasas de aislamiento de EHEC O157:H7 de los animales inmaduros son superiores a las de los adultos [181].

Los terneros vacunados produjeron títulos de IgG séricas significativamente superiores a los no vacunados, indicando que las EBs inoculadas vía SC fueron capaces de generar una respuesta inmune en bovinos sin el agregado de un adyuvante; esto coincide con lo informado por Liu *et al.*, trabajando con ratones y utilizando la misma vía de inoculación de EBs O157:H7 [179]. Sin embargo, la respuesta en saliva de IgG e IgA fue pobre, al tiempo que los coproanticuerpos fueron indetectables a pesar de haber minimizado la proteólisis congelando la muestra y agregándole inhibidores de proteasas. En esta línea, Babiuk *et al.* [106] mostraron que la

inmunización subcutánea de ratones con proteínas secretadas del SSTT podían prevenir la colonización y excreción de *E. coli* O157:H7 sin haberse detectado IgA específica en MF. Sin embargo, la no detección de coproanticuerpos podría deberse a títulos insuficientes de los mismos. Un ensayo previo de vacunación para *E. coli* O157:H7 [108], donde se utilizó el hisopado rectal para medir la respuesta de anticuerpos mucosos, mostró que la inmunización sistémica del ganado produjo un patrón similar de IgG e IgA en diferentes secreciones mucosas. Por lo tanto podemos pensar que la detección de anticuerpos en saliva podría estar relacionada con la presencia de cierta cantidad de anticuerpos específicos para las EBs de *E. coli* O157:H7 en la mucosa intestinal.

No se detectaron lesiones A/E en las muestras intestinales. En un trabajo publicado por Dean-Nystrom *et al.* no se encontraron *E. coli* O157:H7 en colon distal, ciego o vesícula biliar de terneros destetados inoculados experimentalmente con EHEC O157:H7 que excretaron menos de  $10^5$  UFC/g MF los 4 días posteriores a la inoculación; pero se observó la presencia de bacterias en la unión recto-anal o la válvula ileocecal de algunos de los terneros inoculados que excretaron más de  $10^5$  UFC/g MF [151]. En nuestro estudio, la bacteria inoculada pudo ser recuperada únicamente por un procedimiento de enriquecimiento-SIM en el día 15 posdesafío, lo que indicaría bajos niveles de *E. coli* O157:H7 en los segmentos intestinales analizados, probablemente insuficientes para observar lesiones A/E. La respuesta inflamatoria leve representada por los escasos neutrófilos infiltrados en la lamina propia en ambos grupos no estarían asociados a infección por *E. coli*, dado que no hubo diferencias entre los animales positivos y negativos para la presencia de la bacteria.

En estudio realizados en ratones, con estas mismas EBs de *E. coli* O157:H7, la inmunización oral seguida de un refuerzo condujo a una protección del 100 % contra un desafío; mientras que una única inmunización rectal resultó más efectiva porque no fue necesario un refuerzo para alcanzar un nivel similar de protección [182]. Este estudio con EBs de *E. coli* O157:H7 en

ratones realizado por Mayr *et al.* indicaría que, para alcanzar un mejor nivel de protección, sería más efectivo inmunizar a los animales en el sitio de infección; aunque también se ha conseguido proteger a ratones contra un desafío por medio de la inmunización SC con EBs O157:H7 [179]. Dado que el área de colonización de *E. coli* o157:H7 es el recto, un lugar rico tejido linfoide subyacente, podría utilizarse esta ruta de inmunización en animales. Agregado a esto, la aplicación oral o sublingual de EBs *E. coli* O157:H7 podría incrementar los niveles de IgA secretoria, lo que podría ser útil para la captura de la bacteria.

Por otra parte, el suero de los animales vacunados con las EBs fue capaz de provocar la disminución de la adherencia total y relativa de las EHEC O157:H7 a células Hep-2. Esto podría ser producto de la interacción de los anticuerpos específicos contra factores de adherencia que interfieren con la unión entre la bacteria y la célula. Por el momento, la especificidad de los anticuerpos generados es desconocida, al igual que los antígenos protectivos en la composición de las EBs. La falta de anticuerpos contra el LPS que se observó podría estar relacionada con las condiciones de crecimiento y procesamiento utilizadas. Este último aspecto podría mejorarse, como así también podrían ser considerados en estudios posteriores un régimen de inmunización diferente (por ejemplo la aplicación de las EBs en el agua de consumo de terneros jóvenes), o el agregado de un adyuvante; de tal modo de poder contar con una interesante estrategia de intervención prefaena.

## **9.0 Conclusiones**

Este trabajo de tesis doctoral siguió la premisa de que la vacunación puede ser una estrategia factible de intervención prefaena para reducir la excreción fecal de EHEC O157:H7 por parte de los bovinos, y una medida interesante para bajar el riesgo de contaminación en humanos.

Se pudo diseñar, producir y evaluar una vacuna experimental a subunidades compuesta por dos proteínas recombinantes de EHEC O157:H7 (EspB e Int- $\gamma$ 280); a la vez que se logró ensayar una vacuna experimental consistente en envolturas bacterianas vacías de EHEC O157:H7.

Se seleccionaron las proteínas EspA, EspB e Intimina a partir de un análisis de los antecedentes disponibles, posteriormente se produjeron de forma recombinante, y se probó su inmunogenicidad en ratones. Se eligieron finalmente EspB e Intimina y se evaluó su inmunogenicidad en bovinos. A la vez que se ensayaron las proteínas recombinantes en terneros, se examinó la acción del calcitriol como coadyuvante. Por otra parte, buscando alternativas que se ajustaran al objetivo de reducir la colonización, se consiguió obtener envolturas de EHEC O157:H7 para ser examinadas. Por lo tanto, se logró elaborar dos vacunas experimentales para ser probadas.

Se trabajó en la puesta a punto de un modelo de infección experimental en terneros de entre 6 y 8 meses. Se alcanzó este objetivo utilizando una cepa local de EHEC O157:H7.

Las dos vacunas propuestas se sometieron a un ensayo que abarcó desde su aplicación para generar una respuesta inmune hasta un desafío con EHEC O157:H7 en un modelo bovino.

Nuestros resultados indican que la inmunización sistémica con dos dosis de la vacuna formulada con las proteínas recombinantes Intimina y EspB generó una respuesta inmune significativa medida en IgG en suero e IgA en saliva y pudo reducir la colonización y la excreción de EHEC O157:H7 en terneros. Esto se pudo apreciar desde los primeros días posteriores al desafío, ya que durante prácticamente toda la duración del ensayo existió una

diferencia significativa entre el número de bacterias excretadas por los animales vacunados con respecto al grupo no inmunizado.

Por otro lado, la vacuna constituida por envolturas bacterianas logró montar una respuesta inmune significativa medida en IgG sérica y fue capaz de reducir la excreción total de EHECO157:H7 en los animales, como así también su tiempo de colonización. Esto pudo apreciarse al comparar los totales excretados en el período analizado y los días en que los animales resultaron positivos para la bacteria, siendo menores ambos parámetros para el grupo de terneros vacunados comparado con el grupo control.

Creemos que, tomando en cuenta lo expresado, se lograron cumplir los objetivos propuestos al inicio de este trabajo.



