

UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO



Tesis doctoral

**Desarrollo de un cóctel de fagos para el biocontrol de virotipos
de *Escherichia coli* en la industria alimenticia regional**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOQUÍMICAS Y
FARMACÉUTICAS**



Lic. David Tomat
Director: Dra. Claudia Balagué
Co-Director: Dra. Andrea Quiberoni
2013

Universidad Nacional de Rosario

Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas



Tesis de Doctorado presentada como parte de los requisitos de la Universidad Nacional de Rosario para la obtención del grado académico de Doctor en Ciencias Biológicas

“Desarrollo de un cóctel de fagos para el biocontrol de virotipos de *Escherichia coli* en la industria alimenticia regional”

Presentada por David Damián Tomat

Licenciado en Biotecnología – Universidad Nacional de Rosario

Rosario, Argentina

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Área Bacteriología, dependiente de la Facultad de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas, durante el período comprendido entre el abril de 2009 y febrero de 2014, bajo la dirección de la Dra. Claudia Balagué.

Director: Dra. Claudia Balagué

Co-Director: Dra. Andrea Quiberoni

2013

Mi más sincero agradecimiento a:

Todos mis compañeros y amigos que me acompañaron todos estos años de estudio y trabajo.

La Dra. Claudia Balagué y la Dra. Andrea Quiberoni por permitirme hacer este hermoso trabajo de tesis y guiarme a través del trabajo de laboratorio.

Todos los integrantes de la Cátedra de Bacteriología de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas (UNR) y del Instituto de Lactología Industrial (UNL) por haber colaborado en esta tesis.

Mi familia.

Y a mi ángel de la guarda...*mi vieja*

Los resultados de esta Tesis doctoral fueron difundidos a través de los siguientes trabajos científicos:

► **Tomat, D.;** Aquili, V.; Quiberoni, A.; Balagué, C. (2011). Efecto del biocontrol fágico sobre cepas de *Escherichia coli* productoras de toxina shiga en productos cárnicos. *Revista médica de Rosario*, 77 (1), 16-23.

► **Tomat, D.,** Mercanti, D., Balagué, C., Quiberoni, A. (2013). Phage Biocontrol of Enteropathogenic and Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* during milk fermentation. *Letters in Applied Microbiology*, 57, 3-10.

► **Tomat, D.;** Migliore, L.; Aquili, V.; Quiberoni, A.; Balagué, C. (2013). Phage biocontrol of enteropathogenic and shiga toxin-producing *Escherichia coli* in meat products. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 3 (20), 1-10.

► **Tomat, D.;** Quiberoni, A.; Mercanti, D.; Balagué, C. (2013). Hard Surfaces Decontamination of Enteropathogenic and Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* using Bacteriophages. *Food Research International* (En evaluación).

Capítulos en libros:

► **Tomat, D.,** Mercanti, D., Balagué, C., Quiberoni, A. (2013). Bacteriophages as biocontrol tools of pathogens in meat and dairy products. *Bacteriophages: Biology, Applications and Role in Health and Disease*. Hauppauge, NY, USA: Nova Science Publishers, Inc. (ISBN: 978-1-62618-514-2).

Premios:

► Premio al mejor trabajo científico otorgado en el marco del XII Congreso y XXX Reunión anual de la Sociedad de Biología de Rosario: “Efecto del biocontrol fágico sobre cepas de *Escherichia coli* productoras de toxina shiga en productos cárnicos”. **Tomat, D.;** Aquili, V.; Quiberoni, A.; Balagué, C. XII Congreso y XXX Reunión anual de la Sociedad de Biología de Rosario. Rosario, 3 de Diciembre de 2010.

Congresos:

► XIV Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Lugar: Rosario, Santa Fe, Argentina. Fecha: 23 al 25 de octubre de 2013. Descontaminación de superficies sólidas mediante cócteles fágicos para prevenir la contaminación cruzada por *Escherichia coli* enteropatógena y Shigatoxigénica. **Tomat, D;** Quiberoni, A. y Balagué, C.

► XI Congreso Latinoamericano de Microbiología e Higiene de los Alimentos. Lugar: Palermo, Buenos Aires, Argentina. Fecha: 26 al 29 de noviembre de 2012. Biocontrol de *Escherichia coli* con empleo de bacteriofagos durante la producción de leche fermentada. **Tomat, D;** Mercanti, D.; Quiberoni, A. y Balagué, C.

► 8th International Symposium on Shiga Toxin (Verocytotoxin) Producing *Escherichia coli* Infections (VTEC 2012). Lugar: Amsterdam RAI, The Netherlands. Fecha: 6 al 9 de mayo de 2012.

1) Phages cocktail challenge test for biocontrol and determination of bacteriophages insensitive mutants on non-O157 and O157:H7 VETC. Balagué, C.; **Tomat, D.**; Aquili, V.; Casabonne, C.; Quiberoni, A.

2) Isolation and characterization of a T-Even bacteriophage “CEV1” for biocontrol of *Escherichia coli* STEC in dairy products. Aquili, V.; Migliore, L.; **Tomat, D.**; Casabonne, C.; Balagué, C.

► II Simposio Argentino de Lactología. Lugar: Santa Fe, Santa Fe, Argentina. Fecha: 16 y 17 de agosto de 2012. Empleo de bacteriofagos para el biocontrol de *Escherichia coli* durante la producción de leche fermentada. **Tomat, D.**; Mercanti, D.; Quiberoni, A.

► V Jornada de Ciencia y Tecnología: Divulgación de la Producción Científica y Tecnológica de la UNR. Lugar: Rosario, Santa Fe, Argentina. Fecha: 16 de Noviembre de 2011. Efecto del biocontrol fágico sobre cepas de *Escherichia coli* productoras de toxina shiga en productos cárnicos. **Tomat, D.**; Aquili, V.; Quiberoni, A.; Balagué, C.

► VI Congreso y 10° Encuentro Bioquímico 2011. Lugar: Rosario, Santa Fe, Argentina. Fecha: 7 al 9 de Setiembre de 2011. Aislamiento de mutantes insensibles a bacteriofagos durante el biocontrol de *Escherichia coli* en alimentos. **Tomat, D.**; Quiberoni, A.; Balagué, C.

► XII Congreso y XXX Reunión anual de la Sociedad de Biología de Rosario. Lugar: Rosario, Santa Fe, Argentina. Fecha: 2 al 3 de Diciembre de 2010. Efecto del biocontrol fágico sobre cepas de *Escherichia coli* productoras de toxina shiga en productos cárnicos. **Tomat, D.**; Aquili, V.; Quiberoni, A.; Balagué, C.

► XI Congreso y XXIX Reunión anual de la Sociedad de Biología de Rosario. Lugar: Rosario, Santa Fe, Argentina. Fecha: 3 al 4 de Diciembre de 2009. Aplicaciones de bacteriofagos al control de la enfermedad diarreica causada por *Escherichia coli*. Migliore, L.; **Tomat, D.**; Aquili, V.; Balagué, C.

A blurred background image of a tall, thin monument or sculpture on a grassy field. The monument has a long, slender central shaft topped with a rounded, bulbous shape. Below the shaft, there is a horizontal crossbar with four vertical legs extending downwards. The entire scene is out of focus, with a soft, hazy atmosphere.

ÍNDICE

ÍNDICE

RESUMEN	1
SUMMARY	7
INTRODUCCIÓN	12
1. Enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs).....	12
1.1. ETAs asociadas a productos cárnicos	14
1.2. ETAs asociadas a productos lácteos.....	17
1.3. Rutas de contaminación.....	20
2. <i>Escherichia coli</i>.....	23
2.1. Virotipos de <i>E. coli</i>	23
2.2. Receptores celulares de fagos de <i>E. coli</i>	25
2.3. <i>E. coli</i> responsables de ETAs	25
3. Bacteriofagos	26
3.1. Estructura de fagos de <i>E. coli</i>	27
3.2. Organización molecular de genomas fágicos	29
3.2.1. Secuencia temporal de expresión fágica.....	30
3.2.2. Factores de patogenicidad.....	30
3.2.3. Resultados previos del grupo de trabajo.....	31
3.3. Ciclos de vida de los bacteriofagos	33
3.4. Ciclo de vida lítico	33
3.5. Ciclo de vida lisogénico	34
3.6. Regulación ciclo lítico/lisogénico	35
4. Utilización de fagos como herramienta de biocontrol de <i>E. coli</i>	36
4.1. Ventajas y desventajas del uso de fagos.....	37
4.2. Biocontrol en alimentos cárnicos	40
4.3. Biocontrol en alimentos lácteos	40

5. Fagorresistencia	41
5.1. Estrategias para disminuir la incidencia de fagorresistencia	41
6. Situación actual del biocontrol mediante fagos.....	42
6.1. Productos fágicos comerciales	42
6.2. Problemas y desventajas a superar	43
OBJETIVOS GENERALES.....	44
MATERIALES Y MÉTODOS	45
1. Cepas y aislados bacterianos	45
1.1. <i>Cepario</i>	45
2. Bacteriofagos	47
2.1. <i>Aislamiento de bacteriofagos</i>	47
2.2. <i>Purificación de bacteriofagos</i>	48
2.3. <i>Producción de stock de bacteriofagos</i>	48
2.3.1. <i>Obtención de stocks concentrados de fagos mediante precipitación con PEG8000 y centrifugación en Centricon</i>	49
2.4. <i>Titulación de bacteriofagos</i>	49
2.5. <i>Almacenamiento de bacteriofagos – estabilidad de los fagos</i>	50
3. Caracterización de bacteriofagos	50
3.1. <i>Determinación de presencia de genes de patogenicidad por PCR</i>	50
3.2. <i>Microscopía electrónica</i>	52
3.3. <i>Influencia de parámetros fisicoquímicos sobre la actividad lítica</i>	52
3.3.1. <i>Influencia del NaCl</i>	52
3.3.2. <i>Influencia del pH</i>	53
3.3.3. <i>Influencia de la temperatura</i>	53
4. Interacción de <i>Escherichia coli</i> con bacteriofagos	53
4.1. <i>Rango de hospedadores</i>	53
4.1.1. <i>Técnica de Spot test</i>	54

4.1.2. <i>Técnica de doble capa en placa entera</i>	54
4.2. <i>Criterios de selección de fagos para estudios posteriores</i>	55
4.3. <i>Determinación del tiempo y número de eclosión</i>	55
4.4. <i>Eficiencia de plaqueo</i>	56
4.5. <i>Estudio de la naturaleza de los receptores fágicos</i>	56
4.5.1. <i>Ensayos de adsorción fágica</i>	56
4.5.2. <i>Efecto del peryodato sobre la adsorción fágica</i>	57
4.5.3. <i>Efecto de la proteinasa K sobre la adsorción fágica</i>	57
5. In Vitro Challenge tests	58
5.1. <i>Challenge con fagos individuales</i>	58
5.2. <i>Challenge con cócteles</i>	58
6. Biocontrol de <i>Escherichia coli</i> sobre productos cárnicos	59
6.1. <i>Muestras de alimentos – Almacenamiento</i>	59
6.2. <i>Biocontrol con fagos individuales</i>	59
6.3. <i>Biocontrol con cócteles</i>	60
6.4. <i>Porcentaje de recuperación bacteriana desde productos cárnicos</i>	60
7. Aislamiento de mutantes insensibles a bacteriofagos (BIMs)	60
7.1. <i>Metodologías utilizadas en el aislamiento de BIMs</i>	60
7.1.1. <i>Cultivo secundario (medio líquido)</i>	60
7.1.2. <i>Ensayos en muestras cárnicas (medio agarizado)</i>	61
8. Caracterización del fenotipo BIM	61
8.1. <i>Confirmación de BIMs</i>	61
8.2. <i>Eficiencia en la recuperación de BIMs</i>	62
8.3. <i>Determinación de la frecuencia de aislamiento de BIMs</i>	62
8.4. <i>Estabilidad de BIMs</i>	62
8.5. <i>Reversión de BIMs</i>	63
9. Biocontrol de <i>Escherichia coli</i> en productos lácteos	63
9.1. <i>Muestras de alimentos – Almacenamiento</i>	63
9.2. <i>Biocontrol de <i>Escherichia coli</i> durante un proceso de fermentación láctica</i>	63
9.3. <i>Biocontrol de <i>Escherichia coli</i> durante un proceso de cuajado</i>	64

10. Descontaminación de superficies sólidas con cócteles fágicos	65
10.1. <i>Ensayos de descontaminación sobre cubreobjetos (glass coverslip) y sobre acero inoxidable (stainless steel chips).....</i>	65
11. Análisis estadístico	66
RESULTADOS	67
1. Bacteriofagos	67
1.1. <i>Aislamiento de bacteriofagos.....</i>	67
1.2. <i>Almacenamiento de bacteriofagos – estabilidad de los fagos</i>	67
2. Caracterización de bacteriofagos	69
2.1. <i>Determinación de presencia de genes de patogenicidad por PCR.....</i>	69
2.2. <i>Microscopía electrónica</i>	69
2.3. <i>Influencia de parámetros fisicoquímicos sobre la actividad lítica</i>	71
2.3.1. <i>Influencia del NaCl.....</i>	71
2.3.2. <i>Influencia del pH</i>	72
2.3.3. <i>Influencia de la temperatura</i>	73
3. Interacción de <i>Escherichia coli</i> con bacteriofagos	75
3.1. <i>Rango de hospedadores: spot test - doble capa.....</i>	75
3.2. <i>Determinación del tiempo y número de eclosión.....</i>	76
3.3. <i>Eficiencia de plaqueo (EOP)</i>	77
3.4. <i>Estudio de la naturaleza de los receptores fágicos.....</i>	77
3.4.1. <i>Ensayos de adsorción fágica - efecto del peryodato y de la proteinasa K sobre la adsorción fágica</i>	77
4. In Vitro Challenge tests	81
4.1. <i>Challenge con fagos individuales y con cóctel de fagos</i>	81
5. Biocontrol de <i>Escherichia coli</i> sobre productos cárnicos.....	87
5.1. <i>Biocontrol con fagos individuales.....</i>	87
5.2. <i>Biocontrol con cócteles</i>	89
5.3. <i>Porcentaje de recuperación bacteriana desde productos cárnicos.....</i>	91

6. Aislamiento de mutantes insensibles a bacteriofagos (BIMs)	92
6.1. <i>Aislamiento de BIMs</i>	92
6.1.1. <i>Cultivo secundario (medio líquido) vs. ensayos en cárnicos (medio agarizado)</i>	92
7. Caracterización del fenotipo BIM	93
7.1. <i>Confirmación de la fagorresistencia y eficiencia en la recuperación de BIMs</i> ..	93
7.2. <i>Determinación de la frecuencia de aislamiento de BIMs</i>	93
7.3. <i>Estabilidad de BIMs</i>	94
7.4. <i>Reversión del fenotipo fagorresistencia en BIMs</i>	95
8. Biocontrol de <i>Escherichia coli</i> sobre productos lácteos	95
8.1. <i>Biocontrol de <i>Escherichia coli</i> durante un proceso de fermentación láctica</i>	95
8.2. <i>Biocontrol de <i>Escherichia coli</i> durante un proceso de cuajado (producción de queso)</i>	99
9. Descontaminación de superficies sólidas con cócteles fágicos	101
9.1. <i>Ensayos de descontaminación sobre cubreobjetos (glass coverslip)</i>	101
9.2. <i>Ensayos de descontaminación sobre acero inoxidable (stainless steel chips)</i> ..	103
DISCUSIÓN	106
CONCLUSIONES	127
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	130

Abreviaturas y Símbolos

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AI	Fichas de acero inoxidable
ATCC	American Type Culture Collection
BIM	Mutante insensible a bacteriofago (Bacteriophage insensitive mutant)
csp	Cantidad suficiente para
CTS	Caldo tripteína soya.
CV	Cubreobjetos de vidrio
dNTP	Desoxi-Nucleótido trifosfato
DO _{600nm}	Densidad óptica a 600 nm
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
EOP	Eficiencia de plaqueo (Efficiency of plaquing)
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatógena
ETA	Enfermedad transmitida por alimento
Hershey-Mg	Medio Hershey suplementado con MgSO ₄ (5 mM)
HCR	Hospital Centenario de Rosario
IMCU	International Milk-Clotting Units
INTA	Instituto Nacional de Tecnologías Agropecuaria
Kb	Kilobases
Kda	KiloDaltons
LDR	Leche Descremada Reconstituída
LPS	Lipopolisacárido
LFW	Lysis from without
MCWO	Molecular Weight Cut-off
MOI	Multiplicidad de infección (Multiplicity of Infection)
NC	No se obtuvo un conteo válido
NS	No significativo
ONT	Serogrupo no tipificable
<i>p</i>	Probabilidad
pb	Pares de bases
PBS	Buffer fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction)

pd	primer directo
PEG	Polietilenglicol
pr	primer reverso
p/v (%)	Porcentaje peso en volumen
STEC	<i>Escherichia coli</i> Shigatoxigénica
T	Temperatura
TBE	Buffer Tris-Borato-EDTA
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
UDEC	<i>E. coli</i> diarreogénica no-caracterizada
UFC	Unidades formadores de colonias
UFP	Unidades formadores de placas
UPEC	<i>E. coli</i> uropatogénica
v/v (%)	Porcentaje volumen en volumen



Microorganismos

E. *Escherichia*

Strep. *Streptococcus*

L. *Listeria*

S. *Staphylococcus*

C. *Campylobacter*



RESUMEN



RESUMEN

Las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETAs) constituyen un importante problema de salud a nivel mundial. Las mismas son provocadas por el consumo de agua o alimentos contaminados con microorganismos o parásitos, o bien por las sustancias tóxicas que éstos producen. Durante la última década se realizó un notorio esfuerzo a nivel mundial para el desarrollo de biopreservadores alimentarios, aun así, la emergencia de bacterias patógenas causantes de ETAs evidencia la necesidad urgente de investigar nuevas fuentes de agentes bioactivos para enfrentar y controlar este problema.

Numerosos estudios involucran a cepas de *Escherichia coli* patógenas como responsables de ETAs. Específicamente, en nuestra región resulta especialmente importante controlar la diseminación de cepas de *Escherichia coli* shigatoxigénicas (STEC), ya que Argentina tiene la mayor tasa mundial de Síndrome Urémico Hemolítico debido a la diseminación de cepas STEC O157:H7 y no-O157, un patógeno emergente que infecta a los humanos a través de la ingestión de carne u otros alimentos contaminados. Varios factores de patogenicidad, además de las toxinas, como la intimina presente en STEC y cepas enteropatógenas (EPEC), son considerados necesarios en el proceso de infección, convirtiendo a estos patógenos en peligrosos con respecto a la inocuidad alimentaria.

Por otro lado, los conservantes alimentarios, en las concentraciones autorizadas, en general no matan a los microorganismos, sino que solamente evitan su proliferación, limitando su utilidad a materias primas de muy buena calidad. Lo antes mencionado, sumado al incremento en el número de antibióticos a los cuales son resistentes las bacterias, generan la necesidad de nuevos enfoques tanto para garantizar la calidad como para extender la vida útil de los alimentos.

Los bacteriofagos son los enemigos naturales de las bacterias y presentan una alta especificidad para sus células hospedadoras. La naturaleza es una fuente inagotable de fagos que evolucionan constantemente por lo que pueden adaptarse *in situ* para reinfectar bacterias resistentes. Además, son fáciles de aislar y son consumidos cotidianamente ya que están presentes en los alimentos y el agua por lo que representan una alternativa ecológica. Otra de las características que presentan los bacteriofagos es que se auto-amplifican así como se auto-limitan puesto que en presencia de su bacteria hospedadora se replicarán y posteriormente infectarán otras cepas en crecimiento

mostrando un comportamiento de auto-amplificación, por otro lado, en ausencia de células hospedadoras los fagos no se replicarán mostrando una auto-limitación. A pesar de lo antes mencionado, solo recientemente se están realizando un mayor número de investigaciones respecto de su utilidad como agentes de biocontrol para ser empleados en inocuidad alimentaria.

En función de lo anteriormente descripto, este trabajo tuvo como objetivo principal desarrollar una metodología novedosa y económica para el biocontrol de cepas patógenas de *Escherichia coli* mediante bacteriofagos para ser utilizados como aditivos en lácteos y cárnicos o en su proceso de producción.

En primera instancia se realizó el aislamiento de bacteriofagos de *E. coli* desde materia fecal humana, posteriormente se analizó la morfología mediante microscopía electrónica, se evaluó tanto la ausencia de genes de patogenicidad utilizando la técnica de PCR como su estabilidad durante el almacenamiento. En el presente trabajo se aislaron seis bacteriofagos que presentaron un carácter lítico solo frente a cepas patógenas de *E. coli*. Entre ellos, se seleccionaron 3 fagos, a saber DT1, DT5 (para STEC no-O157 ARG4827, no hospedadora de DT1) y DT6, para evaluar la actividad lítica en cepas patógenas de *E. coli* frente a distintas condiciones de temperatura, pH y concentración de cloruro de sodio. Respecto de las microscopías electrónicas, los fagos forman parte de la familia *Myoviridae*, presentando tamaños de cabeza y cola similares. Este dato fue corroborado en un trabajo de tesina, mediante estudios de secuenciación (Migliore, 2011). Los ensayos moleculares de PCR permitieron descartar la presencia de los genes de patogenicidad frecuentemente asociados a cepas de *E. coli* diarreogénicas como *stx1*, *stx2*, *eaeA*, *LT1* y *ST1* en los seis bacteriofagos evaluados. En cuanto a la estabilidad durante el almacenamiento a 4°C, los seis fagos presentaron una leve disminución en el título fágico durante el primer mes así como durante el segundo mes, obteniéndose la menor viabilidad para el fago DT1 y siendo ésta del 55% respecto de la inicial, es decir, una reducción en la viabilidad a lo sumo de 0,26 log UFP al segundo mes de almacenamiento. Al evaluar la actividad lítica en distintas condiciones fisicoquímicas se determinó que, tanto frente a concentraciones crecientes de cloruro de sodio como valores bajos de pH y de temperatura, la actividad lítica fue menor para todos los sistemas evaluados, siendo éstos más afectados por el pH bajo, luego por las bajas temperaturas y en menor medida por la mayor concentración de cloruro de sodio ensayada.

Con respecto a la interacción de los fagos con sus cepas sensibles, se investigó el rango de hospedador para cada fago así como el tiempo y número de eclosión para los fagos DT1 y DT6. También se determinó la eficiencia de plaqueo (EOP) para los fagos DT1, DT5 y DT6 y, adicionalmente, se estudió la naturaleza de los receptores fágicos presentes en cepas patógenas de *E. coli*. Los rangos de hospedador más amplios se obtuvieron para los fagos DT3, DT4 y DT6. Estos fueron capaces de lisar 16, 15 y 16 cepas del cepario evaluado, respectivamente. Por otro lado, los fagos DT1, DT2 y DT5 lisaron solo 6, 7 y 7 de las 104 cepas evaluadas, respectivamente, mostrando un rango estrecho de hospedador. Cabe destacar que las cepas no patógenas de *E. coli* así como las cepas no-*E. coli* no se vieron afectadas por los fagos evaluados. Los bacteriofagos DT1 y DT6 presentaron el mismo tiempo de eclosión, siendo éste de 33 minutos, por otro lado, los números de eclosión fueron de 76 para DT1 y 59 para DT6. Cuando se determinó la EOP, el fago DT1 mostró valores cercanos y superiores al 20%, mientras que el DT5 presentó los menores valores. Contrariamente, el fago DT6 mostró los mayores valores de EOP, obteniéndose valores de hasta 97,6%, sin embargo, para este fago también se obtuvo uno de los menores valores observados, siendo del 10,7% en el sistema con la cepa enteropatógena. Los estudios realizados para identificar los receptores fágicos para DT1, DT5 y DT6 evidenciaron la naturaleza hidrocarbonada de éstos en todas las cepas patógenas de *E. coli* evaluadas puesto que solo se observó una disminución significativa en la adsorción luego del tratamiento con peryodato.

Posteriormente se realizaron ensayos de challenge *in vitro* a distintas temperaturas frente a la cepa DH5 α y a las cepas patógenas EPEC920, STEC no-O157 ARG4827 y STEC464 O157:H7. Se evaluaron fagos individuales así como formando parte de un cóctel, además se comparó la eficacia de los tratamientos y se determinó la evolución del recuento fágico a través de los ensayos. Respecto del biocontrol ejercido por los fagos, éstos fueron más eficaces a la mayor temperatura evaluada (37°C), obteniéndose valores de biocontrol de hasta 6,38 log UFC, sin embargo, a la menor temperatura (4°C) en la mayoría de los casos se obtuvieron valores de reducción significativos de hasta 3,79 log UFC. La acción lítica de los fagos frente a la cepa DH5 α fue similar respecto de las patógenas, presentando reducciones logarítmicas del mismo orden de magnitud con la excepción del mayor tiempo de muestreo (24 h) donde DH5 α fue más afectada. Al comparar los tratamientos a 37°C, el cóctel de fagos resultó ser el más efectivo para reducir el número de células viables, solo en dos casos un fago individual fue significativamente más efectivo que el cóctel, además nunca se obtuvo la

menor reducción de células viables en un sistema tratado con la mezcla fágica. Por otro lado, los tratamientos con los fagos individuales presentaron una eficacia variable independientemente del sistema evaluado. La evolución de los títulos fágicos varió a lo sumo en 1 log UFP/ml, en la mayoría de los casos aumentando levemente y permaneciendo siempre en un número elevado.

Luego se realizaron ensayos de biocontrol con fagos sobre la matriz alimenticia. Se evaluaron tanto fagos individuales como cócteles sobre productos cárnicos contaminados artificialmente con DH5 α y cepas patógenas, a saber EPEC920, STEC no-O157 ARG4827 y STEC464 O157:H7. Además, se evaluó el porcentaje de recuperación bacteriana desde la matriz alimentaria. En general se observaron reducciones, si bien significativas, relativamente bajas cuando se utilizaron fagos individuales en los ensayos de biocontrol a ambas temperaturas evaluadas (5 y 24°C). Por otro lado, cuando se emplearon cócteles en los ensayos las reducciones significativas observadas fueron mayores. A modo de ejemplo, empleando una MOI del mismo orden de magnitud, la cepa STEC464 O157:H7 sufrió una reducción similar a las 3 h de incubación utilizando un fago individual o el cóctel, mientras que a las 6 h el cóctel produjo una reducción 1,6 log UFC mayor que el fago individual a 24°C evidenciando la utilidad del cóctel para prevenir un posterior recrecimiento bacteriano. Además, durante los experimentos la recuperación bacteriana desde la matriz alimentaria osciló entre el 61,4% y el 85,4%.

Durante los ensayos en cárnicos, en algunos casos se observó un recrecimiento bacteriano al mayor tiempo de muestreo (24 h), por lo que se planteó el aislamiento de mutantes insensibles a bacteriofagos (BIMs) desde los experimentos en carnes así como por la metodología de cultivo secundario. Una vez aislados, los BIMs fueron confirmados por el test de sensibilidad en medio líquido y se determinó la frecuencia de aislamiento para cada BIM confirmado. Además, se seleccionaron 9 BIMs confirmados, 5 obtenidos a partir del cultivo secundario y 4 a partir de los ensayos en carnes, y se evaluó la estabilidad y reversión. De los 16 BIMs aislados por la metodología de cultivo secundario se confirmaron como BIMs verdaderos el 75,0%, mientras que de los 30 BIMs aislados desde carnes se evaluaron 14 y solo se confirmaron como verdaderos el 28,5%. Además de presentar frecuencias de aislamiento bajas, oscilando entre $3,7 \times 10^{-7}$ y $1,8 \times 10^{-6}$, los BIMs presentaron una estabilidad variable y solo uno fue capaz de revertir el fenotipo de resistencia.

Otra matriz alimentaria utilizada para los ensayos de biocontrol fueron los lácteos. En los ensayos realizados durante un proceso de fermentación láctica, en el 67% de los casos el tratamiento fágico eliminó completamente la cepa bacteriana inoculada, además, cuando se utilizó el cóctel, este eliminó el patógeno en un menor tiempo respecto de los fagos individuales. Por otro lado, en ensayos realizados durante un proceso de cuajado, si bien se inactivó rápida y completamente el 50% de las cepas evaluadas, no se observó la eficacia obtenida durante la fermentación para la cepa patógena STEC O157:H7 usando el cóctel a una MOI similar, sin embargo, éste pudo eliminar la cepa DH5 α . Respecto de la estabilidad fágica, éstos presentaron un alto nivel de estabilidad en este tipo de matrices considerando los bajos valores de pH alcanzados. Por otro lado, tanto los cultivos iniciadores, a saber *Streptococcus thermophilus*, como la evolución general de los parámetros del proceso de fermentación láctica como del proceso de cuajado, no se vieron afectados por la adición exógena de bacteriofagos.

Finalmente, se evaluó la eficacia del tratamiento con cócteles fágicos sobre superficies sólidas, específicamente sobre cubreobjetos de vidrio (CV) y acero inoxidable (AI), emulando superficies inanimadas potencialmente contaminadas que se pueden encontrar tanto en un ambiente industrial como en el hogar. En los ensayos realizados en CV se obtuvo una eliminación completa de los patógenos EPEC920 y STEC464 O157:H7 tanto a 5 como a 37°C, observándose un recrecimiento de ~1,5 log UFC para esta última cepa a alto inóculo bacteriano. Contrariamente, la cepa STEC no-O157 ARG4827, si bien se vio reducida en su número inicialmente, no se logró eliminar a 5°C y presentó un recrecimiento posterior a 37°C. Cuando se evaluaron los resultados obtenidos en la matriz AI, se determinó que el cóctel fue capaz de eliminar completamente todas las cepas evaluadas a 5°C y a STEC no-O157 ARG4827 a 37°C, mientras que STEC464 O157:H7 y EPEC920 presentaron un recrecimiento posterior a alto, y a bajo y alto inóculo bacteriano, respectivamente.

Cabe destacar que se ha logrado una gran especificidad de acción sobre cepas patógenas de *E. coli* y que estudios posteriores permitirán desarrollar cocteles fágicos con mayores eficiencias de reducción bacteriana. Los mejores resultados se obtuvieron en los ensayos de biocontrol sobre superficies sólidas, a saber cubreobjetos de vidrio y acero inoxidable, y durante los procesos de fermentación láctica y cuajado. También se observaron reducciones bacterianas significativas en la matriz cárnica.

Los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis sugieren, en primera instancia, que los bacteriofagos aislados en nuestro laboratorio son útiles para el biocontrol de cepas patógenas de *E. coli* en alimentos.

A tall, thin, metallic structure with a pointed top and a base of four legs, standing on a white, textured surface against a grey background. The structure is centered and appears to be a stylized monument or sculpture. The word "SUMMARY" is overlaid in the center of the image.

SUMMARY

SUMMARY

Foodborne diseases are a major health threat worldwide. These diseases are caused by consumption of water or food contaminated with microorganisms or parasites, or by toxic substances that they produce. During the last decade a significant effort was made worldwide to develop food biopreservatives, even so, emergence of bacterial pathogens causing foodborne diseases shows the need to investigate new sources of bioactive agents to address and control this problem.

Several studies involve pathogenic *Escherichia coli* strains as responsible for foodborne diseases. Specifically, in our region is particularly important to control the spread of Shigatoxigenic *Escherichia coli* (STEC) strains since Argentina has the world's highest rate of hemolytic uremic syndrome due to dissemination of O157:H7 and non-O157 STEC strains, an emerging pathogen that infects humans through ingestion of contaminated meat or other foods. Several pathogenicity factors, besides toxins, such as intimin present in enteropathogenic (EPEC) and STEC strains, are considered necessary in the infection process, making these pathogens dangerous regarding food safety.

Moreover, food preservatives at authorized concentrations generally do not kill microorganisms, rather, only prevent proliferation, limiting their effectiveness to high quality products. The foregoing linked to the increasing incidence of antibiotic resistant bacteria drives the need for new approaches to extend shelf life and for ensure food quality.

Bacteriophages are natural enemies of bacteria and exhibit a high specificity for their host cells. Nature is an endless source of phages constantly evolving and able to adapt *in situ* and reinfect resistant bacteria. In addition, phages are readily isolated and are routinely consumed in our foods and water, thus representing a more ecological alternative. Another feature presented by bacteriophages is self-amplification and self-limitation. In the presence of their host bacteria phage will replicate and subsequently infect other growing cells showing a self- amplification behavior, on the other hand, in absence of host cells, phage will not replicate showing a self-limited behavior. Despite mentioned above, only recently a greater number of research are carried out regarding their utility as biocontrol agents for use in food safety.

Considering the above described, the main objective of this work was to develop a novel and economic methodology for controlling pathogenic *Escherichia coli* using bacteriophages as additives in meat and dairy or in the production process.

In the first place, *E. coli* bacteriophages were isolated from human stool samples, subsequently, morphology was analyzed by electron microscopy and presence of pathogenicity genes by PCR as their stability during storage was assessed. In the present work, six bacteriophages were isolated, all showing a lytic character only against pathogenic *E. coli*. Among phages isolated, three phages were selected, namely DT1, DT5 (for non-O157 STEC ARG4827, resistant to DT1) and DT6, to evaluate lytic activity on pathogenic *E. coli* against different temperatures, pH and sodium chloride concentrations. In the present work six bacteriophages were isolated showing lytic activity only against pathogenic *E. coli* strains. In addition, from electron microscopy, we were able to obtain clear pictures only from two phages, corresponding to DT1 and DT6. Both, DT1 and DT6, belong to the *Myoviridae* family, showing heads and tails of similar sizes. Molecular PCR assays allowed us to exclude the presence of *stx 1*, *stx2*, *eaeA*, *ST1* and *LT1* pathogenicity genes on all bacteriophages evaluated. Regarding stability on storage at 4°C, all six phages showed a slight decrease in phage titer during the first and second month, DT1 reached the lower viability value being the 55% of the initial value, i.e. a reduction on phage viability of 0.26 log PFU at most after two months of storage. When lytic activity was evaluated against different physicochemical conditions we found that increasing concentrations of sodium chloride as well as low pH and temperature yielded lower lytic activity for all systems tested. Phage activity was more affected by low pH values, then by low temperatures and, to a lesser extent, by the higher sodium chloride concentration assayed.

To characterize the interaction between phages and their sensitive strains, the host range for each phage and the burst size and time for phage DT1 and DT6 were studied. Also, efficiency of plating (EOP) for phage DT1, DT5 and DT6 was determined and, additionally, nature of phage receptors present on pathogenic *E. coli* strains was studied. Phage DT3, DT4 and DT6 showed the broader host ranges, lysing 16, 15 and 16 strains from the collection evaluated, respectively. Moreover, phage DT1, DT2 and DT5 lysed only 6, 7 and 7 from 104 strains tested, respectively, showing narrower host ranges. It should be noted that, non-pathogenic *E. coli* as well as non-*E. coli* strains were not affected by the phages tested. DT1 and DT6 showed the same burst time, namely 33 min, on the other hand, burst size was 76 and 59 for DT1 and DT6,

respectively. In addition, DT1 showed EOP values of ca. 20%, while DT5 presented the lower values observed. Conversely, DT6 showed the highest EOP, yielding values up to 97.6%, however, one of the lowest values observed, 10.7% in the enteropathogenic strain system, was also obtained for DT6. Studies carried out to evaluate phage receptors for DT1, DT5 and DT6 demonstrated their hydrocarbon nature in all pathogenic *E. coli* strains evaluated since a significant decrease only with periodate treatment was observed.

Subsequently *in vitro* challenge tests at different temperatures against DH5 α and pathogenic EPEC920, non-O157 STEC ARG4827 and O157:H7 STEC464 strains were performed. Individual phages and cocktails were evaluated, in addition, efficacy among treatments was compared and phage count evolution through trials determined. In general, phages were more effective at the highest temperature tested, yielding biocontrol values up to 6.38 log CFU, however, significant reductions at the lower temperature evaluated were observed, namely up to 3.79 log CFU. Lytic activity of phages against DH5 α was similar compared to pathogenic strains, showing log reductions of equal magnitude orders excepting the greater sampling time where DH5 α was the most affected one. Comparing treatments at 37°C, phage cocktail was the most effective reducing viable cells numbers, furthermore, single phages were significantly more effective than phage cocktail only twice, besides, the lowest viable cells reduction was never obtained on a system treated with the phage mixture. On the other hand, individual phage treatments showed variable effectiveness regardless of the system evaluated. Evolution of phage titers through experiments varied at most in 1 log PFU/ml, slightly increasing in most cases and always remaining in large numbers.

Next, phage biocontrol trials were performed on food matrices. Individual phages as well as cocktail were evaluated on artificially contaminated meat products, namely DH5 α and EPEC920, non-O157 STEC ARG4827 and O157:H7 STEC464 pathogenic strains. Also, bacterial recovery from food was evaluated. Although significant reductions were observed, a relatively low biocontrol effect was achieved using individual phages at both temperatures tested. On the other hand, using phage cocktails resulted in greater significant reductions. E.g., STEC464 O157:H7 strain experienced a similar reduction at 3 h using an individual phage or the phage cocktail at similar MOIs, while at 6 h the cocktail produced a 1.6 log CFU reduction greater than individual phages at 24°C, demonstrating the utility of phage cocktails to prevent

bacterial regrowth. In addition, bacterial recovery from the food matrix during experiments ranged from 61.4% to 85.4%.

During meat assays, a bacterial regrowth was observed at the longer sampling time, thus bacteriophage insensitive mutants (BIMs) were isolated from meats experiments as well as by the secondary culture method. Once isolated, BIMs were confirmed by the liquid culture sensitivity test, in addition, isolation frequency was determined for each confirmed BIM. Furthermore, nine (9) confirmed BIMs were selected, five (5) obtained from the secondary culture method and four (4) from meat trials, and evaluated for stability and reversion. Out of sixteen (16) BIMs isolated by the secondary culture method, 75.0% were confirmed as true BIM, while from thirty (30) BIMs isolated from meat, fourteen (14) were evaluated and only 28.5% confirmed as true BIM. Besides presenting low isolation frequencies, ranging from 3.7×10^{-7} to 1.8×10^{-6} , BIMs presented variable stability and only one (1) reverted to phage sensitivity.

Another food matrix used for biocontrol assays was dairy. On assays performed during a fermentation process, phage treatment completely eliminated inoculated bacterial strain in the 67% of cases. Also, when phage cocktail was used, pathogen was eliminated in a shorter period of time regarding each individual phage. On tests conducted during curdling, although 50% of tested strains were rapidly and completely inactivated, a lower efficacy than obtained on ferments was observed in pathogenic O157:H7 STEC strain by using phage cocktail at similar MOI values, however, DH5 α was completely eliminated. Regarding phage stability, all showed high stability in this type of matrices despite the low pH values reached. Moreover, starter cultures, namely *Streptococcus thermophilus*, as general parameters evolution of manufacturing process, either fermentation or curdling, were not affected by exogenous bacteriophage addition.

Finally, efficacy of phage cocktail treatments on hard surfaces was evaluated, specifically, on glass coverslips (GC) and stainless steel chips (SSC), emulating potentially contaminated inanimate surfaces found on industrial and home environments. GC trials resulted on complete removal of EPEC920 and O157:H7 STEC464 pathogens at 5 and 37°C, although O157:H7 STEC464 showed a subsequent regrowth of ~ 1.5 log CFU at high bacterial inoculum. Conversely, although an initial reduction was observed, phage cocktail failed eliminating non-O157 STEC ARG4827 strain at 5°C and showed a subsequent bacterial regrowth at 37°C. Results on SSC matrix showed that cocktail was able to completely eliminate all strains tested at 5°C

and non-O157 STEC ARG4827 at 37°C, while O157:H7 STEC464 at high bacterial inoculum and EPEC920 at low and high bacterial inoculum showed subsequent bacterial regrowth.

It is noteworthy that high specificity of action has been achieved on pathogenic *E. coli* and subsequent studies will allow us to develop phage cocktails with higher efficiencies. The best biocontrol results were obtained in assays performed on hard surfaces, namely glass coverslips and stainless steel chips, and during the fermentation and curdling processes. In addition, significant bacterial reductions were observed on biocontrol assays in meat.

Results obtained in this work suggest, at first instance, that bacteriophages isolated in our laboratory are useful for biocontrol pathogenic *E. coli* in foods.

A tall, slender, metallic structure, possibly a monument or a piece of art, stands against a bright, hazy background. The structure has a long, thin vertical shaft topped with a rounded, bulbous finial. Below the shaft, there is a cross-like base with four vertical legs extending downwards. The overall appearance is that of a weathered metal sculpture. The word "INTRODUCCIÓN" is superimposed in the center of the image.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. Enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs)

Las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA) constituyen un importante problema de salud a nivel mundial. Estas enfermedades se producen por el consumo de agua o alimentos contaminados con microorganismos, parásitos o por las sustancias tóxicas que ellos producen. Para prevenirlas, existen controles en todos los países que garantizan los mejores niveles de seguridad, higiene y calidad a lo largo de la cadena alimenticia. En la última década se ha observado un gran incremento de intoxicaciones e infecciones vehiculizadas por alimentos en muchos países desarrollados y en desarrollo. Este fenómeno puede ser atribuido a varios factores tales como el incremento del comercio internacional de alimentos y de ingredientes alimenticios, turismo internacional, cambios climáticos, cambios de hábitos alimenticios con una mayor proporción de consumo de alimentos listos para consumir y servicios masivos de *catering*. Todo esto sumado a las históricas condiciones de escasa sanidad en zonas carenciadas de países en desarrollo, tales como carencia de agua potable, de cloacas, de condiciones de vivienda dignas y de educación para la salud. En síntesis, el incremento de la desigualdad social contribuye al aumento de las ETAs. Un brote de ETA se da cuando dos o más personas sufren una enfermedad con características similares después de ingerir un mismo alimento y los análisis epidemiológicos y de laboratorio confirman al alimento como el origen de la enfermedad.

En el período 1995-1999 en América Latina y el Caribe se produjeron 4234 brotes infecciosos y los principales alimentos identificados como causantes de toxiinfecciones fueron pescados, agua, carnes rojas y productos lácteos. En Argentina se detectaron 9586, 11703 y 6583 casos de ETAs en 2008, 2009 y 2010, respectivamente (AGC, 2011). Según la OMS los siete principales patógenos que pueden encontrarse en los alimentos son: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Shigella* spp., *Listeria monocytogenes* y *Campylobacter* spp. Actualmente, las ETAs de origen zoonótico, enfermedades infecciosas causadas por microorganismos como *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni* y *Salmonella* spp. asociados a animales, se están volviendo un problema en aumento que está probablemente asociado con la práctica bioindustrial actual de producción en masa de productos de origen animal (Heyndrickx y col., 2001). Además, la manufactura de

quesos con leche cruda, los productos con lenta o escasa acidificación, las condiciones de higiene inadecuadas en frigoríficos y tambos, conducen a la contaminación con patógenos bacterianos de productos lácteos y cárnicos.

Las cepas de *Escherichia coli* productoras de toxina Shiga (STEC), especialmente las O157:H7, son patógenos humanos emergentes que pueden causar diarrea así como manifestaciones clínicas más severas incluyendo Púrpura Trombocitopénica Trombótica (PTT), Enterocolitis Hemorrágica (ECH) y Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) (Griffin y col., 2002; Su y Brandt, 1995). Otros serogrupos no-O157 (O26, O103, O111, O128 y O145) productores de toxina Shiga, aislados de alimentos, también han sido identificados como productores de patologías humanas y responsables de la incidencia de SUH (Bettelheim, 2006; Blanco y col., 2003; WHO, 1998). Aquellas STEC que causan ECH y SUH se denominan *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) (Nataro y Kaper, 1998; Levine y col., 1987). El principal reservorio de STEC es el ganado vacuno y otros rumiantes, los cuales poseen STEC en su flora intestinal asintóticamente (Kobayashi y col., 2001). Las personas se infectan con estas cepas primariamente a través de la ingestión de carne contaminada u otros productos alimenticios o por transmisión fecal-oral de humanos o animales infectados (Su y Brandt, 1995).

Otra de las bacterias asociada a brotes de ETA es *Campylobacter*. La infección por *Campylobacter* constituye una zoonosis de distribución mundial y es la bacteria más frecuentemente identificada como causante de gastroenteritis en el mundo, sin embargo, en nuestro país *Campylobacter* nunca se ha aislado como responsables de brotes de ETA. Varias especies de *Campylobacter* se encuentran como comensales en el tracto gastrointestinal de animales salvajes y domésticos. Los principales reservorios los constituyen el ganado bovino, ovino y porcino, roedores, todas las aves de corral, perros y gatos. El espectro de reservorios varía con la especie, siendo *C. jejuni* la especie con el reservorio más amplio, mientras que *C. coli* es más frecuentemente aislado en porcinos. La adquisición primaria del microorganismo por los animales ocurre generalmente temprano en la vida del animal y en la mayoría de los casos la colonización conduce a un estado de portador de por vida. En los países industrializados *Campylobacter* se transmite principalmente a través de alimentos de origen animal, siendo el consumo de carne de ave de corral mal cocida el responsable del 50-70% de las infecciones esporádicas (Blaser, 2000), mientras que en los países menos desarrollados predominan la transmisión por alimentos y aguas contaminadas con

excretas así como el contacto directo con personas o animales enfermos (Franco y Williams, 1999). El síntoma más característico de una campylobacteriosis es la diarrea, que puede ser o no sanguinolenta, y puede estar acompañada de fiebre, vómitos y dolores abdominales y de cabeza. La campylobacteriosis en la mayoría de los casos se auto limita, sin embargo, en algunas ocasiones puede derivar en una alteración del sistema nervioso denominada Síndrome de Guillain-Barré pudiendo dejar daños neurológicos severos en algunos casos.

Salmonella spp. ocupa un rol importante entre las bacterias que causan ETA, ya que es el agente etiológico de la Salmonelosis. Bajo el término Salmonelosis se incluye a las fiebres tifoidea, paratifoidea y no-tifoidea. Las dos primeras formas de salmonelosis están producidas por *S. Typhi* y *S. Paratyphi*, cuyo principal reservorio es el hombre. La fiebre no-tifoidea es la presentación más frecuente de salmonelosis en todo el mundo, se trata de una enfermedad zoonótica y sus principales agentes etiológicos son *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium*, entre otros serotipos, siendo su principal reservorio aves, reptiles y mamíferos. Las vías por las cuales este patógeno puede transmitirse a los seres humanos son alimentos como huevos o alimentos derivados del huevo consumidos crudos, leche y sus derivados, agua, carne y productos cárnicos. Los síntomas típicos de una salmonelosis incluyen fiebre, diarrea sanguinolenta o mucosa y cólicos abdominales. Además, la infección por *Salmonella* puede derivar, en muy pocas ocasiones, en el Síndrome de Reiter, pudiendo generar secuelas permanentes.

1.1. ETAs asociadas a productos cárnicos

Las ETAs asociadas a productos cárnicos han sido ampliamente documentadas en todo el mundo (CDC, 2013a; CDC, 2013b; Rangel y col., 2005; Armstrong y col., 1996). Los productos de origen cárnico poseen una gran variedad de bacterias inocuas y benéficas para el humano, sin embargo, estos productos se pueden contaminar con bacterias patógenas.

Las bacterias de STEC se documentaron por primera vez como un patógeno asociado a brotes en 1982 (Riley y col., 1983) y desde entonces se ha convertido en un patógeno transmitido por alimentos en todas partes en todo el mundo. Los rumiantes, especialmente el ganado bovino, son la fuente primaria de cepas STEC O157 y no-O157 (Bolton, 2011; Bosilevac y Koohmaraie, 2011; Pennington, 2010), y la carne

vacuna se considera una fuente importante de infecciones humanas por éstas (Caprioli y col., 2005; CDC, 1997). En Europa, la prevalencia de STEC no-O157 y O157 en carne fresca oscila entre 0,3-2,3% y 0,1-0,7%, respectivamente (Anónimo, 2011). Además, la carne contaminada, especialmente la de origen bovino, se identificó como la fuente de infección humana en 16 de 40 brotes de STEC en estados miembros de la Unión Europea entre 2007 y 2009 (Ennis y col., 2012). En Argentina, en estudios realizados en niños con SUH se identificó al serotipo O157:H7 como el más prevalente (Rivas y col., 2006), aunque otros autores encontraron este serotipo con menor prevalencia (López y col., 1998). Sin embargo, como las cepas de STEC no-O157 son más prevalentes en animales y como contaminantes en alimentos cárnicos, los humanos están probablemente más expuestos a estas cepas (Beutin y col., 2004; Blanco y col., 2004). Por otro lado, si bien en varios países O157:H7 es el serotipo principalmente asociado con la mayoría de los casos de enfermedad y brotes de ETA, más de 400 serotipos de STEC se han descrito y más de 150 implicados en enfermedades humanas (WHO/CSR/APH/98.8, 1998). Por lo antes mencionado, las cepas de STEC representan una amenaza a nivel mundial como agentes responsables de ETAs en productos cárnicos.

