

CONVOCATORIA 2018 Vigencia: 1/12/17 al 1/03/18	PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO
Título: Estudio in vitro de la patogenicidad de salmonella hadar y Heidelberg en líneas celulares aviarias y humanas	
Resolución de aprobación: 1163/18	
Directora de Proyecto: María Milagros López de Armentia	
Dirección de correo electrónico: milagrosarmentia@gmail.com	
Integrantes del Equipo de Investigación:	
Agustina Denis Sánchez Colucci - Investigador	
Leila Vanesa Zuloaga - Investigadora	
María Celeste Gauron - Becaria diplomada	
Mauricio Terebiznik - Asesor externo	
María Isabel Colombo - Asesora externa	
Carrera/s UMaza a la/s que está asociado el Proyecto: Carrera de Bioquímica	
Unidad/es Académica/s UMaza: Facultad de Farmacia y Bioquímica	
Proyecto es Interinstitucional junto a:	
-Instituto de Histología y Embriología de Mendoza (IHEM), Mendoza, Argentina	
-Department of Biological Sciences, University of Toronto at Scarborough, Toronto, Canada	

• **DESARROLLO DEL PROYECTO**

RESUMEN

Los serotipos de Salmonella entérica, hadar y heidelberg, son agentes causales de salmonelosis, una infección intestinal, ampliamente distribuida por todo el mundo [1]. Actualmente, las principales fuentes de infección en humanos incluyen productos avícolas, como el consumo de carne de ave o huevos contaminados [2]. En Argentina, el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) a través del Programa de Control de las Micoplasmosis y Salmonelosis (Resolución N° 882/02) exige a los establecimientos avícolas a realizar controles de sus animales para disminuir el impacto de esta zoonosis en la salud pública. Por ello, en la presente propuesta de trabajo planteamos estudiar la patogenicidad de Salmonella hadar y heidelberg, utilizando como modelo de infección líneas celulares humanas y aviares y aplicando técnicas de biología celular, molecular y microbiológicas. Los resultados obtenidos aportaran al entendimiento y conocimiento de los mecanismos moleculares asociados a la infección en aves y su transmisión a humanos.

DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

Objetivo general:

Determinar la infectividad de S. hadar y heidelberg en células aviares y humanas.

Objetivos específicos:

- Evaluar la respuesta de S. hadar y heidelberg frente al tratamiento con antibióticos. Con el objetivo de identificar antimicrobianos efectivos para el tratamiento de infecciones producidas por S. hadar y heidelberg, se determinará la susceptibilidad de S. hadar y heidelberg frente a diferentes agentes antimicrobianos. En primer lugar, se realizará la prueba de sensibilidad a discos antibióticos en Mueller Hinton (MH) agar. Posteriormente, se utilizará el e-Test, un antibiograma más sensible, que permitirá determinar la concentración inhibitoria mínima de los antibióticos en estudio [11]. Finalmente, se utilizarán los antibióticos que hayan demostrado efectividad contra S. hadar y heidelberg para tratar células aviares y, a través del conteo de unidades formadoras de colonia se analizará la inhibición en la replicación bacteriana in vitro.
- Evaluar la asociación e invasión de S. hadar y heidelberg en un modelo de células aviares. A partir de cultivos de S. hadar y heidelberg, obtenidos en medio de cultivo Luria Bertani Broth (LB), se determinarán la cantidad de Unidades Formadora de Colonias (UFC) en la fase exponencial, a fin de calcular la multiplicidad de infección (MOI). Posteriormente, las bacterias se enfrentarán a células de la línea celular: QM7 (fibroblastos de codorniz) durante distintos periodos de tiempo y se cuantificará la asociación por recuento de colonias viables. Para diferenciar las bacterias asociadas de las internalizadas, se tratarán a las células con antibiótico (determinado en el objetivo 1) para eliminar las bacterias extracelulares y se

cuantificará la invasión por recuento de colonias viables. Por otro lado, se emplearán células de carcinoma de colón humanas (Caco-2) para evaluar la capacidad de *S. hadar* y *heidelberg* para invadir células de origen humano.

- Estudiar la modulación de la respuesta pro-inflamatoria durante la infección de *S. hadar* y *heidelberg*. Con el objetivo de evaluar la inducción de mediadores inmunes durante la infección bacteriana, se determinarán los niveles de ARN mensajero (ARNm) de citoquinas tales como: TNF- α , IL-1 β e IL-6 por Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Inversa (RT-PCR). Para ello, se infectarán células QM7 con *S. hadar* y *heidelberg*, y posteriormente se extraerá el ARNm. Mediante el empleo de la enzima transcriptasa reversa se obtendrá el ADN copia que servirá como templado para la PCR.

Además, se diseñarán los cebadores para amplificar los genes de interés, que codifican para TNF- α , IL-1 β e IL-6. Finalmente, los productos de PCR se observarán por electroforesis en gel de agarosa y se cuantificará la cantidad de ADN obtenido, que será directamente proporcional a la cantidad de citoquina inducida por la célula huésped frente a la infección.

RESULTADOS ESPERADOS

La escasa información en relación a la patogenia de *S. hadar* y *heidelberg* propone una problemática a la hora de afrontar las infecciones por dicho patógeno. En Estados Unidos y Canadá, *S. Heidelberg* ha sido identificada como uno de los serotipos que mayormente infecta humanos y aves de corral [12], [13]. Recientemente, en Argentina se han reportado un caso de aislamiento de *S. Heidelberg* resistente a oximino-cefalosporinas recuperado de un paciente internado en Buenos Aires [14]. Sin embargo, poco se conoce sobre la patogenicidad de esta bacteria en células aviares y humanas. Por ello, se está desestimando la capacidad de esta bacteria de afectar la salud humana. Finalmente, teniendo en cuenta que cada modelo bacteriano posee características distintivas que impiden que se generalizarse a un grupo de bacterias con semejanzas por ejemplo estructurales; es de gran importancia poder abordar este estudio de caracterización de patogenia de especies y de susceptibilidad a antibióticos. Esperamos caracterizar la infección de *S. hadar* y *heidelberg* en líneas células aviares y humanas, como así también determinar el tipo de respuesta inmune que estas células desarrollan al ser infectadas. Además, esperamos definir la respuesta de ambas cepas bacterianas al tratamiento con antibióticos, tanto en el contexto del crecimiento bacteriano,

como en el de la infección. Finalmente, consideramos que los resultados a obtenerse en este proyecto podrán contribuir al entendimiento y conocimiento de los mecanismos moleculares asociados a las infecciones por Salmonella y a su susceptibilidad a agentes antimicrobianos, como herramientas de control y prevención de la salmonelosis.

Por otro lado, en términos de la formación de recursos humanos y del crecimiento en el área de ciencia y técnica de nuestra universidad esperamos que el desarrollo de la presente propuesta de trabajo contribuya a la generación de recursos humanos capacitados en técnicas de microbiología, biología molecular y celular, así como la incorporación de un trabajo en conjunto de la UMAZA, con la Universidad de Toronto en Canadá y el IHEM en Mendoza. Sin dudas, la posibilidad de que investigadores como becarios de la UMAZA puedan trabajar en conjunto con una unidad ejecutora del CONICET, así como con una universidad internacional, caracterizada por su excelencia en ciencia y catalogada dentro de las mejores universidades del mundo, será el puntapié inicial para poder, en un futuro, consolidar nuestro grupo de investigación de la UMAZA, fortalecido en colaboraciones tanto nacionales como internacionales.