## 10.0 Bibliografía

1. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaüer MA (2006) Microbiología Médica. 5° ed. Marid: Elsevier España SA. 323-325 p.
2. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HLT (2004) Pathogenic *Escherichia coli*. Nat Rev Microbiol 2: 123–140. doi:10.1038/nrmicro818.
3. Nataro JP, Kaper JB (1998) Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev 11: 142–201.
4. Clements A, Young JC, Constantinou N, Frankel G (2012) Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. Gut Microbes 3: 71–87.
5. Lim JY, Yoon JW, Hovde CJ (2010) A Brief Overview of *Escherichia coli* O157:H7 and Its Plasmid O157. J Microbiol Biotechnol 20: 1–10. doi:10.4014/jmb.0908.08007.
6. Scheutz F, Beutin L, Piérard D, Karch H, Tozzoli R, et al. (2009) Nomenclature of Verocytotoxins: a review, a proposal, and a protocol for typing vtx genes. 4th Annu. Workshop Commun. Ref. Lab. *E. coli* VTEC, ISS, Rome, Italy.
7. Bergan J, Dyve Lingelem AB, Simm R, Skotland T, Sandvig K (2012) Shiga toxins. Toxicon 60: 1085–1107. doi:10.1016/j.toxicon.2012.07.016.
8. McDaniel T, Jarvis K, Donnenberg M, Kaper J (1995) A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. Proc Natl Acad Sci U S A 92: 1664–1668.
9. Castillo A, Eguiarte LE, Souza V (2005) A genomic population genetics analysis of the pathogenic enterocyte effacement island in *Escherichia coli*: the search for the unit of selection. Proc Natl Acad Sci U S A 102: 1542–1547. doi:10.1073/pnas.0408633102.
10. Elliott SJ, Wainwright LA, Mc Daniel TK, Jarvis KG, Deng Y, et al. (1998) The complete sequence of the locus of enterocyte effacement (LEE) from enteropathogenic *Escherichia coli* E2348/69. Mol Microbiol 28: 1–4.
11. Elliott SJ, Sperandio V, Girón JA, Mellies JL, Wainwright L, et al. (2000) The Locus of Enterocyte Effacement (LEE)-Encoded Regulator Controls Expression of Both LEE- and Non-LEE-Encoded Virulence Factors in Enteropathogenic and Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Infect Immun 68: 6115–6126. doi:10.1128/IAI.68.11.6115-6126.2000.Updated.
12. Deng W, Puente JL, Gruenheid S, Li Y, Vallance BA, et al. (2004) Dissecting virulence: Systematic and functional analyses of a pathogenicity island. Proc Natl Acad Sci U S A 101: 3597–3602. doi:10.1073/pnas.0400326101.
13. Garmendia J, Frankel G, Crepin VF (2005) Enteropathogenic and Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Infections: Translocation, Translocation, Translocation. Infect Immun 73: 2573–2585. doi:10.1128/IAI.73.5.2573.
14. Burland V, Shao Y, Perna NT, Plunkett G, Sofia HJ, et al. (1998) The complete DNA sequence and analysis of the large virulence plasmid of *Escherichia coli* O157:H7. Nucleic Acids Res 26: 4196–4204.
15. Rivas M, Miliwebsky E, Chinen I, Deza N, Leotta GA (2006) Epidemiología del Síndrome Urémico Hemolítico en Argentina. Diagnóstico del agente etiológico, reservorios y vías de transmisión. Medicina (B Aires) 66: 27–32.
16. Rivas M, Sosa-Estani S, Rangel J, Caletti MG, Vallés P, et al. (2008) Risk Factors for Sporadic Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* Infections in Children, Argentina. Emerg Infect Dis 14: 763–771.

17. Karmali MA, Mascarenhas M, Shen S, Ziebell K, Johnson S, et al. (2003) Association of Genomic O Island 122 of *Escherichia coli* EDL 933 with Verocytotoxin-Producing *Escherichia coli* Seropathotypes That Are Linked to Epidemic and/or Serious Disease. *J Clin Microbiol* 41: 4930–4940. doi:10.1128/JCM.41.11.4930.
18. EFSA Panel on Biological Hazards (2013) Scientific Opinion on VTEC-seropathotype and scientific criteria regarding pathogenicity assessment. *EFSA J* 11 (4):318: 1–106. doi:10.2903/j.efsa.2013.3138.Available.
19. Servicio Fisiopatogenia. Departamento de Bacteriología. INEAE-ANLIS “Carlos G. Malbrán” (2011) Manual de Procedimientos. Diagnóstico y Caracterización de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga O157 y no-O157 a partir de especímenes clínicos. 153 p.
20. Bergen S (2015) *Escherichia coli* diarrhea. *Infectious Diseases of the World*. Los Angeles, California: GIDEON Informatics Inc. pp. 378–384.
21. Pihkala N, Bauer N, Eblen D, Evans P, Johnson R, et al. (2012) Risk Profile for Pathogenic Non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*.
22. Pennington H (2010) *Escherichia coli* O157. *Lancet* 376: 1428–1435.
23. Exeni RA, Fernández G, Palermo MS (2007) Papel de los leucocitos polimorfonucleares, los monocitos y la fractalquina en la fisiopatología del síndrome urémico hemolítico típico. *Rev Nefrol Diálisis y Traspl* 27: 177–180.
24. Exeni RA, Fernández GC, Palermo MS (2007) Role of Polymorphonuclear Leukocytes in the Pathophysiology of Typical Hemolytic Uremic Syndrome. *Sci World J* 7: 1155–1164. doi:10.1100/tsw.2007.172.
25. Dean-Nystrom EA, Bosworth BT, Moon HW, O’Brien AD (1998) *Escherichia coli* O157:H7 requires intimin for enteropathogenicity in calves. *Infect Immun* 66: 4560–4563.
26. Caletti MG, Petetta D, Jaite M, Casaliba S, Gimenez A (2006) Evaluación de costos directos e indirectos del tratamiento del Síndrome Urémico Hemolítico en sus distintas etapas evolutivas. *Medicina (B Aires)* 66: 22–26.
27. Exeni RA (2006) Síndrome Urémico Hemolítico. Manifestaciones clínicas. Tratamiento. *Medicina (B Aires)* 66: 6–10.
28. Gianantonio C, Vitacco M, Mendilaharsu F, Ruddy A, Mendilaharsu J (1964) The hemolytic-uremic syndrome. *J Pediatr* 64: 478–491. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0022-3476(64)80337-1.
29. Antman J, Geffner L, Pianciola L, Rivas M (2014) Informe Especial I: Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) en Argentina, 2010-2013. Boletín integrado de Vigilancia N°222-SE30. Secretaría de Promoción y Programas Sanitarios. Ministerio de Salud. pp. 92–105.
30. Rivas M, Chinen I, Miliwebsky E, Deza E, Carbonari C, et al. (2012) 8th International Symposium on Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Infections (VTEC 2012). *Epidemiology and Molecular Surveillance of Shiga Toxin-Producing Escherichia coli Human Infections in Argentina*.
31. Mellor GE, Sim EM, Barlow RS, D’Astek BA, Galli L, et al. (2012) Phylogenetically related Argentinean and Australian *Escherichia coli* O157 isolates are distinguished by virulence clades and alternative shiga toxin 1 and 2 prophages. *Appl Environ Microbiol* 78: 4724–4731. doi:10.1128/AEM.00365-12.
32. Manning SD, Motiwala AS, Springman AC, Qi W, Lacher DW, et al. (2008) Variation in virulence among clades of *Escherichia coli* O157:H7 associated with disease outbreaks. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 4868–4873. doi:10.1073/pnas.0710834105.
33. Fairbrother JM, Nadeau É (2006) *Escherichia coli*: on-farm contamination of animals. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 25: 555–569.

34. Midgley J, Desmarchelier P (2001) Pre-slaughter handling of cattle and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC). *Lett Appl Microbiol* 32: 307–311.
35. Hovde C, Sheng H, Baker K, Deobald C, Davis M, et al. (2012) 8th International Symposium on Shiga Toxing Producing *Escherichia coli* Infections (VTEC 2012). Experimental Evaluation of the Basis of Seasonal Variation in Bovine Shedding of STEC O157.
36. Hussein HS (2007) Prevalence and pathogenicity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef cattle and their products. *J Anim Sci* 85: E63–E72. doi:10.2527/jas.2006-421.
37. Ferens WA, Hovde CJ (2011) *Escherichia coli* O157:H7: Animal Reservoir and Sources of Human Infection. *Foodborne Pathog Dis* 8: 465–487.
38. Hussein HS, Sakuma T (2005) Invited Review: Prevalence of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in Dairy Cattle and Their Products. *J Dairy Sci* 88: 450–465.
39. Parma AE, Sanz ME, Blanco JE, Blanco J, Viñas MR, et al. (2000) Virulence genotypes and serotypes of verotoxigenic *Escherichia coli* isolated from cattle and foods in Argentina. *Eur J Epidemiol* 16: 757–762.
40. Padola NL, Sanz ME, Blanco JE, Blanco M, Blanco J, et al. (2004) Serotypes and virulence genes of bovine Shigatoxigenic *Escherichia coli* (STEC) isolated from a feedlot in Argentina. *Vet Microbiol* 100: 3–9. doi:10.1016/S0378-1135(03)00127-5.
41. Meichtri L, Miliwebsky E, Gioffré A, Chinen I, Baschkier A, et al. (2004) Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in healthy young beef steers from Argentina: prevalence and virulence properties. *Int J Food Microbiol* 96: 189–198. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.018.
42. Mercado EC, Gioffré A, Rodríguez SM, Cataldi A, Irino K, et al. (2004) Non-O157 Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* Isolated from Diarrhoeic Calves in Argentina. *J Vet Med Ser B* 51: 82–88. doi:10.1111/j.1439-0450.2004.00729.x.
43. Tanaro JD, Leotta GA, Lound LH, Galli L, Piaggio MC, et al. (2010) *Escherichia coli* O157 in bovine feces and surface water streams in a beef cattle farm of Argentina. *Foodborne Pathog Dis* 7: 475–477.
44. Fernández D, Irino K, Sanz ME, Padola NL, Parma AE (2010) Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from dairy cows in Argentina. *Lett Appl Microbiol* 51: 377–382. doi:10.1111/j.1472-765X.2010.02904.x.
45. Gioffré A, Meichtri L, Miliwebsky E, Baschkier A, Chillemi G, et al. (2002) Detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* by PCR in cattle in Argentina: Evaluation of two procedures. *Vet Microbiol* 87: 301–313. doi:10.1016/S0378-1135(02)00079-2.
46. Blanco M, Padola NL, Krüger A, Sanz ME, Blanco JE, et al. (2004) Virulence genes and intimin types of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle and beef products in Argentina. *Int Microbiol* 7: 269–276.
47. Tanaro JD, Galli L, Lound LH, Leotta GA, Piaggio MC, et al. (2012) Non-O157:H7 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in Bovine Rectums and Surface Water Streams on a Beef Cattle Farm in Argentina. *Foodborne Pathog Dis* 9: 878–884. doi:10.1089/fpd.2012.1182.
48. Padola NL, Etcheverría AI, Lucchesi PMA, Krüger A, Sanz ME, et al. (2012) 8th International Symposium on Shiga Toxing Producing *Escherichia coli* Infections (VTEC 2012). Prevalent STEC serotypes isolated from cattle, foods and environment in Argentina.
49. Masana MO, Leotta GA, del Castillo LL, Astek BAD, Palladino PM, et al. (2010) Prevalence , Characterization, and Genotypic Analysis of *Escherichia coli* O157:H7/NM from Selected Beef Exporting Abattoirs of Argentina. *J Food Prot* 73: 649–656.