Por otro lado, *Campylobacter* es la causa más común de ETAs en países industrializados asociada a carne mal cocida de aves de corral. Muchas especies del género son capaces de causar ETAs en seres humanos, destacándose *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* (Franco y Williams, 1999) que poseen una dosis infectiva baja, a saber 400 a 500 células (Moore y col., 2005). Estudios epidemiológicos demostraron la contaminación por *Campylobacter jejuni* en plantas de procesamiento de pollos, tanto en carcasas como en pollos enteros así como en partes y en sus órganos, además, también se detectó contaminación en equipamiento y en las manos de los trabajadores (Quinones-Ramirez y col., 2000; Shih, 2000; Ono y Yamamoto, 1999). Se han descrito brotes involucrando a *Campylobacter jejuni* en alimentos como pollo y pavo (Murphy y col., 1995), en algunos casos debido a carne mal cocida (Evans y col., 1998) y en otros a contaminación cruzada (Roels y col., 1998; Brown y col., 1988).

Salmonella spp. es responsable de la enfermedad conocida como salmonelosis, es una ETA de origen bacteriano y de distribución mundial. En los países de Latinoamérica los rangos de prevalencia varían entre 200 y 500 casos cada 100.000 (Miller y col., 1995). El principal agente etiológico de esta enfermedad es *Salmonella enterica*. Su clasificación taxonómica es muy compleja, actualmente se reconocen dos

especies: *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori*. Estos microorganismos están ampliamente distribuidos en la naturaleza y se los encuentra como comensales y patógenos en el tracto gastrointestinal de mamíferos domésticos y salvajes, reptiles, aves e insectos (WHO, 2008). Los alimentos perecederos y los que requieren manipulación son los que con mayor frecuencia están involucrados en brotes de ETA debido a este patógeno, y entre ellos los productos y subproductos cárnicos (Alcazár Montañez y col., 2006), leche cruda, huevos, productos que contienen huevo y vegetales, entre otros (Gast y col., 1998). Epidemiológicamente, las infecciones por *Salmonella* pueden causar pequeños brotes en la población en general, sin embargo el 60-80% de los casos son esporádicos; a veces se producen grandes brotes en hospitales, jardines maternos, geriátricos y restaurantes (WHO, 2008). Se han registrado brotes por *Salmonella* en países de todo el mundo debido a productos cárnicos como carne de cerdo, carne picada y embutidos (Mosson y col., 2006; ICMSF, 1996), carne de pollo (Berghold y col., 2004), salame (Luzzi y col., 2007; Emberland y col., 2006) y salchichas curadas (Nygard y col., 2007). En Argentina, entre 1993 y 2002 ocurrieron 152 brotes de ETA que afectaron a 3.309 personas, el 33% de los brotes de ETA causados por *Salmonella* se produjeron por consumo de agua contaminada y el 27% fue debido al consumo de carnes rojas (SIRVETA, 2004).

Listeria monocytogenes es el microorganismo patógeno responsable de la listeriosis, ETA de baja frecuencia pero de carácter grave. Éste es un microorganismo ubicuo de amplia distribución en la naturaleza y es un frecuente contaminante de alimentos (Jianshun y col., 2009; Byelashov y col., 2009). Si bien muchos alimentos pueden servir de vehículo para este patógeno, *Listeria monocytogenes* es frecuentemente aislado de alimentos tales como cortes de carnes listos para el consumo (ready-to-eat, RTE) (fiambres y embutidos). Además, su capacidad para tolerar amplios rangos de pH, temperatura y concentración de sales constituye una propiedad que facilita la colonización de una gran variedad de alimentos como carnes, leche, vegetales, pescados y sus respectivos derivados (Privat y col., 2010a; Privat y col., 2010b). Este patógeno tiene la capacidad de infectar y reproducirse en el citoplasma de diversos tipos de células lo que le permite atravesar las barreras intestinal, meníngea y placentaria (Jianshun y col., 2009). Esta bacteria es la única especie del género *Listeria* que produce infección en humanos y ha sido la causa del aumento de ETAs, especialmente en niños, ancianos y pacientes inmunocomprometidos. La listeriosis humana puede presentarse como epidemias o en forma de casos esporádicos de baja frecuencia, sin embargo, su

tasa de mortalidad es alta, hasta un 30% de los casos, y es responsable de aproximadamente la tercera parte de las muertes atribuidas a patógenos de origen alimentario (Liu y col., 2008). Tanto en Estados Unidos como en Europa durante los últimos diez años han ocurrido brotes de ETA involucrando a *Listeria* cuyo origen han sido en su mayoría alimentos cárnicos y lácteos. Además, los alimentos RTE de origen cárnico han sido implicados en la mayoría de los brotes más importantes de listeriosis en los últimos 30 años (Gottlieb y col., 2006; Graves y col., 2005; Olsen y col., 2005; Schlech, 2000; Ryser, 1999; Schwartz y col., 1988). En Argentina, se han documentado numerosos abortos naturales por *Listeria*, sin embargo, no se han documentado brotes alimentarios o en los que se haya identificado el alimento en las últimas 3 décadas. Por otro lado, debe considerarse que la enfermedad no es de notificación obligatoria en nuestro país, y, en casos de abortos o gastroenteritis, no suelen realizarse las determinaciones necesarias para observar la presencia de este patógeno (FAO, 2007).

1.2. ETAs asociadas a productos lácteos

Además de los patógenos mencionados con anterioridad en productos cárnicos tales como STEC, *Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes*, los cuales también producen brotes de ETAs por consumo de lácteos, el patógeno que produce mayor preocupación en estos productos y sus derivados es *Staphylococcus aureus*. Adicionalmente, *Enterobacter sakazakii* es de gran preocupación especialmente en fórmulas en polvo para lactantes, implicado en brotes y causando alta mortalidad y secuelas en los niños.

Se han descrito brotes asociados a STEC en todo el mundo por consumo de leche cruda (Marler, 2010; Minnesota Department of Health, 2010; Food Poison Journal, 2009; Buglino y col., 2008; Strachan y col., 2006; McIntyre y col., 2002; Bockemühl y col., 1990) así como por consumo de quesos (Rothschild, 2010; CDC, 2010; INVS, 2007; MAPAQ, 2004; Curnow, 1999) y otros productos lácteos (De Schrijver y col., 2008; CDC, 2008; Becker, 2005; CDC, 2000; CDSC, 1998). La mayoría de estos brotes fueron atribuidos al serotipo O157:H7, sin embargo, debido a métodos analíticos y a una vigilancia epidemiológica inadecuados, las infecciones por STEC no-O157 pueden ser poco detectadas y por lo tanto, poco reportadas en todo el mundo (Hanna y col., 2010). En Argentina se confirmaron 20 y 35 aislamientos de STEC O157 y STEC no-O157 desde alimentos, respectivamente, entre 2010 y 2012.

Específicamente, en un estudio realizado en nuestro país por Rubeglio y Tesone (2007) se determinó que STEC O157:H7 tuvo una prevalencia del 3,77% en 53 productos lácteos analizados. Por otro lado, hay escasa información y datos epidemiológicos sobre brotes reportados de STEC en productos lácteos.

Respecto de *Salmonella*, en el año 2000 se registraron 21 millones de casos que tuvieron como agente etiológico a *Salmonella typhi* y 5 millones a *Salmonella paratyphi* a nivel mundial. Además, se registraron 93.757.000 casos/año y 155.000 muertes por casos que involucraron a *Salmonella* no-typhi en todo el mundo (Shakoor y col., 2012). Específicamente en lácteos, se registraron brotes por consumo de leche maternizada que afectó a veintinueve y dieciocho bebés en 2008 y 2011 en España, respectivamente, mientras que otro brote en 2007 afectó a veintinueve personas por consumo de leche cruda y queso fresco en Pennsylvania, Estados Unidos (MMWR, 2007). En Argentina, a partir de 1969 y hasta 1972, hubo un gran predominio de aislamientos de *Salmonella* Typhimurium generando cuadros clínicos graves y con una tasa de mortalidad que alcanzó el 14% de 246 niños estudiados. A partir de 1986, se produce un notable incremento de *Salmonella* Enteritidis en la Argentina así como en otros países, produciendo 23 brotes en nuestro país entre 1986 y 1988 (Eiguer y col., 1990; Rodríguez y col., 1990) y manteniéndose como la serovariedad más prevalente a la actualidad. Si bien se han reportado casos de lácteos contaminados, especialmente leche en polvo para niños, por *Salmonella*, los brotes de salmonelosis registrados en nuestro país involucrando productos lácteos son escasos. Uno de estos brotes estuvo asociado a queso de cerdo afectando a diecisiete personas en dos localidades argentinas (Boletín Epidemiológico Periódico, 2006).

Listeria monocytogenes es el agente etiológico de la listeriosis, una zoonosis poco frecuente pero muy grave con baja morbilidad pero muy alta mortalidad (30%) (Perroni, 2008), siendo aún mayor, hasta un 70%, en individuos que pertenecen a grupos de riesgo. Los lácteos fueron citados frecuentemente como causa de listeriosis, la leche en polvo y el yogur no representan un riesgo, mientras que el queso es un producto susceptible de contaminación. Además, la manteca y la crema, poseen bajo riesgo aunque se han producido brotes por su consumo. Se han registrado brotes de listeriosis a nivel mundial involucrando productos lácteos como manteca y queso fresco de tipo hispano en Finlandia y Estados Unidos, respectivamente (FDA/FSIS, 2001). En los Estados Unidos hubo 6 brotes de listeriosis por consumo de productos lácteos contaminados entre 1998 y 2008 afectando a 53 personas de las cuales 48 debieron ser

hospitalizadas y 5 de ellas murieron (Cartwright y col., 2013). Un brote importante se registró en Santiago de Chile en 2008, registrándose 119 casos de enfermedad por consumo de quesos de pasta blanda contaminados (Ministerio de Salud, 2009). Si bien en Argentina esta bacteria es poco frecuente se han aislado varios serotipos desde alimentos (Callejo y col., 2008). En el sistema de vigilancia de ETA en Argentina entre el año 2010 y 2012 se investigaron 26 brotes, resultando solo un brote nosocomial producido por *Listeria monocytogenes* serotipo 4b. Por otro lado, no se han registrado o denunciado brotes por este microorganismo vehiculizados por lácteos.

Staphylococcus aureus es uno de los principales responsable de brotes de ETAs asociado a productos lácteos en todo el mundo (EFSA y ECDC, 2011; Nuñez y col., 2009; De Buyser y col., 2001; Tirado y Schmidt, 2000). En Latinoamérica, específicamente en Uruguay, de acuerdo a datos obtenidos por el Sistema de Información Regional para la Vigilancia Epidemiológica de ETAs, en 9 de 12 brote de intoxicación estafilocócica registrados durante el período 1993-2001 se identificaron lácteos como alimento responsable. Otro país de América Latina, a saber Paraguay, sufrió en 2007 uno de los brotes más importantes de nuestra región donde un brote epidémico asociado al consumo de leche ultrapasteurizada afectó a 400 personas, de las cuales 60 requirieron hospitalización. Este es el primer brote de ETA denunciado en Paraguay en el cual se pudo aislar, caracterizar y subtipificar el agente etiológico en la planta de elaboración, en el alimento y en las personas afectadas debido a que se aisló *S. aureus* de 5 pacientes, 3 operarios y 3 muestras de leche (Weiler y col., 2011). En Argentina, *Staphylococcus aureus* tiene una elevada prevalencia en los ambientes lácteos (Calvinho y Tirante, 2005), es el responsable de la mayoría de las infecciones de la glándula mamaria bovina (mastitis) y debido a la gran producción y consumo de lácteos en nuestro país es probablemente uno de los principales patógenos implicados en brotes de ETA vehiculizados por productos lácteos. Sin embargo, hay escasa información sobre el envenenamiento alimenticio por estafilococo en Argentina ya que la mayoría de los brotes pequeños de intoxicación alimentaria no se denuncian dado que no requieren atención médica (López y col., 2008). Aislados de *S. aureus* asociados con intoxicación alimentaria en distintas provincias Argentinas han sido caracterizados recientemente por métodos fenotípicos y genotípicos aunque la fuente de alimento de las que se aislaron los microorganismos no fue mencionada (Manfredi y col., 2010).

Otra bacteria preocupante en lácteos es *Enterobacter sakazakii*. Si bien *Enterobacter sakazakii* ha sido detectado en diferentes tipos de alimentos, solo las

fórmulas infantiles en polvo se han visto asociada a brotes. Se han informado casos de infecciones por *Enterobacter sakazakii* derivadas de fórmulas infantiles contaminadas solo en algunos países desarrollados (Block y col., 2002; CDC, 2002; Van Acker y col., 2001) y probablemente estos casos no son reportados en todos los países. La incidencia general causada por *Enterobacter sakazakii* parece ser baja y en los pocos brotes investigados se observaron tasas de mortalidad entre el 20% y el 50%. Brotes recientes ocurrieron en 2004 produciendo la muerte de un recién nacido en Nueva Zelanda y otro en Francia donde hubo nueve casos de infección, cuatro enfermos y dos fallecidos (Drudy y col., 2006).

1.3. Rutas de contaminación

En las secciones previas se detallaron los alimentos involucrados en ETAs, en la presente se detallaran las vías de contaminación de los alimentos por los distintos patógenos.

Las cepas de STEC son transferidas desde las heces del ganado y del tracto gastrointestinal a las carcasas durante el proceso de faena. El ganado vacuno es un reservorio de *E. coli* y la contaminación fecal puede ocurrir durante el ordeño así como después de la pasteurización. La transmisión persona a persona, por la ruta fecal-oral, es también muy importante especialmente en comunidades cerradas como guarderías, hogares de ancianos y escuelas. Menos de 10 UFC de *E. coli* O157:H7 pueden ser suficientes para causar la enfermedad en humanos. Las carnes picadas son uno de los productos de mayor riesgo. Esto se debe a que durante el picado, la bacteria pasa de la superficie de la carne al interior del producto donde es más difícil que alcance la temperatura necesaria para eliminarla durante la cocción. Pero no solamente se puede encontrar en las carnes sino también en el agua, la leche sin pasteurizar y las verduras, que pueden contaminarse por contacto con las heces de estos animales por riego con aguas servidas (Rivas y col., 2006).

La vía de infección humana más frecuente por *Campylobacter* es el consumo de carne obtenida de animales infectados. La leche no pasteurizada también constituye un vehículo frecuente de infección así como el agua no clorada. Algunos aspectos de la transmisión del microorganismo aún se desconocen, se sabe que varias especies de *Campylobacter* se encuentran como comensales en el tracto gastrointestinal de animales salvajes y domésticos. La vía de infección humana más frecuente es el consumo de

carne obtenida de animales infectados así como la leche no pasteurizada. Los animales y sus productos derivados han sido identificados de forma precisa como fuentes de infección humana en brotes de Campylobacteriosis (Franco y Williams, 1999). Los brotes de *Campylobacter* ocurren frecuentemente en instalaciones públicas como escuelas, geriátricos y hospitales (Layton, y col., 1997; Stuart y col., 1997; Brown y col., 1988) y se debe principalmente a una escasa limpieza y a contaminación cruzada durante la preparación del alimento. Las rutas más importantes de transmisión por *Campylobacter* a aves de corral comerciales no están claras. Sin embargo, un número de estudios epidemiológicos han sugerido que una desinfección inadecuada donde se ubican los pollo, la proximidad de otros animales, la temporada y fallas en la bioseguridad son factores de riesgo importantes (Bouwknegt y col., 2004).

Patógenos como *Salmonella* spp. fueron encontrados, a baja pero aún preocupante frecuencia (5,9%: 5 de 85 muestras de leche cruda), en productos lácteos elaborados con leche cruda (Addis y col., 2011). Las aves de corral y sus productos, sobre todo los huevos, son los vehículos de transmisión más importantes de *Salmonella* seguido de carnes de vaca y cerdo y de productos lácteos. Las heces de las aves infectadas pueden ser la fuente de infección de huevos para consumo humano. *Salmonella* puede penetrar a los huevos a través de fracturas en la cáscara o por los microporos, en particular cuando los huevos pierden frescura. El hombre adquiere la infección por *Salmonella* después de la ingestión de alimentos (vegetales, pescados, carnes, leche, huevos, alimentos manufacturados) o aguas contaminadas. Esta última vía de transmisión es característica de *S. Typhi* (Miller y Pegues, 2000; Graeber y col., 1995). La infección puede también transmitirse de persona a persona o por vía fecal-oral. Otras fuentes de infección pueden ser los productos manufacturados a partir de leche sin pasteurizar, la misma leche sin tratamiento térmico, las frutas y hortalizas frescas mal lavadas o contaminadas a partir de la intervención humana. La superficie de estos vegetales puede estar contaminada con *Salmonella* debido a la utilización de agua contaminada para riego o a malas prácticas agrícolas, como por ejemplo la utilización de efluentes domiciliarios o heces animales como abono. Adicionalmente, la transmisión puede variar para cada serotipo y la importancia de las distintas fuentes de infección varía para cada uno de ellos (Velilla y col., 2004).

Listeria monocytogenes es una bacteria ambiental resistente a diferentes agentes físicos, químicos y biológicos (Tasara y Stephan, 2006; Pearson y Marth, 1990). Aunque la pasteurización sea un tratamiento seguro, existe el riesgo de una

recontamination posterior especialmente en productos lácteos. Adicionalmente, el mayor peligro como fuente de contagio de *Listeria monocytogenes* para el hombre son los alimentos listos para el consumo (RTE), especialmente los que se conservan refrigerados por períodos prolongados (Doyle y col., 2001). En resumen, las rutas de contaminación pueden deberse al contacto directo con fuentes de contaminación del ambiente de la granja y a la excreción por la ubre de un animal infectado hacia la leche, que es directamente consumida por productores, empleados de las granjas y sus familias, o a través de queso elaborados con esta leche. Además, la entrada de leche cruda contaminada con *L. monocytogenes* en las plantas de procesamiento que puede llevar a la persistencia de este patógeno, con la contaminación subsiguiente de los productos lácteos procesados (Perroni, 2008). Adicionalmente, *L. monocytogenes* puede ingresar a las plantas de procesamiento por medio de la tierra en zapatos y vestimenta de obreros así como en el equipo de transporte de alimentos crudos, posteriormente estas cepas son capaces de adherirse a varios tipos de superficies como acero inoxidable, vidrio y caucho, constituyendo otra potencial fuente de contaminación de los productos lácteos (Marzocca y col., 2004).

Los humanos son el depósito natural de *S. aureus*. Esta bacteria se encuentra en la mucosa nasal y oral, además del pelo, heridas y ampollas. La contaminación de alimentos se da por fallas en la higiene personal y manipulación inadecuada de los alimentos. La intoxicación alimentaria estafilocócica se debe a enterotoxinas termoestables preformadas en el alimento (Le Loir y col., 2003), y la mastitis bovina causada por *S. aureus*, la fuente de contaminación más importante de la leche con este patógeno (Katsuda y col., 2005). Sin embargo, la contaminación post-pasteurización por los manipuladores de alimentos también se ha informado (Waldvogel, 2001).

Respecto de *Enterobacter sakazakii*, existen dos rutas por las que este patógeno puede contaminar la fórmula infantil en polvo: i) a través de una contaminación intrínseca, ya sea por ingredientes contaminados agregados después del proceso de secado o a partir del ambiente de producción después del secado y antes del envasado o ii) a través de una contaminación externa durante la reconstitución y manipulación de la fórmula. Ambas rutas de contaminación mencionadas proponen una contaminación posterior al procesamiento industrial de la fórmula debido a que *Enterobacter sakazakii* no es capaz de sobrevivir a las temperaturas de pasteurización (Nazarowec-White y Farber, 1997). Según la información disponible, en el 50-80% de los casos la fórmula infantil en polvo es tanto la fuente como el vehículo de la enfermedad inducida por

Enterobacter sakazakii y en 20-50% de los casos la fórmula es el vehículo pero la fuente de origen es la falta de higiene durante la reconstitución y manipulación.

2. *Escherichia coli*

Escherichia coli es habitante normal del tracto intestinal de los humanos y otros animales de sangre caliente. Son bacilos cortos Gram negativos, aerobios facultativos, móvil por flagelos peritricos, no forma esporas, es capaz de fermentar glucosa y lactosa, con una temperatura óptima de crecimiento de 37°C, con un rango amplio que se extiende desde temperaturas de refrigeración hasta los 45°C. Es una bacteria que presenta una gran variabilidad genética, existen variedades no patógenas que habitan el intestino de mamíferos, y variantes patogénicas capaces de producir enfermedades entéricas o distintos tipos de infecciones extra intestinales en humanos y animales. Normalmente cumple una función importante en el cuerpo, suprimiendo el crecimiento de especies dañinas de bacterias así como también sintetizando cantidades apreciables de vitaminas B y K.

Los aislamientos se diferencian en base a la estructura antigénica de su constitución polisacárida y proteica, identificando los 3 antígenos de superficie principales que permiten el serotipado: antígeno O (somáticos), H (flagelos) y K (cápsula), K); hasta el presente se identificaron 174 antígenos O, 56 H y 80 K. Adicionalmente se clasifican en 6 virotipos, descriptos en la siguiente sección 2.1., según su mecanismo de acción: *E. coli* enteropatógeno, *E. coli* enteroinvasivo, *E. coli* enterotoxigénico, *E. coli* enteroagregativo, *E. coli* de adherencia difusa y *E. coli* productor de toxina Shiga. Éstas últimas resultan las más preocupantes en Argentina y reciben esta denominación porque la toxina que producen es prácticamente idéntica a la de *Shigella dysenteriae* tipo 1.

2.1. Virotipos de *E. coli*

E. coli enteropatógena (EPEC): se definen como aquellas capaces de producir diarrea y de generar una histopatología en el epitelio intestinal denominada *lesión de adhesión y borrado* o lesión de A/E (*attachment and effacing*) e incapaces de producir toxinas Shiga (verocitotoxinas). Las cepas de EPEC típicas que causan infecciones en humanos poseen un plásmido de virulencia denominado EAF (del inglés: *EPEC*

adhesion factor) que les permite producir un pili y adherirse a las células epiteliales en un patrón característico denominado *adherencia localizada* (Nataro y Kaper, 1998). Los principales serogrupos relacionados con enfermedad son: O55, O86, O111, O119, O125, O126, O127, O128 y O142.

E. coli enterotoxigénica (ETEC): las infecciones por ETEC tienen lugar a través de dos factores de virulencia: fimbrias adhesivas y enterotoxinas (termolábil y termoestable). La colonización del epitelio intestinal del huésped es esencial para la patogénesis. Esta adherencia está mediada por estructuras proteínicas superficiales de la bacteria, conocidas como factores de colonización (Nataro y Kaper, 1998). Los serogrupos de ETEC más frecuentes son: O6, O8, O15, O20, O25, O27, O63, O78, O85, O115, O128, O148, O159 y O167.

E. coli enteroagregativa (EAEC): se definen como aquellas que no secretan enterotoxinas termolábiles ni termoestables y adhieren a células HEP-2 mediante la fimbria de adherencia agregativa I (AAF/I) en un patrón agregativo, reconocido por su auto aglutinación en forma de “ladrillos apilados”. Esta definición abarca tanto cepas patogénicas como no patogénicas, las patogénicas presentan una toxina termoestable similar a la de ETEC. Los serogrupos de EAEC más frecuentes son: O8, O15, O78 y O89.

E. coli de adherencia difusa (DAEC): se identifican por una característica forma de adherencia difuso-adherente a las líneas celulares HEP-2 que no forman microcolonias similares a EPEC. Estas bacterias cubren la superficie celular uniformemente. Las DAEC generalmente no generan toxinas termoestables o termolábiles o niveles elevados de toxinas Shiga, no poseen plásmidos del factor de adherencia de ECEP ni invaden células epiteliales. Además, el 75% de los aislamientos de DAEC presentan adhesinas miembros de la familia Dr., siendo la más frecuente la adhesina F1845 (Nataro y Kaper, 1998).

E. coli enteroinvasiva (EIEC): este grupo, junto con miembros del género *Shigella* es responsable de una enfermedad denominada disentería bacilar o shigellosis que se caracteriza por fiebre, dolores abdominales y diarrea. Estas bacterias desencadenan la enfermedad a través de la invasión de las células epiteliales del intestino grueso, se multiplican dentro de las células y diseminan célula-a-célula a través de la capa epitelial del colon sin abandonar el medio intracelular. EIEC comparte varias propiedades bioquímicas, genéticas y patogénicas con *Shigella* spp., haciéndolas prácticamente indistinguibles entre sí, ambas son lisina decarboxilasa y lactosa

negativas así como no móviles (Nataro y Kaper, 1998). Los serogrupos de EIEC más frecuentemente relacionados con la enfermedad son: O28, O29, O112, O124, O136, O143, O144, O152, O164, y O167.

E. coli enterohemorrágica (EHEC): es un subgrupo dentro de las denominadas *E. coli* productoras de toxina Shiga (STEC). Las STEC son cepas productoras de estas toxinas que llevan el nombre toxina “Shiga” porque fueron originalmente halladas en cepas de *Shigella dysenteriae*. Las EHEC, además de producir esta toxina, poseen la capacidad de producir la *lesión de adhesión y borrado*. Esta bacteria se asocia a brotes de colitis hemorrágica y es considerado el principal agente causal del SUH (Nataro y Kaper, 1998). Existen numerosos serogrupos descritos de EHEC, a saber O26, O103, O111, O113, O121 y O145 entre otros, siendo O157:H7 el principal serotipo asociado a brotes de colitis hemorrágica y SUH (Masana y col., 2010, Karmali y col., 2010).

2.2. Receptores celulares de fagos de *E. coli*

La naturaleza del receptor bacteriano varía en las diferentes bacterias e incluye proteínas sobre la superficie externa de la bacteria. Los receptores de carácter proteico comúnmente utilizados por los fagos son las porinas y proteínas de transporte y del pili, por otro lado, los fagos también utilizan receptores de naturaleza hidrocarbonada como componentes del lipopolisacárido (LPS). Estos receptores están en la bacteria para otros propósitos y los fagos han evolucionado de manera que son capaces de utilizarlos para llevar a cabo la infección.

Específicamente, los fagos relacionados a T4 utilizan múltiples receptores, uniéndose eficientemente a componentes del LPS en algunas cepas de *E. coli* y a proteínas de membrana externa como OmpA, OmpC y OmpF en otras. Otros fagos de *E. coli* como lambda (λ) reconocen al receptor de maltosa LamB ubicado en la membrana externa del hospedador, mientras que algunos utilizan proteínas como FhuA, una proteína pequeña de membrana externa involucrada en el transporte de alta afinidad de sideroforos férricos a través de la membrana externa (Kutter y col., 2005).

2.3. *E. coli* responsables de ETAs

Escherichia coli ha sido asociado consistentemente con ETAs en la mayoría de los países del mundo (Lutful Kabir, 2010). De los virotipos mencionados

anteriormente la mayoría son responsables de brotes de ETAs, sin embargo, los más frecuentes son EPEC y STEC.

Comparando entre serogrupos O157 y no-O157, en Europa las infecciones por cepas STEC no-O157 son más frecuentes, mientras que en Gran Bretaña STEC O157 aparece asociado a casos esporádicos y brotes, fundamentalmente por productos cárnicos. En Alemania, cepas del serogrupo O157 son la causa más frecuente de casos esporádicos y brotes. En EE.UU., las infecciones por *E. coli* O157:H7 continúan siendo un problema importante de salud. El CDC estimó que STEC O157:H7 causa 73.000 casos de enfermedad anuales, mientras que STEC no-O157 causa al menos 37.000 enfermos por año (Mead y Griffin, 1998). Además, *E. coli* O157:H7 representa la segunda causa de las hospitalizaciones por ETA. Respecto de Argentina, STEC O157 y no-O157 están asociados a casos esporádicos y brotes, sin embargo, O157 es el serogrupo prevalente responsable de la mayoría de los casos de ETA, seguido de O145; el resto de las STEC no-O157 son responsables de un número inferior con respecto a las dos primeras (Rivas y col., 2006).

Además de los brotes vehiculizados por lácteos y cárnicos, otras vías de transmisión de cepas de *E. coli* responsables de ETAs implican alimentos de origen vegetal como papas, lechuga, brotes de soja y alfalfa, jugos de manzana no pasteurizados, y agua (Rivas y col., 2006), algunos de éstos vehiculizados por superficies inertes debido a mala higiene y una posterior contaminación cruzada.

Brotes importantes registrados a nivel mundial implicaron a cepas de los serogrupos O157 en Estados Unidos (Wendel y col., 2009; CDC, 2006) y O104 en Alemania vehiculizados por vegetales (Rissland y col., 2013), O145 y O26 en Bélgica implicando helados fabricados con leche pasteurizada (Buvens y col., 2011), O22, O80 y O145 en Alemania y O26 en Austria a través de leche cruda (RKI, 2008; Allerberger y col., 2003; Bockemühl y col., 1990) así como se registraron brotes implicando los serogrupos O119 y O103 en Francia y O110 en Alemania por consumo de quesos manufacturados con leche cruda (Bockemühl y Karch, 1996; Decludt, 1995; Casenave y col., 1993).

3. Bacteriofagos

Los bacteriofagos o fagos son virus que infectan específicamente células del reino procariota. Cada fago posee un genoma con el cual puede dirigir la producción de

más fagos en una célula sensible. Los fagos poseen ácido nucleico (ADN o ARN) cubierto de una cápside proteica o lipoproteica. Las células diana de cada fago son un grupo específico de bacterias, que puede ser un subgrupo de una especie o varias especies relacionadas.

Los fagos, como los virus, son parásitos, y si bien llevan toda la información para dirigir su propia reproducción en un hospedador adecuado, no poseen maquinaria para generar energía ni ribosomas para sintetizar sus proteínas. Además, su alto grado de especificidad y su habilidad de reproducirse rápidamente en hospedadores apropiados contribuyen al mantenimiento de un balance dinámico entre la amplia variedad de especies bacterianas de cualquier ecosistema natural. Cuando no está presente un hospedador apropiado, muchos fagos pueden mantener su habilidad de infectar por décadas a menos de sufrir daños por agentes externos.

Respecto del tamaño de sus genomas, algunos fagos poseen solo unos miles de bases, mientras que el fago G, el más grande secuenciado a la actualidad, posee 480.000 pares de bases. Por otro lado, más del 95% de los fagos descritos a la actualidad pertenecen a los *Caudovirales* (fagos con cola). Sus viriones son, en masa, mitad de ADN doble hebra y mitad proteína, poseen cabezas icosaédricas ensambladas por muchas copias de una o dos proteínas específicas. Las cabezas están constituidas generalmente de pentámeros de proteínas y el resto de cada lado compuesto de hexámeros de la misma proteína o una similar. Las tres familias principales están definidas por sus morfologías de cola distintivas: el 60% de los fagos caracterizados son *Siphoviridae*, con colas largas, flexibles y no contráctiles; 25% son *Myoviridae* con colas contráctiles, un tubo central y una vaina; y un 15% son *Podoviridae* con colas cortas, anchas y no contráctiles (Guttman y col., 2005).

3.1. Estructura de fagos de *E. coli*

En la Figura 1 se detallan las estructuras básicas que componen un bacteriofago. La *cabeza* (o *Cápside*) está compuesta de una o más proteínas o lipoproteínas en disposición icosaédrica. Su función principal es la de resguardar el material genético del fago. El *cuello* (o *collar*) posee una estructura que puede ser rígida o flexible y une la cápside a la *cola*, un tubo proteico hueco de longitud variable a través del cual el ácido nucleico pasa durante la inyección en la célula diana. En los fagos más complejos como T4, la *cola* se rodea de un tubo externo contráctil denominado *vaina*.

Al extremo de la cola se encuentra la *placa basal*, una estructura compleja adicional que puede o no estar presente y que junto a las *fibras de la cola* tienen por función el anclaje del fago a la célula hospedadora, además, puede presentar una o más fibras unidas a ella llamadas *espículas* para contribuir a la unión (Ackermann, 2009).

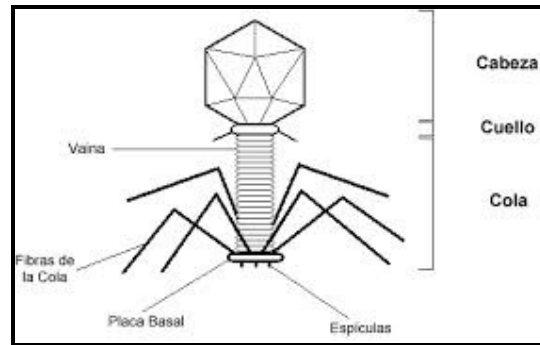


Figura 1. Estructuras básicas de los bacteriófagos de *E. coli*.

Actualmente están descritas trece familias de fagos que se clasifican de acuerdo a la naturaleza de su genoma y a sus características morfológicas. En la Figura 2 se muestran todos los morfotipos y características básicas de las diferentes familias de fagos.

Morfotipo	Forma	Acido nucleico	Familia	Particularidades
A1 a A3	Fagos con cola	ADN dc, L	<i>Myoviridae</i>	Cola contráctil
B1 a B3			<i>Siphoviridae</i>	Cola larga, no contráctil
C1 a C3			<i>Podoviridae</i>	Cola corta
D1	Fagos poliédricos	ADN sc, C	<i>Microviridae</i>	Capsómeros sobresalientes
D3		ADN dc, C, S	<i>Corticoviridae</i>	Cápside compleja, lípidos
D4		ADN dc, L	<i>Tectiviridae</i>	Vesícula lipídica, pseudocola
E1		ARN sc, L	<i>Leviviridae</i>	Cubierta lipídica
E2		ARN dc, L, seg.	<i>Cystoviridae</i>	Cubierta lipídica
F1	Fagos filamentosos	ADN sc, C	<i>Inoviridae</i>	a- filamentos largos b- bastones cortos
F2				
F3		ADN dc, L	<i>Lipothrixviridae</i>	Cubierta lipídica
F4		ADN dc, L	<i>Rudiviridae</i>	Similar al virus del mosaico del tabaco
G1	Fagos pleomórficos	ADN dc, C, S	<i>Plasmaviridae</i>	Cubierta lipídica, sin cápside
G2		ADN dc, C, S	<i>Fuselloviridae</i>	Cubierta lipídica, sin cápside, en forma de limón

Este diagrama ilustra los morfotipos de bacteriófagos. Incluye: A1, B1, C1 (fagos con cola); A2, B2, C2 (fagos poliédricos); A3, B3, C3 (fagos poliédricos con cola); D1, D2, D3, D4 (fagos poliédricos); E1, E2 (fagos poliédricos con cubierta lipídica); F1, F2, F3, F4 (fagos filamentosos); G1, G2 (fagos pleomórficos).

Figura 2. Morfotipos y características básicas de las diferentes familias de fagos. Sc: simple cadena, dc: doble cadena, C: circular, S: superhelicoidal, L: lineal, seg.: segmentado (Ackermann, 2001).

3.2. Organización molecular de genomas fágicos

Respecto de la organización molecular de fagos líticos como los del grupo T, el ejemplo más estudiado es el fago T4, un virus con ADN bicatenario y lineal que mide 169 kb y puede codificar hasta 289 clases de proteínas. Los genes básicos necesarios para la propagación de un fago lítico se muestran en la Figura 3.

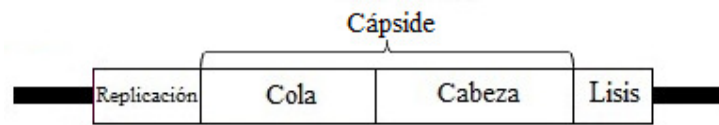


Figura 3. Representación esquemática de la organización genética de un fago lítico.

Por otra parte, fagos lisogénicos como lambda (λ) presentan genes codificando enzimas de recombinación junto a sistemas de represión y antiterminación de su expresión génica para su integración o no al cromosoma bacteriano (Figura 4).

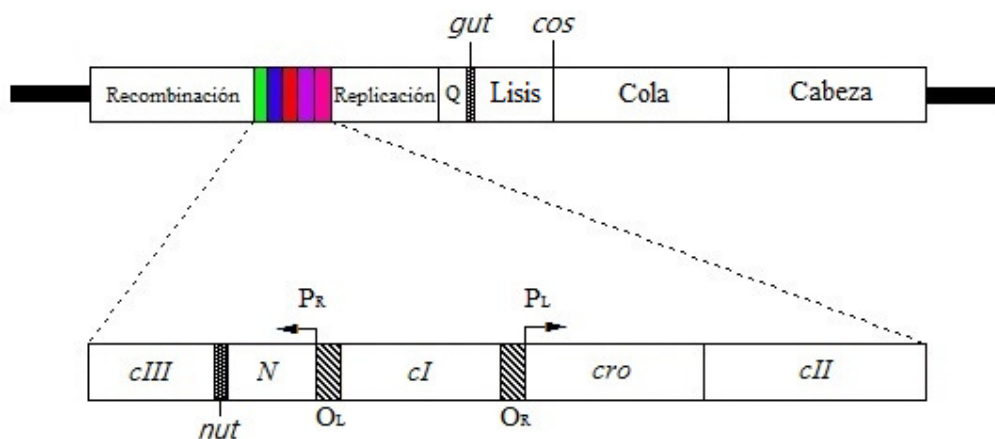


Figura 4. Representación esquemática de la organización genética de un fago lisogénico (fago lambda, λ).

3.2.1. Secuencia temporal de expresión fágica

Los fagos líticos presentan patrones de expresión temporal pudiéndose diferenciar y agrupar genes en:

Genes tempranos: son aquellos que participan en el comienzo de la expresión fágica.

Genes tempranos demorados: están involucrados en la degradación del ADN bacteriano y en suministrar presurores para la replicación del ADN. Además presentan funciones reguladoras.

Genes intermedios: otras enzimas para la replicación y recombinación del ADN. También presentan funciones reguladoras.

Genes tardíos: son los genes involucrados en el ensamblado del virión, a saber genes de la cola y la cabeza entre otros, así como los responsables de producir la lisis bacteriana.

El uso de estos controles sucesivos ya sea por antiterminadores, activadores y/o factores sigma, en los que cada serie de genes contiene un regulador necesario para la expresión de la siguiente batería de genes, crea una cascada en la que en un momento determinado se conectan o desconectan grupos de genes. Distintos fagos tienen distintos medios para crear la cascada llevando a una expresión regulada de los genes fágicos.

Adicionalmente, en fagos lisogénicos previo a la expresión de este patrón temporal de genes debe establecerse el ciclo lítico mediante la competencia entre antiterminadores y represores que intervienen en la regulación del ciclo lítico/lisogénico (ver sección 3.6).

3.2.2. Factores de patogenicidad

Los factores de virulencia codificados por bacteriofagos mejor caracterizados son toxinas extracelulares expresadas en bacterias como *E. coli* y *Shigella* spp., entre otras. Además, los bacteriofagos también codifican genes responsables de la unión al hospedador, invasión celular y supervivencia intracelular (Tabla 1) (Boyd, 2005).

En cepas EHEC y STEC, las toxinas Shiga (Stx1 y Stx2) y la enterohemolisina (Hly) están codificadas por diversos fagos del tipo lambda, encontrándose hasta siete tipos diferentes de fagos codificantes de *stx2* (Wagner y col., 1999) y las proteínas Bor

y Lom, responsables de la resistencia al suero y de la adhesión celular, respectivamente, un factor de colonización intestinal y resistencia a telurito (Boyd, 2005).

Tabla 1. Factores de patogenicidad codificados por fagos específicos de *E. coli*.

Hospedador	Fago	Factor de virulencia	Función
<i>E. coli</i>	λ	Proteína de membrana externa (<i>lom</i>)	Unión al hospedador
<i>E. coli</i>		Proteína de membrana externa (<i>bor</i>)	Supervivencia intracelular
<i>E. coli</i> O157:H7	λ -like	Proteína de membrana externa (<i>eib</i>)	
<i>E. coli</i>	Sp4, Sp10	Superoxido dismutasa (<i>sodC</i>)	Toxina extracelular
<i>E. coli</i>	H-19B	Shiga toxinas (<i>stx1</i> y <i>stx2</i>)	
<i>E. coli</i>	Φ FC3208	Enterohemolisina (<i>hly</i>)	

3.2.3. Resultados previos del grupo de trabajo

En estudios previos de nuestro grupo de investigación (Migliore, 2011), en donde se determinó la pertenencia de los fagos obtenidos a la familia T4, se utilizó un protocolo de PCR, buscando amplificar el gen codificante de una proteína de la cápside presente en todos los fagos T4, el gen *gp23*. Todos los productos de PCR de los bacteriofagos analizados en este punto, corrieron como una banda comparable al peso molecular del producto del gen *gp23*. La posterior secuenciación del fragmento amplificado por PCR arrojó un tamaño de 824 pb con una homología del 98% frente al fragmento interno de 788 pb correspondiente al gen *gp23* del bacteriofago CEV1, el cual está relacionado filogenéticamente con los T4 (95% de homología) (Figura 5).

Por esto, la secuenciación parcial del fago LM4, demostró que, basados en la morfología y en la secuencia de un fragmento de ADN amplificado por PCR correspondiente al gen *gp23*, el fago LM4 está estrechamente relacionado con el

bacteriofago CEV1 (Nº de acceso GenBank AY331985), el cual pertenece a la familia filogenética de los fagos tipo-T4 (Raya y col., 2006).

LM4	31	ATCTGGAACAACAG-A-NATTTAAAGCTTTCACCGGCCCAACGAGCACCNCNNNTATCAA	88
CEV1	26	ATCTGGAACAACAGAAGAATTTAAAGCTTTCACCGGCCCAACGAGCACCACGGATATCAA	85
LM4	89	TCGGGTCCTGGAAGTCAAATACACCAGCTTTAGAACCCAGGAGTCAGGGTCATACCAGATT	148
CEV1	86	TCGGGTCCTGGAAGTCAAATACACCAGCTTTAGAACCCGGAGTCAGGGTCATACCAGATT	145
LM4	149	TACCGACCTGTGCTGAGTAGTTAATCCAATCAACAACCTTCACGGTTGATTTCTAGCATAA	208
CEV1	146	TACCAACCTGTGCTGAGTAGTTAATCCAACCAACAACCTTCACGGTTGATTTCTAGCATAA	205
LM4	209	TTTCTGTAGCCAGAATACCGCTCAGTTCAGCATCAGCATCCATACCGTGTACTGCACGGA	268
CEV1	206	TTTCTGTAGCCAGAATACCGCTCAGTTCAGCATCAGCATCCATACCGTGTACTGCACGGA	265
LM4	269	GGTCTTGTGCTAATTCGATAGAGTAAGCAGCTTTTCAGCTGGCGAGATTTAGCTTCGATAA	328
CEV1	266	GGTCTTGTGCTAATTCGATAGAGTAAGCAGCTTTTCAGCTGGCGAGATTTAGCTTCGATAA	325
LM4	329	CTTGTTTATCGATACGGAAGCCATTTTCATTCCATGGGTTATCGGTAGAACCCTTGAAAC	388
CEV1	326	CTTGTTTATCGATACGGAAGCCATTTTCATTCCATGGGTTATCGGTAGAACCCTTGAAAC	385
LM4	389	CTTCTGGAGTTCAGCGATAGAAGTAGCCATACCTTCAGCGATTTCTACCAGTGCACCAG	448
CEV1	386	CTTCTGGAGTTCAGCGATAGAAGTAGCCATACCTTCAGCGATTTCTACCAGTGCACCAG	445
LM4	449	CTTCCATTTGTTTCTTAACTTCTGCATCTAATTTAGCTGCATCAGTTGCACCAGAATCAA	508
CEV1	446	CTTCCATTTGTTTCTTAACTTCTGCATCTAATTTAGCTGCATCAGTTGCACCAGAATCAA	505
LM4	509	GTGTTACGACAGCAGAAGCTTGCAGATATACAGTACCAGTTTCTTGGGAAGAAGTGAGTAT	568
CEV1	506	GTGTTACGACAGCAGAAGCTTGCAGATATACAGTACCAGTTTCTTGGGAAGAAGTGAGTAT	565
LM4	569	AGATATCACCTACAACAGTAGTAGTGTGTCAGCAGCCAGAGCTGGGAATTTCTTAGCAGCAC	628
CEV1	566	AGATATCACCTACAACAGTAGTAGTGTGTCAGCAGCCAGAGCTGGGAATTTCTTAGCAGCAC	625
LM4	629	CCTGACCAGAGAACATCGCGTCTGGGGCATAACATCGGATGGAAAGCTTCTTTAGCGCCAG	688
CEV1	626	CCTGACCAGAGAACATCGCGTCCGGGGCATAACATCGGATGGAAAGCTTCTTTAGCGCCAG	685
LM4	689	CAGCGATAGGGTCTTTACCATATACTGCACGGAGAGCAAATACCTGACCGGTCGGGCTGT	748
CEV1	686	CAGCGATAGGGTCTTTACCATATACTGCACGGAGAGCAAATACCTGACCGGTCGGGCTGT	745
LM4	749	TCATAGGCTGAACACCACAAATATCAAAAGCGATCAGATTAGGA	792
CEV1	746	TCATAGGCTGAACACCACAAATATCAAAAGCAATCAGAT-AGGA	788

Figura 5. Secuencia nucleotídica del gen *gp23* del bacteriofago LM4 alineada con la del bacteriofago CEV1.

3.3. Ciclos de vida de los bacteriofagos

La estrategia de los bacteriofagos para multiplicarse en la bacteria hospedadora puede darse a través de dos ciclos, el ciclo lítico y el lisogénico (Figura 6).

Durante un ciclo lítico, el fago se adsorbe, inyecta su ADN y se replica en el interior de la bacteria hospedadora. Finalmente, el fago produce la lisis del hospedador y se libera la progenie fágica.

Durante un ciclo lisogénico, el fago se adsorbe, inyecta su ADN pero no se replica activamente en el interior del hospedador sino que se integra al cromosoma bacteriano replicándose con cada ciclo celular, por lo que no se produce liberación de progenie fágica y el hospedador permanece viable.

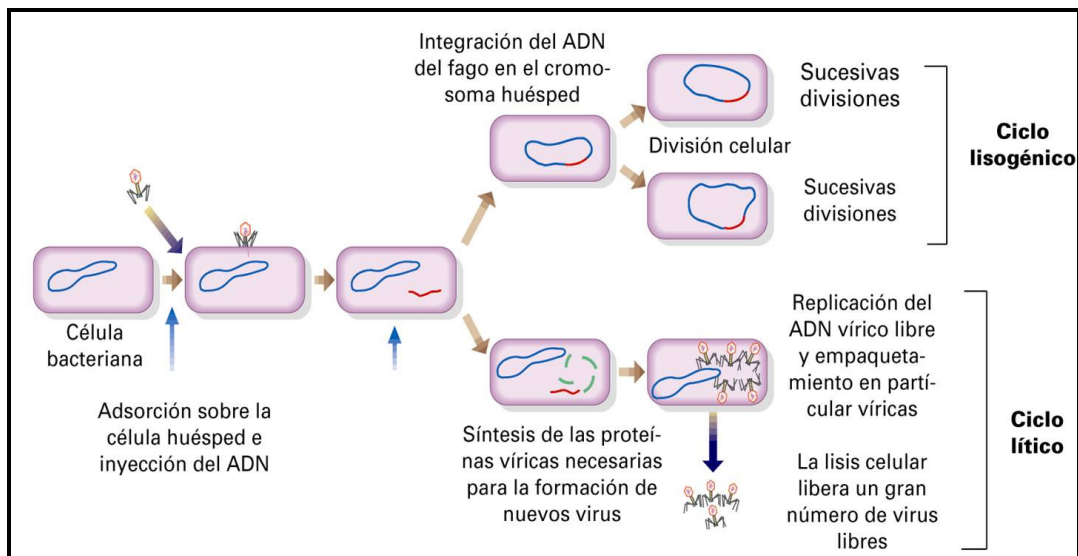


Figura 6. Esquema representativo de los ciclos lítico y lisogénico.

3.4. Ciclo de vida lítico

El ciclo lítico de los bacteriofagos en bacterias Gram negativas está compuesto de las siguientes etapas (Guttman y col., 2005):

Adsorción: Es el proceso en el cual se unen las fibras de la cola del fago a moléculas de receptor primario para disparar rearrreglos en los componentes de la placa basal, posteriormente otra proteína de la cola se une irreversiblemente a un receptor secundario. Los diferentes fagos se unen a distintos receptores, generalmente una

proteína de membrana externa como receptor primario seguido de un residuo de heptosa del núcleo interno del lipopolisacárido.

Inyección del ADN: Después de la unión irreversible del fago a la célula diana se inyecta el ADN fágico a través de la cola hacia adentro de la célula hospedadora. Una dentro de la célula, muchos ADN fágicos se circularizan, para evitar ser sustrato de exonucleasas, por medio de extremos cohesivos o tienen sus extremos lineales protegidos.

Replicación: Es el proceso en donde se sintetiza nuevo ADN fágico. Para esto se produce una detención de la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas del hospedador así como comienza a degradarse su genoma. Por los eventos mencionados, el fago toma el control de la maquinaria metabólica del hospedador, sintetizando sus ácidos nucleicos y proteínas.