50. Jure MA, Condori S, Leotta GA, Chinen I, Miliwebsky E, et al. (2010) Detección, aislamiento y caracterización de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga a partir de carne molida fresca proveniente de carnicerías de Concepción, provincia de Tucumán. *Rev Argent Microbiol* 42: 284–287.
51. Llorente P, Barnech L, Irino K, Rumi MV, Bentancor A (2014) Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from ground beef collected in different socioeconomic strata markets in Buenos Aires, Argentina. *Biomed Res Int* 2014. doi:10.1155/2014/795104.
52. Brusa V, Aliverti V, Aliverti F, Ortega EE, de la Torre JH, et al. (2012) Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef retail markets from Argentina. *Front Cell Infect Microbiol* 2. doi:10.3389/fcimb.2012.00171.
53. Stevens MP, Roe AJ, Vlisidou I, Diemen PM Van, Ragione RM La, et al. (2004) Mutation of *toxB* and a Truncated Version of the *efa-1* Gene in *Escherichia coli* O157:H7 Influences the Expression and Secretion of Locus of Enterocyte Effacement-Encoded Proteins but not Intestinal Colonization in Calves or Sheep. *Infect Immun* 72: 5402–5411. doi:10.1128/IAI.72.9.5402.
54. Dziva F, van Diemen PM, Stevens MP, Smith AJ, Wallis TS (2004) Identification of *Escherichia coli* O157:H7 genes influencing colonization of the bovine gastrointestinal tract using signature-tagged mutagenesis. *Microbiology* 150: 3631–3645. doi:10.1099/mic.0.27448-0.
55. Van Diemen PM, Dziva F, Stevens MP, Wallis TS (2005) Identification of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26:H– Genes Required for Intestinal Colonization in Calves. *Infect Immun* 73: 1735–1743. doi:10.1128/IAI.73.3.1735.
56. Naylor SW, Low JC, Besser TE, Mahajan A, Gunn GJ, et al. (2003) Lymphoid Follicle-Dense Mucosa at the Terminal Rectum Is the Principal Site of Colonization of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in the Bovine Host. *Infect Immun* 71: 1505–1512. doi:10.1128/IAI.71.3.1505.
57. Sheng H, Lim JY, Knecht HJ, Li J, Hovde CJ (2006) Role of *Escherichia coli* O157:H7 virulence factors in colonization at the bovine terminal rectal mucosa. *Infect Immun* 74: 4685–4693. doi:10.1128/IAI.00406-06.
58. Chase-Topping M, Gally D, Low C, Matthews L, Woolhouse M (2008) Super-shedding and the link between human infection and livestock carriage of *Escherichia coli* O157. *Nat Rev Microbiol* 6: 904–912. doi:10.1038/nrmicro2029.
59. Cobbold RN, Hancock DD, Rice DH, Berg J, Stilborn R, et al. (2007) Rectoanal Junction Colonization of Feedlot Cattle by *Escherichia coli* O157:H7 and Its Association with Supershedders and Excretion Dynamics. *Appl Environ Microbiol* 73: 1563–1568. doi:10.1128/AEM.01742-06.
60. Matthews L, McKendrick IJ, Ternent H, Gunn GJ, Synge B, et al. (2006) Super-shedding cattle and the transmission dynamics of *Escherichia coli* O157. *Epidemiol Infect* 134: 131–142. doi:10.1017/S0950268805004590.
61. Cray WC, Moon HW (1995) Experimental infection of calves and adult cattle with *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol* 61: 1586–1590.
62. García A, Fox JG, Besser TE (2010) Zoonotic Enterohemorrhagic *Escherichia coli*: A One Health Perspective. *Ilar J* 51: 221–232.
63. LeJeune JT, Wetzel AN (2007) Preharvest control of *Escherichia coli* O157 in cattle. *J Anim Sci* 85: E73–E80. doi:10.2527/jas.2006-612.
64. Garber LP, Wells SJ, Hancock DD, Doyle MP, Tuttle J, et al. (1995) Risk factors for fecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy calves. *JAmVet Med Assoc* 207: 46–49.
65. Dargatz D, Wells L, Hancock D, Garber L (1997) Factors associated with the presence of *Escherichia coli* O157 in the feces of feedlot cattle. *J Food Prot* 60: 466–470.

66. Herriott DE, Hancock DD, Ebel ED, Carpenter L V, Rice DH, et al. (1998) Association of herd management factors with colonization of dairy cattle by Shiga toxin-positive *Escherichia coli* O157. *J Food Prot* 61: 802–807.
67. Diez-Gonzalez F, Callaway TR, Kizoulis MG, Russell JB (1998) Grain Feeding and the Dissemination of Acid-Resistant *Escherichia coli* from Cattle. *Science* 281: 1666–1668. doi:10.1126/science.281.5383.1666.
68. Hovde CJ, Austin PR, Cloud KA, Williams CJ, Hunt CW (1999) Effect of Cattle Diet on *Escherichia coli* O157:H7 Acid Resistance. *Appl Environ Microbiol* 65: 3233–3235.
69. Buchko SJ, Holley RA, Olson WO, Gannon VPJ, Veira DM (2000) The effect of different grain diets on fecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 by steers. *J Food Prot* 63: 1467–1474.
70. Callaway TR, Elder RO, Keen JE, Anderson RC, Nisbet DJ (2003) Forage Feeding to Reduce Preharvest *Escherichia coli* Populations in Cattle, a Review. *J Dairy Sci* 86: 852–860. doi:http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73668-6.
71. Tkalcic S, Brown CA, Harmon BG, Jain A V, Mueller EP, et al. (2000) Effects of Diet on Rumen Proliferation and Fecal Shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in Calves. *J Food Prot* 63: 1630–1636.
72. Schrezenmeir J, de Vrese M (2001) Probiotics, prebiotics, and synbiotics—approaching a definition . *Am J Clin Nutr* 73 : 361s – 364s.
73. Tkalcic S, Zhao T, Harmon BG, Doyle MP, Brown CA, et al. (2003) Pathogenicity of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in neonatal calves and evaluation of fecal shedding by treatment with probiotic *Escherichia coli*. *J Food Prot* 66: 924–930.
74. Tkalcic S, Zhao T, Harmon BG, Doyle MP, Brown CA, et al. (2003) Fecal shedding of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in weaned calves following treatment with probiotic *Escherichia coli*. *J Food Prot* 66: 1184–1189.
75. Brashears MM, Galyean ML, Loneragan GH, Mann JE, Killinger-Mann K (2003) Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 and performance by beef feedlot cattle given *Lactobacillus* direct-fed microbials. *J Food Prot* 66: 748–754.
76. Elam NA, Gleghorn JF, Rivera JD, Galyean ML, Defoor PJ, et al. (2003) Effects of live cultures of *Lactobacillus acidophilus* (strains NP45 and NP51) and *Propionibacterium freudenreichii* on performance, carcass, and intestinal characteristics, and *Escherichia coli* strain O157 shedding of finishing beef steers. *J Anim Sci* 81: 2686–2698.
77. Younts-Dahl SM, Osborn GD, Galyean ML, Rivera JD, Loneragan GH, et al. (2005) Reduction of *Escherichia coli* O157 in finishing beef cattle by various doses of *Lactobacillus acidophilus* in direct-fed microbials. *J Food Prot* 68: 6–10.
78. Tabe ES, Oloya J, Doetkott DK, Bauer ML, Gibbs PS, et al. (2008) Comparative effect of direct-fed microbials on fecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* in naturally infected feedlot cattle. *J Food Prot* 71: 539–544.
79. Galland JC, Hyatt DR, Crupper SS, Acheson DW (2001) Prevalence, Antibiotic Susceptibility, and Diversity of *Escherichia coli* O157:H7 Isolates from a Longitudinal Study of Beef Cattle Feedlots. *Appl Environ Microbiol* 67: 1619–1627. doi:10.1128/AEM.67.4.1619-1627.2001.
80. Stephan R, Schumacher S (2001) Resistance patterns of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains isolated from animals, food and asymptomatic human carriers in Switzerland. *Lett Appl Microbiol* 32: 114–117.
81. Mora A, Blanco JE, Blanco M, Alonso MP, Dhahi G, et al. (2005) Antimicrobial resistance of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* O157:H7 and non-O157 strains isolated from humans, cattle, sheep and food in Spain. *Res Microbiol* 156: 793–806.

82. Woerner DR, Ransom JR, Sofos JN, Scanga JA, Smith GC, et al. (2006) Preharvest processes for microbial control in cattle. *Food Prot trends* 26: 393–400.
83. Callaway TR, Anderson RC, Genovese KJ, Poole TL, Anderson TJ, et al. (2002) Sodium chlorate supplementation reduces *E. coli* O157:H7 populations in cattle. *J Anim Sci* 80: 1683–1689.
84. Anderson RC, Callaway TR, Buckley SA, Anderson TJ, Genovese KJ, et al. (2001) Effect of oral sodium chlorate administration on *Escherichia coli* O157:H7 in the gut of experimentally infected pigs. *Int J Food Microbiol* 71: 125–130. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00562-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00562-1).
85. Tanji Y, Shimada T, Fukudomi H, Miyanaga K, Nakai Y, et al. (2005) Therapeutic use of phage cocktail for controlling *Escherichia coli* O157:H7 in gastrointestinal tract of mice. *J Biosci Bioeng* 100: 280–287. doi:<http://dx.doi.org/10.1263/jbb.100.280>.
86. Sheng H, Knecht HJ, Kudva IT, Hovde CJ (2006) Application of Bacteriophages To Control Intestinal *Escherichia coli* O157:H7 Levels in Ruminants. *Appl Environ Microbiol* 72: 5359–5366. doi:10.1128/AEM.00099-06.
87. Callaway TR, Edrington TS, Brabban AD, Anderson RC, Rossman ML, et al. (2008) Bacteriophage Isolated from Feedlot Cattle Can Reduce *Escherichia coli* O157:H7 in Ruminant Gastrointestinal Tracts. *Food Prot trends* 5: 183–191.
88. Bach SJ, Johnson RP, Stanford K, Mcallister TA (2009) Bacteriophages reduce *Escherichia coli* O157:H7 levels in experimentally inoculated sheep. *Can J Anim Sci* 89: 285–293.
89. Rivas L, Coffey B, McAuliffe O, McDonnell MJ, Burgess CM, et al. (2010) In vivo and ex vivo evaluations of bacteriophages e11/2 and e4/1c for use in the control of *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol* 76: 7210–7216. doi:10.1128/AEM.01530-10.
90. Meeusen ENT, Walker J, Peters A, Pastoret P-P, Jungersen G (2007) Current status of veterinary vaccines. *Clin Microbiol Rev* 20: 489–510. doi:10.1128/CMR.00005-07.
91. Jordan D, McEwen SA, Lammerding AM, McNab WB, Wilson JB (1999) Pre-slaughter control of *Escherichia coli* O157 in beef cattle: a simulation study. *Prev Vet Med* 41: 55–74.
92. Johnson RP, Cray WC, Johnson ST (1996) Serum antibody responses of cattle following experimental infection with *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun* 64: 1879–1883.
93. Hoffman MA, Menge C, Casey TA, Laegreid W, Bosworth BT, et al. (2006) Bovine immune response to shiga-toxicogenic *Escherichia coli* O157:H7. *Clin Vaccine Immunol* 13: 1322–1327. doi:10.1128/CVI.00205-06.
94. Bretschneider G, Berberov EM, Moxley RA (2007) Isotype-specific antibody responses against *Escherichia coli* O157:H7 locus of enterocyte effacement proteins in adult beef cattle following experimental infection. *Vet Immunol Immunopathol* 118: 229–238. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2007.06.005>.
95. Li Y, Frey E, Mackenzie AMR, Finlay BB (2000) Human Response to *Escherichia coli* O157:H7 Infection: Antibodies to Secreted Virulence Factors. *Infect Immun* 68: 5090–5095. doi:10.1128/IAI.68.9.5090-5095.2000.
96. Martinez MB, Taddei CR, Ruiz-Tagle A, Trabulsi LR, Girón JA (1999) Antibody Response of Children with Enteropathogenic *Escherichia coli* Infection to the Bundle-Forming Pilus and Locus of Enterocyte Effacement—Encoded Virulence Determinants. *J Infect Dis* 179: 269–274. doi:10.1086/314549.
97. Loureiro I, Frankel G, Adu-Bobie J, Dougan G, Trabulsi LR, et al. (1998) Human colostrum contains IgA antibodies reactive to enteropathogenic *Escherichia coli* virulence-associated proteins: intimin, BfpA, EspA, and EspB. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 27: 166–171.
98. Manjarrez-Hernandez HA, Gavilanes-Parra S, Chavez-Berrocal E, Navarro-Ocaña A, Cravioto A (2000) Antigen Detection in Enteropathogenic *Escherichia coli* Using Secretory Immunoglobulin A Antibodies Isolated from Human Breast Milk. *Infect Immun* 68: 5030–5036. doi:10.1128/IAI.68.9.5030-5036.2000.