Ensamblado de los viriones: Una vez sintetizados todos los bloques que componen el fago, a saber ADN, proteínas de la cabeza (icosaédricas) y de la cola así como fibras y las proteínas que componen la placa basal, se ensamblan las proteínas estructurales y el ADN sintetizado *de novo* se empaca en forma condensada en las cabezas mediante un proceso que presenta tanto regulación tanto en *cis* como en *trans*. Finalmente, la cola se une a la cabeza para dar lugar al virion fágico completo.

Lisis: Es el paso final del ciclo lítico y es un evento rápido cuya sincronización está altamente controlado. En este proceso intervienen enzimas llamadas endolisinas, una enzima capaz de romper las moléculas de peptidoglicano bacteriano, y holinas cuya función es ensamblar poros en la membrana plasmática para el pasaje de los endolisinas. El resultado final de la acción de estas enzimas es la liberación de partículas fágicas maduras que tienen la capacidad de infectar nuevas células hospedadoras para comenzar un nuevo ciclo de lisis. El número de partículas fágicas liberadas por cada bacteria infectada constituye el número de eclosión, mientras que el tiempo que demora en emerger un virion *de novo* es el tiempo de eclosión.

3.5. Ciclo de vida lisogénico

En el ciclo lisogénico de los bacteriofagos la *adsorción e inyección del ADN* transcurren de la misma manera que en el ciclo lítico. A continuación se dan las siguientes etapas:

Integración del ADN fágico al cromosoma bacteriano de forma reversible: A la penetración del DNA le sigue la expresión de los genes tempranos, entre ellos los que codifican el represor del ciclo lítico y la integrasa. Estos dos genes son necesarios para impedir la producción de nuevos viriones y para que el DNA fágico se incorpore al cromosoma de la célula hospedadora mediante un mecanismo de recombinación sitio - específica. En este estado de latencia, que se denomina profago, va a permanecer hasta que alguna señal medioambiental dispare la expresión de los genes líticos. El profago se transmite de forma pasiva a las células de la progenie conjuntamente con el genoma del hospedador y les confiere resistencia a la infección por parte del mismo fago o de fagos relacionados. Esta propiedad se denomina inmunidad a la superinfección y está basada en la capacidad del represor del ciclo lítico, responsable del mantenimiento del estado de profago, de actuar en *trans* sobre los genomas fágicos entrantes en la célula.

3.6. Regulación ciclo lítico/lisogénico

El mecanismo por el cual se toma la decisión molecular entre el ciclo lítico o el lisogénico ha sido descrito con detalle en el fago λ (Little, 2006) (Figura 7). El proceso de lisogenia está gobernado por una proteína represora, a saber CI. Este represor se une a un conjunto de promotores en el estado lisogénico y reprime la expresión de todos los genes con excepción de su propio gen. Además, el represor CI compite con otra proteína llamada Cro la que promueve el ciclo lítico. La transición hacia la lisogenia en el fago λ también es promovida por otras dos proteínas, CII y CIII, las que se unen a promotores críticos y estimulan la transcripción del gen *cI* y otros. La estabilidad de CII está determinada por factores que miden el nivel energético de la célula. Una célula con suficiente energía posee poco AMPc, una con poca energía tiene una alta concentración de AMPc. Una alta concentración de AMPc promueve la estabilización de CII y por lo tanto la lisogenia. Por esto, cuando un fago entra a una nueva célula censa si hay suficiente energía para producir un número elevado de fagos, de otra manera su mejor estrategia será entrar en el estado de profago para sobrevivir. La Figura 7 muestra los genes así como los promotores esenciales involucrados en el ciclo lítico y lisogénico del fago lambda (λ).

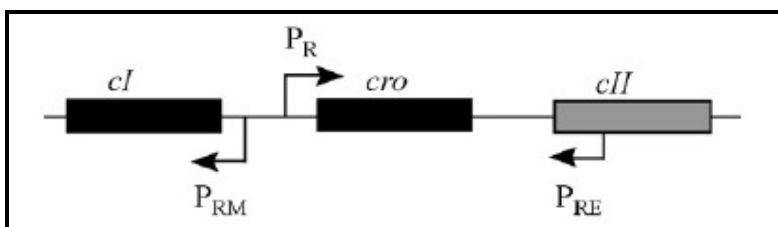


Figura 7. Esquema de la organización de los genes y promotores involucrados en los ciclos lítico y lisogénico del fago lambda (λ). Imagen obtenida del libro “Bacteriophages, biology and applications” (Guttman y col., 2005).

4. Utilización de fagos como herramienta de biocontrol de *E. coli*

En Occidente existe escasa experiencia y desarrollo sobre el uso de bacteriofagos para la prevención y el tratamiento de enfermedades infecciosas. Los bacteriofagos pueden ser considerados como los enemigos naturales de las bacterias, y por lo tanto son candidatos lógicos para ser evaluados como agentes de control de patógenos bacterianos como las cepas nocivas de *Escherichia coli* en productos alimenticios. El potencial terapéutico de los bacteriofagos ha sido explorado desde que éstos fueron descubiertos por Félix d’Herelle. Los primeros ensayos de terapia fágica fueron con frecuencia exitosos, usualmente seguidos de una recuperación rápida y completa de infecciones bacterianas, potencialmente fatales, luego de la administración del bacteriofago. Subsecuentes resultados inconsistentes, debido principalmente al pobre entendimiento de la biología básica de los bacteriofagos, la falta de control de calidad y la ausencia de estudios apropiadamente controlados llevaron a la pérdida de credibilidad en el uso de bacteriofagos como agentes terapéuticos. Esto, junto con el descubrimiento de los antibióticos, llevó a una pérdida de interés en la terapia fágica en Occidente (una tendencia revertida en los últimos años), aunque fue usada rutinariamente en la Unión Soviética (Petty y col., 2007).

Respecto de su potencial aplicación en el biocontrol de patógenos contaminantes de alimentos, debería considerarse que éstos son las unidades autorreplicantes más abundantes en nuestro medio ambiente y están presentes en números significativos en el agua y alimentos (Sulakvelidze y Barrow, 2005). En carnes frescas y otros productos cárnicos se pueden detectar, en algunos casos, más de 10^8 bacteriofagos viables por gramo (Kennedy y Bitton, 1987), por lo que es un hecho que son consumidos

cotidianamente con nuestros alimentos en una gran cantidad. Además, la cavidad oral humana (Hitch y col., 2004; Bachrach y col., 2003) y la materia fecal (Breitbart y col., 2003) contienen bacteriofagos, los cuales son especialmente abundantes en el aparato gastrointestinal (Breitbart y col., 2003; Furuse, 1987). Asimismo, la especificidad de bacteriofagos virulentos por el antígeno O de las cepas de *Escherichia coli* puede ser una característica favorable para el control de éstas en el medio ambiente y permite aplicar o mezclar el bacteriofago directamente sobre o dentro de un producto lácteo o cárnico sin comprometer la calidad de éste, la salud o la viabilidad de la flora normal intestinal.

El potencial de los bacteriofagos para el control de patógenos contaminantes de alimentos se ve reflejado en estudios recientes involucrando a distintos patógenos como *Campylobacter jejuni* (Atterbury y col., 2003), *Escherichia coli* O157:H7 (O'Flynn y col., 2004) y *Listeria monocytogenes* (Leverentz y col., 2003; Dykes y Moorhead, 2002), entre otros.

El uso de bacteriofagos como método preventivo podría controlar las cepas STEC en los productos lácteos y cárnicos y proveería una mayor seguridad en la práctica de producción. El desarrollo y aplicación de esta tecnología permitiría desarrollar una industria alimenticia regional con productos más seguros, lo que brindaría una garantía adicional de inocuidad al consumidor.

4.1. Ventajas y desventajas del uso de fagos

Los fagos son entidades naturales inagotables, su aislamiento es fácil y menos costoso que el desarrollo de nuevos medicamentos como los antibióticos. Por otra parte, mientras que estos últimos pueden volverse ineficaces debido a la resistencia bacteriana, los fagos no lo hacen, ya que evolucionan constantemente y se puede adaptar *in situ* para reinfectar bacterias resistentes. Además, pueden utilizarse como cócteles para minimizar la resistencia. Si bien el uso de fagos para mejorar la inocuidad de los alimentos es una alternativa prometedora y amigable con el medio ambiente, tiene ventajas y desventajas.

- Ventajas

a) Son altamente específicos: debido a las interacciones receptor-ligando, los fagos poseen una alta especificidad de hospedador afectando solamente bacterias diana. Por

otro lado, no cruzan barreras de especie o género. Esto es especialmente importante para alimentos de consumo humano, debido a que es poco probable que los fagos alteren el equilibrio normal de la microflora del tracto gastrointestinal. Bruttin y Brüssow (2005) administraron fagos T4 de *Escherichia coli* oralmente a voluntarios y no observaron efectos adversos, concluyendo que los fagos empleados en el estudio son seguros para el consumo humano.

b) Los fagos se autoperpetúan: en presencia de un hospedador susceptible, los fagos se replicarán e infectarán otras células en crecimiento activo, mostrando una respuesta de autoamplificación.

c) Son autolimitados: en ausencia de un hospedador susceptible no se replicarán, como necesitan un huésped para hacerlo solo persistirán mientras que un huésped sensible este presente.

d) No afectan células eucariotas: no hay evidencia que estos virus representen una amenaza a células eucariotas (Barrow y Soothill, 1997).

e) No afectan la calidad del alimento: están presentes y son consumidos rutinariamente con nuestros alimentos y el agua, además es más probable que los fagos contribuyan a equilibrar el crecimiento de microorganismos deteriorantes. Sin embargo, la información respecto de cambios indeseados en las propiedades organolépticas es escasa, y no hay reportes de cambios negativos producidos por la adición de fagos a alimentos (Greer, 1986).

f) Los fagos son entidades naturales, ubicuas y abundantes: son los enemigos naturales de las bacterias así como las entidades más abundantes en el planeta (aprox. 10^{32} fagos), distribuidos entre todos los ambientes tales como suelo, agua, alimentos, etc. (Rohwer y Edwards, 2002).

g) Son fáciles de aislar y propagar: se pueden aislar fácilmente de los alimentos o el agua y se propagan en su huésped, generalmente produciendo títulos relativamente altos (10^9 UFP/ml) a muy bajo costo.

- Desventajas

a) Aceptación del consumidor: el obstáculo principal a superar para la utilización de fagos para mejorar la inocuidad de los alimentos puede ser la aceptación por parte de los consumidores, no obstante, al proporcionarles información correcta, esta nueva tecnología sería eventualmente aceptada.

b) Mutaciones: en general, las mutaciones espontáneas son deletereas para las bacterias, sin embargo en algunos casos pueden generar ventajas transitorias mientras que el fago este presente.

- Mutación a fago temperado: una conversión lisogénica puede ocurrir donde se inserta el ADN fágico en el cromosoma bacteriano, en este caso las células ya no son sensibles al ataque por fagos. Por otra parte, esto puede dar lugar a la expresión de los genes del fago generando características indeseables.

- Mutación a mutante insensible a bacteriofago (BIM): la pérdida de sensibilidad producida por una mutación bacteriana puede resultar en una selección debido a la infección fágica y eliminación de las bacterias sensibles llevando a un recrecimiento del clon insensible.

c) Entendimiento limitado de las interacciones fago-bacteria: los fagos y bacterias co-evolucionaron por lo que deben coexistir, si un fago mata todas las células huéspedes susceptibles, ya no podría replicarse. En consecuencia, estos requieren un umbral bacteriano para poder hacerlo, a saber aproximadamente de 10^3 a 10^5 UFC/ml, y matar efectivamente las células blanco (Wiggins y Alexander, 1985). Actualmente, los mecanismos subyacentes que regular este equilibrio son desconocidos, y su plena comprensión permitiría obtener mejores fagos para el biocontrol de patógenos.

d) Transducción: si bien los fagos utilizados para este propósito deben ser estrictamente líticos, la transducción es un tema que debe abordarse, ya que lo que realmente puede ocurrir en los alimentos o después de su consumo no se conoce por completo.

e) Rango de hospedador limitado: un único fago no es capaz de matar todas las cepas patógenas que pueden estar potencialmente presentes en los alimentos, sin embargo, el uso de una mezcla de diferentes fagos, o cóctel fágico, puede ampliar la gama de hospedadores y por lo tanto mejorar el potencial del tratamiento (Barrow y Soothill, 1997).

f) Difusión limitada en alimentos sólidos: los fagos no son fácilmente difusibles en alimentos sólidos tales como carne debido a la intrincada red de proteínas y fibras. Sin embargo, varios estudios realizados en estas matrices están de acuerdo en que este inconveniente puede evitarse mediante la adición de una mayor cantidad de fagos, a saber al menos 10^8 UFP/ml.

4.2. Biocontrol en alimentos cárnicos

Actualmente se aplican varias estrategias para preservar alimentos perecederos así como para extender su vida útil. Sin embargo, los procesos físicos y los compuestos químicos (conservantes) utilizados para este propósito pueden alterar las propiedades organolépticas de la carne. A la actualidad no hay reportes de su utilización industrial para mejorar la inocuidad alimentaria, aun cuando esta tecnología “nueva, ecológica y específica” puede ser más económica que las tradicionales, dado que los fagos pueden ser aislados fácilmente del ambiente y son entidades autorreplicantes. Por otro lado, su inclusión en un producto cárnico puede ser vista como un enfoque menos agresivo.

Un gran número de estudios se han realizado para evaluar el biocontrol de patógenos bacterianos sobre superficies de productos cárnicos utilizando fagos específicos de cepas de *E. coli* (Abuladze y col., 2008; O’Flynn y col., 2004), *Campylobacter jejuni* y *Salmonella entérica* (Bigwood y col., 2008) y *Listeria monocytogenes* (Guenther y col., 2009; Holck y Berg, 2009; Dykes y Moorehead, 2002). Si bien la mayoría de los estudios presentan resultados alentadores respecto de la utilización de esta tecnología, todavía se necesitan más datos empíricos y una mejor comprensión de las interacciones fago-huésped que tienen lugar en la matriz cárnica.

4.3. Biocontrol en alimentos lácteos

De la misma manera que en la industria cárnica, en las lácteas se utilizan métodos de conservación físicos y químicos con los mismos efectos indeseables. Por esto, los bacteriofagos constituirían un método de biocontrol tanto más ecológico como menos invasivo.

Los estudios realizados hasta la fecha para evaluar el biocontrol en productos lácteos utilizando fagos específicos han hecho hincapié especialmente en bacterias patógenas como *Staphylococcus aureus* (Bueno y col., 2012; Obeso y col., 2010; Garcia y col., 2007). Además, también se han llevado a cabo ensayos en cepas de *E. coli* (Moradpour y col., 2009), *Enterobacter sakazakii* (Zuber y col., 2008; Kim y col., 2007), *Salmonella enteritidis* (Modi y col., 2001), *Salmonella* Typhimurium (Guenther y col., 2012) y *Listeria monocytogenes* (Carlton y col., 2005). Por otro lado, a pesar del número creciente de investigaciones con esta tecnología, es necesario encontrar las

condiciones óptimas de biocontrol para cada sistema alimento/fago/bacteria particular para asegurar la inocuidad alimentaria.

5. Fagorresistencia

Las cepas poseen o adquieren mecanismos de resistencia naturales frente a fagos para asegurar su supervivencia. Estos mecanismos están muy estudiados y pueden estar codificados tanto en plásmidos como en el cromosoma, sin embargo, la mayoría se encuentra codificado a nivel cromosómico.

Los mecanismos naturales de fagorresistencia pueden ser por bloqueo de adsorción, donde puede existir una reducción o completa ausencia de los receptores fágicos (Quiberoni y col., 2011), enmascarar al receptor o por producción de inhibidores competitivos (Labrie y col., 2010). Otros mecanismos naturales son la inhibición de la inyección del ADN fágico donde el fago es capaz de adsorberse sobre la superficie celular pero luego la etapa de inyección del ADN no se concreta; el sistema de restricción/modificación (R/M) donde, luego de producirse la adsorción e inyección del ADN, el ADN viral es reconocido intracelularmente y es degradado por sistemas enzimáticos; y por últimos la infección abortiva, mecanismo caracterizado por un normal desempeño de las primeras etapas de la infección seguida por una interrupción del ciclo de multiplicación fágica. Todos estos mecanismos son de codificación cromosomal o plasmidial, por lo que producen proteínas que intervienen en el proceso de resistencia.

Las estrategias que se plantearán a continuación para disminuir la incidencia de fagorresistencia están dirigidas específicamente a aquellas que no están codificadas a nivel cromosomal o por plásmidos, sino a las adquiridas por eventos de mutaciones puntuales que confirieron a la bacteria una resistencia o insensibilidad temporaria.

5.1. Estrategias para disminuir la incidencia de fagorresistencia

La experiencia internacional demuestra que la combinación de bacteriofagos en un cóctel aumenta la eficiencia de biocontrol de cepas de STEC en alimentos, pudiendo ser éste utilizado en diversas formulaciones y formas de aplicación (soluciones, geles, spray) tanto sobre los alimentos en sí, como sobre las diferentes maquinarias y herramientas que se usan en el procesamiento de los alimentos (Holck y Berg, 2009;

Abuladze y col., 2008; O'Flynn y col., 2004). El empleo de distintos bacteriofagos en un cóctel contribuiría a disminuir la resistencia o aparición de mutantes insensibles a bacteriofagos (BIM). El razonamiento detrás de esta metodología es la siguiente: fagos diferentes en un dado cóctel (fago¹, fago²,..., fago^N) se unen a receptores distintos (R¹, R²,..., R^N) en la misma especie bacteriana; las mutaciones que generan BIMs para el fago^{1-R1} no deberían afectar la sensibilidad bacteriana para el fago^{2-R2, 3-R3,...,N-RN}, mientras que los BIMs del fago^{2-R2} todavía deberían ser sensibles al fago^{1-R1, 3-R3,...,N-RN}, y así sucesivamente. Esta estrategia permitiría evitar la aparición de clones insensibles a los fagos y su posterior desarrollo.

6. Situación actual del biocontrol mediante fagos

Actualmente la tendencia a nivel mundial es el desarrollo de cócteles fágicos comerciales para ser empleados en inocuidad alimentaria contra los patógenos más importantes responsables de ETAs. Por otro lado, se está avanzando en los problemas y desventajas que representa la utilización de virus bacterianos así como sobre la regulación para su implementación como aditivos alimentarios.

6.1. Productos fágicos comerciales

Actualmente existen cócteles fágicos aprobados por la FDA (Food and Drug Administration) para ser utilizados como aditivos en comestibles para el biocontrol de patógenos. Por ejemplo, el cóctel LISTEX P100 desarrollado por la compañía EBI Food Safety (www.ebifoodsafety.com), compuesto de seis bacteriofagos purificados individualmente, es efectivo contra *Listeria monocytogenes* en productos listos para el consumo y es el primer producto a base de bacteriofagos que recibió el estado de GRAS (Generally Recognised as Safe) por la FDA (USA). Los estudios de toxicidad oral de LISTEX P100 realizados en ratas revelaron que no se produjeron cambios histológicos anormales, morbilidad o mortalidad, por lo que los autores concluyeron que no se encontraron indicios de riesgos potenciales asociados al uso de P100 como aditivo en productos comestibles (Carlton y col., 2005). Asimismo, en otro estudio en voluntarios, tampoco se reportaron efectos adversos relacionados a la aplicación de bacteriofagos específicos de *Escherichia coli*, demostrando ser seguros para su administración oral en humanos (Bruttin y Brussow, 2005). Otro ejemplo lo constituye el producto a base de

bacteriofagos denominado EcoShield™ desarrollado por Intralytix, una empresa biotecnológica norteamericana, que consiste en un spray anti-*Escherichia coli* O157:H7 altamente específico para esta cepa. Intralytix, Inc. también recibió la aprobación de la FDA para la utilización de una preparación a base de bacteriofagos, a saber ListShield (seis bacteriofagos de origen natural aislados del ambiente), como aditivo alimentario para el biocontrol de *Listeria monocytogenes* que puede ser utilizado en alimentos listos para el consumo (RTE).

Actualmente varias compañías de Estados Unidos están involucradas en el desarrollo de cócteles fágicos, por ejemplo, Exponential Biotherapies (www.expobio.com); Gangagen (www.gangagen.com); Intralytix y Omnilytics (www.phage.com). Además, seis compañías están desarrollando esta tecnología en otros países tales como Phage Biotech (Israel) (www.phage-biotech.com); Hexal Genentech (Alemania) (www.hexal-gentech.com); Novolytics (Reino Unido) (www.novolytics.co.uk); Biophage (Canada) (www.biophagepharma.net); Biopharm Pharmaceuticals (Georgia) (www.biopharmservices.com); y EBI Food Safety (Holanda).

6.2. Problemas y desventajas a superar

El uso de fagos para garantizar la inocuidad alimentaria es una tecnología desarrollada durante los últimos años, y su aplicación ha sido demorada por dos razones principales. Por un lado, además de más ensayos de biocontrol y de viabilidad fágica en alimentos diferentes, es necesario ensayar condiciones de procesamiento de alimentos más realistas. Por otro lado, todavía hay una falta de un marco regulatorio en la mayoría de los países, impidiendo así la aplicación de esta tecnología.

Además de la necesidad de tener un mayor volumen de datos empíricos sobre la interacción fago-huésped involucrando cada matriz alimenticia, la aceptación del consumidor representa el mayor obstáculo debido al concepto de la población sobre “virus comestibles”.

A tall, slender, ornate metal monument or sculpture stands on a grassy hill. The monument has a long, thin central shaft topped with a pointed, flame-like or leaf-like finial. Below the shaft, there are several horizontal bars and vertical supports, suggesting a base or a series of steps. The background is a clear, bright sky, and the foreground is a well-maintained lawn.

OBJETIVOS

OBJETIVOS GENERALES


► Desarrollar una metodología novedosa y económica de biocontrol para prevenir la contaminación y lograr un mayor control sobre la diseminación de cepas de *Escherichia coli* patógenas en productos lácteos y cárnicos sin comprometer la calidad de éstos.

OBJETIVOS PARTICULARES

► Establecer las condiciones, para bacteriofagos, de aislamiento, amplificación y lisis *in vitro* sobre cepas de *Escherichia coli* portadoras de genes de virulencia.

► Optimizar las condiciones (multiplicidad óptima de infección, concentración bacteriana, temperatura, tiempo y pH) para el biocontrol de *Escherichia coli* Shigatoxigénica (STEC) y enteropatógena (EPEC) en cultivo y en productos cárnicos y lácteos.

► Evaluar la eficiencia de biocontrol de STEC y EPEC de un cóctel de fagos respecto de cada bacteriofago individual en cultivo, en productos cárnicos, en productos lácteos y sobre superficies sólidas de procesamiento de alimentos.



**MATERIALES
Y
MÉTODOS**

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cepas y aislados bacterianos

1.1. Cepario

Para los ensayos realizados en este estudio se utilizaron las cepas DH5 α , ATCC (25923, 27853, 29212, 25922, 35401, 43985), cepas aisladas desde alimentos y aislados bacterianos desde muestras clínicas que se detallan en la Tabla 2.

Tabla 2. Cepas de alimentos, ATCC y aislados bacterianos.

N° Cepa	Bacteria/Característica	Origen*
<u>1</u>	<i>E. coli</i> 1 (no patógena)	Coprocultivo/1
<u>2</u>	<i>E. coli</i> 12 (no patógena)	
<u>3</u>	<i>E. coli</i> 15 (no patógena)	
<u>4</u>	<i>E. coli</i> 16 (no patógena)	
<u>5</u>	<i>E. coli</i> 20 (no patógena)	
<u>6</u>	<i>E. coli</i> 22 (no patógena)	
<u>7</u>	<i>E. coli</i> 201 (no patógena)	
<u>8</u>	<i>E. coli</i> 421 (no patógena)	
<u>9</u>	<i>Staphylococcus aureus</i> (259)	Secreción de herida/1
<u>10</u>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (397) (PAE)	Coprocultivo/1
<u>11</u>	<i>Enterococcus faecium</i> (63605) (Van R)	
<u>12</u>	<i>E. coli</i> uropatógena (4) (<i>fimH</i> +, <i>csgA</i> +, <i>papC</i> +))	Urocultivo/1
<u>13</u>	<i>E. coli</i> uropatógena (8) (<i>csgA</i> +))	
<u>14</u>	<i>E. coli</i> uropatógena (7) (<i>csgA</i> +))	
<u>15</u>	<i>E. coli</i> uropatógena (18) (<i>fimH</i> +, <i>csgA</i> +))	
<u>16</u>	<i>E. coli</i> uropatógena (19) (<i>fimH</i> +, <i>csgA</i> +, <i>papC</i> +))	Coprocultivo/1
<u>17</u>	<i>E. coli</i> (O157)	
<u>18</u>	<i>E. coli</i> (EPEC 920)	Urocultivo/1
<u>19</u>	<i>Proteus</i> C (17.1)	
<u>20</u>	<i>Proteus</i> B (11.1)	
<u>21</u>	<i>Proteus</i> C (1.2)	
<u>22</u>	<i>Proteus</i> C (2.2)	Aspirado traqueal/1
<u>23</u>	<i>Acinetobacter baumannii</i> (63037)	
<u>24</u>	<i>E. coli</i> (ATCC 43895) (<i>stx1</i> , <i>stx2</i> , <i>hlyA</i> y <i>eaeA</i> +))	ATCC
<u>25</u>	<i>klebsiella pneumonine</i> (63718)	Líquido pleural/1
<u>26</u>	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	ATCC
<u>27</u>	<i>E. coli</i> (O157)	Coprocultivo/1
<u>28</u>	<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	ATCC
<u>29</u>	<i>E. coli</i> uropatógena (3) (<i>fimH</i> +, <i>csgA</i> +))	Urocultivo/1
<u>30</u>	<i>E. coli</i> uropatógena (13) (<i>fimH</i> +))	
<u>31</u>	<i>E. coli</i> (AG100)	Colección Bacteriología
<u>32</u>	<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212)	ATCC

<u>33</u>	<i>Streptococcus</i> (Grupo 6)	Exudado faríngeo/1
<u>34</u>	<i>Streptococcus</i> (Grupo C) (952-1)	
<u>35</u>	<i>Alcaligenes faecalis</i> (898-2)	Líquido de colección/1
<u>36</u>	<i>Pseudomona aeruginosa</i> (ATCC 27853)	ATCC
<u>37</u>	<i>Edwardsiella tarda</i>	Secreción de herida/1
<u>38</u>	<i>E. coli</i> (ATCC 35401) (<i>LT1</i> y <i>ST1+</i>)	ATCC
<u>39</u>	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Coprocultivo/1
<u>40</u>	<i>Shigella flexneri</i>	
<u>41</u>	<i>Salmonella</i> Thyphy	Hemocultivo/1
<u>42</u>	<i>Salmonella enteritidis</i>	Coprocultivo/1
<u>43</u>	<i>Shigella sonnei</i>	
<u>44</u>	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	Secreción de herida/1
<u>45</u>	<i>E. coli</i> (42423)	Coprocultivo/1
<u>46</u>	<i>E. coli</i> (EPEC)	
<u>47</u>	<i>E. coli</i> (O157)	
<u>48</u>	<i>Enterococcus faecium</i> (Van R)	
<u>49</u>	<i>E. coli</i> (PN1A)	
<u>50</u>	<i>E. coli</i> (PN2A)	
<u>51</u>	<i>E. coli</i> (PN3A)	
<u>52</u>	<i>E. coli</i> (PN4A)	
<u>53</u>	<i>E. coli</i> (PN5A)	
<u>54</u>	<i>E. coli</i> (PN6P)	
<u>55</u>	<i>E. coli</i> (PN7P)	
<u>56</u>	<i>E. coli</i> (PN8P)	
<u>57</u>	<i>E. coli</i> (EPEC)	Coprocultivo/2
<u>58</u>	<i>E. coli</i> (EPEC)	Coprocultivo/1
<u>59</u>	<i>E. coli</i> (ARG 20) (serogrupo ONT) (<i>stx1/2+</i>)	Alimentos/3
<u>60</u>	<i>E. coli</i> (ARG 4829)	(Balagué y col., 2006)
<u>61</u>	<i>E. coli</i> (O157)	Coprocultivo/1
<u>62</u>	<i>E. coli</i> (ARG 5012)	Alimentos/3 (Balagué y col., 2006)
<u>63</u>	<i>E. coli</i> (ARG 4824) (serogrupo ONT)	
<u>64</u>	<i>E. coli</i> (ARG 177) (serogrupo O8)	
<u>65</u>	<i>E. coli</i> (ARG 20-R)(serogrupo ONT) (<i>stx1/2+</i>)	
<u>66</u>	<i>E. coli</i> (ARG 4627) (serogrupo O18)	Coprocultivo/1
<u>67</u>	<i>E. coli</i> (EPEC920-R)	
<u>68</u>	<i>E. coli</i> (O157)	Alimentos/3
<u>69</u>	<i>E. coli</i> (ARG 4908)	
<u>70</u>	<i>E. coli</i> (O157)	Coprocultivo/1
<u>71</u>	<i>E. coli</i> (ARG 4924)	Alimentos/3 (Balagué y col., 2006)
<u>72</u>	<i>E. coli</i> (ARG 5266) (serogrupo O79)	
<u>73</u>	<i>E. coli</i> (ARG 5468) (serogrupo O44)	
<u>74</u>	<i>E. coli</i> (ARG 4823) (serogrupo O57)	
<u>75</u>	<i>E. coli</i> (ARG 4827) (serogrupo O18)	Coprocultivo/1
<u>76</u>	<i>E. coli</i> (EPEC 201) (<i>eae +</i>)	
<u>77</u>	<i>E. coli</i> (EPEC 421) (<i>eae +</i>)	
<u>78</u>	<i>E. coli</i> (EPEC 583) (<i>eae +</i>)	
<u>79</u>	<i>E. coli</i> (STEC O157:H7; 464) (<i>eae +</i> , <i>stx2 +</i>)	Urocultivo/1
<u>80</u>	Cepa 020 (MR)	

<u>81</u>	<i>Citrobacter freundii</i> (79)	Urocultivo/1
<u>82</u>	<i>E. coli</i> (ARG 4824-R) (serogrupo ONT)	Alimentos/3 (Balagué y col., 2006)
<u>83</u>	<i>E. coli</i> (ARG 5212)	
<u>84</u>	Cepa 175 (R.S.)	Coprocultivo/1
<u>85</u>	<i>E. coli</i> (ARG 5437)	Alimentos/3
<u>86</u>	Cepa 187	Urocultivo/1
<u>87</u>	Cepa 204	Coprocultivo/1
<u>88</u>	Cepa 190	Urocultivo/1
<u>89</u>	Cepa 66068	Líquido abdominal/1
<u>90</u>	Cepa 660104	Urocultivo/1
<u>91</u>	<i>E. coli</i> (230)	Coprocultivo/1
<u>92</u>	<i>E. coli</i> (304)	
<u>93</u>	<i>E. coli</i> (312)	Urocultivo/1
<u>94</u>	<i>E. coli</i> (330)	Coprocultivo/1
<u>95</u>	<i>E. coli</i> (342)	
<u>96</u>	<i>E. coli</i> (350)	
<u>97</u>	<i>E. coli</i> (359)	
<u>98</u>	<i>E. coli</i> inactiva (300)	Urocultivo/1
<u>99</u>	<i>E. coli</i> (364)	
<u>100</u>	<i>E. coli</i> (361)	
<u>101</u>	<i>E. coli</i> (391)	Coprocultivo/1
<u>102</u>	<i>E. coli</i> (392)	
<u>103</u>	<i>E. coli</i> (393)	
<u>104</u>	<i>E. coli</i> O104:H4 (EHEC)	Alimentos/4

* Origen: 1: Bacteriología, Hospital Centenario de Rosario, Santa Fe, Argentina. 2: Hospital de niños Victor J. Vilela, Rosario, Santa Fe, Argentina. 3: Instituto del Alimento, Rosario, Santa Fe, Argentina. 4: INEI-ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”, Buenos Aires, Argentina. ONT: serogrupo no tipificable. Entre paréntesis se indica la denominación y/o características de las cepas o número de aislamiento. El número de cepario se citará a través de la tesis en letra cursiva subrayada.

2. Bacteriofagos

2.1. Aislamiento de bacteriofagos

La cepa DH5 α se utilizó como receptora para aislar bacteriofagos desde cincuenta (50) coprocultivos, materia fecal de composición diarreica, de pacientes tratados en el Hospital Centenario de Rosario, de acuerdo a experiencia previa del laboratorio de Bacteriología. Brevemente, la cepa receptora se hizo desarrollar hasta una DO_{600nm} = 1 en caldo Hershey (8 g/L Bacto caldo nutritivo, 5 g/l Bacto peptona, 5 g/l

NaCl y 1 g/l glucosa) suplementado con 5 mM de MgSO₄ (caldo Hershey-Mg). Se agregó una porción de materia fecal (5 g) y se incubó entre 12 y 16 horas a 37°C, luego se agregó 0,5 ml de cloroformo, se homogeneizó en vortex y se centrifugó a 15000 x g durante 10 minutos. El sobrenadante se esterilizó por filtración con un filtro de 0,45 µm (Gamafil S.A., Buenos Aires, Argentina) (Kudva y col., 1999). Para detectar la presencia de bacteriofagos (placas de lisis) se utilizó la técnica de la doble capa de agar (Jamalludeen y col., 2007). La misma consiste en mezclar alícuotas (10 µl y 100 µl) de los filtrados con 100 µl de la cepa receptora (DO_{600nm} = 1), agregar 3 ml de soft agar (Hershey-Mg y 0,7% agar, p/v) a 45°C, mezclar y finalmente colocar sobre placas de Petri con agar Hershey-Mg (1,4% agar, p/v), incubando 18 h a 37°C.

2.2. Purificación de bacteriofagos

Para purificar los fagos, placas de lisis bien definidas y de morfologías diferentes en el soft agar, se tomaron y se colocaron en 5 ml de caldo Hershey-Mg. Los tubos se mantuvieron a 4°C por 2 h, luego fueron inoculados con 100 µl de un cultivo de la cepa receptora (DO_{600nm} = 1) y finalmente incubados a 37°C con agitación intermitente hasta la lisis completa del cultivo. Luego, se agregó cloroformo (0,1 ml) a cada tubo y se centrifugó a 4000 x g por 10 min. Los fagos presentes en los sobrenadantes se enumeraron a través de la técnica de la doble capa de agar, enfrentando 100 µl de diluciones decimales de los lisados con 100 µl de la cepa receptora, y colocando las mezclas sobre placas de Petri con agar Hershey-Mg (1,4% agar, p/v) e incubando 18 h a 37°C (Jamalludeen y col., 2007). Estos pasos se repitieron tres veces o hasta obtener una única morfología de placa de lisis.

2.3. Producción de stock de bacteriofagos

Una vez obtenida una morfología homogénea de placas de lisis, se utilizó la técnica de doble capa de agar con una cantidad de bacteriofagos tal que, luego de incubar 18 h a 37°C, se observen placas de lisis confluyentes. Luego se agregaron 5 ml de caldo Hershey-Mg sobre la placa y la misma se incubó 2 h a 4°C, agitando intermitentemente; posteriormente se recogió el líquido sobrenadante y se agregó nuevamente 1 ml de caldo Hershey-Mg, dejando reposar 15 min a temperatura ambiente. Se recogió el líquido y se unió al sobrenadante anterior, se agregó una alícuota de 0,1 ml de cloroformo, se homogeneizó y centrifugó a 4000 x g durante 10

min. Finalmente, el sobrenadante obtenido se esterilizó por filtración (membrana de 0,45 μm de poro) y el stock de fagos se almacenó a 4°C (Jamalludeen y col., 2007).

2.3.1. Obtención de stocks concentrados de fagos mediante precipitación con PEG8000 y centrifugación en Centricon

Para preparar suspensiones fágicas concentradas se procedió de la siguiente manera: en tubos Falcon (15 ml) conteniendo los stocks de fagos obtenidos previamente, se agregaron 0,1 ml de PEG8000 por min, hasta una concentración final de 10 % p/v. Cuando se alcanzó esta concentración de PEG8000 en la solución, ésta se dejó madurar toda la noche a 4°C. Posteriormente, las soluciones se centrifugaron 20 min a 14500 x g, descartando cuidadosamente el sobrenadante y resuspendiendo el pellet en buffer SM (0,05M Tris, 0,1M NaCl, 0,008M MgSO₄, 0,01 % w/v gelatina, pH=7,5), en un volumen 10 veces menor al inicial. Para lograr una mayor concentración de fagos en las suspensiones, se agregaron 4 ml del stock precipitado con PEG8000 en tubos centricones (volumen de muestra: 4 ml; *molecular weight cut off*, MWCO, 10 kDa) (Sigma-Aldrich S.A., Buenos Aires, Argentina), centrifugando a 3000 x g hasta obtener el volumen concentrado en 50 μl .

2.4. Titulación de bacteriofagos

Los stocks fágicos concentrados se titularon (unidades formadoras de placas por mililitro; UFP ml⁻¹) por la técnica de doble capa de agar, mezclando alícuotas de 100 μl de diluciones decimales de las suspensiones fágicas a ensayar, en caldo Hershey-Mg, con 100 μl de la cepa receptora DH5 α (DO_{600nm} = 1) en tubos de hemólisis. A estas mezclas se agregaron 3 ml de soft agar (0,7% agar, p/v) a 45°C, y luego de homogeneizar se colocó el contenido de los tubos de hemólisis sobre placas con agar Hershey-Mg (1,4% agar, p/v), se dejó solidificar y se incubó 18 h a 37°C.

Luego de la incubación se realizó el recuento de placas de lisis y se calculó el título correspondiente (UFP/ml: unidades formadoras de placas por ml) de la siguiente manera:

$$\text{Título (UFP/ml)} = \text{N}^\circ \text{ de placas de lisis} \times f_d \times 10$$

Donde f_d : factor de dilución

2.5. Almacenamiento de bacteriofagos – estabilidad de los fagos

Los stocks de bacteriofagos se conservaron a 4°C. Para evaluar la estabilidad de los bacteriofagos a la temperatura de almacenamiento, se realizaron títulos de un mismo stock de los distintos bacteriofagos almacenados a 4°C a través de un período de 2 meses. A intervalos de tiempo preestablecidos se tomaron alícuotas y se determinaron los títulos fágicos por el método de doble capa de agar. Los resultados se expresaron como porcentajes respecto de las concentraciones de fagos iniciales.

3. Caracterización de bacteriofagos

3.1. Determinación de presencia de genes de patogenicidad por PCR

Para la extracción del ADN de los bacteriofagos se utilizó el Kit “High Pure PCR Template Preparation Kit” (Roche, Buenos Aires, Argentina). Previamente a la extracción del ADN se realizó un paso de enriquecimiento previo en donde 1 ml de la suspensión de fagos se adicionó con PEG8000 al 10% y se incubó 24h a 4°C, luego se centrifugó a 16000 x g durante 1 h a 4°C. Luego, el pellet se resuspendió en 200 µl de Buffer de unión (Binding Buffer: 6 M guanidina-HCl; 10 mM urea; 10 mM Tris-HCl; 20% Triton X-100 v/v; pH 4,4; 25°C), adicionando luego 40 µl de proteinasa K a una concentración final de 0,2 mg/ml e incubando 10 min a 70°C. La suspensión fágica obtenida se hizo circular a través de una columna con resina de unión (Roche), centrifugando 1 min a 8000 x g. A continuación se descartó el líquido en el tubo colector y se agregaron 500 µl de Buffer IRB (Inhibitor Renoval Buffer: 5 M guanidina-HCl; 20 mM Tris-HCl; 20 ml etanol 98% p/v; pH 6,6; 25°C) para la eliminación de inhibidores, se centrifugó 1 min a 8000 x g, descartando nuevamente el líquido del tubo colector. Finalmente se lavó dos veces con el Buffer de lavado (Wash Buffer: 20 mM NaCl; 2 mM Tris-HCl; 80 ml etanol 98% p/v; pH 7,5; 25°C), se centrifugó 1 min a 8000 x g y se descartó el líquido del tubo colector. En un nuevo tubo colector se eluyó con 200 µl de Buffer de elución (Elution Buffer: 10 mM Tris-HCl; pH 8,5; 25°C), se centrifugó 1 min a 8000 x g para obtener en el tubo colector el ADN purificado. La extracción de ADN se confirmó en un gel de agarosa al 0,9 %.

En los bacteriofagos aislados se determinó la presencia o ausencia de los siguientes factores de patogenicidad: *stx1*, toxina Shiga 1; *stx2*, toxina Shiga 2; *eaeA*,

attaching-and effacing; *LTI*, toxina termolábil y *STI*, toxina termoestable. La secuencia nucleotídica de cada uno de los primers utilizados se detalla en la Tabla 3.

Tabla 3. Secuencia de los primers utilizados para evaluar la presencia de factores de patogenicidad.

Gen	Primer ^a	Tamaño esperado del producto (pb)
<i>stx1</i>	pd: 5'- ACGTTACAGCGTGTGCRGGGATC-3' pr: 5'- TTGCCACAGACTGCGTCAGTRAGG-3'	121
<i>stx2</i>	pd: 5'- TGTGGCTGGGTTTCGTTTATACGGC-3' pr: 5'- TCCGTTGTCATGGAAACCGTTGTC-3'	102
<i>eaeA</i>	pd: 5'- TGAGCGGCTGGCATGATGCATAC-3' pr: 5'- TCGATCCCCATCGTCACCAGAGG-3'	241
<i>LTI</i>	pd: 5'-TGGATTCATCATGCACCACAAGG-3' pr: 5'-CCATTTCTCTTTTGCCCTGCCATC-3'	360
<i>STI</i>	pd: 5'-TTTCCCCTCTTTTAGTCAGTCAACTG-3' pr: 5'-GGCAGGACTACAACAAAGTTCACAG-3'	160

^a pd, primer directo; pr, primer reverso. *Stx1* y *stx2*: genes codificantes de la toxina Shiga 1 y 2; *eaeA*: gen codificante de la intimina; *LTI* y *STI*: genes codificantes de las toxinas termolábil y termoestable.

Como controles positivos se utilizaron las cepas *E. coli* ATCC43895 (*stx1*, *stx2* y *eaeA*) y *E. coli* ATCC35401 (*LTI* y *STI*), en tanto que como control negativo se incluyó la cepa *E. coli* HB101. Las mezclas de las reacciones de amplificación contenían: buffer (csp 25 µl) (16 mM (NH₄)₂SO₄; 67 mM Tris-HCl, pH 8,8 y 0,01 % de Tween 20); 3 mM MgCl₂; 0,1 mM de cada dNTP; 5 µl de ADN; 0,1 pmol/µl de cada uno de los primers y 2,5 U de *Taq* polimerasa. El programa de amplificación empleado fue el siguiente: 5 ciclos de 30 segundos a 95°C seguido de 1 minuto a 72°C y luego 20 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 63°C, luego 30 segundos a 72°C, y finalmente 5 minutos a 72°C para lograr la elongación completa de los productos. Los segmentos de amplificación se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 3 % con buffer TBE (89 mM Tris-Borato, 2 mM EDTA, pH 8), a 100 V durante 3 h (Pass y col., 2000). Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (0.5 µg/ml) (Sigma, St. Louis, Missouri, USA) y los productos de PCR fueron visualizados por exposición del gel a luz ultravioleta (Sambrook y Russel, 2001).

3.2. Microscopía electrónica

Las micrografías electrónicas de los viriones fueron obtenidas según Bolondi y col. (1995). Suspensiones fágicas concentradas con PEG8000 al 10% (24 h a 4°C), se centrifugaron (1 h, 16.000 x g, 5°C) y fueron teñidas con ácido fosfotúngstico (2 % w/v) (Biopack, Buenos Aires, Argentina). Las micrografías electrónicas fueron tomadas con un microscopio JEOL 1200 EX II (INTA Castelar, Buenos Aires, Argentina) funcionando a 85 kV. Se registraron morfologías y dimensiones de los fagos (diámetro de la cabeza; longitud y diámetro de la cola).

3.3. Influencia de parámetros fisicoquímicos sobre la actividad lítica

Para determinar las condiciones físicoquímicas en las que se produce una infección óptima de las bacterias por parte de los bacteriofagos, se estudió la influencia de diversos factores ambientales durante la lisis de cepas sensibles de *E. coli*. Las variables a evaluar fueron NaCl (0,3 %; 2 % y 4 % p/v), pH (4,5; 5,7 y 7,5) y temperatura (4°C; 37°C; 50°C).

Condiciones generales y controles realizados en los ensayos para evaluar la influencia del NaCl, pH y temperatura sobre la actividad lítica.

Las cepas utilizadas se hicieron desarrollar hasta una $DO_{600nm} = 1,0$ en caldo Hershey-Mg durante 18 h a 37°C. Las mismas fueron inoculadas con una dilución decimal del stock de fagos ($\sim 10^3$ UFP/ml). Las determinaciones se llevaron a cabo por triplicado. Para comprobar la ausencia de contaminación se incubaron placas controles conteniendo solo bacterias (libres de bacteriofagos), solo bacteriofagos (libres de células procariotas) y solo caldo Hershey-Mg (libre de fagos y bacterias).

3.3.1. Influencia del NaCl

Para evaluar la influencia del NaCl se colocaron 100 µl de agua estéril, 100 µl de solución de NaCl al 6 % p/v y 100 µl de solución de NaCl al 12 % p/v en distintos tubos de ensayo de manera tal de obtener concentraciones finales de NaCl de 0,3 % (control), 2 % y 4 %, respectivamente. Luego se agregaron a cada tubo, 100 µl de la cepa bacteriana receptora sensible ($DO_{600nm} = 1$) y 100 µl de la suspensión del fago a evaluar. La mezcla se incubó durante 40 min a 37°C (un ciclo lítico), se agregaron luego 3 ml de soft-Hershey-Mg a 45°C, se agitó suavemente y se plaqueó según la técnica de doble capa de agar. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 h. Los resultados se expresaron

como porcentajes de fagos remanentes respecto de las condiciones estándar del medio de cultivo (0,3%).

3.3.2. Influencia del pH

Para realizar este ensayo se colocaron 100 µl de solución de HCl 0,1 N, 100 µl de solución de HCl 0,025 N y 100 µl de buffer SM en distintos tubos de ensayo para obtener los siguientes valores finales de pH: 4,5; 5,7 y 7,5 (control), respectivamente. Luego, a cada tubo, se agregaron 100 µl de la cepa bacteriana receptora sensible ($DO_{600nm} = 1,0$) y 100 µl de la suspensión del fago a evaluar. La mezcla se incubó 40 min a 37°C, se agregaron luego 3 ml de soft-Hershey-Mg a 45°C, se agitó suavemente y se plaqueó según la técnica de doble capa de agar. Las placas se incubaron 24 h a 37°C. Los resultados se expresaron como porcentajes de fagos remanentes respecto del pH 7,5 (control).

3.3.3. Influencia de la temperatura

Se prepararon mezclas conteniendo 100 µl de la cepa bacteriana receptora sensible ($DO_{600nm} = 1$) y 100 µl de la suspensión del fago a evaluar, y las mismas se incubaron, separadamente, a 4°C, 37°C (control) y 50°C. Luego de 40 min de incubación se agregaron 3 ml de soft-Hershey-Mg a 45°C, se agitaron suavemente las mezclas y se plaquearon según la técnica de doble capa de agar. Las placas se incubaron 24 h a 37°C. Los resultados se expresaron como porcentajes de fagos remanentes respecto de la temperatura óptima de crecimiento para *E. coli* (37°C).

4. Interacción de *Escherichia coli* con bacteriofagos

4.1. Rango de hospedadores

Para determinar el rango de hospedadores de los bacteriofagos empleados en este estudio se utilizaron dos metodologías diferentes. La técnica de “Spot test” y la de doble capa de agar entera. La primera - Spot test - se utilizó para realizar una búsqueda/evaluación rápida de las cepas sensibles a cada uno de los fagos, mientras que la segunda técnica empleada - doble capa de agar entera - se realizó como técnica confirmatoria de sensibilidad al fago. En la sección 1.1 (cepario; Tabla 2) se detallan las cepas y aislados bacterianos que se evaluaron para determinar el rango de hospedador. A continuación se describe cada una de las metodologías mencionadas.

4.1.1. Técnica de Spot test

El método de “Spot test” consiste en preparar una placa de Petri con una capa de agar-Hershey-Mg (1,5 % p/v). Una vez solidificada esta capa se adicionó por encima de ésta una capa de soft-Hershey-Mg (3 ml; 0,7 % p/v) conteniendo 100 µl de la cepa a ensayar ($DO_{600nm} = 1,0$), mezcla previamente preparada en un tubo de hemólisis. Sobre la capa de soft-agar solidificada se sembraron, por duplicado, alícuotas de 10 µl de cada bacteriofago conteniendo 10^8 UFP/ml, formando un Spot sobre el soft-agar y siguiendo una disposición de hilera (Figura 8). Las placas se secaron en flujo laminar hasta la absorción total del líquido y se incubaron 24 h a 37°C (Goodridge y col., 2003). Pasado el tiempo de incubación se observó la presencia de zonas de lisis en el césped bacteriano, considerándose como “lisis positiva” a las zonas de agar translúcido en el lugar de donde se colocó la gota del fago, y “lisis negativa” cuando la zona donde se colocó la gota tiene igual densidad bacteriana que el césped que lo rodea.