99. Parissi-Crivelli A, Parissi-Crivelli JM, Girón JA (2000) Recognition of Enteropathogenic *Escherichia coli* Virulence Determinants by Human Colostrum and Serum Antibodies. *J Clin Microbiol* 38: 2696–2700.
100. Noguera-Obenza M, Ochoa T, Gomez H, Guerro M, Herrera-Insua I, et al. (2003) Human milk secretory antibodies against attaching and effacing *Escherichia coli* antigens. *Emerg Infect Dis* 9: 545–551.
101. Vilte DA, Larzábal M, Cataldi AA, Mercado EC (2008) Bovine colostrum contains immunoglobulin G antibodies against intimin, EspA, and EspB and inhibits hemolytic activity mediated by the type three secretion system of attaching and effacing *Escherichia coli*. *Clin Vaccine Immunol* 15: 1208–1213. doi:10.1128/CVI.00027-08.
102. Ghaem-Maghami M, Simmons CP, Daniell S, Pizza M, Lewis D, et al. (2001) Intimin-specific immune responses prevent bacterial colonization by the attaching-effacing pathogen *Citrobacter rodentium*. *Infect Immun* 69: 5597–5605.
103. Konadu E, Donohue-Rolfe A, Calderwood SB, Pozsgay V, Shiloach J, et al. (1999) Syntheses and immunologic properties of *Escherichia coli* O157 O-specific polysaccharide and Shiga toxin 1 B subunit conjugates in mice. *Infect Immun* 67: 6191–6193.
104. Dean-Nystrom EA, Gansheroff LJ, Mills M, Moon HW, O'Brien AD (2002) Vaccination of Pregnant Dams with Intimin (O157) Protects Suckling Piglets from *Escherichia coli* O157:H7 Infection. *Infect Immun* 70: 2414–2418. doi:10.1128/IAI.70.5.2414-2418.2002.
105. Potter AA, Klashinsky S, Li Y, Frey E, Townsend H, et al. (2004) Decreased shedding of *Escherichia coli* O157:H7 by cattle following vaccination with type III secreted proteins. *Vaccine* 22: 362–369. doi:10.1016/j.vaccine.2003.08.007.
106. Babiuk S, Asper D, Rogan D, Mutwiri G, Potter A (2008) Subcutaneous and intranasal immunization with type III secreted proteins can prevent colonization and shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in mice. *Microb Pathog* 45: 7–11. doi:10.1016/j.micpath.2008.01.005.
107. Dziva F, Vlisidou I, Crepin VF, Wallis TS, Frankel G, et al. (2007) Vaccination of calves with EspA, a key colonisation factor of *Escherichia coli* O157:H7, induces antigen-specific humoral responses but does not confer protection against intestinal colonisation. *Vet Microbiol* 123: 254–261. doi:10.1016/j.vetmic.2007.02.016.
108. McNeilly TN, Naylor SW, Mahajan A, Mitchell MC, McAteer S, et al. (2008) *Escherichia coli* O157:H7 colonization in cattle following systemic and mucosal immunization with purified H7 flagellin. *Infect Immun* 76: 2594–2602. doi:10.1128/IAI.01452-07.
109. Thomson DU, Lonergan GH, Thornton AB, Lechtenberg KF, Emery DA, et al. (2009) Use of a Siderophore Receptor and Porin Proteins-Based Vaccine to Control the Burden of *Escherichia coli* O157:H7 in Feedlot Cattle. *Foodborne Pathog Dis* 6: 871–877. doi:10.1089/fpd.2009.0290.
110. Thornton A, Thomson D, Lonergan G, Fox J, Burkhardt D, et al. (2009) Effects of a Siderophore Receptor and Porin Proteins-Based Vaccination on Fecal Shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in Experimentally Inoculated Cattle. *J Food Prot* 72: 866–869.
111. Van Diemen P, Dziva F, Abu-Median A, Wallis T, van den Bosch H, et al. (2007) Subunit vaccines based on intimin and Efa-1 polypeptides induce humoral immunity in cattle but do not protect against intestinal colonisation by enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 or O26:H-. *Vet Immunol Immunopathol* 116: 47–58. doi:10.1016/j.vetimm.2006.12.009.
112. Van Donkersgoed J, Hancock D, Rogan D, Potter A (2005) *Escherichia coli* O157:H7 vaccine field trial in 9 feedlots in Alberta and Saskatchewan. *Can Vet J* 48: 724–728.
113. Allen KJ, Rogan D, Finlay BB, Potter A, Asper DJ (2011) Vaccination with type III secreted proteins leads to decreased shedding in calves after experimental infection with *Escherichia coli* O157. *Can J Vet Res* 75: 98–105.

114. Cox E, Verdonck F, Vanrompay D, Goddeeris B (2006) Adjuvants modulating mucosal immune responses or directing systemic responses towards the mucosa. *Vet Res* 37: 511–539. doi:10.1051/vetres.
115. Singh M, O'Hagan DT (2003) Recent advances in veterinary vaccine adjuvants. *Int J Parasitol* 33: 469–478. doi:10.1016/S0020-7519(03)00053-5.
116. Ebel F, Podzadel T, Rohde M, Kresse A, Krämer S, et al. (1998) Initial binding of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* to host cells and subsequent induction of actin rearrangements depend on filamentous EspA-containing surface appendages. *Mol Microbiol* 30: 146161.
117. Cornick NA, Booher SL, Moon HW (2002) Intimin Facilitates Colonization by *Escherichia coli* O157 : H7 in Adult Ruminants. *Infect Immun* 70: 2704–2707. doi:10.1128/IAI.70.5.2704.
118. Naylor SW, Roe AJ, Nart P, Spears K, Smith DGE, et al. (2005) *Escherichia coli* O157:H7 forms attaching and effacing lesions at the terminal rectum of cattle and colonization requires the LEE4 operon. *Microbiology* 151: 2773–2781. doi:10.1099/mic.0.28060-0.
119. Jalava K, Hensel A, Szostak M, Resch S, Lubitz W (2002) Bacterial ghosts as vaccine candidates for veterinary applications. *J Control Release* 85: 17–25. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0168-3659(02)00267-5.
120. Jalava K, Eko FO, Riedmann E, Lubitz W (2003) Bacterial ghosts as carrier and targeting systems for mucosal antigen delivery. *Expert Rev Vaccines* 2: 45–51. doi:10.1586/14760584.2.1.45.
121. MF P, Simon J, Szein M, Levine M (2012) Immunology of Gut Mucosal Vaccines. *Immunol Rev* 239: 125–148. doi:10.1111/j.1600-065X.2010.00970.x.Immunology.
122. Robert-Guroff M (2000) IgG surfaces as an important component in mucosal protection. *Nat Med* 6: 129–130.
123. Mora A, Blanco M, Blanco JE, Dahbi G, López C, et al. (2007) Serotypes, virulence genes and intimin types of Shiga toxin (verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from minced beef in Lugo (Spain) from 1995 through 2003. *BMC Microbiol* 7. doi:10.1186/1471-2180-7-13.
124. De Grado M, Abe A, Gauthier A, Steele-Mortimer O, DeVinney R, et al. (1999) Identification of the intimin-binding domain of Tir of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Cell Microbiol* 1: 7–17.
125. Nguyen Y, Sperandio V (2012) Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) pathogenesis. *Front Cell Infect Microbiol* 2: 90. doi:10.3389/fcimb.2012.00090.
126. Pallen MJ, Beatson SA, Bailey CM (2005) Bioinformatics analysis of the locus for enterocyte effacement provides novel insights into type-III secretion. *BMC Microbiol* 5. doi:10.1186/1471-2180-5-9.
127. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, et al., editors (2003) *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc.
128. Nishimura A, Morita M, Nishimura Y, Sugino Y (1990) A rapid and highly efficient method for preparation of competent *Escherichia coli* cells. *Nucleic Acids Res* 18: 6169.
129. Birnboim H (1983) A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods Enzym* 100: 243–255.
130. Sambrook J, Russell D (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Third Edition)*. CSHL.
131. McKee ML, O'Brien AD (1996) Truncated enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O157:H7 intimin (EaeA) fusion proteins promote adherence of EHEC strains to HEp-2 cells. *Infect Immun* 64: 2225–2233.