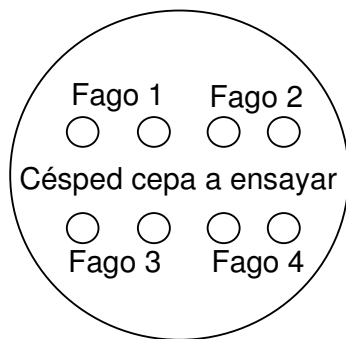


Figura 8. Representación de la disposición de siembra de bacteriofagos en el ensayo de Spot test.

4.1.2. Técnica de doble capa en placa entera

Los resultados positivos (lisis positiva) obtenidos a través de la técnica de Spot test fueron confirmados enfrentando la cepa bacteriana sensible con cada uno de los fagos individuales, separadamente, mediante la técnica de doble capa de agar descrita a continuación. Se prepararon placas de Petri conteniendo una capa de agar-Hershey-Mg (1,5 % p/v). Por otro lado, se mezclaron 100 µl de diluciones decimales de la suspensión fágica a evaluar con 100 µl de la cepa receptora (DH5α; $DO_{600nm} = 1,0$). La mezcla se incubó 10 min a 37°C y se adicionó de 3 ml de soft-Hershey-Mg a 45°C, luego se plaqueó y una vez solidificada se incubó a 37°C por 24 h. El resultado del ensayo se considera positivo cuando se observa, en alguna de las diluciones sembradas, la aparición de placas de lisis. Las cepas evaluadas que dieron “lisis positiva” para el

ensayo de Spot test y de doble capa en placa entera se consideraron sensibles y se incluyeron en el rango de hospedador de cada fago evaluado.

4.2. Criterios de selección de fagos para estudios posteriores

En primera instancia se seleccionaron aquellos fagos que formaron placas de lisis claras y definidas, exhibiendo también reproducibilidad en las determinaciones previas. Otro criterio de selección fue el espectro de hospedador propio cada fago aislado, de acuerdo a lo cual se seleccionó un bacteriofago que presentó rango de hospedador estrecho (fago DT1), y otro cuyo espectro fue más amplio (fago DT6). Adicionalmente y en los ensayos que involucran a la cepa STEC no-O157 (ARG4827) (75), el fago DT1 se reemplazó por el fago DT5 debido a que esta cepa no presentó sensibilidad al primero (DT1).

4.3. Determinación del tiempo y número de eclosión

El tiempo y el número de eclosión para los fagos en estudio se determinaron utilizando DH5 α como cepa receptora. Para esto la cepa receptora DH5 α se hizo desarrollar a 37°C en caldo Hershey-Mg hasta una turbidez adecuada ($DO_{600nm} = 0,5$). Las células fueron cosechadas por centrifugación y el pellet se resuspendió en caldo Hershey-Mg (5 ml; 1/5 del volumen inicial). Luego, 1 ml de la suspensión bacteriana se infectó con el fago correspondiente (*Multiplicity of Infection* = MOI de 0,1 para ambos fagos) y se incubó 10 min a 37°C en baño termostatzado para permitir la adsorción de las partículas fágicas. A continuación, la mezcla fue centrifugada 5 min a 10000 x g. El pellet, libre de fagos no adsorbidos, se resuspendió muy cuidadosamente en 1 ml de caldo Hershey-Mg. Posteriormente, el pellet (1 ml) fue transferido a un tubo conteniendo 9 ml de caldo Hershey-Mg. A partir de esta suspensión se efectuaron diluciones decimales en caldo Hershey-Mg. Estas diluciones se hacen para evitar la readsorción de las partículas fágicas liberadas, que pudieran de esta manera iniciar nuevos ciclos de multiplicación simultáneos, induciendo a error en la determinación del número de eclosión. Los tubos fueron incubados a 37°C en baño de agua termostatzado, y a intervalos regulares de tiempo, se extrajeron alícuotas (100 μ l) que fueron inmediatamente tituladas sobre la cepa sensible, para conocer el número de partículas fágicas libres. El parámetro tiempo de eclosión fue calculado a partir de las curvas de crecimiento obtenidas, mientras que para el cálculo del número de eclosión

(número de fagos producidos por bacteria infectada) se utilizó la ecuación de Wang (2006).

$$b \text{ (UFP/UFC)} = F \text{ (UFP)} / (T - U) \text{ (UFC)}$$

Donde **b** = número de eclosión
 F = número de fagos después de un ciclo de replicación
 T - U = número de fagos adsorbidos (determinado experimentalmente como el número de UFC infectadas)

4.4. Eficiencia de plaqueo

Para analizar la formación de placas de lisis sobre las distintas cepas de *E. coli* utilizadas posteriormente en los ensayos de biocontrol en alimentos [EPEC920 (18), STEC464 O157:H7 (79) y STEC no-O157 ARG4827 (75)], se realizaron recuentos de partículas fágicas (título) por la técnica de doble capa de agar descrita anteriormente (Jamalludeen y col., 2007). La eficiencia de plaqueo (EOP, *Efficiency of Plaquing*), con relación a los recuentos obtenidos con una cepa de referencia (DH5 α), fue calculada de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{EOP} = \frac{\text{Título fágico cepa en estudio (UFP/ml)} \times 100}{\text{Título fágico cepa referencia (UFP/ml)}}$$

4.5. Estudio de la naturaleza de los receptores fágicos

4.5.1. Ensayos de adsorción fágica

Se evaluó la adsorción de los fagos DT1 y DT6 sobre las cepas de *E. coli* EPEC920 (18) y STEC464 O157:H7 (79) y de los fagos DT5 y DT6 sobre la cepa STEC no-O157 ARG4827 (75). Los ensayos se realizaron enfrentando una cepa bacteriana y un fago a la vez. Las bacterias se hicieron desarrollar toda la noche en caldo tripteína soya (CTS) (Britania, Buenos Aires, Argentina) a 37°C. Las células se centrifugaron 5 min a 10000 x g y el pellet se resuspendió en caldo CTS fresco, ajustando la DO_{600nm} a 1. Cada cultivo bacteriano (500 μ l), infectado con 100 μ l del fago correspondiente (MOI = 0,001 – 0,003) se incubó 5 min a 37°C. Luego de la

interacción fago/bacteria, la mezcla se centrifugó 5 min a 10.000 x g y se determinó el título de fagos libres en el sobrenadante por la técnica de doble capa de agar (Jamalludeen y col., 2007), utilizando la cepa receptora de referencia (DH5 α) en todas las titulaciones. Para establecer el título de fagos iniciales en cada ensayo, se reemplazó el cultivo bacteriano con CTS y se procedió según lo descrito.

4.5.2. Efecto del peryodato sobre la adsorción fágica

Para evaluar el efecto del peryodato de sodio sobre los receptores fágicos y consecuentemente sobre la adsorción, se procedió de la siguiente manera. Alícuotas de 1 ml de cada cultivo bacteriano ($DO_{600nm} = 1$) se centrifugaron 5 min a 10.000 x g, el pellet bacteriano se resuspendió en 1 ml de acetato de sodio (50 mM; pH 5,2) o acetato de sodio conteniendo 1 mM de NaIO₄. Las células se incubaron 2 h (protegidas de la luz), luego fueron lavadas con 1 ml de CTS, centrifugadas 5 min a 10000 x g y resuspendidas en CTS.

4.5.3. Efecto de la proteinasa K sobre la adsorción fágica

Del mismo modo, se evaluó el efecto de la proteinasa K sobre la adsorción fágica, para esto 1 ml de cada cultivo bacteriano ($DO_{600nm} = 1$) fue tratado con proteinasa K (0,2 mg/ml; Promega, Madison, USA) durante 3 h a 37°C. Pasado el tiempo de incubación las células fueron lavadas con 1 ml de CTS, centrifugadas 5 min a 10000 x g y resuspendidas en CTS.

Para evaluar la influencia de la matriz (buffer acetato de sodio y buffer proteinasa K) en la adsorción fágica se realizaron controles. Para esto, las cepas fueron resuspendidas en medio CTS (control sin tratamiento), buffer acetato de sodio de sodio (50 mM; pH 5,2) (buffer sin peryodato) y buffer proteinasa K (control sin proteinasa K), y posteriormente se enfrentaron, por separado, a cada fago evaluado. Los ensayos de adsorción después de los tratamientos con peryodato y proteinasa K se realizaron como se ha descrito anteriormente (Materiales y Métodos, sección 4.4.1). Cada ensayo se realizó por triplicado. Los porcentajes de fagos adsorbidos se calcularon del siguiente modo:

$$\% \text{ Ads} = \frac{(T_i - T_f) \times 100}{T_i}$$

Donde T_i : título inicial de fagos (UFP/ml) puestos en contacto con la cepa
 T_f : título de fagos (UFP/ml) libres en el sobrenadante

5. In Vitro Challenge tests

Como se explicó con anterioridad en la sección 4.2, los fagos seleccionados para estos ensayos fueron DT1, DT5 y DT6.

5.1. Challenge con fagos individuales

Para estudiar la lisis celular en medio líquido se inocularon 50 μ l de un cultivo de 16-18 h de la cepa sensible a ensayar, a saber DH5 α , EPEC920 ([18](#)), STEC no-O157 ARG4827 ([75](#)) y STEC464 O157:H7 ([79](#)), en 5 ml de caldo Hershey-Mg fresco, incubando a 37°C. Cuando se alcanzó una $DO_{600nm} = 0,1$ se agregó 0,1 ml del fago a ensayar (DT1, DT5 ó DT6, según corresponda), se mezcló suavemente y los cultivos se incubaron a 4 y 37°C. Para la cepa STEC no-O157 ARG4827 se utilizó el fago DT5 en lugar de DT1 debido a que no es sensible a este último. A tiempos preestablecidos (2, 6 y 24 h) se tomaron alícuotas de 100 μ l, se hicieron diluciones decimales y se plaquearon en agar Hershey-Mg para el recuento de células viables. Para monitorear el desarrollo normal del cultivo y evaluar la reducción de células viables a cada punto de muestreo se incubaron tubos control de cada cepa sin infectar (cultivos sin fagos) así como tubos control sin células (conteniendo solo fagos) para descartar contaminación. El muestreo se realizó por duplicado en dos experimentos independientes. Adicionalmente se realizaron conteos de fagos libres y totales en una cepa no patógena (DH5 α) y en una patógena (STEC464 O157:H7) para evaluar la evolución a cada tiempo de muestreo.

5.2. Challenge con cócteles

Se llevaron a cabo ensayos para estudiar el efecto combinado de los bacteriofagos sobre la lisis celular en medio líquido. Para esto se realizó una mezcla de los fagos (cóctel) en proporciones iguales. Se evaluó el cóctel DT1 + DT6 sobre las cepas DH5 α , EPEC920 ([18](#)) y STEC464 O157:H7 ([79](#)) y el cóctel DT5 + DT6 sobre la cepa STEC no-O157 ARG4827 ([75](#)). Se utilizó la misma metodología (condiciones de

cultivo, volúmenes, temperaturas, tiempos de muestreo y controles) que en los ensayos con fagos individuales descripta anteriormente (ver sección 5.1).

6. Biocontrol de *Escherichia coli* sobre productos cárnicos

6.1. Muestras de alimentos – Almacenamiento

Las muestras de carne bovina fueron adquiridas en un comercio minorista, se cortaron en porciones de no más de 25 g utilizando instrumentos estériles, se colocaron en bolsas de plástico estériles individuales (whirl-pak bag) y luego se almacenaron a -20°C hasta su uso.

6.2. Biocontrol con fagos individuales

Se cortó carne asépticamente en trozos de 1 cm², los cuales se colocaron en placas de Petri y, previo a la inoculación con fagos y bacterias, fueron ajustados al pH deseado (pH 7,5) por lavados con buffer SM. Posteriormente, las muestras de carne (1 cm²) se colocaron equidistantes en una nueva placa de Petri y se atemperaron a 5 y 24°C, representando temperaturas de refrigeración y ambiente, respectivamente. Las cepas bacterianas a ensayar [DH5α, EPEC920 (18), STEC no-O157 ARG4827 (75) y STEC464 O157:H7 (79)] se hicieron desarrollar, 18 h a 37°C, en caldo Hershey-Mg. A continuación se inoculó la superficie de la carne con 10 µl de la dilución decimal adecuada (~10⁶ UFC/ml) de la suspensión bacteriana y, permitiendo su unión a temperatura ambiente (10 min). Pasado este tiempo se adicionaron 10 µl y 100 µl de cada bacteriofago evaluado, por separado, para obtener valores de MOI bajo y alto, respectivamente. En paralelo se evaluaron controles conteniendo el mismo volumen de buffer SM en lugar de la suspensión fágica. Finalizada la etapa de inoculación, tanto los controles como los tratamientos se reincubaron a la temperatura correspondiente. A tiempos predeterminados de muestreo (3, 6 y 24 h) se transfirieron las piezas de carne a una bolsa estéril, se añadieron 5 ml de buffer SM y trataron en un stomacher (Seward, Londres, UK) durante 2 min. La porción líquida fue transferida a un tubo estéril y centrifugada 5 min a 10000 x g, eliminando el sobrenadante y se resuspendiendo las células en 1 ml de buffer SM (Bigwood y col., 2008). Por último, 100 µl de las diluciones decimales apropiadas fueron plaqueadas en agar-Hershey-Mg para el recuento de células viables. Se prepararon las muestras y se realizaron todos los conteos por triplicado. Adicionalmente, se realizaron controles sin inocular (sin fago y bacteria)

para evaluar la presencia de bacteriofagos y patógenos contaminantes. El recuento de unidades formadoras de placas por ml (UFP/ml) fue realizado por la técnica de doble capa de agar (Jamalludeen y col., 2007) (Tomat y col., 2013a).

6.3. Biocontrol con cócteles

Para evaluar la eficacia de biocontrol de los bacteriofagos combinados en una matriz alimenticia sobre cepas de *E. coli*, se llevaron a cabo ensayos con una mezcla de los fagos (cóctel) en proporciones iguales. El cóctel de bacteriofagos se ensayó al mayor valor de MOI sobre las cepas de *E. coli* previamente evaluadas con fagos individuales [DH5 α , EPEC920 (18), STEC no-O157 ARG4827 (75) y STEC464 O157:H7 (79)] utilizando la metodología descrita anteriormente (ver sección 6.2). Además, se realizaron conteos de partículas fágicas al inicio y al final de los experimentos (Tomat y col., 2013a).

6.4. Porcentaje de recuperación bacteriana desde productos cárnicos

Para evaluar el número de bacterias que se recuperan desde la muestra de carne procesada en los experimentos de biocontrol con fagos se realizó el cálculo del porcentaje de recuperación celular. Para realizar estos cálculos se llevaron a cabo experimentos adicionales, en las mismas condiciones de biocontrol con fagos individuales (ver sección 6.2), pero sin el agregado de bacteriofagos y a tiempo cero, incubando solamente 10 min a 37°C para que se produzca la unión de la bacteria a la matriz alimenticia. En estos ensayos también se está considerando el factor de pérdida celular durante la centrifugación. Todos los valores informados en los resultados están corregidos por este factor de recuperación.

7. Aislamiento de mutantes insensibles a bacteriofagos (BIMs)

7.1. Metodologías utilizadas en el aislamiento de BIMs

7.1.1. Cultivo secundario (medio líquido)

Los mutantes insensibles a bacteriofagos (BIMs) fueron aislados por el método de cultivo secundario (Guglielmotti y col., 2007) con algunas modificaciones. Cultivos de cepas sensibles de *E. coli* [EPEC920 (18) y STEC no-O157 ARG4827 (75)], en

caldo Hershey-Mg con una $DO_{600nm} = 0,2-0,3$, fueron infectados con diversas suspensiones fágicas para obtener distintos valores de MOI (multiplicidad de infección, $MOI \approx 1$ y 10). Las mezclas fueron incubadas a $37^{\circ}C$ durante 24 h hasta observar visualmente lisis completa. Se utilizó como control de desarrollo un cultivo no infectado de cada cepa de *E. coli*. Los cultivos que exhibieron lisis completa y tardía fueron los mejores candidatos para aislar BIMs. Después de observar lisis completa, se prolongó la incubación durante 48 h adicionales a $37^{\circ}C$ para el desarrollo del cultivo secundario. Cada tubo con crecimiento secundario se plaqueó en placas de agar-Hershey-Mg para el aislamiento de colonias.

7.1.2. Ensayos en muestras cárnicas (medio agarizado)

El aislamiento de BIMs desde carne se realizó en la condiciones descriptas en los ensayos de biocontrol en carne (ver sección 6.2), pero modificando los tiempos de incubación de las muestras inoculadas con bacterias [DH5 α , EPEC920 ([18](#)) y STEC no-O157 ARG4827 ([75](#)) y STEC464 O157:H7 ([79](#))] y fagos. Las incubaciones se prolongaron hasta 48 h para permitir el desarrollo de las variantes fagorresistentes y facilitar su detección y aislamiento.

En ambos ensayos (7.1.1 y 7.1.2), luego de la incubación de las placas, colonias diferentes fueron seleccionadas al azar y cultivadas en caldo Hershey-Mg durante la noche a $37^{\circ}C$. Dichos aislamientos fueron purificados por tres estriados consecutivos en placas de agar-Hershey-Mg. Las colonias aisladas fueron consideradas como BIMs presuntivos.

8. Caracterización del fenotipo BIM

8.1. Confirmación de BIMs

Los BIMs presuntivos fueron confirmados por el test de sensibilidad en medio líquido (Guglielmotti y col., 2007). Brevemente, un cultivo en fase de crecimiento exponencial ($DO_{600nm} = 0,2-0,3$) de cada BIM presuntivo se infectó con las suspensiones fágicas a $MOI \approx 1$. El fago utilizado en cada caso fue aquel capaz de infectar a la cepa sensible de la cual se obtuvieron los mutantes correspondientes.

Cultivos no infectados de cada cepa de *E. coli* se utilizaron como control de desarrollo. Los cultivos se incubaron en caldo Hershey-Mg a 37°C hasta evidenciar turbidez de las cepas control y se almacenaron a 4°C. Los cultivos infectados que no presentaron lisis en este primer intento se sometieron a un segundo subcultivo. El segundo subcultivo consistió en transferir 2-3% del volumen total final del primer cultivo a otro tubo de ensayo con 1 ml de caldo Hershey-Mg fresco. En caso de no observarse lisis bacteriana evidente, el cultivo resultante se almacenó a 4°C y fue sometido a un tercer subcultivo en las mismas condiciones. Los BIMs presuntivos que pasaron esta barrera se consideran BIMs confirmados. Los mutantes fagorresistentes confirmados fueron almacenados a -20°C en caldo Hershey-Mg adicionado con glicerol (20 % v/v). El test de sensibilidad en medio líquido de las cepas madre (sensibles) se llevó a cabo en un experimento paralelo para garantizar la actividad lítica de las suspensiones fágicas.

8.2. Eficiencia en la recuperación de BIMs

La eficiencia en la recuperación de BIMs confirmados fue calculada de la siguiente manera:

$$\text{Eficiencia} = \frac{(\text{N}^\circ \text{ de BIMs confirmados}) \times 100}{\text{N}^\circ \text{ de BIMs presuntivos}}$$

8.3. Determinación de la frecuencia de aislamiento de BIMs

Una vez realizada la confirmación de los BIMs se evaluó la frecuencia de aislamiento (solo BIMs confirmados) mezclando el volumen apropiado (1 ml) de un cultivo overnight de cada cepa de *E. coli* [DH5 α , EPEC920 (18), STEC no-O157 ARG4827 (25) y STEC464 O157:H7 (29)] y de las suspensiones fágicas para obtener una MOI de 100. La mezcla bacteria-fago fue suplementada con MgSO₄ (5 mM) y luego se plaqueó por la técnica de doble capa de agar y se incubó toda la noche a 37°C. La frecuencia de aislamiento de BIMs se estimó como el número de BIMs-confirmados/recuento bacteriano inicial. Todos los experimentos se realizaron por duplicado.

8.4. Estabilidad de BIMs

Después de confirmar el fenotipo de BIM, se procedió a estudiar si esta propiedad se mantenía bajo presión del fago correspondiente. Para los BIMs

confirmados se ensayó la estabilidad de la resistencia fágica mediante siete subcultivos secuenciales (2-3 % v/v), en caldo Hershey-Mg (1 ml), con agregados independientes de nuevas e iguales dosis de bacteriofagos (MOI \approx 1) en cada subcultivo. La pérdida de la resistencia al bacteriofago se determinó por la comparación de lisis del cultivo respecto del control sin bacteriofago adicionado (Guglielmotti y col., 2007). Se registró el número de subcultivo en el cual el mutante resultó lisado por el fago.

8.5. Reversión de BIMs

Se estudió la capacidad de los BIMs confirmados para revertir espontáneamente al fenotipo sensible. Para esto, cada uno de ellos fue propagado a través de 50 generaciones, sin el agregado del bacteriofago al que resultó insensible, en caldo Hershey-Mg a 37°C. Cada BIM propagado fue examinado por ensayo en placa (técnica de doble capa de agar) para evaluar reversión a sensibilidad fágica por formación de placas de lisis al ser enfrentado al fago correspondiente (O'Flynn y col., 2004).

9. Biocontrol de *Escherichia coli* en productos lácteos

9.1. Muestras de alimentos – Almacenamiento

Para realizar los experimentos en muestras de origen lácteo se utilizó leche en polvo descremada que fue almacenada a temperatura ambiente. Las muestras se prepararon reconstituyéndola y esterilizándola inmediatamente antes de ser utilizadas.

9.2. Biocontrol de *Escherichia coli* durante un proceso de fermentación láctica

Se llevaron a cabo ensayos de biocontrol a 37°C en alícuotas paralelas (200 ml) de leche descremada reconstituida (LDR, 10 % p/v) estéril adicionada con CaCl₂ (0,28 g/l). Todas las alícuotas se inocularon (1% v/v) con cultivos *over night*, en leche, de *Streptococcus thermophilus* 10-C, ya sea solo (ensayo control) o junto con cultivos *over night*, crecidos en caldo Hershey-Mg a 37°C, de las cepas de *E. coli* ensayadas (concentración final aprox. 10³ UFC/ml; ensayos experimentales). Una alícuota de 100 ml de cada lote infectado con *E. coli* se inoculó con el fago o cóctel de fagos correspondiente (10⁷-10⁸ UFP/ml) con el fin de evaluar su potencial como agente de biocontrol. Las combinaciones ensayadas fueron: DT1/DH5 α , DT1/EPEC920 ([18](#)), DT6/STEC no-O157:H7 (ARG4827, [75](#)), DT1/STEC464 O157:H7 ([79](#)), DTS/TEC464

O157:H7 (79) y cóctel/STEC464 O157:H7 (79). La acidificación procedió durante 24 h a 37°C en baño termostático. Durante el proceso de fermentación se determinaron: la evolución del pH con un peachímetro modelo SA 720 (Orion, Beverly, Massachusetts, USA), los recuentos de células bacterianas, realizados en agar Elliker (37°C, 48 h) para *Streptococcus thermophilus* 10-C o agar Hershey-Mg (37°C, 18 h) para *E. coli*, y finalmente los títulos fágicos por la técnica de doble capa de agar (Tomat y col., 2013b).

9.3. Biocontrol de *Escherichia coli* durante un proceso de cuajado

Se llevaron a cabo experimentos durante el proceso de cuajado a escala de laboratorio con el objetivo de evaluar el comportamiento de las cepas y fagos de *E. coli* durante la formación del gel y etapas de deshidratación, propias de una elaboración lactocasearia. Para este propósito, se reconstituyó (10 % p/v) asépticamente leche en polvo descremada comercial (recuento total de bacterias < 100.000 UFC/g) en agua destilada estéril, dado que la coagulación de leche no podría llevarse a cabo utilizando leche esterilizada. Para cada sistema cepa/fago estudiado (cóctel/DH5 α , DT1/EPEC920 (18), DT6/STEC no-O157:H7 ARG4827 (75), DT1/STEC464 O157:H7 (79), DT6/STEC464 O157:H7 (79) y cóctel/STEC464 O157:H7 (79), alícuotas de 250 ml de LDR adicionada con CaCl₂ (0,28 g/l) (LDR-Ca), fueron inoculadas con un cultivo *overnight*, desarrollado en caldo Hershey-Mg a 37°C, de la cepa de *E. coli* correspondiente, a una concentración final de 10² – 10⁴ UFC/ml. Dichas alícuotas fueron divididas en dos nuevas porciones equivalentes de 125 ml, una de ellas fue inoculada con el fago o cóctel de fagos correspondiente (10⁷–10⁸ UFP/ml) ($t = 0$ min) y la restante se utilizó como control sin bacteriofagos. Luego de 1 h a 37°C, tiempo necesario para que se inicie el proceso de infección fágica en la matriz láctea aún líquida, se agregó MAXIREN™ 150 (100 % quimosina, fuerza del cuajo 150.000 IMCU/ml, Gist-brocades, France) (0,042 g/l) para lograr la coagulación de la leche, e inmediatamente cada muestra fue dividida en cuatro tubos Falcon de 50 ml. Al $t = 120$ min, el coágulo obtenido se cortó verticalmente a lo largo de toda la longitud del tubo mediante el uso de un cuchillo esterilizado a la llama adaptado al diámetro de los tubos, haciendo dos cortes perpendiculares y dos paralelos en forma de una cruz, y manteniendo las muestras en incubación a 37°C. Al $t = 150$ min, las cuajadas fueron centrifugadas 10 min a 1000 x g, a temperatura ambiente, inmediatamente después fueron separadas del suero y las dos muestras (suero y cuajada) se mantuvieron a 4 ° C hasta el $t = 240$ min. Se determinaron los títulos fágicos a los tiempos de muestreo $t = 0$ y 240 min (en suero), y se realizaron

recuentos bacterianos en todas las muestras a $t = 0, 60, 120$ (coágulo inmediatamente antes de cortar), 180 y 240 min. El suero y la cuajada se analizaron como muestras independientes a partir de $t = 180$ min. Para procesar las muestras sólidas (después de la coagulación), las mismas se diluyeron en citrato de sodio 2% (p/v).

10. Descontaminación de superficies sólidas con cócteles fágicos

10.1. Ensayos de descontaminación sobre cubreobjetos (*glass coverslip*) y sobre acero inoxidable (*stainless steel chips*)

Se utilizaron cubreobjetos de vidrio (CV) (18 mm x 18 mm) y fichas de acero inoxidable (AI) (25 mm x 15 mm) para representar dos materiales diferentes involucrados en el procesamiento de alimentos. Las matrices se limpiaron con etanol al 70 % (v/v), posteriormente se autoclavaron, se colocaron en placas de Petri y se utilizaron inmediatamente o se almacenaron a temperatura ambiente hasta su uso. Cada cultivo bacteriano, EPEC920 (18), STEC no-O157 (ARG4827, 75), y STEC464 O157:H7 (79), se inoculó (10 μ l) por separado, a dos concentraciones distintas, sobre las superficies sólidas evaluadas, a saber aproximadamente 10^4 y 10^6 UFC/ml para CV y aproximadamente 10^5 y 10^7 UFC/ml para AI, y se dejó secar durante 30 min a temperatura ambiente en flujo laminar (Gabinete de Bioseguridad Telstar Bio II A, Teslar, Inc., Buenos Aires, Argentina). Luego, se aplicaron alícuotas de 100 μ l del cóctel de fagos (DT1 + DT6 para EPEC920 y STEC464 O157:H7; DT5 + DT6 para STEC no-O157 ARG4827) (aproximadamente 10^9 UFP/ml) o de caldo Hershey-Mg (control) en la parte superior de las superficies sólidas (CV y AI) inoculadas con la cepa correspondiente de *E. coli* evaluada. Se realizaron controles de secado en donde se inoculó 10 μ l de cultivos bacterianos sobre las superficies CV y AI sin adición de fagos ó caldo Hershey-Mg para evaluar el porcentaje de recuperación celular. A continuación los CV y las AI se incubaron en el interior de las placas de Petri a 5 y 37°C durante 1, 3 y 24 h. Para las muestras ensayadas a 37°C por el período de tiempo más prolongado (24 h), las placas de Petri se incubaron en un baño termostatzado para evitar la evaporación completa del cóctel fágico o del caldo Hershey-Mg. Los tratamientos y los controles de CV y AI se colocaron en tubos de 50 ml de centrifuga conteniendo 1 ml de buffer fosfato salino (PBS) (pH 7,2), estos se homogeneizaron con vortex durante 2 min, se realizaron diluciones decimales en PBS, las cuales se sembraron en agar Hershey-Mg y se incubaron 24 h a 37°C. Luego de la incubación, se enumeraron las

células viables (UFC/ml). La reducción en el número de células viables se calculó restando el número de UFC/ml obtenido en las superficies tratadas (10 µl cepa bacteriana + 100 µl cóctel fágico) del número de UFC/ml obtenido en superficies control (10 µl cepa bacteriana + 100 µl caldo Hershey-Mg). Se llevaron a cabo dos experimentos independientes y se ensayaron muestras por duplicado en cada tiempo de muestreo.

11. Análisis estadístico

Todos los análisis desarrollados fueron por comparación de medias de las variables analizadas, realizando un ensayo de análisis de varianza de un solo factor (one way ANOVA) con un nivel de significación del 5% ($p < 0,05$). Cuando se analizaron más de dos tratamientos (two-way ANOVA), y se observaron diferencias significativas, se utilizó el método de Scheffé para realizar comparaciones múltiples entre tratamientos con un nivel de significación del 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS



RESULTADOS

1. Bacteriofagos

1.1. Aislamiento de bacteriofagos

Se obtuvo un total de 6 bacteriofagos aislados desde materia fecal humana de composición diarreica utilizando la cepa DH5 α como cepa receptora. Los fagos aislados se sometieron a un proceso de purificación hasta obtener una morfología homogénea de placas de lisis. Posteriormente se obtuvieron stocks concentrados de cada uno mediante precipitación con PEG8000 y se almacenaron a 4°C. Los stocks de bacteriofagos puros se detallan en la Tabla 4.

Tabla 4. Bacteriofagos aislados

Nombre del stock fágico	Origen del fago* – Referencia
DT1	Coprocultivo - HCR - Tomat y col., 2013
DT2	Coprocultivo - HCR
DT3	
DT4	
DT5	Coprocultivo - HCR - Tomat y col., 2013
DT6	

* HCR: Hospital Centenario de Rosario, Rosario, Santa Fe, Argentina.

1.2. Almacenamiento de bacteriofagos – estabilidad de los fagos

Los seis (6) bacteriofagos estudiados presentaron una estabilidad moderada a la temperatura de refrigeración debido a que se observaron leves disminuciones de viabilidad en los recuentos hasta los 2 meses de evaluación (Figura 9).

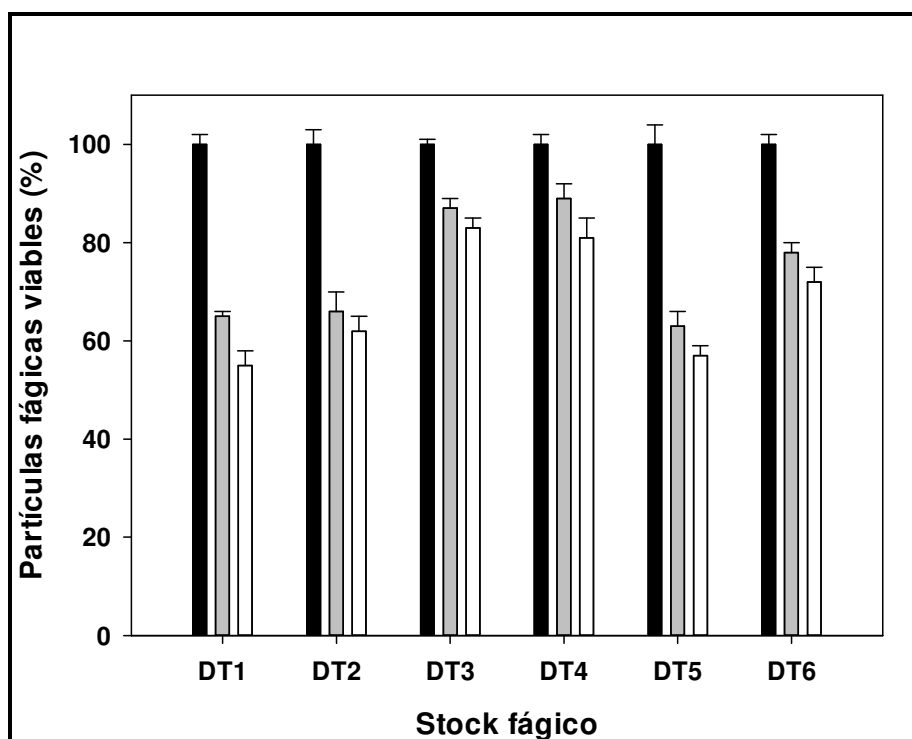


Figura 9. Viabilidad de los fagos a tiempo inicial (■), a un (1) mes (■) y a los dos (2) meses (□) en caldo Hershey-Mg durante el almacenamiento a 4°C. Los valores informados son la media de tres determinaciones con sus correspondientes barras de error.

Específicamente, después del primer mes de almacenamiento a 4°C, para los fagos DT1, DT2 y DT5 se observaron valores similares de viabilidad remanente. Los porcentajes de partículas fágicas viables estuvieron comprendidos entre el 63% y 66%, a saber 65%, 66% y 63%, respectivamente. Por otro lado, los fagos DT3, DT4 y DT6 presentaron valores de viabilidad levemente más elevados y comprendidos entre el 78% y 89% (87%, 89% y 78%, respectivamente). Al segundo mes de almacenamiento a 4°C los descensos de viabilidad de las partículas fágicas fueron menores respecto del primero para todos los stocks fágicos evaluados, manteniendo su capacidad infectiva el 55% (DT1), 62% (DT2) y 57% (DT5), mientras que los fagos DT3, DT4 y DT6 mostraron disminuciones similares a los tres primeros aunque valores de viabilidad comprendidos entre el 72% y 83%, a saber 83%, 81% y 72%, respectivamente.

2. Caracterización de bacteriofagos

2.1. Determinación de presencia de genes de patogenicidad por PCR

Para todos los fagos en estudio, se analizó la presencia de bandas con el tamaño esperado para los productos de amplificación de cada uno de los factores de patogenicidad. Todos los fagos estudiados resultaron negativos para la amplificación de los genes *stx1*, *stx2*, *eaeA*, *LT1* y *ST1* (Figura 10). Las líneas 5, 6 y 11 corresponden a la siembra de los controles positivos, ATCC43895 (*stx1*, *stx2*, *eaeA*), ATCC35401 (*LT1* y *ST1*) y ATCC43895 (*stx1*, *stx2*, *eaeA*), respectivamente, donde se observan las bandas correspondientes al producto de cada gen amplificado. La línea 9 corresponde al control negativo *E. coli* HB101, mientras que las líneas 1, 2, 3, 4, 7 y 8 demuestran la ausencia de amplificación para todos los factores de patogenicidad evaluados en los fagos DT1, DT2, DT3, DT4, DT5 y DT6, respectivamente.



Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa (3%) de los productos de amplificación para la búsqueda de *stx1*, *stx2*, *eaeA*, *LT1* y *ST1*. Línea 1: fago DT1; línea 2: fago DT2; línea 3: fago DT3; línea 4: fago DT4; línea 5: *E. coli* ATCC43895 (control positivo); línea 6: *E. coli* ATCC35401 (control positivo); línea 7: fago DT5; línea 8: fago DT6; línea 9: *E. coli* HB101 (control negativo); línea 11: *E. coli* ATCC43895 (control positivo); PM: marcador de peso molecular de 1 kb.

2.2. Microscopía electrónica

Se obtuvieron micrografías electrónicas de los seis (6) stocks fágicos estudiados, sin embargo, solo se pudo obtener imágenes claras de dos de ellos, correspondientes a los fagos DT1 y DT6.

Las micrografías electrónicas permitieron inferir que los bacteriofagos estudiados pertenecen, taxonómicamente, al tipo T-pares de la familia *Myoviridae* de acuerdo al International Committee on Taxonomy of Viruses (2009). Los fagos DT1 y DT6 presentan cabezas icosaédricas y colas contráctiles características de este tipo de viriones (Figura 11). Las dimensiones de los bacteriofagos DT1 (Figura 11A) y DT6 (Figura 11B) se detallan en la Tabla 5.

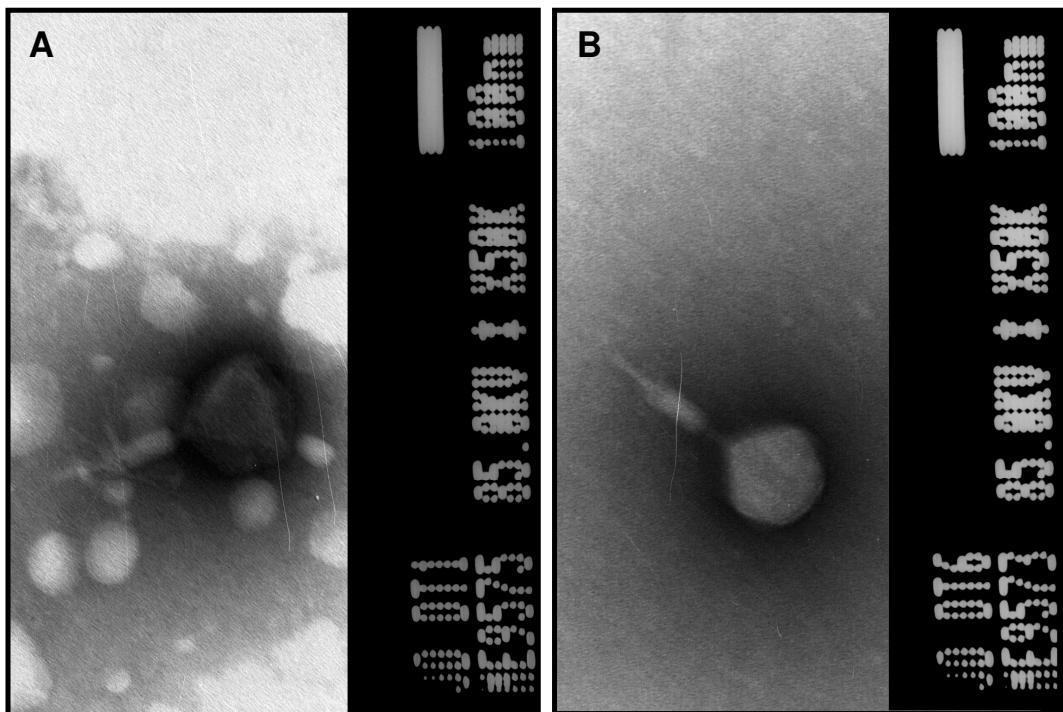


Figura 11: Micrografías electrónicas de los bacteriofagos DT1 (A) y DT6 (B) teñidos negativamente con ácido fosfotúngstico (2%). Las barras representan 100 nm.

Tabla 5. Dimensiones de los bacteriofagos DT1 y DT6. Los valores informados son la media de diez (10) determinaciones \pm desviación estándar.

Bacteriofago	Cápside (nm)	Cola		Total (nm)
		Longitud (nm)	Diámetro (nm)	
DT1	89,3 \pm 2,2	127,8 \pm 2,3	20,8 \pm 1,0	217,1 \pm 4,3
DT6	82,1 \pm 1,5	125,7 \pm 2,0	17,7 \pm 2,1	207,8 \pm 3,1

2.3. Influencia de parámetros fisicoquímicos sobre la actividad lítica

2.3.1. Influencia del NaCl

Los fagos evaluados mostraron valores similares de actividad lítica en los sistemas fago/cepa estudiados en el rango de 0,3% a 4% de NaCl. En la Figura 12 se detalla el porcentaje de partículas fágicas viables remanentes luego de cada tratamiento respecto de las condiciones estándar del medio de cultivo (0,3%). A concentraciones de 2% de NaCl, el fago DT1 [DT5 para STEC no-O157 ARG4827 (75)] presentó un recuento fágico promedio del 85,9% mostrando un valor superior en el sistema DT1/EPEC920 (18) del 93,0%, mientras que con el fago DT6 se obtuvieron valores de 87,3% (DH5 α), 78,5% (EPEC920), 96,6% (STEC no-O157 ARG4827) y 86,5% (STEC464 O157:H7, 79).

Cuando la concentración de NaCl fue 4%, ambos fagos exhibieron un recuento cercano o superior al 50% en la mayoría de los casos. Específicamente, el porcentaje obtenido para los sistemas DT1/DH5 α , DT1/EPEC920, DT5/STEC no-O157 ARG4827 y DT1/STEC464 O157:H7 fueron 50,6%, 58,8%, 56,5% y 61,6%, respectivamente. Para el fago DT6, si bien se obtuvo el mayor porcentaje de recuento fágico, a saber 72,0% para STEC464 O157:H7, también se observó el menor, siendo de 42,4% para la cepa DH5 α , mientras que para las cepas EPEC920 y STEC no-O157 ARG4827 se obtuvieron valores de 60,8% y 55,2%, respectivamente.

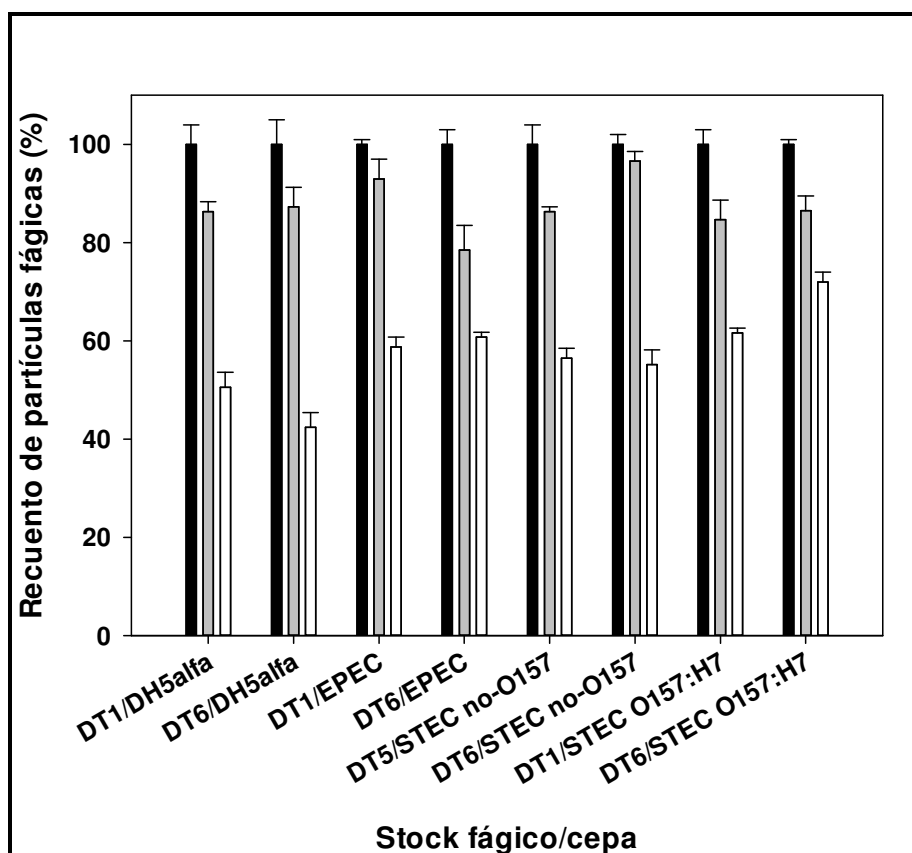


Figura 12. Actividad lítica a distintas concentraciones de NaCl, 0,3% (■) (control), 2% (■) y 4% (□), para los sistemas fago/cepa evaluados. Los valores que se informan son la media de tres determinaciones con sus correspondientes barras de error.

2.3.2. Influencia del pH

La Figura 13 muestra que la actividad lítica de los fagos evaluados fue menor tanto a pH 5,7 como 4,5, respecto de condiciones control (pH 7,5). El único caso en que se observó una actividad elevada, obteniéndose un recuento del 95,0%, fue en el sistema DT5/STEC no-O157 ARG4827.

A pH 5,7 y para el fago DT1, se observaron porcentajes de recuentos del 22,3% (DH5 α), 52,1% (EPEC920) y 29,5% (STEC464 O157:H7). Los valores obtenidos para el fago DT6 fueron 32,9%, 65,8%, 42,6% y 61,2% para las cepas DH5 α , EPEC920, STEC no-O157 ARG4827 y STEC464 O157:H7, respectivamente.

A pH 4,5 los porcentajes obtenidos para los fagos evaluados fueron menores al 10% y oscilaron entre el 3,0% y 8,8%. A saber para cada uno de los sistemas

individuales: DT1/DH5 α = 7,4%, DT1/EPEC920 = 5,2%, DT5/STEC no-O157 ARG4827 = 7,1% y DT1/STEC464 O157:H7 = 5,9%. DT6/DH5 α = 6,3%, DT6/EPEC920 = 8,8%, DT6/STEC no-O157 ARG4827 = 3,0% y DT6/STEC464 O157:H7 = 7,1%.

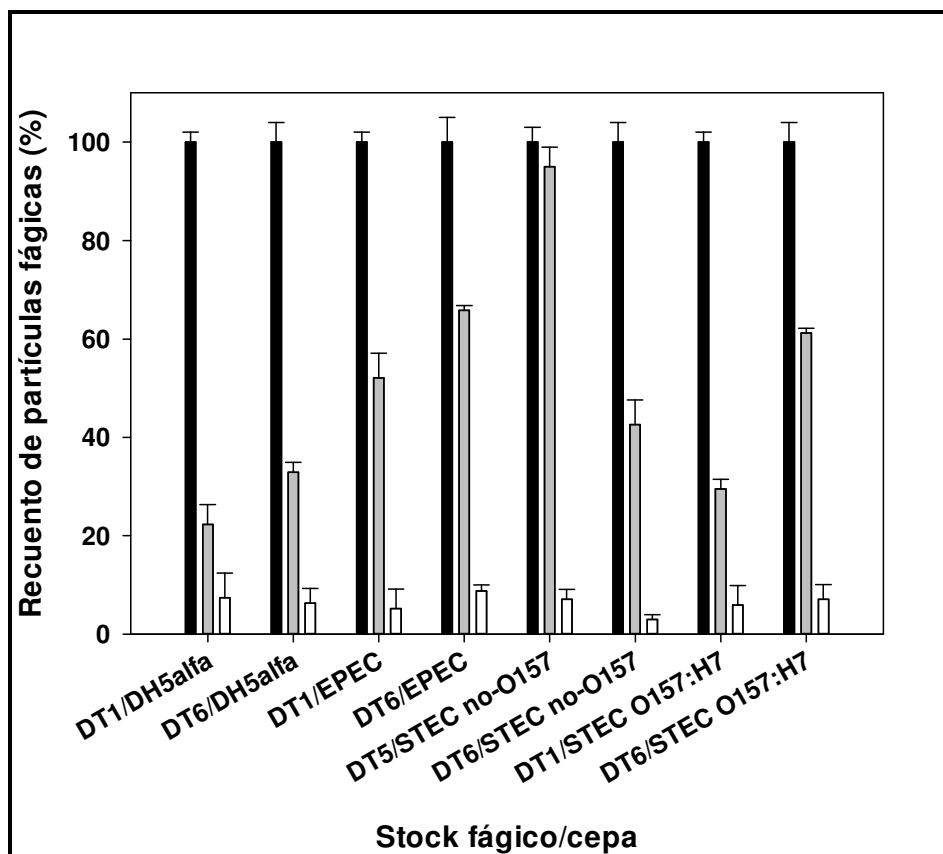


Figura 13. Actividad lítica a distintos pH, 7,5 (■) (control), 5,7 (■) y 4,5 (□), para los sistemas fago/cepa evaluados. Los valores que se muestran son la media de tres determinaciones con sus correspondientes barras de error.

2.3.3. Influencia de la temperatura

Los fagos evaluados mostraron una actividad lítica muy reducida cuando se trabajó a 4°C mientras que a 50°C la reducción fue moderada para todos los sistemas evaluados, siempre en comparación a lo observado a 37°C (condiciones control).

Específicamente, a 4°C y para el fago DT1 se observaron porcentajes de actividad de 20,2%, 14,8% y 16,2% para las cepas DH5 α , EPEC920 (18) y STEC464 O157:H7 (79), respectivamente. Para el fago DT5 fue de 11,8% (STEC no-O157

ARG4827, 75) mientras que los sistemas DT6/DH5 α , DT6/EPEC920, DT6/STEC no-O157 ARG4827 y DT6/STEC464 O157:H7 presentaron porcentajes de 15,1%, 15,2%, 5,0% y 17,3%, respectivamente.