132. Stevens MP, van Diemen PM, Frankel G, Phillips AD, Wallis TS (2002) Efa1 Influences Colonization of the Bovine Intestine by Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Serotypes O5 and O111. *Infect Immun* 70: 5158–5166. doi:10.1128/IAI.70.9.5158.
133. Cataldi A, Yevsa T, Vilte DA, Schulze K, Castro-Parodi M, et al. (2008) Efficient immune responses against Intimin and EspB of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* after intranasal vaccination using the TLR2/6 agonist MALP-2 as adjuvant. *Vaccine* 26: 5662–5667. doi:10.1016/j.vaccine.2008.07.027.
134. Karpman D, Békássy ZD, Sjögren A-C, Dubois MS, Karmali MA, et al. (2002) Antibodies to intimin and *Escherichia coli* secreted proteins A and B in patients with enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections. *Pediatr Nephrol* 17: 201–211. doi:10.1007/s00467-001-0792-z.
135. Aucouturier J, Dupuis L, Ganne V (2001) Adjuvants designed for veterinary and human vaccines. *Vaccine* 19: 2666–2672.
136. Daynes RA, Enioutina EY, Butler S, Mu H, Gee ZAMC, et al. (1996) Induction of common mucosal immunity by hormonally immunomodulated peripheral immunization. *Infect Immun* 64: 1100–1109.
137. Van der Stede Y, Cox E, Van den Broeck W, Goddeeris BM (2001) Enhanced induction of the IgA response in pigs by calcitriol after intramuscular immunization. *Vaccine* 19: 1870–1878.
138. Van der Stede Y, Cox E, Verdonck F, Vancaeneghem S, Goddeeris BM (2003) Reduced faecal excretion of F4+ *E. coli* by the intramuscular immunisation of suckling piglets by the addition of 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D3 or CpG-oligodeoxynucleotides. *Vaccine* 21: 1023–1032.
139. McNeilly TN, Mitchell MC, Rosser T, McAteer S, Low JC, et al. (2010) Immunization of cattle with a combination of purified intimin-531, EspA and Tir significantly reduces shedding of *Escherichia coli* O157:H7 following oral challenge. *Vaccine* 28: 1422–1428. doi:10.1016/j.vaccine.2009.10.076.
140. Low JC, Mckendrick IJ, Mckechnie C, Fenlon D, Naylor SW, et al. (2005) Rectal Carriage of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 in Slaughtered Cattle. *Appl Environ Microbiol* 71: 93–97. doi:10.1128/AEM.71.1.93.
141. Fox JT, Shi X, Nagaraja TG (2008) *Escherichia coli* O157 in the rectoanal mucosal region of cattle. *Foodborne Pathog Dis* 5: 69–77. doi:10.1089/fpd.2008.0042.
142. Lim JY, Li J, Sheng H, Besser TE, Potter K, et al. (2007) *Escherichia coli* O157:H7 colonization at the rectoanal junction of long-duration culture-positive cattle. *Appl Environ Microbiol* 73: 1380–1382. doi:10.1128/AEM.02242-06.
143. Davis MA, Rice DH, Sheng H, Hancock DD, Besser TE, et al. (2006) Comparison of Cultures from Rectoanal-Junction Mucosal Swabs and Feces for Detection of *Escherichia coli* O157 in Dairy Heifers. *Appl Environ Microbiol* 72: 3766–3770. doi:10.1128/AEM.72.5.3766.
144. Rice DH, Sheng HQ, Wynia SA, Hovde CJ (2003) Rectoanal Mucosal Swab Culture Is More Sensitive Than Fecal Culture and Distinguishes *Escherichia coli* O157:H7-Colonized Cattle and Those Transiently Shedding the Same Organism. *J Clin Microbiol* 41: 4924–4929. doi:10.1128/JCM.41.11.4924.
145. Kudva IT, Hatfield PG, Hovde CJ (1995) Effect of diet on the shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in a sheep model. *Appl Environ Microbiol* 61: 1363–1370.
146. Blanco M, Blanco JE, Mora A, Dahbi G, Alonso MP, et al. (2004) Serotypes, Virulence Genes, and Intimin Types of Shiga Toxin (Verotoxin)-Producing *Escherichia coli* Isolates from Cattle in Spain and Identification of a New Intimin Variant Gene (eae- $\xi$ ). *J Clin Microbiol* 42: 645–651. doi:10.1128/JCM.42.2.645.
147. Olsvik Ø, Strockbine NA (1993) PCR detection of heat stable, heat labile and Shiga-like toxin genes in *Escherichia coli*. In: Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ, editors. *Diagnostic Molecular Microbiology. Principles and applications*. Washington, DC: American Society for Microbiology. pp. 271–276.

148. Paton AW, Paton JC (1998) Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for stx1, stx2, eaeA, enterohemorrhagic *E. coli* hlyA, rfbO111, and rfbO157. *J Clin Microbiol* 36: 598–602.
149. Brown CA, Harmon BG, Zhao T, Doyle MP (1997) Experimental *Escherichia coli* O157:H7 carriage in calves. *Appl Environ Microbiol* 63: 27–32.
150. LeJeune JT, Hancock DD, Besser TE (2006) Sensitivity of *Escherichia coli* O157 Detection in Bovine Feces Assessed by Broth Enrichment followed by Immunomagnetic Separation and Direct Plating Methodologies. *J Clin Microbiol* 44: 872–875. doi:10.1128/JCM.44.3.872-875.2006.
151. Dean-Nystrom E a, Stoffregen WC, Bosworth BT, Moon HW, Pohlentz JF (2008) Early attachment sites for Shiga-toxigenic *Escherichia coli* O157:H7 in experimentally inoculated weaned calves. *Appl Environ Microbiol* 74: 6378–6384. doi:10.1128/AEM.00636-08.
152. Nart P, Holden N, McAteer SP, Wang D, Flockhart AF, et al. (2008) Mucosal antibody responses of colonized cattle to *Escherichia coli* O157-secreted proteins, flagellin, outer membrane proteins and lipopolysaccharide. *FEMS Immunol Med Microbiol* 52: 59–68. doi:10.1111/j.1574-695X.2007.00341.x.
153. Nart P, Naylor SW, Huntley JF, McKendrick IJ, Gally DL, et al. (2008) Responses of cattle to gastrointestinal colonization by *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun* 76: 5366–5372. doi:10.1128/IAI.01223-07.
154. Snider TA, Fabich AJ, Washburn KE, Sims WP, Blair JL, et al. (2006) Evaluation of a model for *Escherichia coli* O157:H7 colonization in streptomycin-treated adult cattle. *Am J Vet Res* 67: 1914–1920. doi:10.2460/ajvr.67.11.1914.
155. Robinson SE, Wright EJ, Hart CA, Bennett M, French NP (2004) Intermittent and persistent shedding of *Escherichia coli* O157 in cohorts of naturally infected calves. *J Appl Microbiol* 97: 1045–1053. doi:10.1111/j.1365-2672.2004.02390.x.
156. Besser T, Hancock D, Pritchett L, McRae E, Rice D, et al. (1997) Duration of detection of fecal excretion of *Escherichia coli* O157:H7 in cattle. *J Infect Dis* 175: 726–729.
157. Khaitsa ML, Smith DR, Stoner JA, Parkhurst AM, Hinkley S, et al. (2003) Incidence , Duration , and Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 Fecal Shedding by Feedlot Cattle during the Finishing Period. *J Food Prot* 66: 1972–1977.
158. Cookson AL, Woodward MJ (2003) The role of intimin in the adherence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O157 : H7 to HEp-2 tissue culture cells and to bovine gut explant tissues. *Int J Med Microbiol* 292: 547–553. doi:http://dx.doi.org/10.1078/1438-4221-00235.
159. Smith DR, Moxley RA, Peterson RE, Klopfenstein TJ, Erickson GE, et al. (2009) A Two-Dose Regimen of a Vaccine Against Type III Secreted Proteins Reduced *Escherichia coli* in Beef Cattle in Commercial Feedlots. *Foodborne Pathog Dis* 6: 155–161.
160. Judge NA, Mason HS, Brien ADO (2004) Plant Cell-Based Intimin Vaccine Given Orally to Mice Primed with Intimin Reduces Time of *Escherichia coli* O157:H7 Shedding in Feces. *Infect Immun* 72: 168–175. doi:10.1128/IAI.72.1.168.
161. Agin TS, Zhu C, Johnson LA, Thate TE, Yang Z, et al. (2005) Protection against Hemorrhagic Colitis in an Animal Model by Oral Immunization with Isogeneic Rabbit Enteropathogenic *Escherichia coli* Attenuated by Truncating Intimin. *Infect Immun* 73: 6608–6619. doi:10.1128/IAI.73.10.6608.
162. Smith MJ, Teel LD, Carvalho HM, Melton-Celsa AR, O'Brien AD (2006) Development of a hybrid Shiga holotoxoid vaccine to elicit heterologous protection against Shiga toxins types 1 and 2. *Vaccine* 24: 4122–4129. doi:10.1016/j.vaccine.2006.02.035.