A 50°C, se observó un 95,7% (DT1/DH5 α), 87,3% (DT1/EPEC920), 70,8% (DT5/STEC no-O157 ARG4827) y 82,9% (DT1/STEC464 O157:H7) de actividad lítica. El sistema fago/cepa DT6/DH5 α presentó el mayor porcentaje de actividad de todos los sistemas evaluados, a saber 96,5%, mientras que la actividad para el resto fue de 93,1%, 88,0% y 78,9% para los sistemas DT6/EPEC920, DT6/STEC no-O157 ARG4827 y DT6/STEC464 O157:H7, respectivamente (Figura 14).

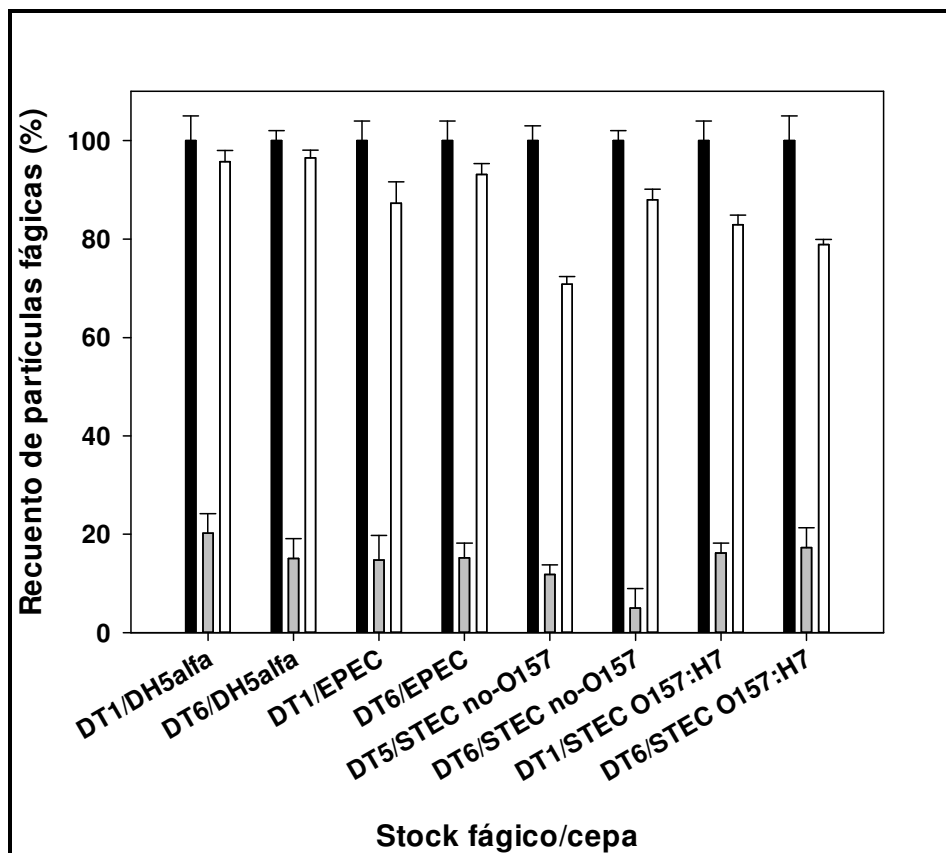


Figura 14. Actividad lítica a distintas temperaturas, 37°C (■) (control), 4°C (■) y 50°C (□), para los sistemas fago/cepa evaluados. Los valores que se muestran son la media de tres determinaciones con sus correspondientes barras de error.

3. Interacción de *Escherichia coli* con bacteriofagos

3.1. Rango de hospedadores: spot test - doble capa

Para establecer el rango de hospedador de los fagos, se determinó su carácter lítico sobre las cepas bacterianas que se detallaron en la Tabla 2 (Materiales y Métodos, sección 1.1), mediante las técnicas de Spot test y doble capa de agar.

Los rangos de hospedador más amplios se obtuvieron para los fagos DT3, DT4 y DT6, los cuales presentaron un efecto lítico en 16, 15 y 16 cepas, respectivamente, de distintos serogrupos de *E. coli* (O8, O18 y O157), mientras que los fagos DT1, DT2 y DT5 presentaron un rango de hospedador más estrecho, mostrando una actividad lítica frente a 6, 7 y 7 cepas, respectivamente, de *E. coli* de los serogrupos O18 y O157.

Las cepas no patógenas de *E. coli* y las cepas bacterianas no-*E. coli* fueron resistentes a la acción lítica de todos los fagos evaluados. En la Tabla 6 se detallan las cepas bacterianas que resultaron sensibles a uno o más de los stocks de bacteriofagos evaluados.

Tabla 6. Rango de hospedadores de los stocks de fagos evaluados.

Stock fágico	Cepas de <i>E. coli</i> sensibles (número de cepario)	Número total de cepas sensibles
DT1	2 EPEC (<u>18</u> , <u>77</u>); 1 STEC O157:H7 (<u>79</u>); 1 STEC no-O157 (<u>59</u>); 2 UDEC (<u>101</u> , <u>102</u>)	6
DT2	4 STEC O157:H7 (<u>27</u> , <u>47</u> , <u>70</u> , <u>79</u>); 1 STEC no-O157 (<u>75</u>); 2 UDEC (<u>101</u> , <u>102</u>)	7
DT3	2 EPEC (<u>18</u> , <u>77</u>); 6 STEC O157:H7 (<u>27</u> , <u>47</u> , <u>61</u> , <u>68</u> , <u>70</u> , <u>79</u>); 4 STEC no-O157 (<u>59</u> , <u>64</u> , <u>66</u> , <u>75</u>); 3 UDEC (<u>49</u> , <u>101</u> , <u>102</u>); 1 UPEC (<u>100</u>)	16
DT4	2 EPEC (<u>18</u> , <u>77</u>); 6 STEC O157:H7 (<u>27</u> , <u>47</u> , <u>61</u> , <u>68</u> , <u>70</u> , <u>79</u>); 4 STEC no-O157 (<u>59</u> , <u>64</u> , <u>66</u> , <u>75</u>); 2 UDEC (<u>101</u> , <u>102</u>); 1 UPEC (<u>100</u>)	15
DT5	4 STEC O157:H7 (<u>27</u> , <u>47</u> , <u>70</u> , <u>79</u>); 1 STEC no-O157 (<u>75</u>); 2 UDEC (<u>101</u> , <u>102</u>)	7
DT6	4 EPEC (<u>18</u> , <u>46</u> , <u>58</u> , <u>77</u>); 6 STEC O157:H7 (<u>27</u> , <u>47</u> , <u>61</u> , <u>68</u> , <u>70</u> , <u>79</u>); 3 STEC no-O157 (<u>59</u> , <u>66</u> , <u>75</u>); 2 UDEC (<u>101</u> , <u>102</u>); 1 UPEC (<u>100</u>)	16

EPEC: *E. coli* enteropatógena; STEC O157:H7: *E. coli* O157:H7 shigatoxigénica, STEC no-O157: *E. coli* no-O157 shigatoxigénica, UDEC: *E. coli* diarreogénica no-caracterizada, UPEC: *E. coli* uropatógena. El número que precede la descripción del virotipo indica el número de cepas que resultaron sensibles en cada caso.

3.2. Determinación del tiempo y número de eclosión

Las curvas de crecimiento en un solo paso para los fagos DT1 y DT6 se observan en la Figura 15. A partir de la misma, se estimaron los parámetros de multiplicación fágica.

Ambos fagos presentaron valores de número de eclosión (**b**; ecuación de Wang; Materiales y Métodos, sección 4.2) medianamente bajos. El fago DT1 presentó un valor de $\mathbf{b} = 5,42 \times 10^8 / 7,10 \times 10^6 = 76$, mientras que para el fago DT6 el mismo fue de 59 ($\mathbf{b} = 4,92 \times 10^8 / 8,40 \times 10^6$). A partir de las curvas de crecimiento de los bacteriofagos se determinaron los tiempos de eclosión de ambos fagos y se encontró que tanto el fago DT1 como el DT6 presentaron un valor aproximado de 33 min.

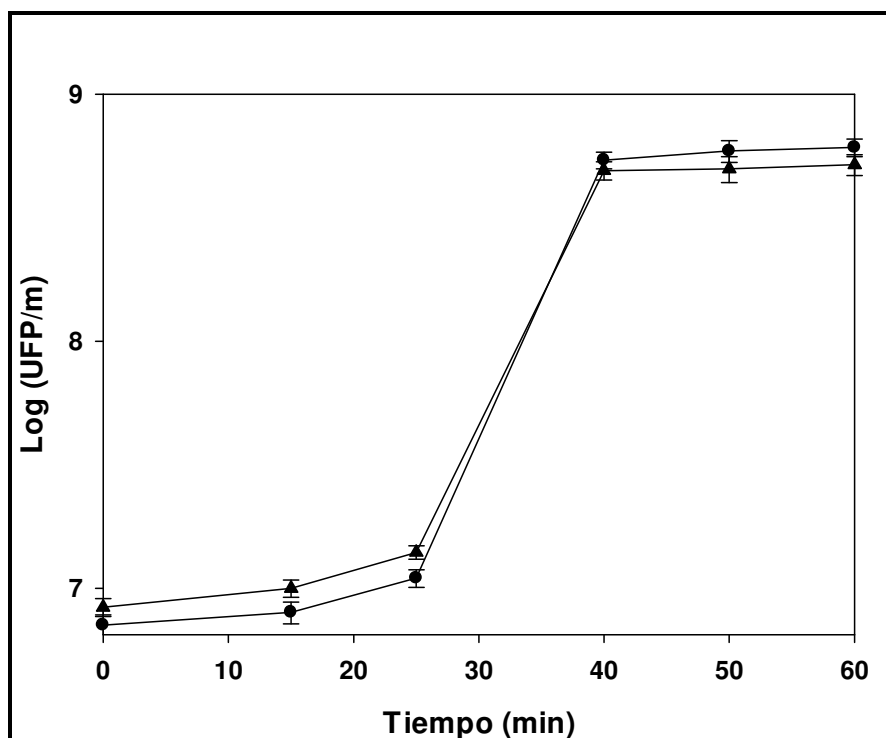


Figura 15. Curva de crecimiento en un paso para los fagos DT1 (●) y DT6 (▲) sobre la cepa de *E. coli* DH5α a 37°C. Los valores informados son la media de tres determinaciones \pm desviación estándar.

3.3. Eficiencia de plaqueo (EOP)

Los títulos fágicos fueron determinados en la cepa DH5 α para setear el 100% de eficiencia de plaqueo para cada uno de los bacteriofagos evaluados.

Cuando los fagos se ensayaron sobre las demás cepas, se obtuvieron títulos fágicos inferiores a los observados sobre la cepa de referencia (Tabla 7). Específicamente, los sistemas DT1/EPEC920, DT1/STEC464 O157:H7 y DT5/STEC no-O157 ARG4827 presentaron los menores valores de EOP, siendo éstos de 24,3%; 21,0% y 5,7%, respectivamente. El fago DT6 evidenció valores de EOP similares a la cepa de referencia, a saber 97,6% para la cepa STEC464 O157:H7 y 79,7% para la cepa STEC no-O157 ARG4827, con la excepción de la cepa EPEC920 la cual mostró una EOP del 10,7%.

Tabla 7. Eficiencia de plaqueo de los bacteriofagos en cepas patógenas de *E. coli*.

Bacteriofago	Cepa	* EOP (%)
DT1	EPEC920 (18)	24,3 \pm 3,1
	STEC464 O157:H7 (79)	21,0 \pm 5,8
DT5	STEC no-O157 ARG4827 (75)	5,7 \pm 3,8
DT6	EPEC920 (18)	10,7 \pm 6,8
	STEC464 O157:H7 (79)	97,6 \pm 11,2
	STEC no-O157 ARG4827 (75)	79,7 \pm 16,5

* Los valores porcentuales están referidos a la cepa de referencia *E. coli* DH5 α . Los valores que se informan son la media de tres determinaciones \pm desviación estándar.

3.4. Estudio de la naturaleza de los receptores fágicos

3.4.1. Ensayos de adsorción fágica - efecto del peryodato y de la proteinasa K sobre la adsorción fágica

La adsorción de ambos fagos sobre la cepa *E. coli* EPEC920 fue influenciada por la acción del peryodato mientras que el tratamiento con proteinasa K no redujo la capacidad de adsorción de los dos fagos evaluados sobre las células bacterianas.

Se analizaron controles sin tratamiento, donde se evaluó la adsorción de cada fago por separado sobre las bacterias en CTS, y se descartó la influencia de la matriz sobre la adsorción fágica al comparar con los controles correspondientes, a saber Buffer sin peryodato y Control sin proteinasa K.

Específicamente, cuando se trataron células de *E. coli* EPEC920 con peryodato de sodio (1 mM), se encontró el 86,2% y el 49% de los fagos DT1 y DT6 remanentes en el sobrenadante (fagos no adsorbidos), respectivamente. Por el contrario, cuando se realizó el tratamiento con proteinasa K no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de fagos libres en el sobrenadante, a saber 15,5% para DT1 y 13,0% para DT6, respecto de los controles, 8,9% y 7,3%, respectivamente (Figura 16).

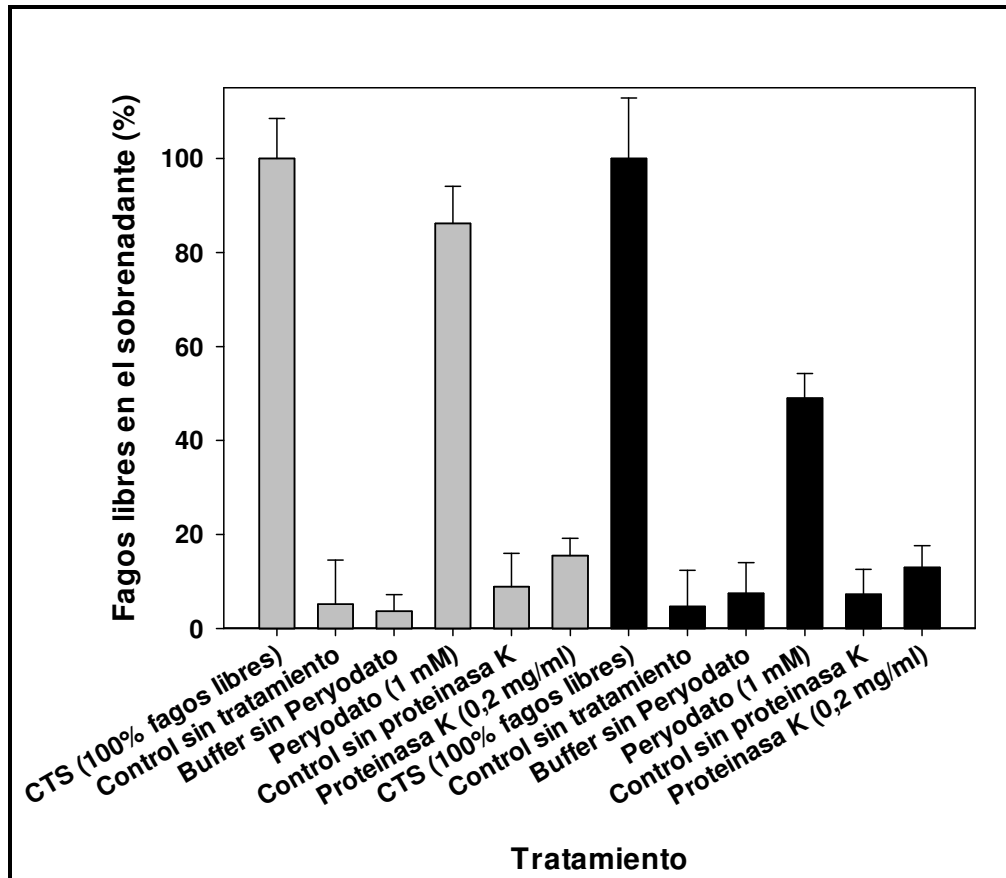


Figura 16. Efecto de distintos tratamientos sobre la adsorción (CTS, 37°C, 5 min) de los fagos DT1 (■) y DT6 (■) sobre *E. coli* EPEC920 (18).

Para la adsorción del fago DT6 sobre células de *E. coli* STEC no-O157 ARG4827, tratadas tanto con peryodato como con proteinasa K, se obtuvieron resultados similares a los detallados para *E. coli* EPEC920, observándose 50,6% y 11,2% de fagos no adsorbidos, respectivamente. Por otro lado, el fago DT5 presentó valores de adsorción que no fueron significativamente diferentes al control en el caso

del tratamiento con la proteinasa K mientras que la adsorción fue nula después del tratamiento con peryodato (1 mM) (Figura 17).

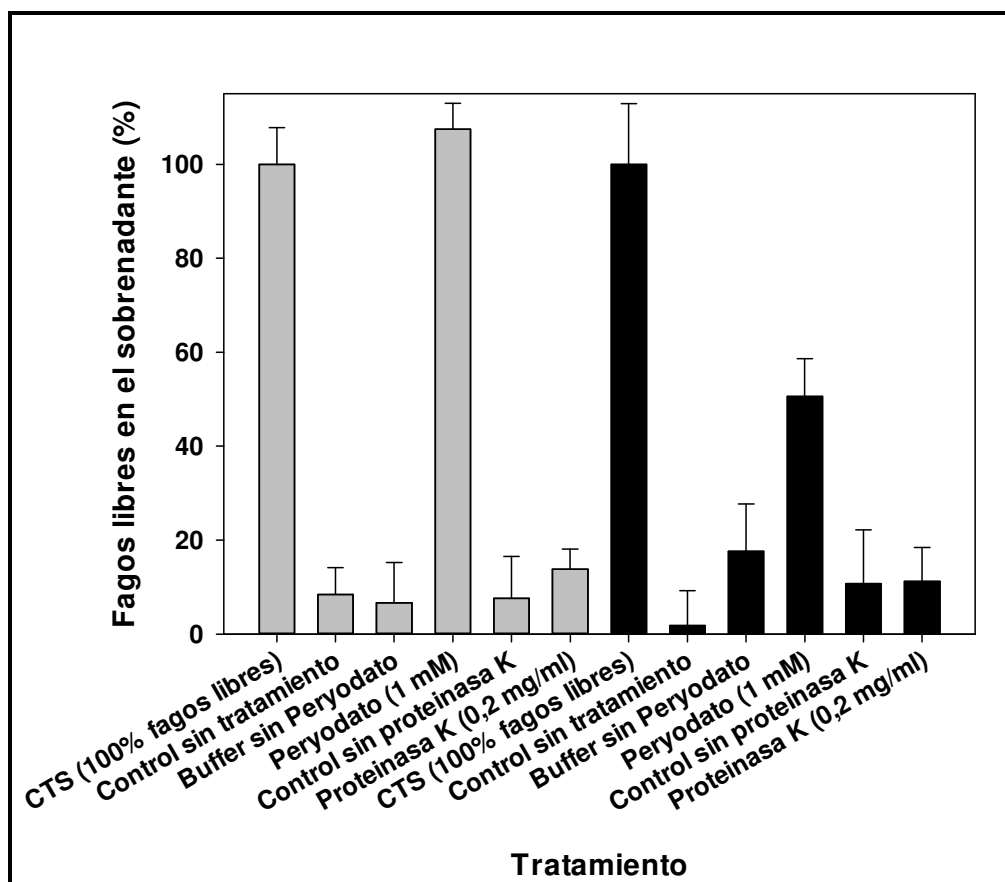


Figura 17. Efecto de distintos tratamientos sobre la adsorción (CTS, 37°C, 5 min) de los fagos DT5 (■) y DT6 (■) sobre *E. coli* STEC no-O157 ARG4827 (75).

Respecto de la adsorción de DT1 y DT6 sobre la cepa *E. coli* STEC464 O157:H7, se observaron tasas de adsorción que presentaron diferencias significativas respecto del control (buffer sin peryodato), cuando las células fueron tratada con peryodato. El fago DT1 presentó una tasa de adsorción del 20,7%, comparado con el 92,2% para el control. De manera similar, el fago DT6 presentó valores de adsorción del 16,7%, mostrando diferencias significativas con el control el cual alcanzó tasas de adsorción del 96,7%.

Los porcentajes de adsorción de ambos fagos luego de tratar las células de *E. coli* STEC464 O157:H7 con proteinasa K no mostraron diferencias significativas

respecto del control sin el agregado de proteinasa K, observándose valores de adsorción del 93,1% y 86,7% para DT1 y DT6, respectivamente (Figura 18).

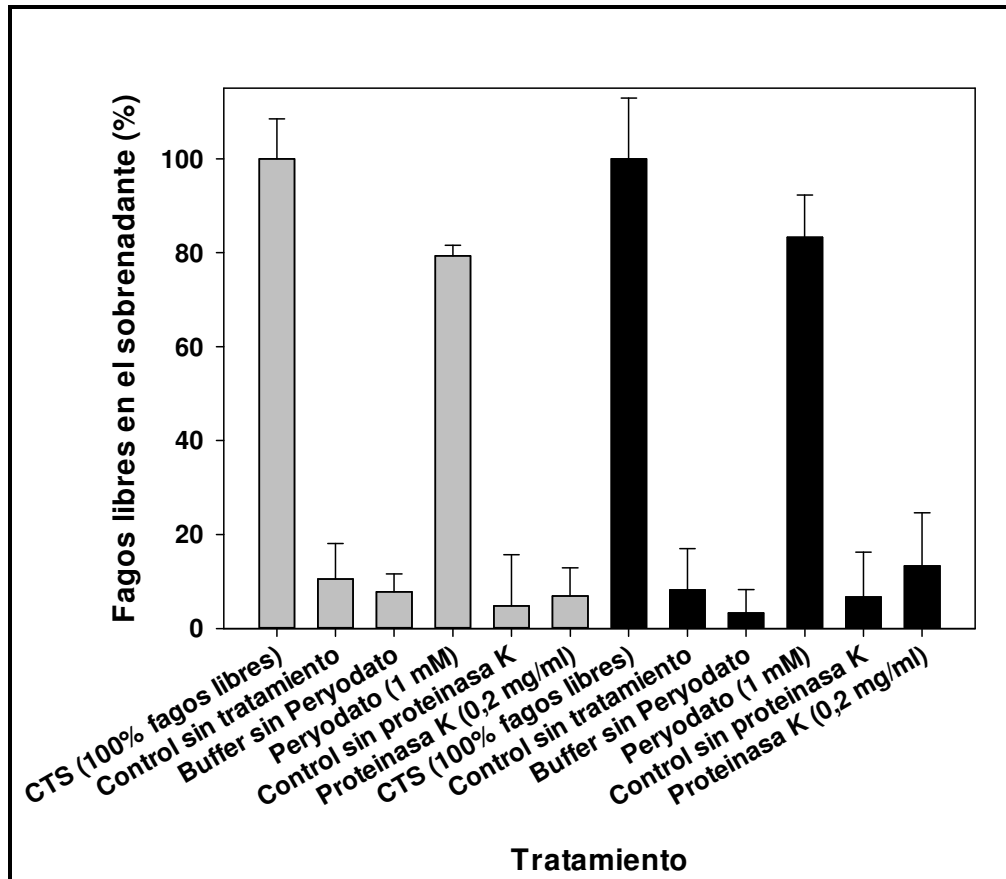


Figura 18. Efecto de distintos tratamientos sobre la adsorción (CTS, 37°C, 5 min) de los fagos DT1 (■) y DT6 (■) sobre *E. coli* STEC464 O157:H7 (79).

En la Tabla 8 se detallan los porcentajes de adsorción para los distintos tratamientos aplicados a los sistemas cepa/fago evaluados.

Tabla 8. Tasas de adsorción (CTS, 37°C, 5 min) de los fagos DT1 y DT6 sobre células de *E. coli* tratadas químicamente. Los valores son la media de tres determinaciones \pm desviación estándar.

Tratamiento	Adsorción fágica (%) sobre cepas de <i>E. coli</i>					
	EPEC920 (<u>18</u>)		STEC no-O157 (<u>75</u>)		STEC O157:H7 (<u>79</u>)	
	DT1	DT6	DT5	DT6	DT1	DT6
Control sin tratamiento	94,8 \pm 9,4	95,3 \pm 7,7	91,6 \pm 5,7	98,2 \pm 7,4	89,5 \pm 7,6	91,8 \pm 8,8
Buffer sin peryodato	96,3 \pm 3,5	92,5 \pm 6,5	93,4 \pm 8,6	82,4 \pm 10,1	92,2 \pm 3,8	96,7 \pm 5,0
Peryodato (1 mM)	13,8 \pm 7,9	51,0 \pm 5,3	0,0 \pm 5,5	49,4 \pm 8,0	20,7 \pm 2,3	16,7 \pm 9,0
Control sin Prot. K	91,1 \pm 7,1	92,7 \pm 5,3	92,4 \pm 8,9	89,3 \pm 11,5	95,2 \pm 10,9	93,3 \pm 9,5
Proteinasa K (0,2 mg/ml)	84,5 \pm 3,7	87,0 \pm 4,6	86,2 \pm 4,3	88,8 \pm 7,2	93,1 \pm 6,0	86,7 \pm 11,3

4. In Vitro Challenge tests

4.1. Challenge con fagos individuales y con cóctel de fagos

Tanto con fagos individuales como con el cóctel, a saber DT1 + DT6 para *E. coli* EPEC920 (18) y STEC464 O157:H7 (79) y DT5 + DT6 para *E. coli* STEC no-O157 ARG4827 (75), se obtuvieron reducciones significativas de células viables, respecto de los controles sin fagos, para todas las cepas evaluadas (Tabla 9). Cuando se ensayó la cepa *E. coli* DH5 α se obtuvieron reducciones desde 2,04 a 5,55 log, siendo el cóctel el tratamiento con el que se obtuvo mayor reducción a 2 y 24 h (5,55 y 2,29 log, respectivamente), mientras que el DT1 fue más efectivo a tiempos intermedios (5,21 log a 6 h).

Para *E. coli* EPEC920, los fagos individuales fueron más efectivos en reducir la población bacteriana que la mezcla de ellos, obteniéndose las mayores reducciones para DT6 a 2 (5,51 log) y 6 h (5,23 log), mientras que a 24 h, la mayor reducción se obtuvo con DT1, a saber 1,50 log.

La cepa *E. coli* STEC no-O157 ARG4827 fue la más sensible a la acción lítica, tanto de los fagos individuales como formando parte de un cóctel. Se obtuvieron valores máximos de reducción de hasta 6,38 log, sin embargo, a las 24 h de incubación también fue una de las menos afectadas (0,55 log).

Al evaluar los valores de biocontrol para *E. coli* STEC464 O157:H7, se alcanzaron reducciones intermedias de 3,88 log (2 h) con DT6, elevadas hasta 5,23 log (6 h) y bajas de 1,99 log (24 h), las dos últimas con el cóctel.

Tabla 9. Reducción logarítmica en el número de células viables de *E. coli* después del tratamiento fágico *in vitro* a 37°C, con los fagos DT1 (DT5 para ARG4827) y DT6, ya sea individualmente o como cóctel.

Cepa sensible de <i>E. coli</i>	Condiciones del ensayo		Reducción logarítmica ^b de células viables de <i>E. coli</i> ^a después del tiempo de incubación (h)		
	Fagos	MOI	2	6	24
DH5α	DT1	4,6x10 ²	3,37±0,40	5,21±0,67	2,04±0,28
	DT6	4,2x10 ²	3,85±0,55	4,36±0,66	2,09±0,43
	Cóctel	4,4x10 ²	5,55±0,29	4,43±0,54	2,29±0,23
EPEC920	DT1	8,6x10 ¹	3,33±0,16	4,73±0,27	1,50±0,24
	DT6	7,8x10 ¹	5,51±0,42	5,23±0,25	1,16±0,22
	Cóctel	8,2x10 ¹	3,98±0,34	5,00±0,23	1,38±0,31
STEC no-O157 (ARG4827)	DT5	2,9x10 ²	4,54±0,30	5,19±0,38	0,55±0,16
	DT6	2,6x10 ²	6,34±0,47	5,14±0,82	1,09±0,20
	Cóctel	3,0x10 ²	6,38±0,43	5,53±0,31	1,72±0,43
STEC464 O157:H7	DT1	1,4x10 ²	3,32±0,15	4,37±0,31	NS
	DT6	1,3x10 ²	3,88±0,39	3,78±0,17	0,53±0,39
	Cóctel	1,4x10 ²	3,63±0,32	5,23±0,45	1,99±0,40

MOI: multiplicidad de infección; NS: no significativo: valores medios de muestras tratadas y controles no significativamente diferentes a $p = 0,05$. ^a Reducción logarítmica en células viables de *E. coli* respecto del control libre de fagos. ^b Valor medio de tres determinaciones ± desviación estándar.

En la Figura 19 se muestran las curvas de muerte de las cepas de *E. coli* evaluadas frente a los distintos tratamientos de biocontrol. Se puede observar una acción lítica efectiva de los fagos a tiempos cortos de muestreo (2 y 6 h), por otra parte, a las 24 h de incubación se observó un recrecimiento de las células en todos los sistemas evaluados. Esto llevó a obtener, para todos los casos, los menores valores de reducción bacteriana en los tiempos largos de muestreo (Tabla 9). Sin embargo, el cóctel fue el

tratamiento que mostró mayor actividad lítica a las 24 h en todos los sistemas, mostrando diferencias significativas con los demás tratamientos solamente en las cepas *E. coli* STEC no-O157 ARG4827 (Figura 19C) y *E. coli* STEC464 O157:H7 (Figura 19D).

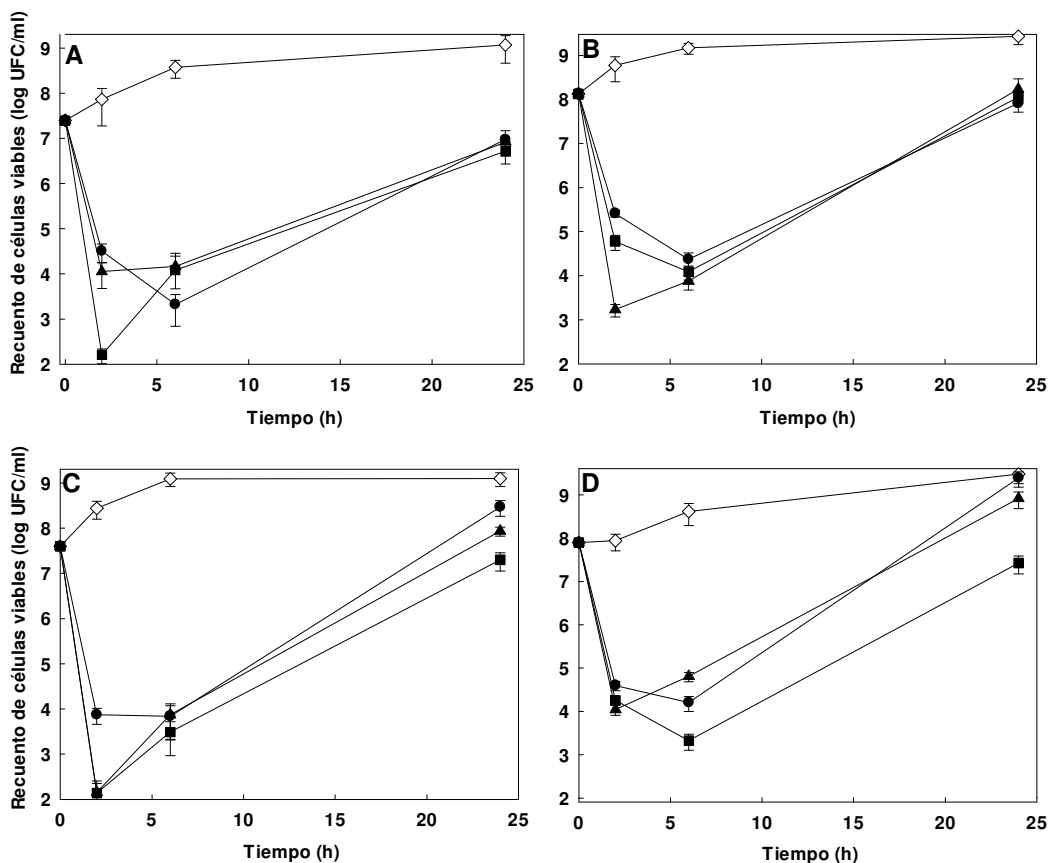


Figura 19. Evolución del recuento de células viables de *E. coli* (UFC/ml) en ausencia (◇) y presencia del fago DT1 (DT5 para ARG4827) (●), DT6 (▲) y el cóctel (■) durante los challenge test. *E. coli* DH5α (A), *E. coli* EPEC 920 (18) (B), *E. coli* STEC no-O157 ARG4827 (75) (C), *E. coli* STEC464 O157:H7 (79) (D). Se informan valores medios de dos determinaciones (por duplicado) ± desviación estándar.

La diferencia de eficacia en los distintos tratamientos, DT1 (DT5 para ARG4827), DT6 y cóctel, se ve reflejada en la Tabla 10. En la parte superior de cada sistema se muestran los tratamientos que provocaron la menor reducción de células viables. En muchos de los sistemas se observó que el cóctel produjo la mayor reducción

de células viables diferenciándose significativamente de los tratamientos con los fagos individuales, sin embargo, hubo algunas excepciones.

Específicamente, en los sistemas fago/*E. coli* EPEC920, a tiempos cortos de incubación (2 y 6 h) se observó una mayor eficiencia del fago DT6 diferenciándose significativamente del cóctel solo a las 2 h de incubación. Si bien a 24 h con DT1 se obtuvo una mayor reducción de células viables, esta diferencia no fue significativa. En los sistemas con la cepa *E. coli* DH5 α el tratamiento más eficaz a las 6 h fue DT1, presentando diferencias significativas con DT6 y el cóctel. Para la cepa *E. coli* STEC464 O157:H7 se obtuvo el menor recuento de células viables con DT6 a las 2 h de incubación, sin embargo, no mostró diferencias significativas con el cóctel. Además, para los sistemas fago/ *E. coli* DH5 α a las 24 h y fago/ *E. coli* STEC no-O157 ARG4827 a 6 h de incubación, el cóctel no presentó diferencias significativas respecto de los otros dos, es decir, los tres tratamientos fueron igualmente eficaces, mientras que en el sistema fago/ *E. coli* STEC no-O157 ARG4827 a 2 h de incubación, el cóctel fue tan eficaz como el tratamiento con DT6, diferenciándose significativamente solo de DT5.

Tabla 10. Comparación múltiple entre tratamientos.

Cepa de <i>E. coli</i>	Tiempo de Incubación (h)					
	2		6		24	
DH5 α	Control	◇	Control	◇	Control	◇
	DT1	●	DT6	▲	DT1	●
	DT6	▲	Cóctel	■	DT6	▲
	Cóctel	■	DT1	●	Cóctel	■
EPEC920	Control	◇	Control	◇	Control	◇
	DT1	●	DT1	●	DT6	▲
	Cóctel	■	Cóctel	■	Cóctel	■ ■
	DT6	▲	DT6	▲	DT1	●
STEC no-O157 (ARG4827)	Control	◇	Control	◇	Control	◇
	DT5	●	DT6	▲	DT5	●
	DT6	▲	DT5	●	DT6	▲
	Cóctel	■	Cóctel	■	Cóctel	■
STEC464 O157:H7	Control	◇	Control	◇	Control	◇
	DT1	●	DT6	▲	DT1	●
	Cóctel	■	DT1	●	DT6	▲
	DT6	▲	Cóctel	■	Cóctel	■

Los tratamientos fágicos están ordenados de acuerdo al promedio de recuentos de células viables en forma decreciente desde arriba hacia abajo. Los símbolos alineados

en una misma columna indican que los valores medios entre tratamientos fágicos no son significativamente diferentes a un nivel de significación del 5%.

Se realizaron ensayos de biocontrol *in vitro* (challenge test) a temperaturas de refrigeración (4°C) para todos los sistemas evaluados anteriormente a 37°C. Si bien en la mayoría de los casos se obtuvieron reducciones significativas, éstas fueron pequeñas. Se observó una reducción en promedio para todas las cepas evaluadas cercana a 1,1 log (2 h), 2,8 log (6 h) y 1,5 log (24 h). Adicionalmente, se obtuvieron reducciones de hasta 3,79 log utilizando la mezcla de ambos fagos (cóctel) y valores de reducción comparables a ambas temperaturas a las 24 h de incubación (Tabla 11).

Tabla 11. Reducción logarítmica en el número de células viables de *E. coli* después del tratamiento fágico *in vitro* (challenge test) a 4°C, con los fagos DT1 (DT5 para ARG4827) y DT6, ya sea individualmente o como cóctel.

Cepa sensible de <i>E. coli</i>	Condiciones del ensayo		Reducción logarítmica ^b de células viables de <i>E. coli</i> ^a después del tiempo de incubación (h)		
	Fagos	MOI	2	6	24
DH5α	DT1	1,1x10 ²	1,34±0,20	3,27±0,51	1,62±0,37
	DT6	1,2x10 ²	1,09±0,32	3,45±0,49	2,08±0,32
	Cóctel	1,1x10 ²	1,27±0,22	3,41±0,45	2,12±0,41
EPEC920	DT1	4,5x10 ¹	1,08±0,21	3,01±0,19	1,45±0,34
	DT6	5,2x10 ¹	NS	1,89±0,37	1,76±0,36
	Cóctel	4,8x10 ¹	1,05±0,27	3,79±0,54	1,64±0,32
STEC no-O157 (ARG4827)	DT5	3,1x10 ²	NS	1,61±0,35	1,68±0,26
	DT6	1,6x10 ²	1,17±0,36	3,52±0,49	2,29±0,24
	Cóctel	2,3x10 ²	1,24±0,34	3,49±0,43	1,85±0,38
STEC464 O157:H7	DT1	1,0x10 ²	1,57±0,24	1,97±0,41	1,27±0,28
	DT6	1,1x10 ²	1,20±0,31	2,29±0,28	NS
	Cóctel	1,0x10 ²	1,34±0,25	2,13±0,41	NS

MOI: multiplicidad de infección; NS: no significativo = valores medios de muestras tratadas y controles no significativamente diferentes a $p = 0,05$. ^a Reducción logarítmica en células viables de *E. coli* respecto del control libre de fagos. ^b Valor medio de tres determinaciones ± desviación estándar.

La evolución de los recuentos fágicos de partículas libres, así como totales, presentaron diferencias significativas y mostraron comportamiento similar. El recuento de bacteriofagos en los ensayos con DH5 α se mantuvo prácticamente constante (dentro del mismo orden de magnitud) a ambas temperaturas. Se observó el mismo comportamiento para la evolución en el recuento de ambos fagos para *E. coli* STEC464 O157:H7 a 4°C, mientras que a 37°C el recuento de partículas fágicas fue un orden de magnitud mayor, obteniéndose los valores más elevados a las 24 h de incubación (Figura 20).

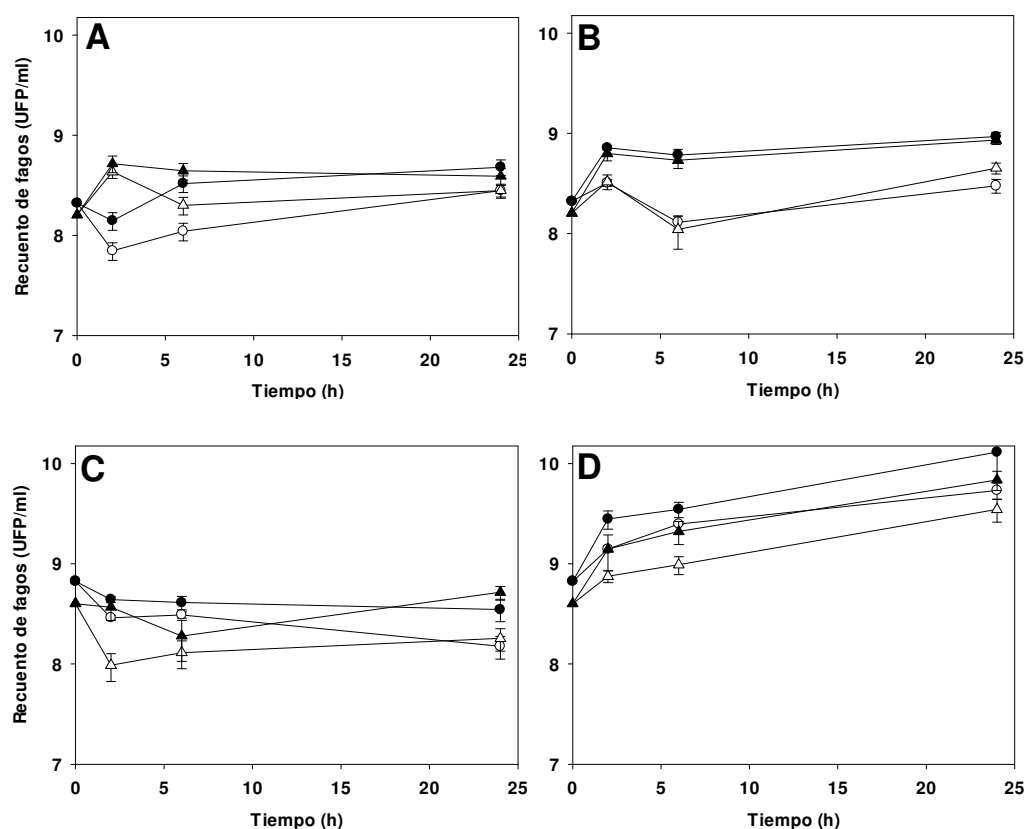


Figura 20. Evolución del recuento fágico (UFP/ml) con *E. coli* DH5 α a 4°C (A) y 37°C (B) y *E. coli* STEC464 O157:H7 (79) a 4°C (C) y 37°C (D). (DT1: ● = fago total; ○ = fago libre y DT6: ▲ = fago total; △ = fago libre). Se informan valores medios de dos determinaciones (por duplicado) \pm desviación estándar.

En la Tabla 12 se detallan los valores de recuento de partículas fágicas para cada sistema evaluado a 4 y 37°C.

Tabla 12. Evolución del título fágico en los experimentos *in vitro*.

Cepa de <i>E. coli</i>	T (°C)	Tiempo (h)	Stock fágico*			
			DT1 (UFP/ml)		DT6 (UFP/ml)	
			Libre	Total	Libre	Total
DH5α	4	2	7,0x10 ⁷	1,4x10 ⁸	4,3x10 ⁸	5,2x10 ⁸
		6	1,1x10 ⁸	3,3x10 ⁸	2,0x10 ⁸	4,4x10 ⁸
		24	2,8x10 ⁸	4,8x10 ⁸	2,8x10 ⁸	3,9x10 ⁸
	37	2	3,2x10 ⁸	7,2x10 ⁸	3,3x10 ⁸	6,3x10 ⁸
		6	1,3x10 ⁸	6,1x10 ⁸	1,1x10 ⁸	5,4x10 ⁸
		24	3,0x10 ⁸	9,3x10 ⁸	4,5x10 ⁸	8,6x10 ⁸
STEC 464 O157:H7	4	2	2,9x10 ⁸	4,4x10 ⁸	9,7x10 ⁷	3,7x10 ⁸
		6	3,1x10 ⁸	4,1x10 ⁸	1,3x10 ⁸	1,9x10 ⁸
		24	1,5x10 ⁸	3,5x10 ⁸	1,8x10 ⁸	5,2x10 ⁸
	37	2	1,4x10 ⁹	2,8x10 ⁹	7,5x10 ⁸	1,4x10 ⁹
		6	2,5x10 ⁹	3,5x10 ⁹	9,8x10 ⁸	2,1x10 ⁹
		24	5,4x10 ⁹	1,3x10 ¹⁰	3,5x10 ⁹	6,9x10 ⁹

*Título inicial (0 h) de los stocks (DT1=2,1x10⁸ UFP/ml y DT6= 1,6x10⁸ UFP/ml para *E. coli* DH5α; DT1=6,7x10⁸ UFP/ml y DT6= 4,0x10⁸ UFP/ml para *E. coli* STEC464 O157:H7).

5. Biocontrol de *Escherichia coli* sobre productos cárnicos

5.1. Biocontrol con fagos individuales

El fago con rango de hospedador estrecho (DT1) fue ensayado en las cepas *E. coli* DH5α, *E. coli* EPEC920 (18) y *E. coli* STEC464 O157:H7 (79). Se utilizó el fago DT5 en reemplazo de DT1 para la cepa *E. coli* STEC no-O157 ARG4827 (75) debido a que ésta no es sensible a DT1. Por otro lado, el fago con rango de hospedador más amplio (DT6) fue ensayado en las cuatro cepas antes mencionadas.

Se observó una disminución significativa en el recuento de células viables en la mayoría de las cepas ensayadas en comparación con el control libre de fago para ambos fagos analizados en cada caso, sin embargo, las reducciones obtenidas fueron bajas. La Tabla 13 muestra la reducción logarítmica obtenida en cada sistema fago/cepa evaluado. Cuando se evaluó el biocontrol de *E. coli* DH5α con DT1, a 5°C se observó una reducción significativa y mayor que a 24°C, además, el tratamiento a MOI alta resultó más eficaz obteniéndose reducciones de hasta 1,03 log a las 3 h de incubación. Por otro lado, cuando esta misma cepa se trató con DT6, el tratamiento más efectivo se obtuvo a 24°C utilizando una MOI alta, sin embargo, el biocontrol a 5°C a baja MOI fue más

prolongado en el tiempo (hasta las 24 h). La eficiencia de biocontrol para el sistema DT1/ *E. coli* EPEC920 resultó ser contrastante de acuerdo a la temperatura de incubación, observándose mayores valores de reducción a 5°C pero una actividad lítica más rápida y prolongada en el tiempo (24 h) a 24°C. El fago DT6 fue más efectivo cuando se trató la cepa *E. coli* EPEC920 a valores altos de MOI a 5°C. No se obtuvieron reducciones significativas cuando se trató la cepa *E. coli* STEC no-O157 ARG4827 con el fago DT5 con la excepción de una reducción de 0,52 log obtenida a las 6 h de incubación, a MOI alta, a 5°C. Para el sistema DT6/ *E. coli* STEC no-O157 ARG4827 se observaron reducciones significativas similares y bajas a ambos valores de MOI empleados a 5 y 24°C, a esta última temperatura (24°C) solo a las 3 h de incubación. Finalmente, los sistemas DT1/ *E. coli* STEC464 O157:H7 y DT6/ *E. coli* STEC464 O157:H7 mostraron los mayores valores de reducción cuando se empleó el tratamiento a MOI alta a 24°C obteniéndose valores de hasta 1,73 log de reducción.

Las mayores reducciones de células viables obtenidas por la exposición a los fagos a las temperaturas evaluadas para cada caso se obtuvieron con los siguientes fagos: DT1 para *E. coli* DH5 α a 5°C y DT6 a 24°C; DT1 para la cepa *E. coli* EPEC920 a 5 y 24°C; DT6 para *E. coli* STEC no-O157:H7 ARG4827 a 5 y 24°C y DT6 para STEC464 O157:H7 a 5°C y DT1 a 24°C. Adicionalmente cuando se compararon los resultados obtenidos entre las diferentes MOI, se observaron diferencias significativas a ambas temperaturas para la mayoría de las combinaciones fago/bacteria (Tabla 13).

Tabla 13. Reducción logarítmica de células viables de *E. coli* después del tratamiento fágico en productos cárnicos contaminados.