163. Wen SX, Teel LD, Judge N a, O'Brien AD (2006) Genetic toxoids of Shiga toxin types 1 and 2 protect mice against homologous but not heterologous toxin challenge. *Vaccine* 24: 1142–1148. doi:10.1016/j.vaccine.2005.08.094.
164. Luo W, Donnenberg MS (2006) Analysis of the Function of Enteropathogenic *Escherichia coli* EspB by Random Mutagenesis. *Infect Immun* 74: 810–820. doi:10.1128/IAI.74.2.810.
165. Tacket CO, Sztein MB, Losonsky G, Abe A, Finlay BB, et al. (2000) Role of EspB in experimental human enteropathogenic *Escherichia coli* infection. *Infect Immun* 68: 3689–3695.
166. Ivanov A, Dragunsky E, Ivanova O, Rezapkin G, Potapova S, et al. (2005) Determination of poliovirus-specific IgA in saliva by ELISA tests. *J Virol Methods* 126: 45–52. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2005.01.030.
167. Warawa J, Finlay BB, Kenny B (1999) Type III secretion-dependent hemolytic activity of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 67: 5538–5540.
168. Gansheroff LJ, Wachtel MR, O'Brien AD (1999) Decreased Adherence of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* to HEp-2 Cells in the Presence of Antibodies That Recognize the C-Terminal Region of Intimin. *Infect Immun* 67: 6409–6417.
169. Badia R, Zanello G, Chevaleyre C, Lizardo R, Meurens F, et al. (2012) Effect of *Saccharomyces cerevisiae* var. Boulardii and  $\beta$ -galactomannan oligosaccharide on porcine intestinal epithelial and dendritic cells challenged in vitro with *Escherichia coli* F4 (K88). *Vet Res* 43: 4. doi:10.1186/1297-9716-43-4.
170. Searle SR (1971) *Linear models*. New York: J. Wiley and Sons.
171. Bono A, Alvarez R, Buschiazzi D, Cantet RJC (2008) Tillage effects on soil carbon balance in a semiarid agroecosystem. *Soil Sci Soc Am J* 72: 1140–1149.
172. Kenward MG, Roger JH (1997) Small sample inference for fixed effects from restricted maximum likelihood. *Biometrics* 53: 983–997.
173. Herremans TMPT, Reimerink JH, Buisman a M, Kimman TG, Koopmans MPG (1999) Induction of mucosal immunity by inactivated poliovirus vaccine is dependent on previous mucosal contact with live virus. *J Immunol* 162: 5011–5018.
174. Jeurissen SHM, Claassen E, van Rooijen N, Kraal G (1985) Intra-intestinal priming leads to antigen-specific IgA memory cells in peripheral lymphoid organs. *Immunology* 56: 417–423.
175. Cook SR, Maiti PK, DeVinney R, Allen-Vercoe E, Bach SJ, et al. (2007) Avian- and mammalian-derived antibodies against adherence-associated proteins inhibit host cell colonization by *Escherichia coli* O157:H7. *J Appl Microbiol* 103: 1206–1219. doi:10.1111/j.1365-2672.2007.03334.x.
176. Eko FO, Mayr UB, Attridge SR, Lubitz W (2000) Characterization and immunogenicity of *Vibrio cholerae* ghosts expressing toxin-coregulated pili. *J Biotechnol* 83: 115–123. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1656(00)00315-1.
177. Marchart J, Rehagen M, Dropmann G, Szostak MP, Alldinger S, et al. (2003) Protective immunity against pasteurellosis in cattle, induced by *Pasteurella haemolytica* ghosts. *Vaccine* 21: 1415–1422. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0264-410X(02)00635-7.
178. Marchart J, Dropmann G, Lechleitner S, Schlapp T, Wanner G, et al. (2003) *Pasteurella multocida*- and *Pasteurella haemolytica*-ghosts: new vaccine candidates. *Vaccine* 21: 3988–3997. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0264-410X(03)00383-9.
179. Liu J, Wang WD, Liu YJ, Liu S, Zhou B, et al. (2012) Mice vaccinated with enteropathogenic *Escherichia coli* ghosts show significant protection against lethal challenges. *Lett Appl Microbiol* 54: 255–262. doi:10.1111/j.1472-765X.2011.03202.x.

180. Mayr UB, Haller C, Haidinger W, Atrasheuskaya A, Bukin E, et al. (2005) Bacterial Ghosts as an Oral Vaccine : a Single Dose of *Escherichia coli* O157 : H7 Bacterial Ghosts Protects Mice against Lethal Challenge. *Infect Immun* 73: 4810–4817. doi:10.1128/IAI.73.8.4810.
181. Wells JG, Shipman LD, Greene KD, Sowers EG, Green JH, et al. (1991) Isolation of *Escherichia coli* Serotype O157:H7 and Other Shiga- Like-Toxin-Producing *E. coli* from Dairy Cattle. *J Clin Microbiol* 29: 985–989.
182. Mayr UB, Kudela P, Atrasheuskaya A, Bukin E, Ignatyev G, et al. (2012) Rectal single dose immunization of mice with *Escherichia coli* O157:H7 bacterial ghosts induces efficient humoral and cellular immune responses and protects against the lethal heterologous challenge. *Microb Biotechnol* 5: 283–294. doi:10.1111/j.1751-7915.2011.00316.x.

## Anexo

En este anexo se pueden observar las secuencias de ADN resultantes de la secuenciación de los genes clonados y su correspondiente traducción a proteínas. Por medio de una búsqueda en bases de datos se pudo comprobar que presentan entre 99 y 100 % de identidad con secuencias homólogas. Con estas proteínas se realizaron los ensayos de la vacuna IB-D3.

>EspA INTA

1	ATG	GAT	ACA	TCA	ACT	GCA	ACA	TCC	GTT	GTT	AAT	GTG	AGT	GCG	AGT	45
1	M	D	T	S	T	A	T	S	V	V	N	V	S	A	S	15
46	TCT	TCG	ACA	TCG	ACG	ATC	TAT	GAC	TTA	GGT	AAT	ATG	TCG	AAG	GAT	90
16	S	S	T	S	T	I	Y	D	L	G	N	M	S	K	D	30
91	GAG	GTG	GTT	AAG	CTA	TTT	GAG	GAA	CTC	GGT	GTT	TTT	CAG	GCT	GCG	135
31	E	V	V	K	L	F	E	E	L	G	V	F	Q	A	A	45
136	ATT	CTC	ATG	TTT	TCT	TAT	ATG	TAT	CAG	GCA	CAA	AGT	AAT	CTG	TCG	180
46	I	L	M	F	S	Y	M	Y	Q	A	Q	S	N	L	S	60
181	ATT	GCA	AAG	TTT	GCT	GAT	ATG	AAT	GAG	GCA	TCT	AAA	GCG	TCA	ACC	225
61	I	A	K	F	A	D	M	N	E	A	S	K	A	S	T	75
226	ACG	GCA	CAA	AAG	ATG	GCT	AAT	CTT	GTG	GAT	GCC	AAA	ATT	GCT	GAT	270
76	T	A	Q	K	M	A	N	L	V	D	A	K	I	A	D	90
271	GTT	CAG	AGT	AGC	ACT	GAT	AAG	AAT	GCG	AAA	GCC	AAA	CTT	CCT	CAA	315
91	V	Q	S	S	T	D	K	N	A	K	A	K	L	P	Q	105
316	GAC	GTG	ATT	GAC	TAT	ATA	AAC	GAT	CCA	CGT	AAT	GAC	ATA	AGT	GTA	360
106	D	V	I	D	Y	I	N	D	P	R	N	D	I	S	V	120
361	ACT	GGT	ATT	CGT	GAT	CTT	AGT	GGT	GAT	TTA	AGC	GCT	GGT	GAT	CTG	405
121	T	G	I	R	D	L	S	G	D	L	S	A	G	D	L	135
406	CAA	ACA	GTG	AAG	GCG	GCT	ATT	TCA	GCT	AAA	GCG	AAT	AAC	CTG	ACA	450
136	Q	T	V	K	A	A	I	S	A	K	A	N	N	L	T	150
451	ACG	GTA	GTG	AAT	AAT	AGC	CAG	CTC	GAA	ATT	CAG	CAA	ATG	TCG	AAT	495
151	T	V	V	N	N	S	Q	L	E	I	Q	Q	M	S	N	165
496	ACA	TTA	AAT	CTC	TTA	ACG	AGT	GCA	CGT	TCT	GAT	GTG	CAA	TCT	CTA	540
166	T	L	N	L	L	T	S	A	R	S	D	V	Q	S	L	180
541	CAA	TAT	AGA	ACT	ATT	TCA	GCA	ATA	TCC	CTT	GGT	AAA	TAA		579	
181	Q	Y	R	T	I	S	A	I	S	L	G	K	*			