Stock fágico/cepa sensible de <i>E. coli</i> (número de cepario)	Condiciones del ensayo		Reducción logarítmica ^b en células viables de <i>E. coli</i> ^a después del tiempo de incubación (h)		
	T (°C)	MOI	3	6	24
DT1/DH5 α	5	4,8x10 ³	**1,03±0,16	*0,90±0,21	*0,87±0,20
	5	4,8x10 ²	NS	NS	*0,48±0,05
	24	5,3x10 ¹	*0,77±0,22	*0,50±0,11	NS
	24	5,3	NS	NS	NS
DT6/DH5 α	5	2,3x10 ³	*0,57±0,14	NC	NC
	5	2,3x10 ²	NS	NS	*0,76±0,21
	24	1,9x10 ³	*0,60±0,16	**1,50±0,22	NS
	24	1,9x10 ²	NS	*0,88±0,24	NS

	5	4,4x10 ²	NS	**0,80±0,14	NS
DT1/EPEC920	5	4,4x10 ¹	NS	**0,49±0,09	NS
(18)	24	4,8x10 ²	**0,30±0,05	NS	NS
	24	4,8x10 ¹	NS	NS	**0,46±0,08
	5	5,2x10 ²	**0,67±0,12	**0,59±0,11	*0,46±0,15
DT6/EPEC920	5	5,2x10 ¹	NS	*0,30±0,08	NS
(18)	24	6,5x10 ³	*0,32±0,09	NS	NS
	24	6,5x10 ²	NS	NS	NS
	5	9,4X10 ⁴	NS	*0,52±0,14	NS
DT5/STEC no-O157	5	9,4X10 ³	NS	NS	NS
(ARG4827)	24	1,6X10 ⁴	NS	NS	NS
(75)	24	1,6X10 ³	NS	NS	NS
	5	2,4x10 ⁴	*0,33±0,09	*0,47±0,12	*0,56±0,17
DT6/STEC no-O157	5	2,4x10 ³	NS	*0,37±0,09	*0,50±0,16
(ARG4827)	24	4,0x10 ²	*0,43±0,13	NS	NS
(75)	24	4,0x10 ¹	*0,35±0,11	NS	NS
	5	2,5 x10 ⁵	NS	*0,63±0,20	*0,80±0,21
DT1/STEC464	5	2,5 x10 ⁴	NS	NS	NS
O157:H7	24	5,0 x10 ⁵	**1,73±0,22	*0,98±0,19	**1,01±0,17
(79)	24	5,0 x10 ⁴	*0,75±0,23	*0,78±0,21	NS
	5	2,3x10 ³	*0,59±0,16	**0,86±0,15	*0,38±0,10
DT6/STEC464	5	2,3x10 ²	*0,38±0,09	*0,62±0,18	NS
O157:H7	24	5,8x10 ³	**0,77±0,14	***1,15±0,12	NS
(79)	24	5,8x10 ²	NS	**0,74±0,13	NS

MOI: multiplicidad de infección (UFP/UFC); NS: no significativo = valor medio de los tratamientos y controles no significativamente diferentes (*significativo a $p=0,05$; ** a $p=0,01$; *** a $p=0,001$). NC: no se obtuvo un conteo válido. ^a Reducción logarítmica de células viables de *E. coli* respecto del control libre de fagos. ^b Valor medio de tres determinaciones ± desviación estándar.

5.2. Biocontrol con cócteles

Se confeccionó el cóctel utilizando proporciones iguales de cada fago que lo compone. Para las cepas *E. coli* DH5 α , *E. coli* EPEC920 (18) y *E. coli* STEC464 O157:H7 (79) el cóctel está compuesto por los fagos DT1 y DT6 mientras que para la

cepa *E. coli* STEC no-O157 ARG4827 (75) está compuesto por DT5 y DT6. El cóctel de fagos redujo con éxito el número de células viables de *E. coli* DH5 α sólo a 5°C, mientras que para *E. coli* STEC464 O157:H7 las reducciones tuvieron lugar sólo a 24°C. Específicamente, en el sistema cóctel/DH5 α se observó una disminución significativa en el recuento de células viables respecto del control libre de fagos para todos los tiempos de muestreo a 5°C, siendo el valor de 2,23 log la mayor reducción obtenida (24 h), mientras que a 24°C solo se obtuvo una reducción significativa a las 3 h de incubación (0,66 log; $p=0,05$). El cóctel también fue activo contra *E. coli* STEC464 O157:H7 solamente a 24°C, obteniéndose reducciones de hasta 2,58 log a las 6 h de incubación, además, el cóctel fue capaz de lograr un efecto de biocontrol efectivo prolongado en el tiempo (2,20 log a 24 h). No se observaron reducciones significativas por acción del cóctel en las cepas *E. coli* EPEC920 y *E. coli* STEC no-O157 ARG4827 con excepción de las reducciones de 0,93 log y 1,00 log obtenidas a 24°C para *E. coli* EPEC920 y *E. coli* STEC no-O157 ARG4827, respectivamente (Tabla 14).

Tabla 14. Reducción logarítmica en el número de células viables de *E. coli* después del tratamiento fágico de productos cárnicos contaminados.

Stock fágico/cepa sensible de <i>E. coli</i>	Condiciones del ensayo		Reducción logarítmica ^b en células viables de <i>E. coli</i> ^a después del tiempo de incubación (h)		
	T (°C)	MOI	3	6	24
Cóctel/DH5 α	5	2,25x10 ⁴	*0,91±0.19	**2,16±0.20	**2,23±0.21
	24	1,75x10 ⁴	*0,66±0.15	NS	NS
Cóctel/EPEC920	5	1,7X10 ⁵	NS	NS	NS
	24	1,1X10 ⁵	NS	NS	*0,93±0.24
Cóctel/STEC no-O157	5	2,6X10 ⁵	NS	NS	NS
	24	4,5X10 ⁵	NS	*1,00±0.26	NS
Cóctel/STEC464 O157:H7	5	1,56x10 ⁵	NS	NS	NS
	24	3,33x10 ⁵	**1,43±0.24	**2,58±0.21	**2,20±0.22

MOI: multiplicidad de infección; NS: no significativa: valores medios de muestras control y tratadas no significativamente diferentes (*significativo a $p=0,05$; **significativo a $p=0,01$; ***significativo a $p=0,001$). ^a Reducción Log en células

viabiles de *E. coli* respecto del control libre de fagos ^b Promedio de tres determinaciones \pm desviación estándar.

La Figura 21 muestra la evolución del número de células viables para cada cepa evaluada frente al cóctel así como el recuento de partículas fágicas al principio y al final de cada experimento.

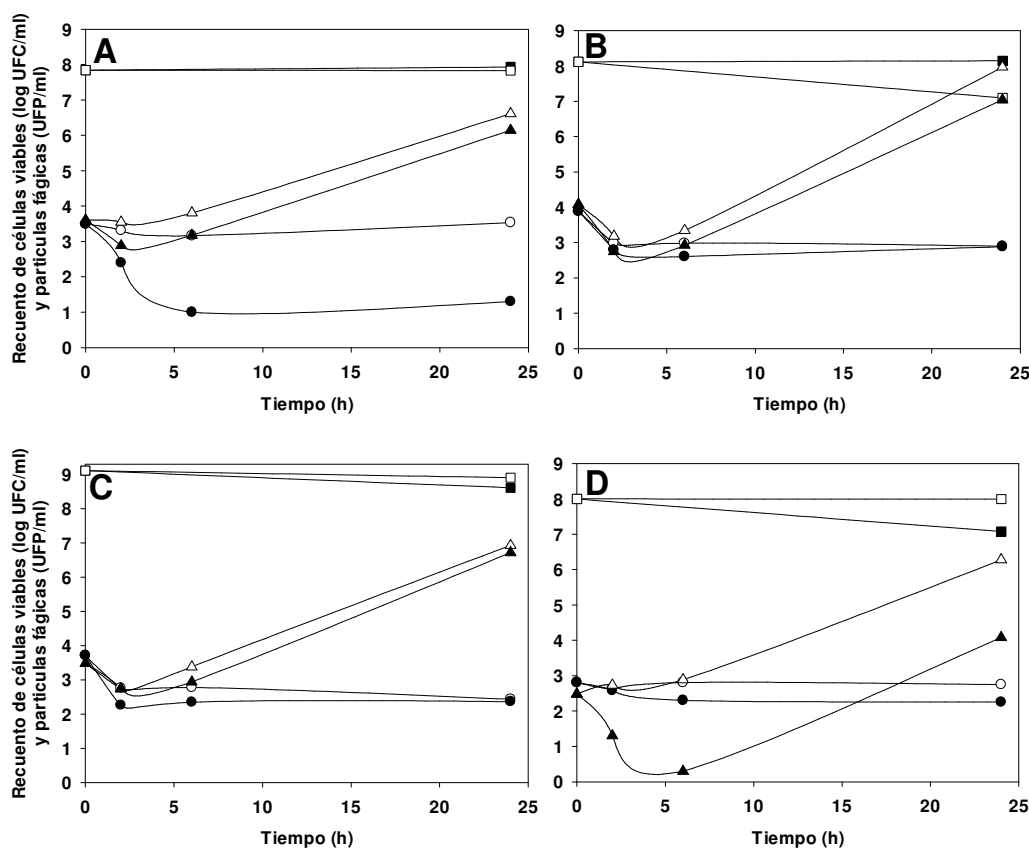


Figura 21. Evolución del recuento de células viables (UFC/ml) en ausencia (símbolo vacío) y presencia (símbolo lleno) de un cóctel de fagos a 5°C (círculo) y 24°C (triángulo) para la cepa *E. coli* DH5 α (A), *E. coli* EPEC920 (18) (B), *E. coli* STEC no-O157 ARG4827 (75) (C) y *E. coli* STEC464 O157:H7 (79) (D). Recuento de partículas fágicas (UFP/ml) a 5°C (■) y 24°C (□).

5.3. Porcentaje de recuperación bacteriana desde productos cárnicos

En los ensayos de biocontrol sobre productos cárnicos se puede observar una disminución inicial en el número de células viables, incluyendo en los controles. Esto está probablemente asociado al estrés térmico que sufren las células bacterianas y a una

baja recuperación desde la carne debida a la adhesión bacteriana. Por esto, se realizaron experimentos para determinar el porcentaje de células que quedan retenidas en la matriz y así evaluar la recuperación bacteriana desde el alimento (Tabla 15).

Tabla 15. Porcentaje de recuperación bacteriana desde alimentos cárnicos contaminados.

Cepa de <i>E. coli</i>	Recuento bacteriano inicial*	Recuento bacteriano recuperado*	% Recuperación**
DH5 α	1,36x10 ⁴	8,35x10 ³	61,4 \pm 5,3
EPEC920	2,12x10 ⁴	1,81x10 ⁴	85,4 \pm 15,5
STEC no-O157 (ARG4827)	3,80x10 ⁴	2,38x10 ⁴	62,6 \pm 6,6
STEC464 O157:H7	2,55x10 ⁴	1,94x10 ⁴	76,0 \pm 13,4

* Valores medios de dos determinaciones (UFC/ml). ** Porcentaje de recuperación \pm desviación estándar.

6. Aislamiento de mutantes insensibles a bacteriofagos (BIMs)

6.1. Aislamiento de BIMs

En algunas de las experiencias realizadas en carne, al mayor tiempo y temperatura de incubación, se observó un aumento en el número de células viables sugiriendo una potencial selección de variantes fagorresistentes bajo estas condiciones de ensayo. Empleando dos metodologías diferentes, se investigó la presencia de BIMs, que naturalmente forman parte de la población celular bacteriana.

6.1.1. Cultivo secundario (medio líquido) vs. ensayos en cárnicos (medio agarizado)

Se aislaron 16 BIMs presuntivos con la metodología de cultivo secundario y 30 desde los ensayos en carne (Tabla 16). Como se describirá a continuación, la técnica de cultivo secundario fue más eficiente para la obtención de mutantes fagorresistentes que el método de aislamiento desde ensayos en cárnicos.

7. Caracterización del fenotipo BIM

7.1. Confirmación de la fagorresistencia y eficiencia en la recuperación de BIMs

Todos los BIMs presuntivos fueron sometidos al test de sensibilidad en medio líquido para confirmar la fagorresistencia. Respecto del método de cultivo secundario, de ocho BIMs presuntivos, seis (75%) se confirmaron como BIMs verdaderos para las cepas *E. coli* EPEC920 (18) y *E. coli* STEC no-O157 ARG4827 (75). De los BIMs confirmados para *E. coli* EPEC920, tres (3) de cuatro (4) fueron resistentes a DT1 (75%) y DT6 (75%), mientras que los confirmados para *E. coli* STEC no-O157 ARG4827, cuatro (4, el 100%) presentaron resistencia a DT5 y dos (2, el 50%) a DT6.

De los BIMs presuntivos aislados desde carne, solo 2 (33,3%) resultaron ser fagorresistentes al fago DT1 de los seis (6) BIMs presuntivos derivados de *E. coli* DH5 α . Además, de ocho (8) BIMs potenciales fueron confirmados dos (25%) en total, uno resistente a DT1 (12,5%) y otro a DT6 (12,5%), como BIMs verdaderos para la cepa *E. coli* STEC464 O157:H7 (79) (Tabla 16), mientras que para el resto de los BIMs presuntos evaluados ninguno resultó ser un mutante fagorresistente verdadero.

En la Tabla 16 se detalla la eficiencia de recuperación total de BIMs para aquellas combinaciones cepas/fagos donde se obtuvieron BIMs confirmados.

7.2. Determinación de la frecuencia de aislamiento de BIMs

Las frecuencias de aislamiento de los BIMs se calcularon como el número de BIMs-confirmados/título bacteriano original, obteniéndose frecuencias bajas, en el rango de $3,7 \times 10^{-7}$ y $1,8 \times 10^{-6}$, para todos los BIMs evaluados (Tabla 16).

Tabla 16. Confirmación de la fagorresistencia y frecuencia de aislamiento de BIMs recuperados por la metodología de cultivo secundario y desde ensayos en carne, para las capas *E. coli* DH5 α , *E. coli* EPEC920 (18), *E. coli* STEC no-O157 (75) y *E. coli* STEC464 O157:H7 (79).

Fuente de BIMs	BIMs presuntivos ensayados	BIMs confirmados (% total)*	Frecuencia BIM (media \pm SD)**
Cultivo secundario	8 EPEC	6 (75,0)	EPEC/DT1=8,7x10 ⁻⁷ \pm 3,9x10 ⁻⁸ EPEC/DT6=6,5x10 ⁻⁷ \pm 4,8x10 ⁻⁸
	8 STEC no-O157	6 (75,0)	STEC no-O157/DT5=6,2x10 ⁻⁷ \pm 5,4x10 ⁻⁸ STEC no-O157/DT6=3,7x10 ⁻⁷ \pm 5,0x10 ⁻⁸
Carne	6 DH5 α	2 (33,3)	DH5 α /DT1=9,0x10 ⁻⁷ \pm 2,5x10 ⁻⁸ DH5 α /DT6=4,3x10 ⁻⁷ \pm 3,7x10 ⁻⁸
	8 STEC O157:H7	2 (25,0)	STEC O157:H7/DT1=1,8x10 ⁻⁶ \pm 1,5x10 ⁻⁷ STEC O157:H7/DT6=1,3x10 ⁻⁶ \pm 9,4x10 ⁻⁷

* Porcentaje de BIMs confirmados totales (provenientes de ambos fagos). ** La frecuencia se calculó de ensayos independientes de la fuente de BIMs. Media \pm SD (desviación estándar) fueron calculadas de experimentos duplicados.

7.3. Estabilidad de BIMs

Se evaluó la estabilidad de los BIMs confirmados. Para esto se seleccionaron cinco (5) obtenidos a partir del cultivo secundario y otros cuatro (4) a partir de los ensayos en carne (Tabla 17).

Dos (2) mutantes aislados a partir del cultivo secundario de la cepa *E. coli* EPEC920, obtenidos por exposición a DT1, mantuvieron el fenotipo hasta el cuarto y quinto subcultivo. Los mutantes aislados de *E. coli* STEC no-O157 ARG4827 mantuvieron el fenotipo resistente hasta el segundo y tercer subcultivo con DT5 y el sexto subcultivo con DT6.

Ambos BIMs provenientes de ensayos en carne con *E. coli* DH5 α y resistentes a DT1 mantuvieron el fenotipo resistente hasta el quinto subcultivo. El mutante aislado de la cepa *E. coli* STEC464 O157:H7 por exposición a DT6 mantuvo la resistencia hasta el tercer subcultivo, mientras que el fagorresistente a DT1, hasta el séptimo subcultivo.

Tabla 17. Estabilidad del fenotipo fagorresistencia en mutantes aislados a partir de cultivo secundario y de ensayos en carne.

Cepa de <i>E. coli</i>	Fago	Número de repiques						
		1	2	3	4	5	6	7
EPEC920	DT1	2R	2R	2R	1R 1S	2S		
STEC no-O157 (ARG4827)	DT5	2R	1R 1S	2S				
	DT6	R	R	R	R	R	S	
DH5 α	DT1	2R	2R	2R	2R	2S		
STEC464 O157:H7	DT1	R	R	R	R	R	R	R
	DT6	R	R	R	S			

R: BIM resistente, S: BIM sensible (en cada caso al fago correspondiente).

7.4. Reversión del fenotipo fagorresistencia en BIMs

La reversión del fenotipo fagorresistencia fue evaluada en los nueve (9) BIMs anteriormente seleccionados para el estudio de estabilidad. Cada BIM fue evaluado por susceptibilidad al fago después de ser propagado a través de 50 generaciones. Se encontró que solo un BIM proveniente de la exposición de la cepa *E. coli* STEC464 O157:H7 al fago DT6, y que pudo formar un césped en una placa, fue susceptible a DT6 mientras que el resto de los BIMs evaluados para ambos fagos resultaron ser resistentes, no mostrando reversión ni sensibilidad al fago correspondiente.

8. Biocontrol de *Escherichia coli* sobre productos lácteos

8.1. Biocontrol de *Escherichia coli* durante un proceso de fermentación láctica

Los fagos DT1 y DT6, ya sea individualmente o mezclados en un cóctel, fueron evaluados por su eficacia para inhibir el crecimiento de *E. coli* durante la fermentación de la leche. El fago DT1 se ensayó en las cepas *E. coli* DH5 α , *E. coli* EPEC920 (18) y *E. coli* STEC464 O157:H7 (79), mientras que fago DT6 en las dos cepas STEC [*E. coli* O157:H7 464 y *E. coli* no-O157 ARG4827 (75)]. Se llevó a cabo un ensayo adicional utilizando un cóctel de fagos (DT1 + DT6) contra la cepa *E. coli* STEC464 O157:H7.

En todos los ensayos el crecimiento de *Streptococcus thermophilus* 10-C y el descenso de pH fueron similares, independientemente de la presencia de las cepas y fagos de *E. coli* ensayados. *Strep. thermophilus* 10-C alcanzó 10⁹ UFC/ml después de 4 h y mantuvo este nivel durante todo el experimento (24 h). Los valores de pH evolucionaron en consecuencia, cayendo hasta 4,5 a las 8 h y a 4,0 al final del proceso

de fermentación (24 h). En la Figura 22 se observa el desarrollo de *Strep. thermophilus* 10-C, así como la evolución del pH, durante la fermentación láctica y el biocontrol de *E. coli* STEC464 O157:H7 con el cóctel fágico. Este mismo comportamiento se verificó en los demás sistemas (datos no mostrados).

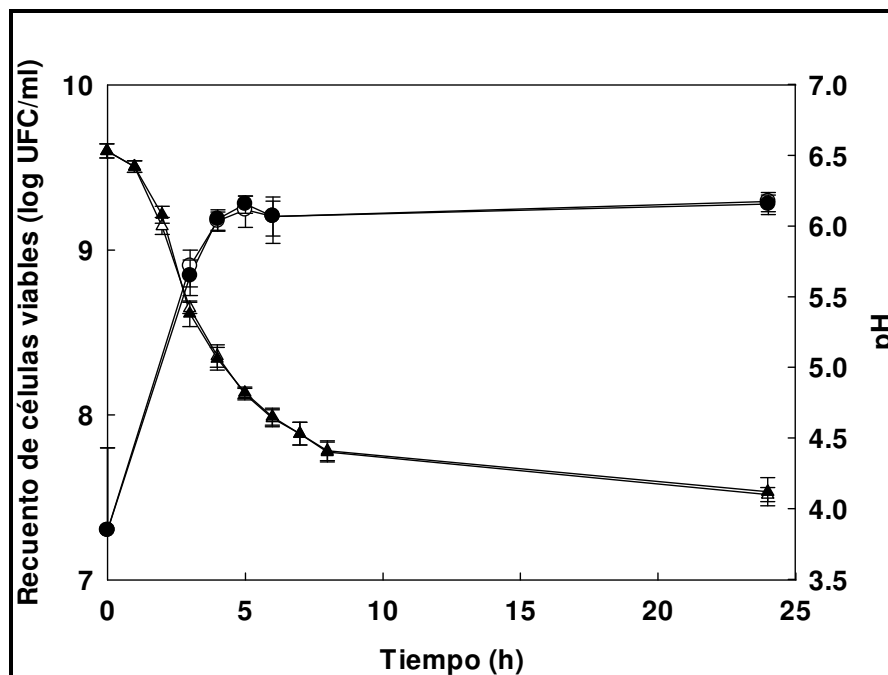


Figura 22. Evolución de *Streptococcus thermophilus* con *E. coli* STEC464 O157:H7 (79) en ausencia (○) y presencia (●) del cóctel de fagos, y evolución del pH con *E. coli* STEC464 O157:H7 (79) en ausencia (Δ) y presencia (▲) del cóctel fágico. Los valores son la media de tres determinaciones \pm desviación estándar.

Excluyendo el título del cóctel de fagos (DT1 + DT6), que mostró una ligera pero constante reducción (1,6 log UFP/ml después de 24 h) (Figura 23 D), los títulos fágicos se mantuvieron constantes (Figuras 23 A, C, E) o aumentado ligeramente (0,5 log UFP/ml) (Figuras 23 B, F) a lo largo de las primeras 8 h, con una disminución posterior entre 8 y 24 h (1-2 log UFP/ml).

Respecto a las cepas de *E. coli*, el fago DT1 y el cóctel de fagos inactivaron rápida (<1 h) y completamente a DH5 α (MOI = $2,3 \times 10^5$) y STEC464 O157:H7 (MOI = $2,2 \times 10^4$), respectivamente (Figuras 23 A, D). La cepa *E. coli* STEC464 O157:H7 fue completamente inactivada tanto por el fago DT1 como por DT6 a las 8 h (Figura 23 E,

F). Por otro lado, *E. coli* EPEC920 no se detectó a 1 h (<10 UFC/ml) de incubación después de la infección con el fago DT1 a una MOI de $2,4 \times 10^4$ pero mostró un recrecimiento posterior, aunque siempre menor que el control sin fago, obteniéndose una reducción de 1,1 log UFC/ml después de 24 h (Figura 23 B). Para *E. coli* STEC no-O157 ARG4827 (MOI = $3,5 \times 10^3$), se obtuvieron reducciones inferiores a 1 log para todos los tiempos de muestreo (Figura 23 C). Por lo tanto, las cepas *E. coli* EPEC920 y *E. coli* STEC no-O157 ARG4827 no fueron eliminadas completamente por los fagos DT1 y DT6, respectivamente.

En los controles sin fagos, todas las cepas de *E. coli* alcanzaron 4-6 log UFC/ml después de 5-6 horas de incubación (Figura 23). Independientemente de la presencia de fagos, se observó una disminución en la viabilidad de las cepas de *E. coli* como resultado del bajo pH alcanzado durante la acidificación, resultando DH5 α (1,5 log UFC/ml a las 24 h) y STEC464 O157:H7 (2,3 log UFC/ml a las 24 h) las cepas más afectadas. Los fagos DT1 y DT6 fueron más eficaces formando parte de un cóctel que individualmente, debido a que la inactivación total del patógeno *E. coli* STEC464 O157:H7 se logró después de 1 h de incubación en el primer caso (cóctel), mientras que necesitó al menos 8 h para los fagos individuales.

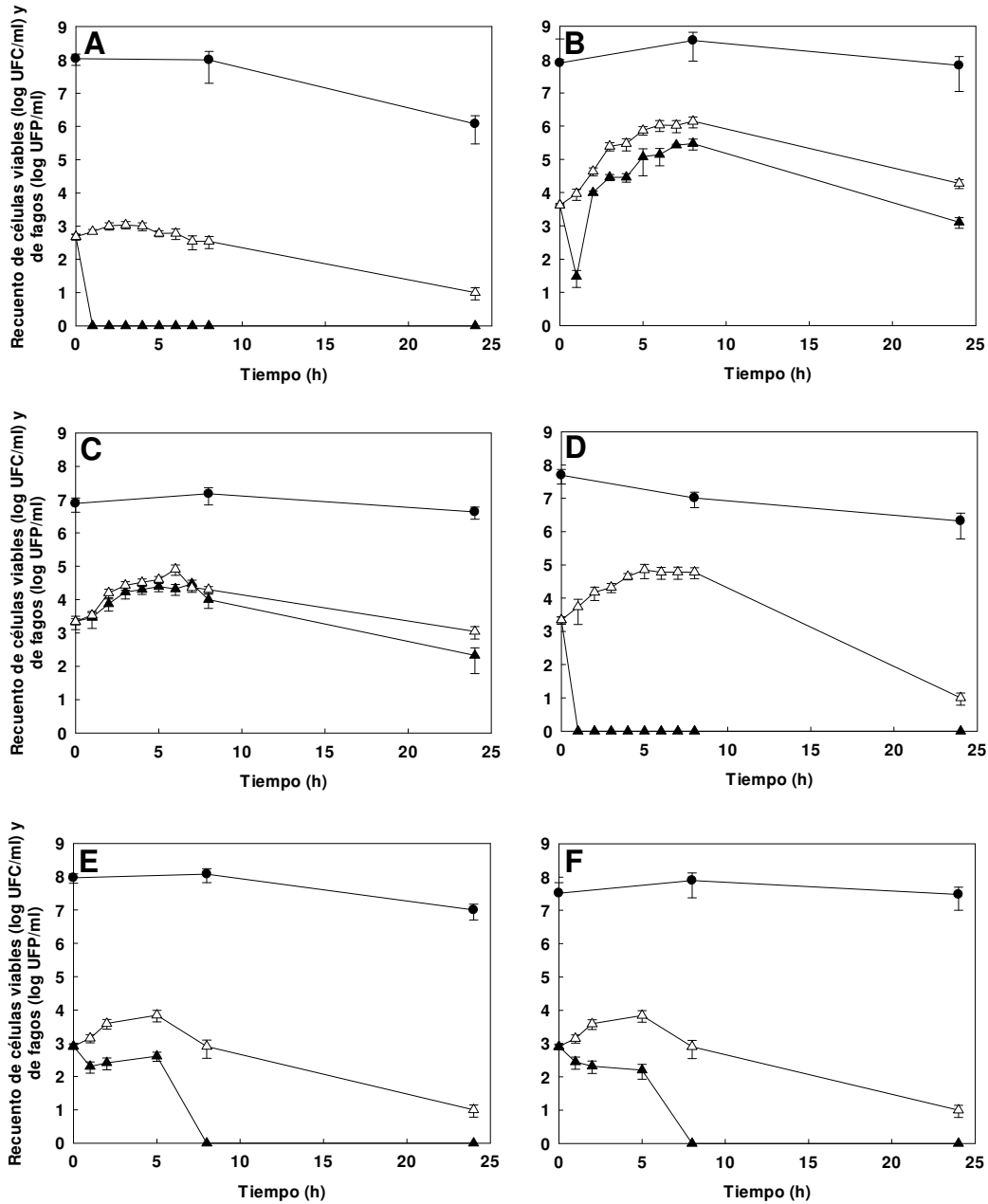


Figura 23. Evolución del título de bacteriofagos (●) y de células viables de *E. coli* en ausencia (Δ) y presencia (▲) de bacteriofagos durante la producción de leche fermentada. Sistemas DT1/DH5α (A), DT1/EPEC920 (18) (B), DT6/STEC no-O157 ARG4827 (75) (C), cóctel/STEC464 O157:H7 (79) (D), DT1/STEC464 O157:H7 (79) (E) y DT6/STEC464 O157:H7 (79) (F). Los valores son la media de tres determinaciones ± desviación estándar.

8.2. Biocontrol de *Escherichia coli* durante un proceso de cuajado (producción de queso)

Los fagos DT1 y DT6 también fueron evaluados como herramientas de biocontrol de *E. coli* durante el proceso de cuajado. El fago DT1 se ensayó en las cepas *E. coli* EPEC920 (18) y *E. coli* STEC464 O157:H7 (79), mientras que el fago DT6 en las dos cepas STEC [*E. coli* O157:H7 464 y *E. coli* no-O157 ARG4827 (75)]. Adicionalmente se evaluó el efecto del cóctel (DT1 + DT6) sobre las cepas *E. coli* DH5 α y *E. coli* STEC464 O157:H7.

El recuento de partículas fágicas se mantuvo constante (Figura 24 B, C, D, E, F) o disminuyó ligeramente (Figura 24 A) luego de 24 h de incubación.

Respecto del biocontrol sobre *E. coli*, la cepa DH5 α fue rápida (<1 h) y totalmente inactivada (<10 UFC/ml) por el cóctel (DT1+DT6) a una MOI de $9,1 \times 10^3$ tanto en suero como en cuajada (Figura 24 A). Para la cepa *E. coli* EPEC920 se observó un aumento en el número de células viables aunque siempre menor al control sin fago, obteniéndose la mayor reducción en suero, a saber, 1,29 log a las 3 h y 1,38 log a las 4 h de incubación (Figura 24 B). La cepa *E. coli* STEC no-O157:H7 ARG4827 presentó valores de reducción muy bajos al ser tratada con el fago DT6 (MOI = $5,4 \times 10^1$) ya que solo se obtuvo una reducción significativa de 0,95 log para el último tiempo de muestreo (t = 4 h) en la cuajada, mientras que en el suero la reducción fue de 0,54 log (Figura 24 C). En los ensayos con la cepa *E. coli* STEC464 O157:H7 se observó una inactivación bacteriana total al ser tratada con el fago DT1 (MOI = $2,2 \times 10^5$) (Figura 24 E) y DT6 (MOI = $1,7 \times 10^5$) (Figura 24 F) en suero y cuajada, mientras que al ser tratada con el cóctel (MOI = $1,6 \times 10^4$) se obtuvo, en suero, una reducción significativa de 1,84 log a 1 h, 2,39 log a 3 h (siendo la mayor reducción observada para este sistema) y de 1,83 a las 4 h de incubación. Además, solo se obtuvo una reducción significativa de 0,85 log para este sistema en cuajada a las 3 h de incubación (Figura 24 D).

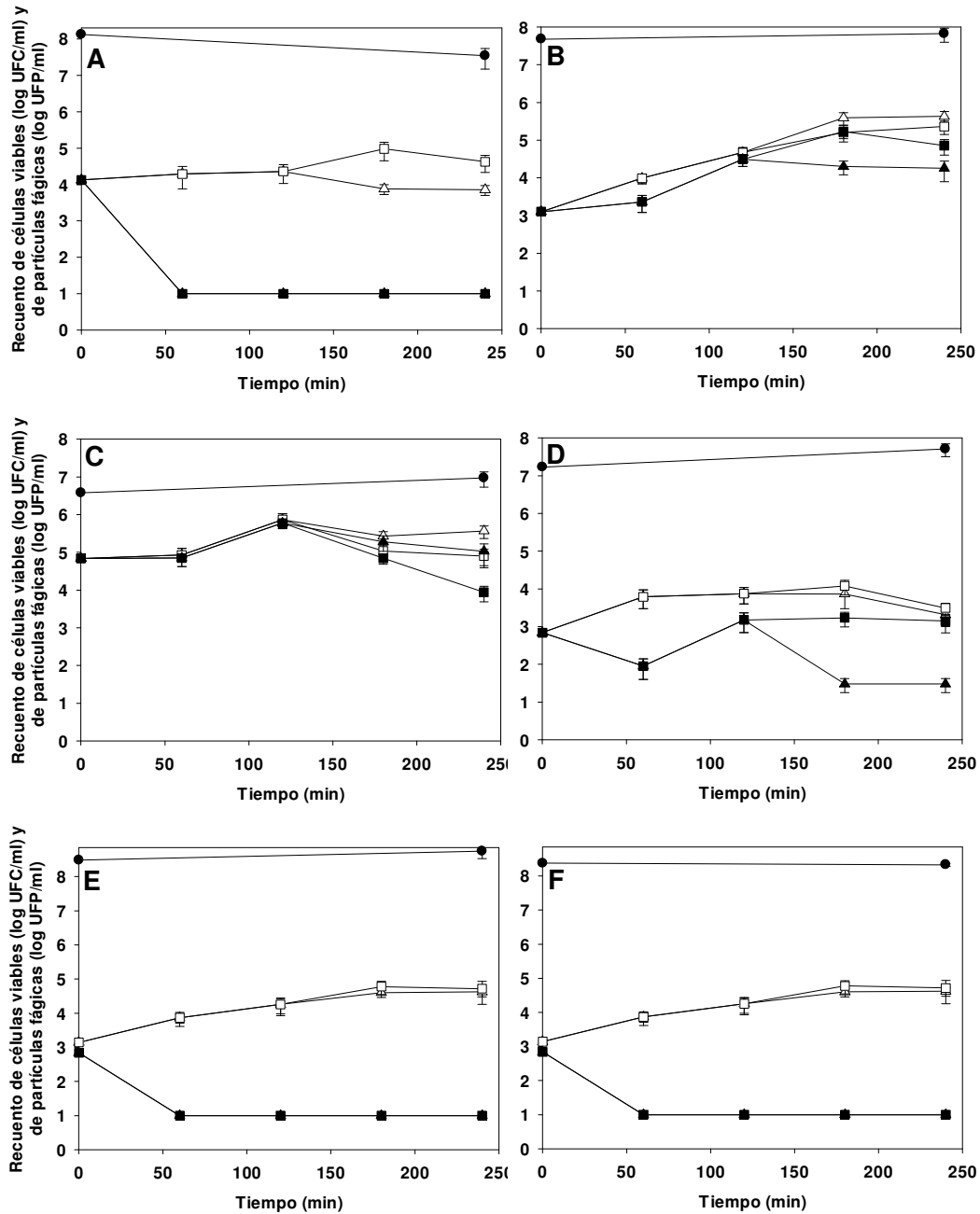


Figura 24. Recuento de bacteriofagos (●) y de *E. coli* en ausencia de bacteriofagos en suero (Δ) y en cuajada (□) y en presencia de bacteriofagos en suero (▲) y en cuajada (■) durante la producción de quesos. Sistemas cóctel/DH5α (A), DT1/EPEC920 (18) (B), DT6/STEC no-O157 ARG4827 (75) (C), cóctel/STEC464 O157:H7 (79) (D), DT1/STEC464 O157:H7 (79) (E) y DT6/STEC464 O157:H7 (79) (F). Los valores son la media de tres determinaciones ± desviación estándar.

9. Descontaminación de superficies sólidas con cócteles fágicos

Cócteles de fagos fueron evaluados por su eficacia para inhibir el crecimiento de *E. coli* en distintas superficies sólidas a 5 y 37°C. El cóctel DT1 + DT6 se ensayó en las cepas EPEC920 (18) y STEC464 O157:H7 (79), mientras que el cóctel DT5 + DT6 en la STEC no-O157 ARG4827 (75).

9.1. Ensayos de descontaminación sobre cubreobjetos (glass coverslip)

Cuando se utilizaron cubreobjetos de vidrio como superficie sólida para los experimentos de biocontrol el cóctel de fagos inactivó rápida y completamente tanto a la cepa *E. coli* EPEC920 (Figura 25 A, B) como a *E. coli* STEC464 O157:H7 (Figura 25 E, F) a las temperaturas evaluadas (5 y 37°C) a ambas MOIs, a saber $1,8 \times 10^4$ y $1,8 \times 10^6$ (EPEC920) y $1,2 \times 10^5$ y $1,2 \times 10^7$ (STEC464 O157:H7). Sin embargo, a las 24 h se observó un recrecimiento cuando se empleó el menor valor de MOI a 5°C. La cepa *E. coli* STEC no-O157 ARG4827 fue significativamente reducida en su número por el cóctel (DT5 + DT6) a las primeras horas del ensayo (Figura 25 C, D) tanto a 5 como a 37°C. Estas reducciones se obtuvieron empleando MOIs de $2,2 \times 10^4$ y $2,2 \times 10^6$, y si bien en ningún caso se logró la eliminación de *E. coli* STEC no-O157 ARG4827, a 5°C el número de células viables se mantuvo constante hasta las 24 h mientras que a 37°C aumentó hasta alcanzar un valor del orden de 10^6 UFC/ml aunque siempre menor que el control sin fagos.

Los controles a 5°C mostraron valores ligeramente menores al inóculo bacteriano inicial mientras que a 37°C se evidenció un aumento de varios órdenes de magnitud en las UFC/ml a las 24 h de incubación (Figura 25). Los controles de secado no se diferenciaron significativamente del inóculo inicial, recuperándose aproximadamente un 90% de células viables.

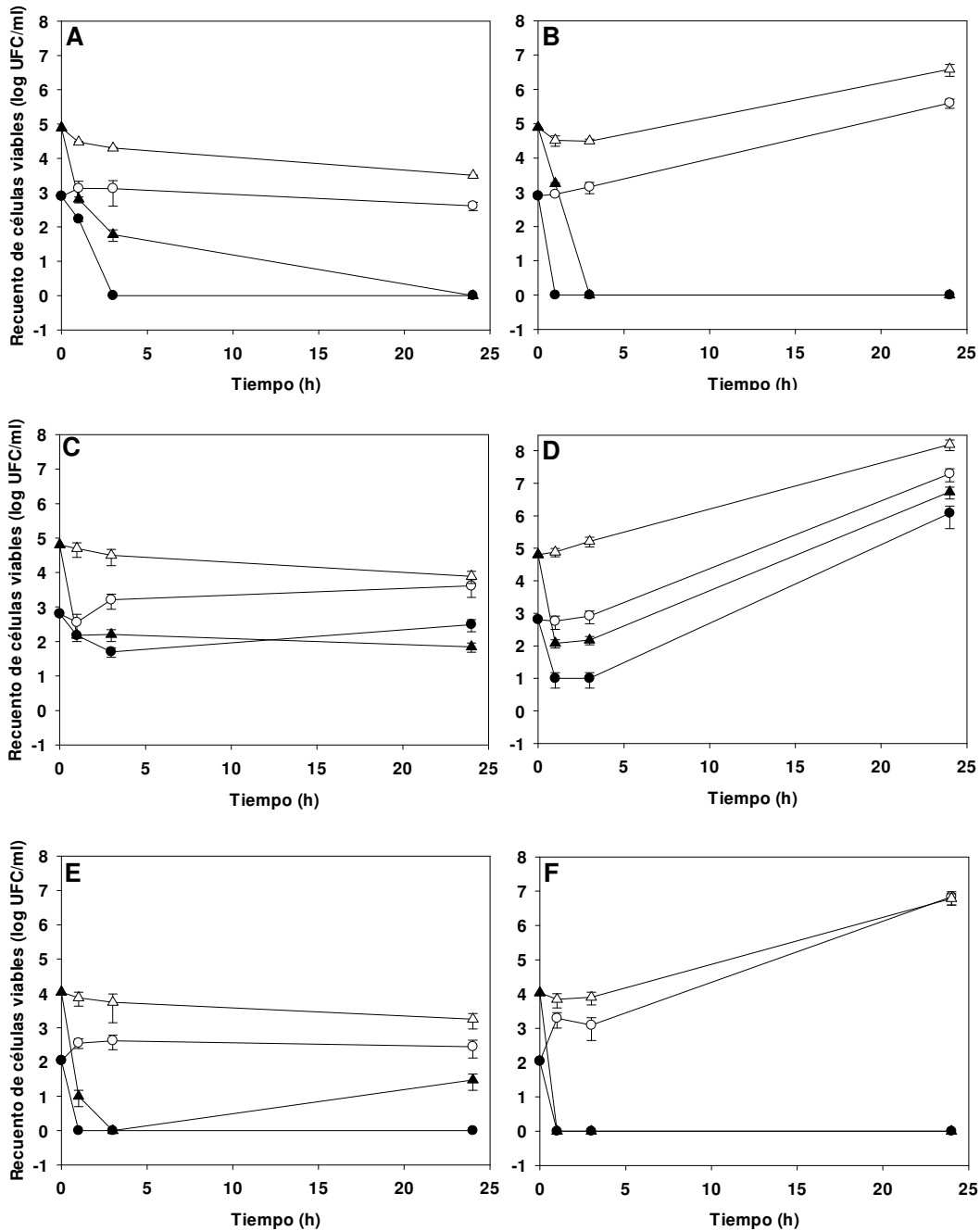


Figura 25. Evolución del recuento de células viables (UFC/ml) en ausencia del cóctel de bacteriofagos a bajo (○) y alto inóculo bacteriano (Δ) y en presencia del cóctel de bacteriofagos a bajo (●) y alto inóculo bacteriano (▲) durante el biocontrol sobre superficies sólidas (cubreobjetos de vidrio). Sistemas cóctel/EPEC920 (18) a 5°C (A), cóctel/EPEC920 (18) a 37°C (B), cóctel/STEC no-O157 ARG4827 (75) a 5°C (C), cóctel/STEC no-O157 ARG4827 (75) a 37°C (D), cóctel/STEC464 O157:H7 (79) a

5°C (**E**), cóctel/STEC464 O157:H7 (**79**) a 37°C (**F**). Los valores son la media de dos determinaciones independientes por duplicado \pm desviación estándar.

9.2. Ensayos de descontaminación sobre acero inoxidable (*stainless steel chips*)

Al utilizar fichas de acero inoxidable como superficie sólida para el biocontrol de cepas de *E. coli*, el cóctel de fagos inactivó rápida (<3 h) y completamente a EPEC920 (Figura 26 A, B) así como a STEC464 O157:H7 (Figura 26 E, F) a 5 y 37°C tanto a baja como alta MOI. Además, se obtuvo una inactivación completa de *E. coli* STEC no-O157 ARG4827 a 1 h (MOI = $1,7 \times 10^5$) y 3 h (MOI = $1,7 \times 10^3$) de incubación solo cuando se realizaron los ensayos a 37°C (Figura 26 D). En el caso de *E. coli* STEC464 O157:H7, si bien no se pudieron detectar células viables a las 3 h de incubación, se observó un recrecimiento de la población bacteriana cuando se utilizó MOI baja ($9,3 \times 10^3$) a 37°C, alcanzando un recuento de $5,8 \times 10^6$ UFC/ml a las 24 h. Adicionalmente, también se observó un recrecimiento para *E. coli* EPEC920 a 37°C a ambos valores de MOI empleados, a saber $1,8 \times 10^3$ y $1,8 \times 10^5$, a las 24 h alcanzando el orden de 10^3 UFC/ml. En los ensayos a 5°C con *E. coli* STEC no-O157 ARG4827 se logró eliminar completamente el patógeno a la tercera hora de incubación utilizando MOI elevada, mientras que al emplear una MOI baja esto se logró solo a las 24 h de incubación (Figura 26 C).

Los controles de crecimiento y de secado se comportaron de manera similar a ambas temperaturas en las superficies sólidas evaluadas.

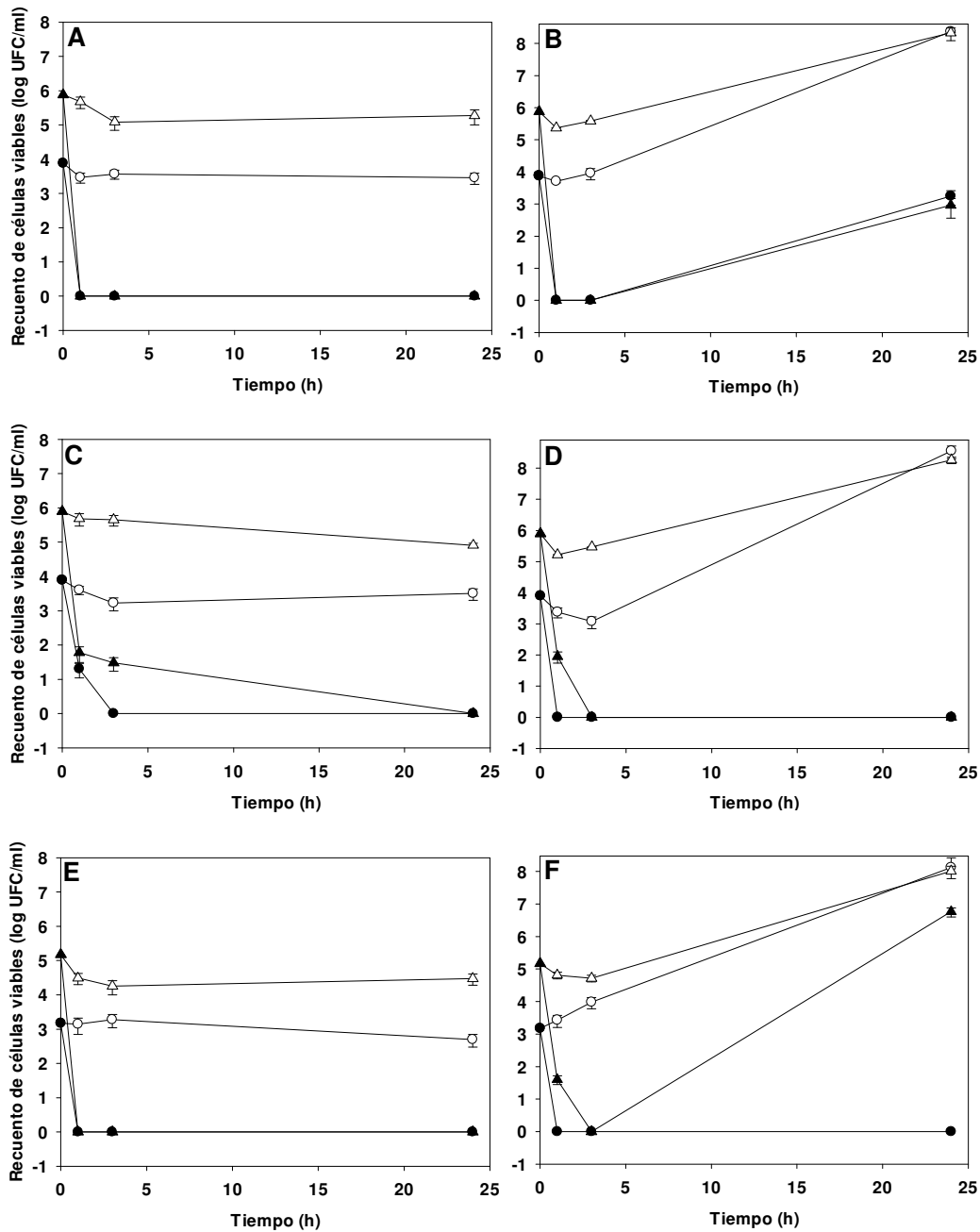


Figura 26. Evolución del recuento de células viables (UFC/ml) en ausencia del cóctel de bacteriofagos a bajo (\circ) y alto inóculo bacteriano (Δ) y en presencia del cóctel de bacteriofagos a bajo (\bullet) y alto inóculo bacteriano (\blacktriangle) durante el biocontrol sobre superficies sólidas (fichas de acero inoxidable). Sistemas cóctel/*EPEC920* (18) a 5°C (A), cóctel/*EPEC920* (18) a 37°C (B), cóctel/*STEC no-O157 ARG4827* (75) a 5°C (C), cóctel/*STEC no-O157 ARG4827* (75) a 37°C (D), cóctel/*STEC464 O157:H7*

(79) a 5°C (**E**), cóctel/STEC464 O157:H7 (79) a 37°C (**F**). Los valores son la media de dos determinaciones independientes por duplicado \pm desviación estándar.

A tall, thin, metallic structure, possibly a monument or a sculpture, stands on a star-shaped base. The structure is composed of a central vertical pole with a rounded top, and a base with six radiating arms. The background shows a cloudy sky and a body of water. The word "DISCUSIÓN" is overlaid in the center.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

Con el fin de desarrollar cócteles fágicos comerciales es necesario evaluar, entre otras cosas, la estabilidad de cada bacteriofago aislado en condiciones normales de almacenamiento. Para esto, en primera instancia, se llevaron a cabo estudios de viabilidad fágica a temperatura de refrigeración (4°C). Los seis bacteriofagos estudiados presentaron una estabilidad moderada a la temperatura de refrigeración dentro de los 2 meses de evaluación. En general se obtuvieron diferencias significativas pequeñas entre los distintos tiempos de muestreo por lo que se observaron leves disminuciones de viabilidad fágica. Si bien el estudio se realizó por un período de tiempo corto, los resultados obtenidos concuerdan con los encontrados previamente por otros autores ya sea en caldo (Skurnik y col., 2007) o inoculados sobre el alimento (Guenther y col., 2009). Adicionalmente se encontraron resultados de estabilidad similares a 4°C para fagos de otras especies bacterianas (Merabishvili y col., 2009).