## &gt;EspB INTA

1	ATG	AAT	ACT	ATT	GAT	TAT	ACT	AAT	CAA	GTA	ATG	ACG	GTT	AAT	TCT	45
1	M	N	T	I	D	Y	T	N	Q	V	M	T	V	N	S	15
46	GTT	TCG	GAG	AAT	ACT	ACC	GGC	TCT	AAT	GCA	ATT	ACC	GCA	TCT	GCT	90
16	V	S	E	N	T	T	G	S	N	A	I	T	A	S	A	30
91	ATT	AAT	TCA	TCT	TTG	CTT	ACC	GAT	GGT	AAG	GTC	GAT	GTT	TCT	AAA	135
31	I	N	S	S	L	L	T	D	G	K	V	D	V	S	K	45
136	CTG	ATG	CTG	GAA	ATT	CAA	AAA	CTC	CTG	GGC	AAG	ATG	GTG	CGT	ATA	180
46	L	M	L	E	I	Q	K	L	L	G	K	M	V	R	I	60
181	TTG	CAG	GAT	TAC	CAA	CAG	CAA	CAG	TTG	TCG	CAG	AGC	TAT	CAG	ATC	225
61	L	Q	D	Y	Q	Q	Q	Q	L	S	Q	S	Y	Q	I	75
226	CAA	CTG	GCC	GTT	TTT	GAG	AGC	CAG	AAT	AAA	GCC	ATT	GAT	GAA	AAA	270
76	Q	L	A	V	F	E	S	Q	N	K	A	I	D	E	K	90
271	AAG	GCC	GCT	GCA	ACA	GCC	GCT	CTG	GTT	GGT	GGG	GCT	ATT	TCA	TCA	315
91	K	A	A	A	T	A	A	L	V	G	G	A	I	S	S	105
316	GTA	TTG	GGG	ATC	TTA	GGC	TCT	TTT	GCA	GCA	ATT	AAC	AGT	GCT	ACG	360
106	V	L	G	I	L	G	S	F	A	A	I	N	S	A	T	120
361	AAA	GGC	GCG	AGT	GAT	ATT	GCT	CAA	AAA	ACC	GCC	TCT	ACA	TCT	TCT	405
121	K	G	A	S	D	I	A	Q	K	T	A	S	T	S	S	135
406	AAG	GCT	ATT	GAT	GCG	GCT	TCT	GAT	ACT	GCG	ACT	AAA	ACG	TTG	ACT	450
136	K	A	I	D	A	A	S	D	T	A	T	K	T	L	T	150
451	AAG	GCA	ACG	GAA	AGC	GTT	GCT	GAT	GCT	GTT	GAA	GAT	GCA	TCC	AGC	495
151	K	A	T	E	S	V	A	D	A	V	E	D	A	S	S	165
496	GTG	ATG	CAG	CAA	GCG	ATG	ACT	ACA	GCA	ACG	AGA	GCG	GCC	AGC	CGT	540
166	V	M	Q	Q	A	M	T	T	A	T	R	A	A	S	R	180
541	ACA	TCC	GAC	GTT	GCT	GAT	GAC	ATT	GCC	GAT	TCT	GCT	CAG	AGA	GCT	585
181	T	S	D	V	A	D	D	I	A	D	S	A	Q	R	A	195
586	TCT	CAG	CTG	GCT	GAA	AAC	GCT	GCA	GAT	GCC	GCT	CAG	AAG	GCA	AGT	630
196	S	Q	L	A	E	N	A	A	D	A	A	Q	K	A	S	210
631	CGG	GCA	AGC	CGC	TTT	ATG	GCT	GCA	GTA	GAT	AAG	ATT	ACT	GGC	TCT	675
211	R	A	S	R	F	M	A	A	V	D	K	I	T	G	S	225
676	ACA	CCA	TTT	ATT	GCC	GTT	ACC	AGT	CTT	GCC	GAA	GGC	ACG	AAG	ACA	720
226	T	P	F	I	A	V	T	S	L	A	E	G	T	K	T	240
721	TTG	CCA	ACA	ACG	GTA	TCT	GAA	TCA	GTC	AAA	TCT	AAC	CAT	GAG	ATT	765
241	L	P	T	T	V	S	E	S	V	K	S	N	H	E	I	255
766	AGC	GAA	CAG	CGT	TAT	AAG	TCT	GTG	GAG	AAC	TTC	CAG	CAG	GGT	AAT	810
256	S	E	Q	R	Y	K	S	V	E	N	F	Q	Q	G	N	270
811	TTG	GAT	CTG	TAT	AAG	CAA	GAA	GTT	CGC	AGA	GCG	CAG	GAT	GAT	ATC	855
271	L	D	L	Y	K	Q	E	V	R	R	A	Q	D	D	I	285
856	GCT	AGC	CGT	CTG	CGT	GAT	ATG	ACA	ACA	GCC	GCT	CGC	GAT	CTC	ACT	900
286	A	S	R	L	R	D	M	T	T	A	A	R	D	L	T	300
901	GAT	CTT	CAG	AAT	CGT	ATG	GGT	CAA	TCG	GTT	CGC	TTA	GCT	GGT	TAA	945
301	D	L	Q	N	R	M	G	Q	S	V	R	L	A	G	*	

## &gt;Int280GammaINTA

1	CAA	ACC	AAG	GCC	AGC	ATT	ACT	GAG	ATT	AAG	GCT	GAT	AAG	ACA	ACT	45
1	Q	T	K	A	S	I	T	E	I	K	A	D	K	T	T	15
46	GCA	GTA	GCA	AAT	GGT	AAG	GAT	GCT	ATT	AAA	TAT	ACT	GTA	AAA	GTT	90
16	A	V	A	N	G	K	D	A	I	K	Y	T	V	K	V	30
91	ATG	AAA	AAC	GGT	CAG	CCA	GTT	AAT	AAT	CAA	TCC	GTT	ACA	TTC	TCA	135
31	M	K	N	G	Q	P	V	N	N	Q	S	V	T	F	S	45
136	ACA	AAC	TTT	GGG	ATG	TTC	AAC	GGT	AAG	TCT	CAA	ACG	CAA	GCA	ACC	180
46	T	N	F	G	M	F	N	G	K	S	Q	T	Q	A	T	60
181	ACG	GGA	AAT	GAT	GGT	CGT	GCG	ACG	ATA	ACA	CTA	ACT	TCC	AGT	TCC	225
61	T	G	N	D	G	R	A	T	I	T	L	T	S	S	S	75
226	GCC	GGT	AAA	GCG	ACT	GTT	AGT	GCG	ACA	GTC	AGT	GAT	GGG	GCT	GAG	270
76	A	G	K	A	T	V	S	A	T	V	S	D	G	A	E	90
271	GTT	AAA	GCG	ACT	GAG	GTC	ACT	TTT	TTT	GAT	GAA	CTG	AAA	ATT	GAC	315
91	V	K	A	T	E	V	T	F	F	D	E	L	K	I	D	105
316	AAC	AAG	GTT	GAT	ATT	ATT	GGT	AAC	AAT	GTC	AGA	GGC	GAG	TTG	CCT	360
106	N	K	V	D	I	I	G	N	N	V	R	G	E	L	P	120
361	AAT	ATT	TGG	CTG	CAA	TAT	GGT	CAG	TTT	AAA	CTG	AAA	GCA	AGC	GGT	405
121	N	I	W	L	Q	Y	G	Q	F	K	L	K	A	S	G	135
406	GGT	GAT	GGT	ACA	TAT	TCA	TGG	TAT	TCA	GAA	AAT	ACC	AGT	ATC	GCG	450
136	G	D	G	T	Y	S	W	Y	S	E	N	T	S	I	A	150
451	ACT	GTC	GAT	GCA	TCA	GGG	AAA	GTC	ACT	TTG	AAT	GGT	AAA	GGC	AGT	495
151	T	V	D	A	S	G	K	V	T	L	N	G	K	G	S	165
496	GTC	GTA	ATT	AAA	GCC	ACA	TCT	GGT	GAT	AAG	CAA	ACA	GTA	AGT	TAC	540
166	V	V	I	K	A	T	S	G	D	K	Q	T	V	S	Y	180
541	ACT	ATA	AAA	GCA	CCG	TCG	TAT	ATG	ATA	AAA	GTG	GAT	AAG	CAA	GCC	585
181	T	I	K	A	P	S	Y	M	I	K	V	D	K	Q	A	195
586	TAT	TAT	GCT	GAT	GCT	ATG	TCC	ATT	TGC	AAA	AAT	TTA	TTA	CCA	TCC	630
196	Y	Y	A	D	A	M	S	I	C	K	N	L	L	P	S	210
631	ACA	CAG	ACG	GTA	TTG	TCA	GAT	ATT	TAT	GAC	TCA	TGG	GGG	GCT	GCA	675
211	T	Q	T	V	L	S	D	I	Y	D	S	W	G	A	A	225
676	AAT	AAA	TAT	AGC	CAT	TAT	AGT	TCT	ATG	AAC	TCA	ATA	ACT	GCT	TGG	720
226	N	K	Y	S	H	Y	S	S	M	N	S	I	T	A	W	240
721	ATT	AAA	CAG	ACA	TCT	AGT	GAG	CAG	CGT	TCT	GGA	GTA	TCA	AGC	ACT	765
241	I	K	Q	T	S	S	E	Q	R	S	G	V	S	S	T	255
766	TAT	AAC	CTA	ATA	ACA	CAA	AAC	CCT	CTT	CCT	GGG	GTT	AAT	GTT	AAT	810
256	Y	N	L	I	T	Q	N	P	L	P	G	V	N	V	N	270
811	ACT	CCA	AAT	GTC	TAT	GCG	GTT	TGT	GTA	GAA	TAA					843
271	T	P	N	V	Y	A	V	C	V	E	*					