Los bacteriofagos se caracterizaron mediante PCR y microscopía electrónica, además se evaluó la actividad lítica en distintas condiciones. Algunos fagos pueden poseer en su secuencia factores de patogenicidad confiriendo propiedades patogénicas a las bacterias que éstos infectan o lisogenizan. Entre ellos se encuentran genes involucrados en adhesión bacteriana, colonización, invasión y esparcimiento en tejidos humanos, resistencia y producción de toxinas (Wagner y Waldor, 2002). Los primeros factores de virulencia codificados por genomas de bacteriofagos que se encontraron fueron toxinas bacterianas como la toxina de la difteria codificada por *Corynebacterium diphtheriae* (Freeman, 1951), la toxina botulínica codificada por *Clostridium botulinum* (Sakaguchi y col., 2005), la toxina del cólera codificada por *Vibrio cholerae* (Waldor y Mekalanos, 1996) y la toxina Shiga codificada por varios fagos de *Escherichia coli* enterohemorrágica (García-Aljaro y col., 2006). Para la mayoría de las toxinas antes mencionadas, la adquisición del gen correspondiente después de la integración del genoma fágico al cromosoma del hospedador es condición suficiente para que una cepa no-patogénica se transforme en una patogénica. Por lo antes mencionado es necesario garantizar la inocuidad de los bacteriofagos antes de ser utilizados como herramientas de biocontrol en alimentos. Cuando se investigó la presencia de factores de patogenicidad, a saber genes *stx1*, *stx2*, *eaeA*, *LT1* y *ST1*, todos los fagos estudiados resultaron negativos. Sin embargo, son necesarios análisis de secuencia y bioinformáticos más detallados para asegurar que los fagos estudiados están libres de

otros factores de patogenicidad dañinos y, en consecuencia, son completamente seguros para su utilización como herramientas de biocontrol de patógenos en alimentos. Los fagos de la serie T-pares que infectan *Escherichia coli* son representantes de la familia *Myoviridae*. Cuando estos bacteriofagos son observados por microscopía electrónica presentan una cápside icosaédrica con cola contráctil, un collar proteico (cuello) y una placa basal con fibras largas. De acuerdo a las micrografías electrónicas, los fagos DT1 y DT6 tienen cabezas icosaédricas y colas contráctiles y pueden ser clasificados como fagos T-pares de la familia *Myoviridae* de acuerdo al *International Committee on Taxonomy of Viruses* (2009). Los fagos evaluados presentaron valores promedio estándar para las longitudes y diámetros de la cabeza y cola así como para la longitud total de los viriones (Ackermann, 2009). Por otro lado, aunque no fue posible observar la placa basal y las fibras en éstas, se pudo observar una diferencia en el ancho de la región adyacente a la cabeza (collar), a diferencia de lo que se observaría en fagos de la familia *Siphoviridae*, reforzando la clasificación dentro de la familia *Myoviridae*. Estudios previos de nuestro grupo de investigación (Migliore, 2011), donde se realizó secuenciación parcial del fago LM4, aislado de materia fecal de composición diarreaica, demostraron que, basados en la morfología y en la secuencia de un fragmento de ADN amplificado por PCR correspondiente al gen *gp23*, el fago LM4 está estrechamente relacionado con el bacteriofago CEV1 (N° de acceso GenBank AY331985), el cual pertenece a la familia filogenética de los fagos tipo-T4 (Raya y col., 2006).

Continuando con la caracterización de los fagos, se llevaron a cabo estudios de la actividad lítica en distintas condiciones. Se evaluó la influencia del cloruro de sodio (NaCl) sobre la actividad lítica de los fagos. Estudios previos en bacteriofagos de *E. coli* encontraron que presentan una gran resistencia en distintas condiciones, sin embargo, no hay muchos estudios sobre la influencia del NaCl en la actividad lítica de éstos. Coffey y col. (2011) encontraron que concentraciones de NaCl en el rango del 1 al 2,5%, no afectaron significativamente el número de fagos de *E. coli* O157:H7. Por el contrario, cuando se evaluó la influencia del NaCl sobre la actividad lítica en el presente estudio, se observaron reducciones significativas a la mayor concentración de NaCl (4%). Estas reducciones fueron pequeñas dado que se observó un 42,4% respecto del control como el menor recuento fágico registrado. Por lo antes mencionado, si bien el NaCl tuvo un efecto significativo sobre la actividad lítica de los bacteriofagos, a niveles prácticos este efecto es pequeño respecto del número de fagos que permanecen viables. Una característica importante es la actividad lítica que presentan los fagos de *E. coli*

frente a distintos valores de pH. La importancia radica en la utilización de éstos para el biocontrol de patógenos en alimentos ácidos tales como fermentos lácticos. Jamalludeen y col. (2007) indicaron en un estudio que el título de nueve (9) fagos de *E. coli* permaneció inalterado en el rango de pH de 5 a 9. Adicionalmente, otros dos fagos de *E. coli* O157:H7 presentaron un alto nivel de estabilidad entre valores de 4 a 10 de pH (Coffey y col., 2011). Cuando se evaluó la resistencia de fagos de *E. coli* a valores de pH menores a 3 no se encontraron partículas fágicas viables (Dini y Urraza, 2010). Por esto, los fagos seleccionados para este fin, descontaminación de alimentos ácidos, deben ser resistentes y soportar bajos valores de pH para poder mantener su viabilidad en el alimento y alcanzar su célula blanco a una concentración adecuada. En este trabajo hemos evaluado la actividad lítica a los valores de pH de 7,5, 5,7 y 4,5. Los fagos evaluados mostraron la mayor actividad lítica a pH = 7,5, mientras que a medida que el pH disminuye, disminuye la actividad lítica. El fago DT5 fue el único que mostró resistencia a pH más ácidos, no obteniéndose diferencias significativas a pH 5,7 respecto del control, sin embargo, a pH 4,5 se observó una caída del 92,9% en su actividad. Los resultados obtenidos para el fago DT5 a pH 4,5 fueron similares al de los demás sistemas evaluados, los cuales mostraron una reducción de su actividad lítica en el rango del 91,2 al 97%. Los resultados obtenidos concuerdan con lo observado por otros autores (Dini y de Urraza, 2010; Jamalludeen y col. 2007), donde se evidenció alta resistencia de los fagos hasta pH 5, mientras que a valores cercanos e inferiores a este pH producen diferentes sensibilidades específicas de cada bacteriofago evaluado, afectando así su actividad lítica. Respecto del efecto de la temperatura sobre la actividad lítica, autores como Coffey y col. (2011) encontraron que fagos de *E. coli* O157:H7 permanecen viables después de la exposición a un rango amplio de temperaturas, a saber entre -22 y 60°C. Otros autores concuerdan que se observa una mayor actividad lítica a la mayor temperatura evaluada (Viazis y col., 2010; O'Flynn y col., 2004; Kudva y col., 1999). En general, se observa una mayor actividad lítica a medida que la temperatura se aproxima a la temperatura óptima de crecimiento para la bacteria hospedadora. Adicionalmente, Coffey y col. (2011), Viazis y col. (2010) y Kudva y col. (1999) observaron una reducción de células viables a bajas temperaturas por acción de los fagos, esto es probable que se deba al mecanismo de lisis desde afuera (lysis from without, LFW) en donde el bacteriofago lisa la bacteria hospedadora sin replicarse. En los experimentos realizados en esta Tesis pudimos observar una actividad lítica significativamente reducida a las temperaturas evaluadas respecto de las condiciones

control. Los valores de actividad a la mayor temperatura testada variaron entre el 70,8 y 96,5%. Esta reducción de actividad lítica puede deberse en parte a la desorganización y/o desnaturalización parcial de los receptores fágicos en la superficie bacteriana por efecto de la elevada temperatura, por lo tanto, la incapacidad de los fagos para adsorberse a éstas. Además, las temperaturas elevadas pueden alterar la función y estructura de los bacteriofagos (Coffey y col., 2011). Cuando se evaluó la actividad lítica a 4°C, los valores oscilaron entre el 5,0 y 20,2%. Si bien a bajas temperaturas se observa ausencia de metabolismo bacteriano, Kudva y col. (1999) hipotetizaron que éstas temperatura pueden favorecer la adsorción fágica, promoviendo el mecanismo de LFW, además, la actividad lítica observada es menor debido a la ausencia de multiplicación fágica, fortaleciendo la idea de que LFW es el mecanismo predominante a esta temperatura donde hay ausencia de replicación fágica. Cuando se analizaron los tres parámetros comparativamente, a saber NaCl, pH y temperatura, a pesar de que se observaron valores no significativamente diferentes en algunos casos en la condición extrema respecto de condiciones control, ningún sistema bacteriofago/cepa presentó características de resistencia y actividad lítica significativamente superiores conjuntamente para los tres parámetros evaluados.

Los bacteriofagos a utilizar como herramienta de biocontrol o descontaminación en alimentos o superficies sólidas deben ser inocuos para cepas de *E. coli* no patógenas así como para otras cepas no-*E. coli* y enterobacterias. Esta alta especificidad permite utilizar los bacteriofagos como método preventivo en inocuidad alimentaria sin alterar la calidad (Jay, 1996) y la viabilidad de la microbiota normal del alimento (Kudva y col., 1999) y la del consumidor (Chibani-Chennoufi y col., 2004). Se ensayó mediante la técnica de spot test y se confirmó por la técnica de doble capa el rango de hospedador de los bacteriofagos sobre las bacterias detalladas en la Tabla 2. Los rangos más amplios se obtuvieron para los fagos DT3, DT4 y DT6, infectando y lisando un total de 47 cepas de *E. coli*. Por otro lado, los fagos que presentaron un rango estrecho, DT1, DT2 y DT5, infectaron y lisaron 20 cepas de *E. coli*. En total, los bacteriofagos evaluados fueron activos líticamente contra 18 cepas patógenas de *E. coli* diferentes pertenecientes a tres o más serogrupos distintos. Por lo antes expuesto, la utilización de estos bacteriofagos combinados permitiría garantizar un tratamiento eficaz contra esta amplia gama de patógenos pertenecientes a serogrupos diferentes. Si bien los fagos capaces de infectar *E. coli* y otros géneros pueden ser útiles para eliminar varios patógenos al mismo tiempo, se debe considerar que los fagos con baja especificidad

pueden ser infectivos para bacterias benéficas o comensales a la hora de ser introducidos en un alimento. La existencia de fagos capaces de infectar distintos géneros se ha reportado anteriormente (Jensen y col., 1998), sin embargo, ninguno de los fagos evaluados en esta Tesis fue capaz de lisar cepas de *E. coli* no patógenas así como cepas no-*E. coli* y otras enterobacterias.

Continuando con la caracterización de la interacción entre fagos y bacterias se analizaron los tiempos así como los números de eclosión. Se seleccionó un bacteriofago de cada grupo, uno de rango de hospedador estrecho y otro de rango amplio, a saber DT1 y DT6, respectivamente. El número de placas de lisis generalmente permanece constante por un tiempo característico, el tiempo de eclosión, luego aumenta rápidamente alcanzando varias veces su valor inicial a medida que cada célula lisa y libera los fagos completos. La relación entre el número de placas obtenidas antes y después de la lisis se llama número de eclosión. Además, se sabe que estos dos parámetros son independientes, es decir, el tiempo de eclosión no tiene efecto sobre el número de eclosión (Ellis y Delbrück, 1939). Los resultados obtenidos para tiempo y número de eclosión para los fagos evaluados en esta Tesis fueron similares. Ambos fagos presentaron un tiempo de eclosión aproximado de 33 min y un número de eclosión de 76 y 59 unidades formadoras de placas por célula para los fagos DT1 y DT6, respectivamente. Normalmente, el número de eclosión del fago T4 individual es aproximadamente de 130 fagos luego de 60 min de incubación a 37°C (Camara y de Almeida, 1991). Sin embargo, estos dos parámetros son característicos de cada fago bajo condiciones particulares y son afectados por el hospedador utilizado, el medio de cultivo empleado y la temperatura a la cual se lleva a cabo el ensayo (Guttman y col., 2005). El trabajo realizado por Goodridge y col. (2003) pone de manifiesto la variabilidad de estos parámetros para fagos de *E. coli*, donde encontraron valores variables para dos fagos de *E. coli*, obteniendo tiempos de eclosión de 40 y 52 min correspondientes a números de eclosión de 38 y 177, respectivamente.

Para evaluar la eficiencia de los sistemas fago/cepa, se determinaron las eficiencias de plaqueo (EOP) para cada uno respecto los resultados obtenidos con la cepa de referencia DH5 α . Los bacteriofagos DT1 y DT5 presentaron valores de EOP significativamente menores a la cepa de referencia, mientras que el fago DT6 solo mostró baja EOP frente a la cepa enteropatógena. Debido a características y/o factores del hospedador tales como el enmascaramiento por antígenos O del lipopolisacárido (LPS) que afecta la unión así como la inyección del ADN fágico y la presencia de

endonucleasas de restricción, la eficiencia de plaqueo (EOP), es decir, el título del fago en una línea celular bacteriana dada en comparación con el título máximo observado (para nuestro caso en la cepa de referencia) puede variar considerablemente (Kutter, 2009). La cepa de referencia DH5 α utilizada en nuestros experimentos posee un LPS truncado, haciendo más accesible la unión por parte de bacteriofagos, siendo así más permisiva al momento de la adsorción del fago e inyección del ADN fágico en comparación con las cepas STEC y EPEC evaluadas en los demás sistemas. Por esto, la EOP reducida observada para los fagos, en especial para DT5, pueden deberse a algunas de estas características bacterianas anteriormente mencionadas.

Posteriormente estudiamos la naturaleza de los receptores fágicos presentes en la superficie celular bacteriana. Los estudios se realizaron sobre células enteras tratadas química y enzimáticamente. Las células sometidas a tratamientos químicos podrían verse afectadas en su integridad celular, causando una posterior liberación de sustancias intracelulares que podrían contaminar o interferir en los experimentos de adsorción. Por esta razón, se realizaron numerosos lavados post-tratamiento previamente a los ensayos de adsorción. Los antígenos O pueden participar tanto en el reconocimiento de adhesinas fágicas o interferir con el acceso a un receptor ubicado más internamente, reduciendo o bloqueando la adsorción fágica y la EOP (Kutter y col., 2005). Anteriormente postulamos que el LPS podría interferir en la unión/adsorción de los fagos y por lo tanto reducir la EOP, sin embargo, evaluando los resultados de adsorción podemos concluir que otros factores podrían estar involucrados en la disminución de la EOP observada debido a que en células tratadas con peryodato, el cual degrada carbohidratos conteniendo motivos 1,2-diol en su estructura, se observó una disminución significativa en la adsorción fágica por lo que el LPS estaría participando en el reconocimiento y adsorción de los fagos. En conclusión, la aplicación de estos tratamientos demostró que los receptores fágicos de *E. coli* poseen carbohidratos en su composición. Resultados similares fueron obtenidos por otros autores para *E. coli* O157:H7 (Tanji y col., 2004) y otras especies bacterianas (Kiljunen y col., 2011; Sorensen y col., 2011). Por otro lado, también se han encontrado receptores fágicos en *E. coli* de naturaleza proteica, éstas son de membrana externa, generalmente porinas como OmpC (Yu y col., 2000), proteínas de transporte involucradas en el transporte de alta afinidad de sustratos como la vitamina B₁₂, o proteínas constituyentes del pili (Rakhuba y col., 2010).

Realizamos ensayos de challenge *in vitro* para evaluar la eficacia de los bacteriofagos tanto de manera individual como formando parte de un cóctel para reducir la población bacteriana inoculada en caldo. Cuando se llevaron a cabo ensayos a 37°C, se observaron reducciones significativas de células viables en todos los sistemas evaluados, alcanzándose valores de biocontrol de hasta 6,38 log UFC comparables a las alcanzadas por otros autores donde se obtuvieron reducciones de 6,0 log para la cepa *E. coli* O157:H7 a 37°C utilizando una MOI de 100 (O'Flynn y col., 2004). Resultados comparables de biocontrol se obtuvieron para cepas de *Enterobacter sakasaki* (Kim y col., 2007) así como para cepas de *Staphylococcus aureus* (García y col., 2007). Para todos los sistemas se observó una mayor eficacia y actividad lítica a tiempos cortos de muestreo, mientras que en tiempos largos se observó un recrecimiento bacteriano, obteniéndose reducciones a lo sumo de 2,29 log. Esto puede deberse a que el crecimiento bacteriano que se observa a 37°C puede promover la variabilidad fenotípica en la expresión del antígeno O pudiendo favorecer la supervivencia y crecimiento secundario de células bacterias resistentes a la infección por fagos (Dodds y col., 1987). O'Flynn y col. (2004) observaron un desarrollo bacteriano posterior en ensayos a 37°C utilizando una MOI similar a la empleada en nuestros experimentos, pasando de no detectar la bacteria (< 1 UFC) después de la primer hora de incubación a un recuento superior a 3 log UFC después de 4 h de incubación. En challenge *in vitro* con fagos específicos de *E. coli* O157, Kudva y col. (1999), si bien obtuvieron un biocontrol significativo a tiempos cortos de muestreo, observaron un recrecimiento de hasta aproximadamente 8 log UFC a las 24 h de incubación empleando una MOI = 1×10^3 con y sin aireación. En otras enterobacterias se observó un comportamiento similar de crecimiento secundario a 37°C cuando se enfrentaron células de *Enterobacter sakasaki* ($DO_{600nm} \sim 0,5$) a diferentes concentraciones de bacteriofagos, sin embargo, el recrecimiento bacteriano se observó a tiempos de muestreo menores (Kim y col., 2007). Cuando se evaluó la diferencia en la eficacia de los distintos tratamientos, comparando entre cada fago individual y con el cóctel de fagos, se observó una eficacia igual, al segundo tratamiento más eficaz, o mayor para el cóctel en el 83,33 % de los casos (10 de los 12 sistemas evaluados - 4 cepas x 3 tiempos de muestreo), diferenciándose significativamente en el 33,33 % de los sistemas respecto del segundo tratamiento más eficaz. Otros autores encontraron resultados similares (Kudva y col., 1999; O'Flynn y col., 2004), obteniendo mayores reducciones y tratamientos más eficaces utilizando mezclas conteniendo tres bacteriofagos respecto de los fagos individuales. Un factor

importante en la actividad lítica de los bacteriofagos es la temperatura a la cual se lleva a cabo el challenge. A 4°C, los valores de reducción obtenidos si bien fueron significativos en la mayoría de los sistemas, fueron en promedio inferiores al comparar con las reducciones obtenidas a 37°C, alcanzándose reducciones de a lo sumo 3,79 log UFC con el cóctel. En comparación a autores que realizaron ensayos en condiciones equivalentes y con cócteles de tres bacteriofagos, reducciones de este orden de magnitud no se pudieron alcanzar a 12°C (O'Flynn y col., 2004) mientras que se lograron reducciones similares, a saber 4,5 log UFC, a 4°C (Kudva y col., 1999) para cepas de *E. coli* O157:H7. Adicionalmente, estos autores observaron una completa eliminación del patógeno cuando un cultivo se infectaba con este cóctel de tres fagos, indicando que el efecto combinado de los fagos fue más que aditivo. Por otro lado, para evidenciar replicación por parte de los fagos durante los experimentos de challenge se siguió la evolución de los recuentos fágicos a 4 y 37°C, tanto de partículas libres como totales, a través de los tiempos de muestreo para cada fago individual en una cepa no patógena y en otra patógena. Al evaluar si se dio replicación debemos tener en cuenta el descenso inicial en el título de fagos libres provocado por el arrastre de fagos adsorbidos durante la centrifugación, por lo que se evaluó entre los tiempos de muestreo 2 a 6 h, 6 a 24 h y 2 a 24 h. Por otro lado, en la determinación del título total el factor centrifugación no está presente, siendo este recuento, en la mayoría de los casos, igual o mayor al título inicial. Por lo antes mencionado, en la mayoría de los casos se observaron diferencias significativas entre estos recuentos fágicos. En la cepa DH5 α , una cepa de un tiempo de generación largo, es decir de crecimiento lento, respecto de las patógenas, no se observó una replicación activa por parte de los fagos a ninguna de las temperaturas evaluadas, sin embargo, a 37°C se observó una tendencia creciente en el título de fagos totales. Para la cepa patógena, en concordancia con los resultados obtenidos para DH5 α a 4°C, tampoco se observó replicación posiblemente debido a la ausencia de metabolismo bacteriano, mientras que a 37°C se obtuvieron títulos con una tendencia creciente para los dos fagos evaluados, mostrando ambos una replicación que generó un título de a lo sumo un orden de magnitud mayor respecto del inicial. Algunos autores encontraron resultados similares a 37°C para bacteriofagos tipo CEV1 de *E. coli*, observando una disminución inicial y posteriormente obteniendo un aumento de casi 2 órdenes de magnitud utilizando una MOI baja (Raya y col., 2006). Por otro lado, Kudva y col. (1999) encontraron que a 4°C y utilizando una MOI de 10³ el título fágico se mantuvo constante mientras que a 37°C aumento 10 veces, sugiriendo que los

bacteriofagos solo se replicaron a la temperatura permisiva para el crecimiento bacteriano. Adicionalmente, Chibani-Chennoufi y col. (2004) obtuvieron altos niveles de replicación para fagos de *E. coli* a 37°C, registrándose aumentos en el título fágico del orden de 4 log UFP/ml utilizando un valor de MOI de 0,1, permitiendo así más de un ciclo de replicación.

Posterior a los ensayos de biocontrol *in vitro* en caldo realizamos las determinaciones sobre la matriz alimentaria, más específicamente sobre alimentos cárnicos y lácteos. En esta sección de la discusión trataremos el biocontrol sobre alimentos cárnicos tanto con fagos individuales como formando parte de un cóctel. Cuando se evaluaron los resultados obtenidos con fagos individuales, tanto DT1 como DT6, produjeron valores de reducción significativas en la mayoría de los sistemas, aproximadamente en el 50 % de las condiciones evaluadas, observándose reducciones que oscilaron entre 0,3 y 1,73 log UFC. Resultados similares se han obtenido empleando fagos individuales tanto a 5 como a 24°C en carnes crudas y cocidas para *Salmonella* y *Campylobacter* (Bigwood y col., 2008) así como para *Listeria monocytogenes* en alimentos cárnicos listos para el consumo (Guenther y col., 2009). Por otro lado, el fago DT5 no produjo reducciones significativas en su bacteria hospedadora, esto puede deberse al bajo inóculo bacteriano respecto de la concentración fágica utilizada en este sistema. Los requisitos de un umbral de densidad de células hospedadoras bacterianas relativamente alto pueden limitar el impacto de los fagos en las bacterias, constituyendo un impedimento en el biocontrol por fagos (Greer, 2005). Por otro lado, en situaciones reales es poco probable encontrar un nivel de contaminación muy alto en alimentos por *E. coli* O157:H7. De hecho, muchos brotes causados por *E. coli* O157:H7 han sido provocados por menos de 20 *E. coli* O157:H7 UFC/g de alimento, a menudo por menos de 1 UFC/g de alimento (Meng y col., 2001). Por lo tanto, si bien en algunos casos se observaron reducciones relativamente bajas, los bacteriofagos DT1 y DT6 tienen el potencial para eliminar este tipo de patógenos presentes en bajo número. En nuestros ensayos se encontró que el nivel de biocontrol para todos los fagos analizados fue dependiente de la dosis, siendo la concentración más alta la más eficaz, como también fue encontrado por Leverentz y col. (2001). Teniendo en cuenta que el biocontrol en una matriz alimenticia está gobernado por parámetros más complejos respecto a un medio de cultivo dado, hay varios factores que influyen en la inactivación en alimentos. El más relevante en nuestros experimentos es la capacidad de la matriz alimentaria para absorber líquido de la suspensión fágica, siendo éste un

parámetro decisivo que limita físicamente la distribución de partículas fágicas con el fin de alcanzar a todas las bacterias diana. Por lo tanto, la eficacia disminuida de estos tratamientos puede ser debido parcialmente a la difusión limitada, lo que impide el contacto entre las bacterias y los fagos. Por otra parte, las bacterias diana pueden estar embebidas dentro de la compleja matriz del alimento conformada por la red de proteínas, así como otras moléculas presentes en carnes, que pueden proteger las células bacterianas del alcance de los fagos (Sulakvelidze, 2013). Por estos motivos, un mayor efecto de biocontrol puede lograrse mediante la modificación de la aplicación del fago, por ejemplo, mediante el uso de volúmenes de líquido más grandes para evitar la absorción total de líquido. Por lo antes mencionado varios autores (Sulakvelidze y Barrow, 2005; Sulakvelidze y Kutter, 2005; Tanji y col., 2004) han propuesto que la utilización de mezclas de fagos conteniendo varios fagos líticos diferentes para la misma especie bacteriana reduciría la probabilidad de seleccionar mutantes resistentes a los cócteles. Una posible explicación para este fenómeno es que si fagos diferentes se unen a distintos receptores en las bacterias, las mutaciones en un receptor fágico no alterará la susceptibilidad del mutante a otro fago que se une a un receptor diferente en la membrana celular bacteriana (Tanji y col., 2004). Cuando analizamos los resultados obtenidos con los cócteles fágicos a un valor de MOI alto, éste fue capaz de producir una reducción mayor de células viables de STEC464 O157:H7 respecto de los fagos individuales, alcanzándose valores de biocontrol de 2,58 log UFC. Esto indica que los fagos pueden ser de valor práctico si se desarrollan cócteles conteniendo muchos fagos diferentes, por un lado para reducir la aparición de mutantes resistentes y por otro lado para expandir el rango de hospedador del cóctel. Además, el uso de altas concentraciones de fagos, es decir MOI elevadas, también contribuyó a lograr un tratamiento efectivo en concordancia con otros autores que han informado que la utilización de concentraciones mayores de fagos generalmente resulta en una mayor inactivación (Guenther y col., 2009). Además, la cepa DH5 α se vio significativamente reducida solo a 5°C, esta reducción puede haber sido ocasionada por el mecanismo de lisis desde afuera (lysis from without, LFW) dado que ésta cepa posee un lipopolisacárido (LPS) más corto, siendo más permisiva y susceptible a este mecanismo. Por otro lado, para STEC464 O157:H7 a 5°C este mecanismo no se observó así como tampoco se obtuvieron reducciones significativas, pudiéndose deberse en este caso a la ausencia de crecimiento bacteriano necesario para la replicación del fago. Para los demás sistemas evaluados no se observaron reducciones significativas cuando se utilizó

el cóctel con la excepción de algunos casos puntuales. Por ejemplo, a 24°C, el número de células de DH5 α no se vio afectado y después de 24 h de incubación se observó un recrecimiento bacteriano. Esta recuperación en el número de células puede deberse a varios factores anteriormente mencionados, por ejemplo, células que escapan al tratamiento por difusión limitada de los fagos y generando así una subsiguiente multiplicación bacteriana. Otros autores (Abuladze y col., 2008) encontraron resultados comparables a los obtenidos en esta tesis, obteniendo reducciones de hasta 1,27 log UFC en carnes rojas utilizando un cóctel compuesto de tres bacteriofagos a valores moderados de MOI, a saber $\sim 5 \times 10^4$. Adicionalmente, O'Flynn y col. (2004) lograron reducir por debajo de los niveles de detección 10^2 UFC en siete de nueve muestras de carne con un cóctel de tres fagos específicos para *E. coli* O157:H7, sin embargo, en estos experimentos se utilizó una MOI entre uno o dos órdenes de magnitud mayor, a saber 10^6 , que los empleados en el presente trabajo. Los porcentajes de recuperación bacteriana desde la matriz cárnica obtenidos oscilaron entre el 61,4 y el 85,4 %, siendo similares a los obtenidos para cepas de *Salmonella* (88,3 %) y *Campylobacter* (55,4 %) por otros autores (Bigwood y col., 2008). En algunos sistemas puede observarse una disminución inicial en el número de células viables, incluyendo los controles sin el agregado de bacteriofagos. Esto está probablemente asociado al estrés térmico que sufren las células bacterianas además de una recuperación variable desde la carne debido a la adhesión bacteriana.

En los ensayos de biocontrol en productos cárnicos encontramos un aumento en el número de células viables después de 24 h a 24°C, sugiriendo una potencial selección de variantes fagorresistentes bajo estas condiciones de ensayo. Otros autores también han informado un crecimiento bacteriano posterior durante ensayos *in vitro* (O'Flynn y col., 2004). Actualmente, la aparición de BIMs durante experimentos realizados en productos lácteos y cárnicos es probablemente el impedimento más importante para el desarrollo de protocolos exitosos de biocontrol en alimentos mediante la utilización de fagos. Esta aparición de BIMs que podría poner en peligro la eficacia de un tratamiento con fagos para asegurar la inocuidad de los alimentos, a menudo se asocia con mutaciones puntuales en los genes que codifican moléculas receptoras en la superficie celular bacteriana que comúnmente revierten rápidamente a sensibilidad al fago (García y col., 2007). Los factores que contribuyen a la resistencia contra un fago lítico incluyen la alteración en la longitud del lipopolisacárido (LPS), en la regulación de su producción, y la pérdida completa de los receptores. Sin embargo, éstas alteraciones le

proporcionan a la bacteria solo una ventaja temporal en la presencia del fago pero podrían ser también perjudiciales. Kudva y col. (1999) proponen que las bajas temperaturas y la ausencia de crecimiento bacteriano favorecen la adsorción del fago y la infección. Por el contrario, temperaturas más altas, el crecimiento celular, y el potencial para la variabilidad fenotípica en la expresión del antígeno O favoreciendo la supervivencia de las células resistentes a los fagos. Por esto, nos propusimos analizar la existencia de mutantes insensibles a bacteriofagos (BIMs) espontáneos, presentes de manera natural en la población bacteriana con el fin de evaluar tanto las frecuencias de aparición como la estabilidad en cada uno de los sistemas evaluados. Con respecto al aislamiento de BIMs, de las dos metodologías utilizadas, el método de cultivo secundario fue más eficiente que el de aislamiento en carne para la obtención de mutantes fagorresistentes debido a que en el primero se observó una mayor recuperación de BIMs confirmados. Además, la obtención de mutantes confirmados fue más eficiente cuando se utilizó el fago DT5, ya que el 100 % de las variantes presuntivas obtenidas presentaron el fenotipo de resistencia, mientras que para los fagos DT1 y DT6 solo se obtuvo un 55 y 40 % de BIMs confirmados, respectivamente. Posterior a la confirmación se determinó la frecuencia de aislamiento de BIMs para cada sistema cepa/fago. Como se informó anteriormente para otros sistemas (O'Flynn y col., 2004), todos los BIMs de *E. coli* O157:H7 presentaron una frecuencia de aparición baja frente a fagos pertenecientes a la familia *Myoviridae*. Estos autores encontraron que las frecuencias de aislamiento oscilaron entre $1,1 \times 10^{-6}$ y $1,9 \times 10^{-6}$, sin embargo, para BIMs provenientes del enfrentamiento con un fago de la familia *Siphoviridae*, la frecuencia observada fue superior, a saber $3,3 \times 10^{-4}$. Las variantes fagorresistentes aisladas en esta Tesis presentaron frecuencias de aislamientos bajas, en el rango de $3,7 \times 10^{-7}$ y $1,8 \times 10^{-6}$, comparables e incluso inferiores a las obtenidas para la familia *Myoviridae* por O'Flynn y col. (2004). La estabilidad de la fagorresistencia presentó una amplia variabilidad, y sin bien debería evaluarse un mayor número de mutantes, la estabilidad de los BIMs estaría asociada a cada sistema y condición en particular dependiendo del tipo de alteración sufrida por la bacteria para ser insensible al ataque de cada fago específico. El razonamiento detrás de esta hipótesis es que la alteración de un receptor fágico esencial para la supervivencia de una bacteria generará BIMs inestables para un determinado fago que lo utilice, mientras que la alteración de un receptor fágico no esencial producirá BIMs más estables para otro fago que se una a éste, en ambos casos, dependiendo y siempre teniendo en cuenta las necesidades y limitaciones

metabólicas de cada bacteria en una condición determinada. En nuestros ensayos los BIMs obtenidos bajo la presión selectiva de los fagos DT1 y DT6 mostraron una estabilidad moderada oscilando entre el tercer y séptimo subcultivo, presentando DT1 los mayores niveles de estabilidad, contrariamente, los mutantes aislados utilizando el fago DT5 presentaron los menores niveles de estabilidad. Además, no se encontró una diferencia en la estabilidad entre los BIMs provenientes de carnes y de cultivo secundario. Por otro lado, al analizar la reversión del fenotipo fagoresistencia encontramos que después de ser propagado a través de 50 generaciones, solo un BIMs proveniente de la exposición a DT6 fue susceptible a este fago, es decir, revirtió el fenotipo, mientras que los demás BIMs analizados, resistentes a DT1 o DT6, no mostraron reversión al fenotipo de sensibilidad. En resumen, todos los BIMs presentaron una baja frecuencia de aparición (García y col., 2007) y una estabilidad variable (O'Flynn y col., 2004) en concordancia con los resultados obtenidos por otros autores para sistemas *S. aureus*/fago y *E. coli* O157:H7/fago, respectivamente. Estos hallazgos sugieren que los BIMs de *E. coli* no deben impedir el uso de fagos como herramientas de control biológico, principalmente debido a la baja frecuencia de aparición observada para todos los fagos evaluados. En nuestros ensayos el cóctel de fagos redujo la aparición de BIMs presuntos, sin embargo, se necesitan más estudios para evaluar las condiciones óptimas que permitan la reducción de aparición de BIMs tales como las mencionadas anteriormente, a saber, la adición de más fagos diferentes en la mezcla de un cóctel.

Respecto de la problemática de la contaminación de productos lácteos por cepas patógenas de *E. coli*, los bovinos son un reservorio de *E. coli* y la contaminación fecal pueden ocurrir durante el ordeño (Fremaux y col., 2008) así como después de la pasteurización. Sin embargo, los informes relacionados con el control biológico de *E. coli* en leche utilizando fagos son muy escasos. Los cultivos iniciadores lácticos se componen de bacterias del ácido láctico (BAL) pertenecientes a géneros tales como *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Leuconostoc* y proporcionan una función de protección por sí mismos a través del proceso de fermentación. Sin embargo, la contaminación de la materia prima después del proceso de pasteurización puede conducir a la reducción en la eficiencia de estas BAL, modificando la calidad y el sabor de los productos finales y causando pérdidas económicas para los productores así como intoxicación en los consumidores. Por otra parte, algunos productos lácteos se elaboran con leche cruda, otra de las principales preocupaciones en materia de inocuidad

alimentaria. Tanto en la industria cárnica como en las lácteas utilizan métodos físicos y químicos para la conservación con los mismos efectos indeseables. Debido a la alta sensibilidad al calor de estos patógenos, los tratamientos térmicos son los más ampliamente aplicados con el fin de inactivarlos cuando están presentes en leche cruda. Sin embargo, el problema no puede ser resuelto si se producen contaminaciones post-pasteurización ya que se demostró la supervivencia de *E. coli* O157:H7 después de 28 días en leche a 5°C (Wang y col., 1997) y después de 21 días en suero de queso a 4, 10 o 15°C (Marek y col., 2004). Las consecuencias podrían ser aún peor si tenemos en cuenta que las temperaturas de pasteurización no fueron validadas para toxina Shiga libre (Rasooly y Do, 2010), la cual requiere 5 minutos a 100°C para su inactivación. Por lo tanto, la posible persistencia de la toxina resistente al calor refuerza la necesidad de un método para controlar el patógeno durante el crecimiento temprano con el fin de bloquear su producción. Estudios epidemiológicos llevaron al aislamiento de *E. coli* O157:H7 de los tubos de conducción de la leche y equipos de envasado en plantas de productos lácteos, indicando una pasteurización inadecuada o una contaminación post-pasteurización. Como consecuencia, muchos estudios han hecho hincapié en el diseño y la aplicación de varias estrategias complementarias para reducir la incidencia de enfermedades transmitidas por alimentos relacionadas con los productos lácteos (Viazis y Diez-González, 2011).

Por lo antes dicho, luego de estudiar el efecto de los fagos sobre cepas patógenas de *E. coli* sobre productos cárnicos así como de evaluar la potencial nocividad de BIMs, nos propusimos realizar ensayos de biocontrol sobre productos lácteos, en primera instancia durante un proceso de fermentación láctica y luego durante un proceso de cuajado. Los fagos DT1 y DT6, ya sea solos o mezclados en un cóctel, fueron evaluados por su eficacia para inhibir el crecimiento de *E. coli* durante la fermentación de leche. El crecimiento de *Streptococcus thermophilus* 10-C fue similar en todos los experimentos, así como el descenso del pH, independientemente de la presencia de las cepas de *E. coli* y de los fagos ensayados. Otros autores encontraron que en presencia de fagos líticos contra *S. aureus* tanto los cultivos iniciadores como el pH no se vieron afectados y evolucionaron a su tasa normal durante experimentos de cuajada ácida (García y col., 2007). Los fagos se vieron reducidos en su número a través de los experimentos, el pH bajo y el ácido láctico acumulado podrían estar relacionados con la inactivación parcial de los fagos observada al final del proceso de fermentación. García y col. (2007) observaron un aumento en el título fágico en el período donde se observó la reducción

bacteriana, sin embargo, al finalizar los experimentos de cuajada ácida observaron una disminución en la viabilidad fágica similar a las obtenidas en el presente estudio. En cuanto a las cepas de *E. coli*, algunas fueron eliminadas completamente mientras que otras presentaron un recrecimiento posterior, hecho observado por otros autores para *Enterobacter sakazakii* (Kim y col., 2007) en leche y *L. monocytogenes* (Guenther y col., 2009) en leche chocolatada. Por ejemplo, Kim y col. (2007) encontraron que la concentración de fago entre 10^7 y 10^9 UFP/ml (MOI = 10^5 a 10^7) fue capaz de inhibir significativamente el crecimiento de *Enterobacter sakazakii* en fórmula reconstituida para lactantes, aunque de una manera dependiente de la concentración ya que las concentraciones de fagos más bajas resultaron en un recrecimiento de *Enterobacter sakazakii*. Los fagos ensayados en este estudio mostraron actividad bacteriostática seguida del recrecimiento bacteriano mencionado, sin embargo en los ensayos en cuestión se utilizaron fagos individuales. Por otro lado, otros autores encontraron una actividad bacteriolítica (Zuber y col., 2008), en donde un cóctel de cinco fagos a una MOI de 10^6 eliminaron completamente a *Enterobacter sakazakii*. Adicionalmente, Moradpour y col. (2009) evaluaron un bacteriofago modificado genéticamente a una MOI de 100 para reducir *E. coli* O157:H7 en leche (1×10^7 UFC/ml) y, si bien después de 120 min obtuvieron una reducción muy significativa (6 log UFC), no se observó la eliminación completa del patógeno. Por otro lado e independientemente de la presencia de fagos, se observó una disminución en la viabilidad de las cepas de *E. coli* como resultado del bajo pH alcanzado durante la acidificación, resultando las cepas DH5 α y STEC O157:H7 las más afectadas. Aunque la acidez es conocida por afectar el crecimiento y la supervivencia de las cepas EPEC y STEC, los valores de pH alcanzados durante la fermentación de leche no son suficientes para garantizar su inactivación (Farrokh y col., 2012). Por otra parte, se ha sugerido que la adaptación ácida a un pH no letal podría aumentar la supervivencia de *E. coli* O157:H7 (Jordán y col., 1999). El efecto antagonista de los ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas producidas por cepas iniciadoras en lácteos también puede contribuir a la inhibición de *E. coli* (Akpınar y col., 2011). Sin embargo, el efecto inhibitor del pH bajo se observó sólo después de que ocurrió una multiplicación considerable de *E. coli*, cuando el riesgo de la acumulación de la toxina Shiga es alta. Por consiguiente, y teniendo en cuenta nuestros resultados, el uso de los fagos DT1 y DT6, ya sea individualmente o como un cóctel, podría ser una herramienta valiosa para el control del crecimiento temprano de *E. coli*, especialmente de STEC O157:H7, limitando la

producción y acumulación de toxinas. Vale la pena señalar que los fagos DT1 y DT6 fueron más eficaces como un cóctel que individualmente ya que la inactivación total del agente patógeno STEC O157:H7 se logró después de 1 h de incubación en el primer caso mientras que se necesitó al menos 8 h para los fagos individuales. O'Flynn y col. (2004) también reportaron tiempos de inactivación más cortos cuando se utiliza un cóctel de fagos durante ensayos *in vitro*. Por otro lado, los agentes patógenos EPEC920 y STEC no-O157 ARG4827 no fueron eliminados por los fagos DT1 y DT6, respectivamente. La infección fágica exitosa y la muerte del hospedador depende en gran medida de la MOI (Cairns y col., 2009). La MOI utilizada para la cepa STEC no-O157:H7 y EPEC920 puede no ser lo suficientemente alta para conseguir un control biológico completo, aunque la reducción del recuento de células viables de esas cepas reduciría la posibilidad de la producción de toxinas. Otros autores coinciden en gran medida en la utilización de MOIs elevadas para obtener mayores reducciones bacterianas en matrices alimenticias (por ejemplo, MOI = 10^6 , O'Flynn y col., 2004; 6×10^7 UFP/cm², Carlton y col., 2005), mientras que los tratamientos con valores menores de MOI eventualmente conducen al recrecimiento bacteriano. Teniendo en cuenta lo anterior y evaluando los resultados alentadores obtenidos con las cepas DH5 α y STEC O157:H7, los fagos pueden ser concentrados aún más, hasta aproximadamente 10^{12} UFP/ml utilizando PEG8000 y gradientes de CsCl, para ensayar si MOIs más elevados permiten una inactivación total de STEC no-O157 y EPEC.

A continuación se evaluaron los fagos DT1 y DT6, ya sea solos o mezclados en un cóctel, por su eficacia para inhibir el crecimiento de *E. coli* durante un proceso de cuajado enzimático. En la mayoría de los ensayos el título fágico se mantuvo constante con la excepción del sistema cóctel/DH5 α en el cual se observó una leve disminución luego de 24 h de incubación. En los ensayos realizados por García y col. (2007) observaron una viabilidad fágica similar a las obtenidas en nuestros ensayos durante un proceso de cuajado enzimático, donde el título fágico permaneció estable a través de todo el experimento.

Respecto de las cepas de *E. coli*, algunas fueron eliminadas completamente mientras que otras permanecieron a niveles detectables, sin embargo, ninguna presentó un recrecimiento posterior al final del experimento. Las cepas EPEC920 y STEC no-O157 se comportaron de manera similar a los experimentos en fermentos, siendo estos los sistemas que mostraron la menor reducción frente a los fagos DT1 y DT6, respectivamente. La MOI empleada en la cepa STEC no-O157 fue de $5,4 \times 10^1$, por lo

que esto podría explicar la baja reducción en el número de células viables observada, sin embargo, para la cepa EPEC920 se utilizó una MOI de aproximadamente de 3×10^4 , lo suficientemente alta como para alcanzar reducciones elevadas aunque siempre mostró, por un lado un crecimiento activo en cuajada con un mínimo efecto bacteriolítico al final del experimento, y por otro lado un efecto a lo sumo bacteriostático en suero después de 2 h de incubación. Por otro lado, en ausencia de fagos y a diferencia de los experimentos en fermentos, no se observó una disminución en la viabilidad de las cepas de *E. coli*. Esto puede deberse en parte a que, a diferencia de los fermentos, en el cuajado enzimático se da una disminución mínima, hasta $\sim 6,5$, en el valor del pH, ya que se sabe que el pH bajo tiene una influencia directa sobre la inactivación parcial de cepas de *E. coli* (Farrokh y col., 2012).

Vale la pena señalar que, al contrario que en los ensayos en leche fermentada, los fagos DT1 y DT6 fueron más eficaces individualmente que formando parte de un cóctel ya que la inactivación total del agente patógeno STEC O157:H7 se logró después de 1 h de incubación con los fagos individuales mientras que se detectaron células viables hasta 4 h de incubación para los fagos combinados. Contrariamente y a pesar de que se utilizó una MOI menor en comparación con la utilizada para STEC O157:H7, la cepa DH5 α fue rápida y completamente inactivada tanto en suero como en cuajada por el cóctel fágico. En estudios que emplearon cócteles de fagos líticos como herramientas de biocontrol de *S. aureus* durante la producción enzimática de cuajada obtuvieron reducciones de células viables comparables a las obtenidas en este estudio (García y col., 2007). Los estudios de biocontrol durante estos procesos de elaboración se han focalizado sobre patógenos distintos a *E. coli*. Respecto de *Salmonella*, Modi y col. (2001) ensayaron la actividad del fago SJ2 durante la producción y el almacenamiento de queso Cheddar. Ellos concluyeron que la adición del fago SJ2 a la leche utilizada para la producción de queso eliminó completamente y redujo significativamente el número de *Salmonella* Enteritidis en queso hecho de leche pasteurizada y cruda sin pasteurizar, respectivamente. Sin embargo, el número relativamente elevado de *Salmonella* Enteritidis en la leche inoculada artificialmente (4 log UFC/ml) puede no ser encontrado bajo condiciones normales de producción de quesos comerciales. *Listeria monocytogenes* es una bacteria ambiental resistente a tratamientos físicos, químicos y a agentes biológicos (Pearson y Marth, 1990; Tasara y Stephan, 2006). Aunque la pasteurización sea un tratamiento seguro, existe el riesgo de recontaminación por parte de este patógeno especialmente en productos lácteos tales como el queso

blando. La aplicación del fago de *L. monocytogenes* P100 en un modelo de superficie del queso artificial y durante un proceso de producción de queso comercial, tanto dosis repetidas de fagos a alta concentración como una sola dosis utilizando un volumen más grande para optimizar la distribución del fago en la superficie del queso, inactivo completamente a *L. monocytogenes*, sin observarse un recrecimiento posterior (Carlton y col., 2005). Por otro lado, un fago relacionado a P100, a saber A511, se evaluó por Guenther y col. (2009) para el biocontrol en queso mozzarella contaminado artificialmente con *L. monocytogenes* y las reducciones obtenidas oscilaron entre 2,3 - 5,0 log UFC después de 6 días a 6°C. Además, un experimento prolongado de más de 13 días a 6°C en queso mozzarella dio lugar a la erradicación completa del patógeno.

En los ensayos de biocontrol en alimentos anteriormente citados cabe destacar que independientemente del patógeno que este siendo evaluado todos los autores emplearon un valor de MOI elevado para eliminar u obtener reducciones bacterianas significativas, a saber Guenther y col. (2009) utilizó una MOI de 3×10^5 , Modi y col. (2001) una de 10^4 , mientras que Carlton y col. (2005) emplearon el valor más elevado, siendo este de 3×10^6 .

Finalmente evaluamos la descontaminación de superficies sólidas empleando cócteles de bacteriofagos. En la industria cárnica así como en el hogar de los consumidores se emplean maquinarias y utensilios como picadoras de carne, tablas de picar y cuchillos. Estos son una potencial vía de contaminación de otros alimentos, hecho también conocido como contaminación cruzada, debido a una mala higiene o a la manipulación simultánea de una superficie sólida con alimentos de orígenes diferentes.

La contaminación de los equipos de procesamiento de alimentos, superficies e instalaciones por bacterias patógenas tales como *E. coli*, *Salmonella* spp. y *L. monocytogenes* puede ser un problema grave (Abuladze y col., 2008). Algunas bacterias se adhieren a las superficies como su forma predominante de supervivencia en la naturaleza (Lindsay y Von Holy, 1999) y pueden sobrevivir en las manos, esponjas, paños, utensilios y monedas por horas o días después del contacto inicial (Scott y Bloomfield, 2008). La descontaminación representa un gran desafío debido al aumento de la resistencia de muchas bacterias potencialmente patógenas a los desinfectantes tradicionales tales como el ácido hipocloroso y el cloruro de benzalconio (Davidson y Harrison, 2002). Además, muchos desinfectantes químicos pueden ser corrosivos y tóxicos, por lo tanto, inaceptable para su uso en alimentos o en superficies que entran en contacto directo con los alimentos, por esto, los fagos pueden considerarse como una

potencial alternativa o complemento a los desinfectantes químicos para el biocontrol en superficies de procesamiento de alimentos. Por otro lado, la aparición de cepas resistentes a antibióticos de patógenos transmitidos por los alimentos ha generado un mayor interés en el desarrollo de tratamientos bactericidas alternativos, por ejemplo, los bacteriofagos (Merrill y col., 1996). Como resultado de lo antes dicho, son necesarios nuevos y novedosos enfoques para contribuir a la prevención de enfermedades causadas por bacterias patógenas, ya sea previniendo la ingestión de alimentos contaminados por *E. coli* O157:H7 y por otro lado asistiendo en la descontaminación de superficies de procesamiento de alimentos y equipos que potencialmente pueden contaminar un alimento. El interés por los bacteriofagos es impulsado por la demanda de métodos no antibióticos y naturales que puedan cumplir con los estándares de alimentos orgánicos para reducir los patógenos en los alimentos (OMRI, 2010). Una de sus ventajas es la especificidad, que permite su uso como biocidas para inactivar bacterias patógenas en situaciones que se basan en la presencia de la flora natural para lograr, por ejemplo, la fermentación deseada de los productos cárnicos (Ammor y col., 2004). Idealmente, estos nuevos enfoques deberían ser eficaces, seguros y económicos. Los bacteriofagos líticos cumplen estos tres requisitos por lo que podrían constituir una nueva herramienta en la lucha contra la resistencia bacteriana.

El objetivo de estos ensayos fue determinar el efecto del cóctel de fagos en la viabilidad de cepas de *E. coli* patógenas sobre superficies inanimadas experimentalmente contaminadas en materiales comúnmente encontrados en plantas de procesamiento de alimentos así como en el hogar. Tanto en los cubreobjetos de vidrio como sobre las fichas de acero inoxidable los cócteles de fagos resultaron ser muy eficaces a ambas temperaturas para el biocontrol de las cepas patógenas de *E. coli* evaluadas. Las reducciones obtenidas en cubreobjetos de vidrio alcanzaron valores de hasta 5 log UFC, lográndose, en la mayoría de los casos, la eliminación completa del patógeno. Sin embargo, en algunos casos no se obtuvo la eliminación completa y en otros casos, en donde no se pudo detectar el patógeno en los primeros tiempos de muestreo, se observó un recrecimiento posterior. En los ensayos realizados a 5°C y cuando el patógeno no se pudo eliminar, a saber STEC no-O157, no se observó un recrecimiento, mientras que en los ensayos donde no se pudo detectar en los tiempos de muestreo anteriores, el recrecimiento observado fue mínimo y de aproximadamente 1 log UFC. Por otro lado, en un único caso se observó un recrecimiento hasta alcanzar los 6 log UFC a 37°C, aunque este recrecimiento siempre fue significativamente menor al control sin fago. Un

estudio reciente realizado por Abuladze y col. (2008) informaron que altos niveles (10^{10} UFP/ml) de una mezcla de tres bacteriofagos líticos inactivaron el 99,99% de una mezcla de tres *E. coli* O157:H7. Además, la reducción permaneció significativa, siendo aproximadamente del 98 y del 94%, con la mezcla de fagos diluida 10 y 100 veces (10^9 UFP/ml y 10^8 UFP/ml), respectivamente, sobre cubreobjetos de vidrio impregnados con materia orgánica seca. De los datos aportados por estos autores se puede ver la relación directa que hay entre la concentración de fagos y la reducción en el número de células viables de los patógenos evaluados.

Respecto del biocontrol sobre acero inoxidable, todas las cepas de *E. coli* evaluadas fueron eliminadas completamente a 5°C y no presentaron un recrecimiento posterior. A 37°C , se observó una disminución progresiva en el número de bacterias, no pudiéndose detectar ninguna célula viable a las 3 h de incubación, sin embargo, las cepas EPEC920 y STEC O157:H7 (464) presentaron un recrecimiento posterior. La cepa EPEC920 desarrolló hasta un orden de magnitud de 3 log UFC, aunque la reducción en el número de células viables respecto del control fue mayor a 5 log UFC, es decir, se obtuvo un buen nivel de biocontrol. Por otro lado, la cepa shigatoxigénica creció hasta aproximadamente 6 log UFC solo cuando se inoculó el acero inoxidable a alta concentración bacteriana, posiblemente debido a la MOI baja utilizada, sin embargo, y a pesar del recrecimiento, aun se diferenció significativamente del control. Viazis y col. (2010) obtuvieron resultados similares a los obtenidos en este estudio, observando reducciones que oscilaron entre 0,52 y 2,05 log UFC a 4°C y entre 1,90 y 5,25 log UFC a 37°C . Otros investigadores han informado que los bacteriofagos fueron capaces de inactivar eficazmente patógenos bacterianos cuando se encuentran unidos a superficies duras que se encuentran en entornos de procesamiento de alimentos, pero sólo a valores de MOI de 1×10^3 (Abuladze y col., 2008; Hibma y col., 1997) o superiores (1×10^5) (Sharma y col., 2005). Otros autores obtuvieron niveles de biocontrol moderados utilizando altos valores de MOI, por ejemplo, un estudio realizado por Sharma y col. (2005) trató de determinar la eficacia del bacteriofago lítico KH1 contra dos cepas de *E. coli* unidas a fichas de acero inoxidable. Poblaciones iniciales de células unidas de 2,6 log UFC/ficha de ambas cepas se redujeron en 1,2 log UFC/ficha durante el tratamiento con el fago KH1 a $7,7$ log UFP/ml durante 4 días a 4°C utilizando una MOI de aproximadamente 1×10^5 . Respecto de otros patógenos, en un estudio realizado por Roy y col. (1993), se utilizaron fagos para la desinfección de superficies de acero inoxidable y de polipropileno contaminadas con dos cepas de *L. monocytogenes* a

temperatura ambiente. Ellos encontraron que la mezcla de fagos, a una MOI de aproximadamente 1×10^4 , fue capaz de reducir los niveles de bacterias por 3,7 y 3,5 log UFC después de una hora en acero inoxidable y polipropileno, respectivamente. Otros autores encontraron que utilizando como herramienta de biocontrol el fago P100, las reducciones en el número de células viables de *L. monocytogenes* en acero inoxidable oscilaron entre 3,5 y 5,4 log UFC después de 24 h de incubación (Soni y Nanapaneni, 2010). En nuestro estudio, y a valores de MOI y condiciones de temperatura similares a las citadas previamente, obtuvimos una inactivación de aproximadamente 6 log UFC/ml de *E. coli* después de una hora de tratamiento. Por otro lado y considerando condiciones un poco más realistas, los niveles de *E. coli* utilizados en nuestro estudio fueron 50 a 5.000 veces más alta que los encontrados en alimentos o superficies contaminadas naturalmente, por lo tanto, y considerando todo lo antes mencionado, los bacteriofagos podrían ser útiles para descontaminar superficies duras de procesamiento de alimentos.

Cabe destacar que la mayoría de las investigaciones realizadas hasta la fecha tanto en productos alimenticios, cárnicos y lácteos, como en superficies sólidas, están enfocadas específicamente al biocontrol de cepas pertenecientes al serogrupo O157:H7. Patógenos transmitidos por alimentos como EPEC y STEC no-O157 también se encuentran, además del alimento, en los ambientes donde éstos se procesan (Kaspar y col., 2010; FDA, 2012). Los fagos utilizados en el presente estudio son líticos para cepas de *E. coli* pertenecientes a diferentes serogrupos (O157 y no-O157) y virotipos (STEC y EPEC), por lo tanto tienen una mayor cobertura sobre el rango de patógenos que se pueden encontrar en productos cárnicos y lácteos y sobre las superficies de procesamiento de alimentos.



CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Se aislaron bacteriofagos líticos para cepas de *E. coli*, posteriormente analizamos su morfología así como la presencia de genes potencialmente nocivos. Por otro lado, caracterizamos sus actividades líticas *in vitro* tanto en caldo como en distintas matrices alimenticias para evaluar su uso como agentes de biocontrol de STEC y EPEC. Evaluamos y caracterizamos los mutantes fagorresistentes llamados BIMs. Adicionalmente, se evaluó la eficacia de tratamiento con fagos sobre superficies sólidas emulando superficies potencialmente contaminadas que se pueden encontrar en un ambiente industrial.

En el presente trabajo de Tesis se lograron aislar seis bacteriofagos desde materia fecal humana de composición diarreica que presentaron un carácter lítico solo frente a cepas patógenas de *E. coli*.

A través de estudios moleculares fue posible determinar la ausencia de los genes de patogenicidad *stx1*, *stx2*, *eaeA*, *LT1* y *ST1* en los seis bacteriofagos.

Según las microscopías electrónicas, los fago DT1 y DT6 forman parte de la familia *Myoviridae* con dimensiones morfológicas acordes a la familia fágica y a la especie bacteriana.

Con respecto a la influencia de parámetros fisicoquímicos, en general los fagos evaluados mostraron una actividad lítica alta con excepción de los extremos evaluados, a saber tanto pH como temperaturas bajas. Por otro lado, se observó una gran estabilidad en el título de fagos durante el almacenamiento refrigerado a 4°C.

Cuando se evaluó la interacción con sus cepas sensibles, se observó que los fagos DT1, DT2 y DT5 resultaron infectivos para un número reducido de cepas mientras que los fagos DT3, DT4 y DT6 resultaron infectivos para un elevado número de cepas patógenas *E. coli*.

Los ensayos posteriores se realizaron sobre el fago DT1 y DT6 por ser, entre los fagos *Myoviridae* seleccionados, los que presentaron los rangos de hospedador más contrastantes. Además, en algunos casos el fago DT1 se reemplazó por DT5 debido a la resistencia a DT1 por parte de la cepa STEC no-O157:H7 ARG4827.

Continuando con la interacción fago-cepa, los fagos DT1 y DT6 presentaron tiempos y números de eclosión similares. Adicionalmente, las eficiencias de plaqueo (EOP) variaron de acuerdo al sistema evaluado.

En los ensayos de adsorción, la utilización de peryodato y proteinasa K permitieron evidenciar la naturaleza hidrocarbonada de los receptores fágicos utilizados por los fagos DT1, DT5 y DT6.

Los ensayos de challenge *in vitro* permitieron evidenciar una alta eficiencia lítica de los fagos evaluados frente a sus cepas sensibles. Específicamente, pudimos observar una mayor actividad lítica a la mayor temperatura evaluada, sin embargo, en la mayoría de los casos obtuvimos valores de reducción significativos a la menor temperatura. Por otro lado, en la mayoría de los tratamientos a 37°C, el cóctel de bacteriofagos fue el más efectivo para reducir la población bacteriana. Además, si bien la evolución del recuento fágico durante los experimentos varió a lo sumo en 1 log UFP/ml, los fagos permanecieron en un número elevado.

Cuando se evaluó el potencial de los bacteriofagos para ser utilizados como agentes de biocontrol en productos cárnicos, encontramos que los cócteles produjeron las mayores reducciones de células viables y concluimos que al utilizar tanto una mayor concentración como una mayor variabilidad de fagos contribuyen a un mayor nivel de biocontrol en esta matriz alimenticia.

También fuimos capaces de aislar BIMs, o mutantes insensibles a bacteriofagos, utilizando dos metodologías diferentes. Al evaluar la frecuencia de aparición para cada sistema estudiado y la estabilidad y reversión de cada BIM aislado concluimos que, principalmente debido a su baja frecuencia y estabilidad, los mutantes fagorresistentes no representan un obstáculo para la utilización de fagos como una herramienta de biocontrol en productos cárnicos.

Con respecto al potencial de los fagos como estrategia de biocontrol en productos lácteos, se observó que fueron eficaces para reducir significativamente poblaciones de cepas patógenas de *E. coli* y que presentaron un alto nivel de estabilidad en este tipo de productos considerando los valores de pH alcanzados. Por otro lado, tanto los cultivos iniciadores, a saber *Streptococcus thermophilus*, como la evolución general de los parámetros normales del proceso de manufactura del fermento lácteo como del proceso de cuajado, no se vieron afectados por la adición exógena de bacteriofagos. Además, y a nuestro conocimiento, en este trabajo se propuso por primera vez el uso de fagos como agentes de biocontrol de STEC y EPEC durante un proceso de fermentación.

Finalmente analizamos la actividad lítica de los fagos sobre superficies sólidas, y en líneas generales, presentaron un alto nivel de eliminación de los patógenos

evaluados, sin embargo, de los experimentos se pudo evidenciar para algunos casos que es necesario aplicar una mayor concentración de fagos en los cócteles evaluados con el fin de evitar posteriores recrecimientos bacterianos. Por lo tanto, su aplicación podría disminuir la carga bacteriana contenida en superficies de maquinarias o utensilios tanto en ambientes industriales como en el hogar. Por lo antes dicho, resultaría indispensable llevar a cabo estudios relacionados a las distintas condiciones ambientales para poder diseñar estrategias para su utilización en plantas industriales.

En resumen, en este trabajo de Tesis se planteó un método de aislamiento de fagos, luego se caracterizaron para posteriormente optimizar el protocolo sobre distintos sistemas, es decir suministro y número de fagos, temperatura y densidad bacteriana, para ser utilizados como agentes de biocontrol de *E. coli* patógenas tanto en matrices alimenticias como sobre superficies inanimadas.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abuladze, T., Li, M., Menetrez, M. Y., Dean, T., Senecal, A., and Sulakvelidze, A. (2008). Bacteriophages reduce experimental contamination of hard surfaces, tomato, spinach, broccoli, and ground beef by *Escherichia coli* O157:H7. *Appl. Environ. Microbiol.* 74 (20), 6230-6238.
- Ackermann, H. W. (2009). Phage classification and characterization. *Methods Mol. Biol.* 501, 127-140.
- Ackermann, H. W. (2001) Frequency of morphological phage descriptions in the year 2000. Brief review. *Arch. Virol.* 146, 843-857.
- Addis, Z., Kebede, N., Sisay, Z., Alemayehu, H., Yirsaw, A., and Kassa, T. (2011). Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from lactating cows and in contact humans in dairy farms of Addis Ababa: a cross sectional study. *BMC Infect. Dis.* 11, 222.
- Agencia Gubernamental de Control (AGC). (2011). Enfermedades Transmitidas por Alimentos (<http://www.agcontrol.gob.ar/pdf/Que-son-las-ETA.pdf>).
- Akpinar, A., Yerlikaya, O., and Kiliç, S. (2011). Antimicrobial activity and antibiotic resistance of *Lactobacillus delbrueckii* ssp *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* strain isolated from Turkish homemade yoghurts. *Afr. J. Microbiol. Res.* 5, 675-682.
- Alcazár Montañez, C., Rubio Lozano, M., Núñez Espinosa, F., Alonso Morales, R. (2006). Detección de *Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes* en quesos frescos y semimadurados que se expenden en vía pública en la ciudad de México. *Rev. Vet. México.* 37 (4), 417-429.
- Allerberger, F., Friedrich, A.W., Grif, K., Dierich, M.P., Dornbusch, H.J., Mache, C.J., Nachbaur, E., Freilinger, M., Rieck, P., and Wagner, M. (2003). Hemolytic-uremic syndrome associated with enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26:H infection and consumption of unpasteurized cow's milk. *Int. J. Infect. Dis.* 7, 42-45.
- Ammor, S., Chevallier, I., Laguet, A., Labadie, J., Talon, R., and Dufour, E. (2004). Investigation of the selective bactericidal effect of several decontaminating solutions on bacterial biofilms including useful spoilage and/or pathogenic bacteria. *Food Microbiol.* 21, 11-17.
- Anónimo. (2011). Shiga toxin/verotoxin-producing *Escherichia coli* in humans, food and animals in the EU/EEA, with special reference to the German outbreak strain

-
- STEC O104. Technical Report by the European Centre for Disease Prevention and Control and the European Food Safety Authority, Stockholm, Sweden.
- Armstrong, G.L., Hollingsworth, J., Glenn Morris, J. (Jr). (1996). Emerging foodborne pathogens: *Escherichia coli* O157:H7 as a model of entry of a new pathogen into the food supply of the developed world. *Epidemiol. Rev.* 18, 29-51.
- Atterbury, R.J., Connerton, P.L., Dodd, C.E., Rees, C.E., and Connerton, I.F. (2003). Application of host-specific bacteriophages to the surface of chicken skin leads to a reduction in recovery of *Campylobacter jejuni*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 6302-6306.
- Bachrach, G., Leizerovici-Zigmond, M., Zlotkin, A., Naor, R., and Steinberg, D. (2003). Bacteriophage isolation from human saliva. *Lett. Appl. Microbiol.* 36, 50-53.
- Balagué, C., Khan, A., Fernandez, L., Redolfi, A. L., Aquili, V., Voltattorni, P., Hofer, C., Ebner, G., Dueñas, S., and Cerniglia, C. (2006). Occurrence of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in ready-to-eat food from supermarkets in Argentina. *Food Microbiol.* 23, 307-313.
- Barrow, P.A., and Soothill, S. (1997). Bacteriophage therapy and prophylaxis: rediscovery and renewed assessment of potential. *Trends Genet.* 5, 268-271.
- Becker, A.L. (2005). Alberta *E. coli* outbreak tied to milk shakes. Press release CIDRAP. 2005-05-13.
- Berghold, C., Kornschober, C., Lederer, I., and Alleeberger, F. (2004). Occurrence of *Salmonella enteritidis* phage type 29 in Austria: an opportunity to assess the relevance of chicken meat as source of human *Salmonella* infections. *Eurosurveillance.* 9 (10-12), 31-34.
- Bettelheim, K. A. (2006). Serotypes of VTEC: The VTEC Table. (<http://www.microbionet.com.au/vtetable.htm> Accessed Jan. 9, 2006).
- Beutin, L., Krause, G., Zimmermann, S., Kaulfuss, S., and Gleier, K. (2004). Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from human patients in Germany over a 3 year period. *J. Clin. Microbiol.* 42, 1099-1198.
- Bigwood, T., Hudson, J. A., Billington, C., Carey-Smith, G. V., and Heinemann, J. A. (2008). Phage inactivation of foodborne pathogens on cooked and raw meat. *Food Microbiol.* 25, 400-406.
- Blanco, J., Blanco, M., Blanco, J. E., Mora, A., González, E. A., Bernárdez, M. I., Alonso, M. P., Coira, A., Rodríguez, A., Rey, J., Alonso, J. M., and Usera, M. A..
-

- (2003). Verotoxin-producing *Escherichia coli* in Spain: Prevalence, serotypes, and virulence genes of O157:H7 and non-O157 VTEC in ruminants, raw beef products, and humans. *Exp. Biol. Med.* 228, 345–351.
- Blanco, J.E., Blanco, M., Blanco, J., Mora, A., Balaguer, L., Mouriño, M., Juárez, A., and Janse, W.H. (1996). O serogroups, biotypes and *eae* genes in *Escherichia coli* isolates from diarrheic and healthy rabbits. *J. Clin. Microbiol.* 43, 3101–3107.
- Blaser, M. J. (2000): *Campylobacter jejuni* and related species. In: Mandell, Bennett, Dolin, eds. Principles and Practice of Infectious Diseases. 5th ed. New York: Churchill Livingstone.
- Block, C., Peleg, O., Minster, N., Bar-Oz, B., Simhon, A., Arad, I., and Shapiro, M. 2002. Cluster of neonatal infections in Jerusalem due to unusual biochemical variant of *Enterobacter sakazakii*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 21 (8), 613-616.
- Bockemühl, J., and Karch, H. (1996). Zur aktuellen Bedeutung der enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC) in Deutschland (1994-1995). *Bundesgesundheitsblatt.* 39, 290-296.
- Bockemühl, J., Karch, H., Rüssmann, H., Aleksic, S., Wiss, R., and Emmrich, P. (1990). Shigalike toxin (verotoxin)-produzierende *Escherichia coli* O22:H8: Übertragung durch unpasteurisierte Milch mit nachfolgender Erkrankung an hämolytisch-urämischen Syndrom. *Bundesgesundheitsblatt.* 33, 3-6.
- Boletín Epidemiológico Periódico. (2006). Evolución de las infecciones humanas por *Salmonella* spp. en Argentina (2004-2005). (http://msal.gov.ar/html/site/sala_situacion/PANELES/boletines/boletin-BEP30.pdf)
- Bolondi, A., Gaggino, O., and Monesiglio, J. (1995). *Electronic microscopy: general techniques*. Electronic Microscopy Unit and Applied Biochemistry of the Research Centre in Veterinary Sciences. INTA–Castelar, Argentina.
- Bolton, D.J. (2011) Verocytotoxigenic (shiga toxin-producing) *Escherichia coli*: virulence factors and pathogenicity in the farm to fork paradigm. *Foodborne Pathog. Dis.* 8, 357–365.
- Bosilevac, J.M., and Koohmaraie, M. (2011). Prevalence and characterisation of non-O157 shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from commercial ground beef in the United States. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 2103–2112.

-
- Bouwknegt, M., van de Giessen, A.W., Dam-Deisz, W.D.C., Havelaar, A.H., Nagelkerke, N.J.D., and Henken, A.M. (2004). Risk factors for the presence of *Campylobacter* spp. in Dutch broiler flocks, *Prev. Vet. Med.* 62, 35-49.
- Boyd, E.F. Bacteriophages and Bacterial Virulence. In: Kutter, E., and Sulakvelidze, A., eds. (2005). Bacteriophages: Biology and Applications. Boca Raton, FL. CRC Press, pag. 223-265.
- Breitbart, M., Hewson, I., Felts, B., MahaVy, J. M., Nulton, J., Salamon, P., and Rohwer, F.E. (2003). Metagenomic analysis of an uncultured viral community from human feces. *J. Bacteriol.* 185, 6220-6223.
- Brown, P., Kidd, D., Riordan, T., and Barrell, R. A. (1988). An outbreak of food-borne *Campylobacter jejuni* infection and the possible role of cross-contamination. *J. Infect.* 17, 171-176.
- Bruttin, A., and Brussow, H. (2005). Human volunteers receiving *Escherichia coli* phage T4 orally: a safety test of phage therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 2874-2878.
- Bueno, E., Garcia, P., Martínez, B., and Rodríguez, A. (2012). Phage inactivation of *Staphylococcus aureus* in fresh and hard-type cheeses. *Int. J. Food Microbiol.* 158 (1), 23-27.
- Buglino, D., Smith-Sayer, K., Fortino, S., Van Meter, J., Frykman, E., Crawford-Mikszta, L., Myers, C., Himathongkham, S., Palumbo, M., Atwell, J., Chang, T., Csuti, D., Fontanoz, S., Gerbremichael, Y., Glover, J., O'Connell, J., Sun, B., Wheeler, C., Zhao, Y., and Lynch, M. (2008). *Escherichia coli* O157:H7 infections in children associated with raw milk and raw colostrum from cows - California, 2006. *MMWR Morbid. Mortal. Wkly. Rep.* 57, 625-628.
- Buvsens, G., Possé, B., De Schrijver, K., De Zutter, L., Lauwers, S., Pierard, D. (2011). Virulence profiling and quantification of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O145:H28 and O26:H11 isolated during an ice cream-related haemolytic uremic syndrome outbreak. *Foodborne Pathog. Dis.* 8, 421-426.
- Byelashov, O.A., Carlson, B.A., Geornaras, I., Kendall, P.A., Scanga, J.A., and Sofos, J.N. (2009). Fate of post-processing inoculated *Listeria monocytogenes* on vacuum-packaged pepperoni stored at 4, 12 or 25 °C. *Food Microbiol.* 26, 77-81.
- Caffer, M.I., Terragno, R., and Binsztein, N. (2008). Introducción. p. 5-8. In: Caffer, M.I., Terragno, R., and Binsztein, N. eds. WHO Global Salm Surv. Manual de

-
- Procedimientos Diagnóstico y caracterización de *Salmonella* spp. Editorial WHO/OPS/INEI/MSN. Buenos Aires.
- Cairns, B.J., Timms, A.R., Jansen, V.A.A., Connerton, I.F., and Payne, R.J.H. (2009). Quantitative models of *in vitro* bacteriophage-host dynamics and their application to phage therapy. *PLoS Pathogens*. 5, 1-10.
- Calvinho, L., and Tirante, L. (2005). Prevalencia de microorganismos patógenos de mastitis bovina y evolución del estado de salud de la glándula mamaria en Argentina en los últimos 25 años. *FAVE Sección Ciencias Vet.* 4 (1), 29-40.
- Callejo, R., Prieto, M., Martínez, C., Aguerre, L., Rocca, F., Martínez, G., Palmieri, O. (2008). Estudio mediante PCR múltiple de serotipos de *Listeria monocytogenes* aislados en Argentina. *Rev. Arg. Microbiol.* 40, 89-92.
- Camara, F. P., and de Almeida, D. F. (1991). Studies on the growth of the phage T4 in cell division mutants DV2111 and AD651 of *Escherichia coli* at normal and high temperatures. *Rev. Bras. Genet.* 14, 233-238.
- Caprioli, A., Morabito, S., Brugreb, H., and Oswald, E. (2005). Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. *Vet. Res.* 36, 286–311.
- Carlton, R. M., Noordman, W. H., Biswas, B., de Meester, E. D., and Loessner, M. J. (2005). Bacteriophage P100 for control of *Listeria monocytogenes* in foods: genome sequence, bioinformatic analyses, oral toxicity study, and application. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 43, 301–312.
- Cartwright, E.J., Jackson, K.A., Johnson, S.D., Graves, L.M., Silk, B.J., and Mahon, B.E. Listeriosis outbreaks and associated food vehicles, United States, 1998–2008. *Emerg. Infect. Dis.* 19 (1), 1-10.
- Casenave, C., Desenclos, J.C., Maillot, E., Benoît, S., Deschenes, G., Nivet, H., Grimont, F., Baron, S., Mariani, P., and Grimont, P.A.D. (1993). Éclosion de syndrome hémolytique et urémique dans une commune rurale du Cher. *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire.* 48, 222-224.
- CDC (Centers for Disease Control and Prevention). (2013a). Surveillance for Foodborne-Disease Outbreaks - United State, 1998-2008. MMWR 49 (SS-1).
- CDC (Centers for Disease Control and Prevention). (2013b). Multistate Outbreak of *Salmonella* Typhimurium Infections Linked to Ground Beef. (<http://www.cdc.gov/salmonella/typhimurium-01-13/index.html>).
-

-
- CDC (Centers for Diseases Control and Prevention). (2010). Investigation Update: Multistate outbreak of *E. coli* O157:H7 infections associated with cheese. (2010-11-24).
- CDC (Centers for Diseases Control and Prevention). (2008). *Escherichia coli* O157:H7 infections in children associated with raw milk and raw colostrum from cows-California, 2006. *MMWR Morbid. Mortal. Wkly. Rep.* 57, 625–628.
- CDC (Centers for Diseases Control and Prevention). (2007). *Salmonella* Typhimurium Infection Associated with Raw Milk and Cheese Consumption - Pennsylvania, 2007. *MMWR Morbi. Mortal. Wkly. Rep.* 56 (44), 1161-1164.
- CDC (Centers for Diseases Control and Prevention). (2006). Ongoing multistate outbreak of *Escherichia coli* serotype O157:H7 infections associated with consumption of fresh spinach-United States, September 2006. *MMWR Morbid. Mortal. Wkly. Rep.* 55, 1045-1046.
- CDC (Centers for Disease Control and Prevention). (2002). *Enterobacter sakazakii* infections associated with the use of powdered infant formula - Tennessee, 2001. *MMWR Morbi. Mortal. Wkly. Rep.* 51, 297-300.
- CDC (Centers for Diseases Control and Prevention). (2000). Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with eating fresh cheese curds-Wisconsin, June 1998. *MMWR Morbi. Mortal. Wkly. Rep.* 49, 911-913.
- CDC (Centers for Disease Control and Prevention). (1997). *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with eating a nationally distributed commercial brand of frozen ground beef patties and burgers-Colorado, 1997. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 46, 777-8.
- CDSC (Communicable Disease Surveillance Centre). (1998). Cases of *Escherichia coli* O157 infection associated with unpasteurised cream in England. *Eurosurveillance.* 2, 1135 (1998-10-29).
- Chibani-Chennoufi, S., Sidoti, J., Bruttin, A., Kutter, E., Sarker, S., and Brüßow, H. (2004). In Vitro and In Vivo Bacteriolytic Activities of *Escherichia coli* Phages: Implications for Phage Therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48 (7), 2558–2569.
- Coffey, B., Rivas, L., Duffy, G., Coffey, A., Ross, R. P., and McAuliffe, O. (2011). Assessment of *Escherichia coli* O157:H7-specific bacteriophages e11/2 and e4/1c in model broth and hide environments. *Int. J. Food Microbiol.* 147, 188-194.
- Curnow, J. (1999). *Escherichia coli* O157 outbreak in Scotland linked to unpasteurized goat's milk. *Eurosurveillance.* 3 (article 1387).
-

-
- Davidson, P.M., and Harrison, M.A. (2002). Resistance and adaptation to food antimicrobials, sanitizers, and other process controls. *Food Technol.* 56, 69-78.
- De Buyser, M.L., Dufour, B., Maire, M., and Lafarge, V. (2001). Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialised countries. *Int. J. Food Microbiol.* 67, 1-17.
- De Schrijver, K., Buvens, G., Possé, B., Van den Branden, D., Oosterlynck, C., De Zutter, L., Eilers, K., Piérard, D., Dierick, K., Van Damme-Lombaerts, R., Lauwers, C., and Jakobs, R. (2008). Outbreak of verocytotoxin-producing *E. coli* O145 and O26 infections associated with consumption of ice cream produced at a farm, Belgium, 2007. *Eurosurveillance.* 13 (article 8041).
- Decludt, B. (1995). Cas groupés de syndromes hémolytiques et urémiques dans le département de l'Ardèche en 1994. pag. 9. Institut de Veille Sanitaire, France.
- Dini C., and de Urza P.J. (2010). Isolation and selection of coliphages as potential biocontrol agents of enterohemorrhagic and Shiga toxin-producing *E. coli* (EHEC and STEC) in cattle. *J. Appl. Microbiol.* 109, 873-887.
- Dodds, K.L., Perry, M.B., and McDonald, I.J. (1987). Alterations in lipopolysaccharide produced by chemostat-grown *Escherichia coli* O157:H7 as a function of growth-limiting nutrient. *Can. J. Microbiol.* 33, 452-458.
- Doyle, M.P., Beuchat, L.R., Montville, T.J. (2001). En: Microbiología de los alimentos. Fundamentos y Fronteras edición de la lengua española. Zaragoza, España. Editorial Acribia. p. 355-370.
- Drudy, D., Mullane, N.R., Quinn, T., Wall, P.P., and Fanning, S. (2006). *Enterobacter sakazakii*: An Emerging Pathogen in Powdered Infant Formula. *Food Safety.* 42, 996-1002.
- Dykes, G.A., and Moorhead, S.M. (2002). Combined antimicrobial effect of nisin and a listeriophage against *Listeria monocytogenes* in broth but not in buffer or on raw beef. *Int. J. Food Microbiol.* 73, 71-81.
- Eiguer T, Caffer MI, Fronckowsky GB. (1990). Significance of *Salmonella enteritidis* in outbreaks of diseases transmitted by foods in Argentina, 1986-1988. *Rev. Argent. Microbiol.* 22 (1), 31-36.
- Ellis, E.L., and Delbrück, M. (1939). The growth of bacteriophage. *J. Gen. Physiol.* 22, 365-384.
- Emberland, K.E., Nygard, K., Heler, B.T., Aavistsland, P., Lassen, J., Stavnes, T., and Gondrosen, B. (2006). Outbreak of *Salmonella* Kedougou in Norway associated
-

-
- with salami, April-June 2006. *Eurosurveillance*. 11 (7), 060706. (<http://www.eurosurveillance.org/ew/2006/060706.asp>).
- Ennis, C., McDowell, D., and Bolton, D.J. (2012). The prevalence, distribution and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) serotypes and virulotypes from a cluster of bovine farms. *J. Appl. Microbiol.* 113, 1238-1248.
- European Food Safety Authority (EFSA) and European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). (2011). The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in the European Union in 2009. *EFSA J.* 9 (7), 2154.
- Evans, M. R., Lane, W., Frost, J. A., and Nylen, G. (1998). A *Campylobacter* outbreak associated with stir-fried food. *Epidemiol. Infect.* 121, 275-279.
- Farrokh, C., Jordan, K., Auvray, F., Glass, K., Oppegaard, H., Raynaud, S., Thevenot, D., Condrón, R., De Reu, K., Govaris, A., Heggum, K., Heyndrickx, M., Hummerjohann, J., Lindsay, D., Mischczycha, S., Moussiégt, S., Verstraete, K., and Cerf, O. (2012). Review of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and their significance in dairy production. *Int. J. Food Microbiol.* 162 (2), 190-212.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (2007). (www.fao.org, Septiembre 2007).
- Food and Drug Administration (FDA). (2012) Bad Bug Book, Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins. Second Edition. Pathogenic *Escherichia coli* group, 72-85.
- Food and Drug Administration (FDA) and Food Safety Inspection Service (FSIS) of United State Department of Agriculture (USDA). (2001). Quantitative assessment of the relative risk to public health from food-borne *Listeria monocytogenes* among selected categories of ready-to-eat foods. (www.foodsafety.gov/~dms/lmr2-toc.html).
- Food Poison Journal. (2009). Presented by Marler Clark. (<http://www.foodpoisonjournal.com/foodborne-illness-outbreaks/raw-milk-e-coli-strikes-again-recent-illnesses-are-reminder-of-risks-from-drinking-raw-milk/>).
- Franco, D.A., and Williams, C. E. (1999): *Campylobacter jejuni*. In: Hui YH, Pierson MD, Gorham JR, eds: Foodborne disease handbook. 2nd. ed. New York: Marcel Dekker.

-
- Fremaux, B., Prigent-Combaret, C., and Vernozy-Rozand, C. (2008). Long-term survival of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in cattle effluents and environment: An updated review. *Vet. Microbiol.* 132, 1-18.
- Freeman, V. J. (1951). Studies on the virulence of bacteriophage-infected strains of *Corynebacterium diphtheriae*. *J. Bacteriol.* 61, 675-688.
- Furuse, K. (1987). Distribution of coliphages in the general environment general considerations. In: Goyal, S.M., Gerba, C., Bitton, G. (Eds.), *Phage Ecology*. John Wiley & Sons, New York, NY, pp. 87-124.
- García, P., Madera, C., Martínez, B., and Rodríguez, A. (2007). Biocontrol of *Staphylococcus aureus* in curd manufacturing processes using bacteriophages. *Int. Dairy J.* 17, 1232–1239.
- Garcia-Aljaro, C., Muniesa, M., Jofre, J., and Blanch, A. R. (2006). Newly identified bacteriophages carrying the *stx2g* Shiga toxin gene isolated from *Escherichia coli* strains in polluted waters. *FEMS Microbiol. Lett.* 258, 127-135.
- Gast, R., Porter, R., and Holt, S. (1998). Applying tests for specific yolk antibodies to predict contamination by *Salmonella enteritidis* in eggs from experimentally infected laying hens. United States Department of Agriculture. *Agr. Res. Service.* 12-18.
- Goodridge, L., Gallaccio, A., and Griffiths, M. (2003). Morphological, host range, and genetic characterization of two coliphages. *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (9), 5364–5371.
- Gottlieb, S.L., Newbern, E.C., Griffin, P.M., Graves, L.M., Hoekstra, R.M., Baker, N.L., Hunter, S.B., Holt, K.G., Ramsey, F., Head, M., Levine, P., Johnson, G., Schoonmaker-Bopp, D., Reddy, V., Kornstein, L., Gerwel, M., Nsubuga, J., Edwards, L., Stonecipher, S., Hurd, S., Austin, D., Jefferson, M.A., Young, S.D., Hise, K., Chernak, E.D., Sobel, J., and the Listeriosis Outbreak Working Group. (2006). "Multistate outbreak of listeriosis linked to turkey deli meat and subsequent changes in US regulatory policy. *Clin. Infect. Dis.* 42 (1), 29-36.
- Graeber, I., Montenegro, M.A., Bunge, C., Boettcher, U., Tobias, H., Heinemeyer, E.A., and Helmuth, R. (1995). Molecular marker analysis of *Salmonella typhimurium* from surface waters, humans, and animals. *Eur. J. Epidemiol.* 11 (3), 325-331.
- Graves, L.M., Hunter, S.B., Ong, A.R., Schoonmaker-Bopp, D., Hise, K., Kornstein, L., DeWitt, W.E., Hayes, P.S., Dunne, E., Mead, P., and Swaminathan, B. (2005). Microbiological aspects of the investigation that traced the 1998 outbreak of

-
- listeriosis in the United States to contaminated hot dogs and establishment of molecular subtyping-based surveillance for *Listeria monocytogenes* in the PulseNet network. *J. Clin. Microbiol.* 43 (5), 2350-2355.
- Greer, G. (2005). Bacteriophage control of foodborne bacteria. *J. Food Prot.* 68, 1102–1111.
- Greer, G. (1986). Homologous bacteriophage control of *Pseudomonas* growth and beef spoilage. *J. Food Protect.* 49, 104-109.
- Griffin, P. M., Mead, P. S., and Sivapalasingam, S. (2002). *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohemorrhagic *Escherichia coli*, p. 627–642. In M. J. Blaser, P. D. Smith, J. I. Ravdin, et al. (ed.), *Infections of the gastrointestinal tract*, 2nd ed. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, Pa.
- Guenther, S., Herzig, O., Fieseler, L., Klumpp, J., and Loessner, M.J. (2012). Biocontrol of *Salmonella* Typhimurium in RTE foods with the virulent bacteriophage FO1-E2. *Int. J. Food Microbiol.* 154 (1-2), 66-72.
- Guenther, S., Huwyler, D., Richard, S., and Loessner, M. J. (2009). Virulent bacteriophage for efficient biocontrol of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 75 (1), 93–100.
- Guglielmotti, D., Briggiler Marcó, M., Golowczyc, M., Reinheimer, J., and Quiberoni, A. (2007). Probiotic potential of *Lactobacillus delbrueckii* strains and their phage resistant mutants. *Int. Dairy J.* 17, 916-925.
- Guttman, B., Raya, R., and Kutter, E. (2005). Basic phage biology. In: Kutter, E., and Sulakvelidze, A., eds. *Bacteriophages: Biology and Applications*. Boca Raton, FL. CRC Press, pag. 29-66.
- Hanna, S.S., Atkinson, R.M., Jones, T.F., and Dunn, J.R. (2010). Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in Tennessee: surveillance and current clinical laboratory practices. *Tenn. Medicine.* 103, 39–42.
- Heyndrickx, M., Rijpens, N. and Herman, L. (2001). Molecular detection and typing of foodborne bacterial pathogens: A review. Ministry of Small Enterprises, Traders and Agriculture, Centre for Agricultural Research, Department for Animal Product Quality, Brusselsesteenweg 370, B-9090 Melle, Belgium.
- Hibma, A.M., Jassim, S.A.A., and Griffiths, M.W. (1997). Infection and removal of L-forms of *Listeria monocytogenes* with bred bacteriophage. *Int. J. Food Microbiol.* 34, 197-207.
-

-
- Hitch, G., Pratten, J., and Taylor, P.W. (2004). Isolation of bacteriophages from the oral cavity. *Lett. Appl. Microbiol.* 39, 215-219.
- Holck, A., and Berg, J. (2009). Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cooked ham by virulent bacteriophages and protective cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 75 (21), 6944-6946.
- ICMSF. (1996). Microbiología de los alimentos. Características de los patógenos microbianos. Editorial Acribia S.A. Zaragoza, España.
- International Committee on Taxonomy of Viruses. Ed: King, A. M. Q., Adams, M.J., Carstens, E. B. y Lefkowitz, E. J. (2009). "Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses. Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press, San Diego.
- INVS (Institut de Veille Sanitaire). (2007). Epidémie d'infections à *E. coli* producteurs de Shiga-toxines non O157 liée à la consommation de camembert au lait cru, nordouest de la France, octobre-décembre 2005. Available at (http://www.invs.sant e.fr/publications/2008/epidemie_e_coli_camembert/rapport_epidemie_stec.pdf).
- Jamalludeen, N., Jonson, R. P., Friendship, R., Kropinski, A. M., Lingohr, E. J., and Gyles, C. L. (2007). Isolation and characterization of nine bacteriophages that lyse O149 enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Vet. Microbiol.* 124, 47-57.
- Jay, J. M. (1996). Microorganism in fresh ground meats: the relative safety of products with low versus high numbers. *Meat Sci.* 43, S59-S66.
- Jensen, E. C., Schrader, H. S., Rieland, B., Thompson, T. L., Lee, K. W., Nickerson, K. W., and Kokjohn, T. A. (1998) Prevalence of broad-host-range lytic bacteriophages of *Sphaerotilus natans*, *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 575-580.
- Jianshun, C., Xiaokai, L., Lingli, J., Peijie, J., Wei, W., Dongyou, L., and Weihuan, F. (2009). Molecular characteristics and virulence potential of *Listeria monocytogenes* isolates from Chinese food systems. *Food Microbiol.* 26, 103-11.
- Jordan, K.N., Oxford, L., and O'Byrne, C.P. (1999). Survival of low-pH stress by *Escherichia coli* O157:H7: correlation between alterations in the cell envelope and increased acid tolerance. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 3048-3055.
- Karmali, M.A., Gannon, V., and Sargeant, J.M. (2010). Verocytotoxin producing *Escherichia coli* (VTEC). *Vet. Microbiol.* 140, 360-370.
- Kaspar, C., Doyle, M. E., and Archer, J. (2010). Non-O157:H7 Shiga Toxin-producing *E. coli* from meat and non-meat sources. *FRI Food Safety Reviews.* 1-26.
-

-
- Katsuda, K., Hata, E., and Eguchi, M. (2005). Molecular typing of *S. aureus* isolated from bovine mastitic milk on the basis of toxin genes and coagulase gene polymorphisms. *Vet. Microbiol.* 105, 301-305.
- Kennedy, J. E. J., and Bitton, G. (1987). Bacteriophages in foods. In: Goyal, S.M., Gerba, C.P., Bitton, G. (Eds.), *Phage Ecology*. John Wiley & Sons, New York, pp. 289–316.
- Kiljunen, S., Datta, N., Dentovskaya, S. V., Anisimov, A. P., Knirel, Y. A., Bengoechea, J. A., Holst, O., and Skurnik, M. (2011). Identification of the Lipopolysaccharide Core of *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis* as the Receptor for Bacteriophage Φ A1122. *J. Bacteriol.* 193 (18), 4963–4972.
- Kim, K., Klumpp, J., and Loessner, M. (2007). *Enterobacter sakasaki* bacteriophages can prevent bacterial growth in reconstituted infant formula. *Int. J. Food Microbiol.* 115, 195-203.
- Kobayashi, H., Shimada, J., Nakazawa, M., Morozumi T., Pohjanvirta T., Pelkonen, S., and Yamamoto, K. (2001). Prevalence and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from healthy cattle in Japan. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 484–489.
- Kudva, I. T., Jelacic, S., Tarr, P. I., Youderian, P., and Hovde, C. J. (1999). Biocontrol of *Escherichia coli* O157 with O157-specific bacteriophages. *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (9), 3767–3773.
- Kutter, E. Phage host range and efficiency of plating. p. 141-149. In: Clokie, M. R. J., and Kropinski, A. M., eds. (2009). *Bacteriophages Methods in Molecular Biology*. New York: Springer/Humana Press.
- Kutter, E, Raya, R., and Carlson, K. Molecular mechanisms of phage infection. In: Kutter, E., and Sulakvelidze, A., eds. (2005). *Bacteriophages: Biology and Applications*. Boca Raton, FL. CRC Press, pag. 165-222.
- Labrie, S.L., Samson, J.E., and Moineau, S. (2010). Bacteriophage resistance mechanisms. *Nature Reviews Microbiol.* 8, 317-327.
- Layton, M.C., Calliste, S.G., Gomez, T.M., Patton, C., and Brooks, S. (1997). A mixed foodborne outbreak with *Salmonella heidelberg* and *Campylobacter jejuni* in a nursing home. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 18, 115-121.
- Le Loir, Y., Baron, F., and Gautier, M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genet. Mol. Res.* 2 (1), 63-76.
-

-
- Leverentz, B., Conway, W.S., Camp, M.J., Janisiewicz, W., Abuladze, T., Yang, M., Saftner, R., and Sulakvelidze, A. (2003). Biocontrol of *Listeria monocytogenes* on fresh-cut produce by treatment with lytic bacteriophages and a bacteriocin. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 4519-4526.
- Leverentz, B., Conway, W. S., Alavidze, Z., Janisiewicz, W. J., Fuchs, Y., and Camp, M. J. (2001). Examination of bacteriophage as a biocontrol method for *Salmonella* on fresh-cut fruit: a model study. *J. Food Prot.* 64, 1116–1121.
- Levine, M. M., Xu, J. G., Kaper, J. B., Lior, H., Prado V., Tall B., Nataro, J., Karch, H., and Wachsmuth, K. (1987). A DNA probe to identify enterohemorrhagic *Escherichia coli* of O157:H7 and other serotypes that cause hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome. *J. Infect. Dis.* 156:175–182.
- Lindsay, D., and Von Holy, A. (1999). Different responses of planktonic and attached *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas fluorescens* to sanitizer treatment. *J. Food Protect.* 62, 368-379.
- Little, J. W. (2006). Gene regulatory circuitry of phage 1, p. 74-82. In: R. Calendar and S. T. Abedon (eds.). *The Bacteriophages*. 2nd ed. Oxford University Press, Oxford.
- Liu, L., O'Conner, P., Hill, C., and Ross, R. (2008). Controlling *Listeria monocytogenes* in cottage cheese through heterologous production of enterocin A by *Lactococcus lactis*. *J. Appl. Microbiol.* 104, 1059-66.
- López, C., Feltri, A., Leotta, G., González, G., Manfredi, E., Gottardi, G., Elder, M., De Las Carreras, S., Patri, C., Guajardo, F., San Martín, A., and Rivas, M. (2008). Brote de enfermedad alimentaria en la localidad de El Huecú, provincia de Neuquén. *Rev. Arg. Microbiol.* 40, 198-203.
- López, F., Isequilla, P.E., and Kaplan, D. (1998). Enfermedades de transmisión hídrico en el Río de La Plata, Diagnóstico de situación Enero-Junio 1998. Gobierno de la Ciudad de Buenos Aires.
- Lutful Kabir, S.M. (2010). Avian colibacillosis and salmonellosis: a closer look at epidemiology, pathogenesis, diagnosis, control and public health concerns. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 7, 89-114.
- Luzzi, I., Galetta, P., Massari, M., Rizzo, C., Dionisi, A.M., Filetici, E., Cawthorne, A., and Tozzi, A. (2007). An Eastern outbreak of *Salmonella* Thymurium DT 104 associated with the traditional pork salami in Italy. *Eurosurveillance.* 12 (4), 1204-1226. (<http://www.eurosurveillance.org/em/v12n04/1204-226.asp>).
-

-
- Manfredi, E.A., Leotta, G.A., and Rivas, M. (2010). PCR múltiple para la detección de los genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed* y *see* de *Staphylococcus aureus*. Caracterización de aislamientos de origen alimentario. *Rev. Argent. Microbiol.* 42, 212-215.
- MAPAQ (Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec). (2004). Mise en garde - Onze personnes malades à la suite de la consommation de fromages au lait cru fabriqués à la ferme. Press Release, 2004-07-14.
- Marek, P., Nair, M., Hoagland, T., and Venkitanarayanan, K. (2004). Survival and growth characteristics of *Escherichia coli* O157:H7 in pasteurized and unpasteurized Cheddar cheese whey. *Int. J. Food Microbiol.* 94, 1-7.
- Marler, B., (2010). Raw milk *E. coli* O157:H7 outbreak strikes Minnesota. Seventh outbreak in 2010. Marler Blog. (2010-05-28, <http://www.marlerblog.com/legal-cases/raw-milk-ecoli-o157h7-outbreak-strikes-minnesota-seventh-outbreak-in-2010/>).
- Marzocca, M.A., Marucci, P.L., Sica, M.G., and Alvarez, E.E. (2004). Detección de *L. monocytogenes* en distintos productos alimenticios y en muestras ambientales de una amplia cadena de supermercados de la ciudad de Bahía Blanca, Argentina. *Rev. Arg. Microbiol.* 36, 179-181.
- Masana, M.O., Leotta, G.A., Del Castillo, L.L., D'Astek, B.A., Palladino, P.M., Galli, L., Vilacoba, E., Carbonari, C., Rodríguez, H.R., and Rivas, M. (2010). Prevalence, characterization, and genotypic analysis of *Escherichia coli* O157:H7/NM from selected beef exporting abattoirs of Argentina. *J. Food Protect.* 73, 649-656.
- McIntyre, L., Fung, J., Paccagnella, A., Isacc-Renton, J., Rockwell, F., Emerson, B., and Preston, T. (2002). *Escherichia coli* O157 outbreak associated with the ingestion of unpasteurized goat's milk in British Columbia, 2001. *Can. Commun. Dis. Rep.* 28, 6-8.
- Mead, P.S., and Griffin, P.M. (1998). *Escherichia coli* O157:H7. *Lancet.* 352, 1207-1212.
- Meng, J., M. P. Doyle, T. Zhao, and S. Zhao. (2001). Enterohemorrhagic *Escherichia coli*, p. 193–213. In M. P. Doyle, L. R. Beuchat, and T. J. Montville (ed.), *Food microbiology: fundamentals and frontiers*, 2nd ed. ASM Press, Washington, DC.
- Merabishvili, M., Pirnay, J. P., Verbeken, G., Chanishvili, N., Tediashvili, M., Lashkhi, N., Glonti, T., Krylov, V., Mast, J., Parys, L. V., Lavigne, R., Volckaert, G., Mattheus, W., Verween, G., De Corte, P., Rose, T., Jennes, S., Zizi, M., De Vos, D., and Vanechoutte, M. (2009). Quality-controlled small-scale production of a well-

- defined bacteriophage cocktail for use in human clinical trials. *Plos one*. 4 (3), e4944 (1-10).
- Merrill, C.R., Biswas, B., Carlton, R., Jensen, N.C., Creed, G.J., Zullo, S., and Adhya, S. (1996) Long-circulating bacteriophage as antibacterial agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 93, 3188–3192.
- Migliore, L. (2011). Caracterización molecular, y estudio de las condiciones de estabilidad y actividad de bacteriofagos sobre cepas de *Escherichia coli* Shiga-toxigénicas aisladas de alimentos. Tesina de grado.
- Miller, S., and Pegues, D. (2000). *Salmonella* species, including *Salmonella typhi*. In Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, 5th edn, pp. 2344-2363. Edited by Mandell, G.L., Bennett, J.E and Dolin, R. Philadelphia: Churchill Livingstone.
- Miller, I.S., Hohmann, E.L., and Pegues, D.A. (1995). *Salmonella* (Including *Salmonella Typhi*). p. 2013-2033. In: Mandel, Douglas and Bennett, eds. Principles and Practice of Infectious Diseases. 4th ed., Churchill Livingstone, New York.
- Ministerio de Salud. (2009). Informe brote listeriosis región metropolitana Departamento de Epidemiología. (<http://epi.minsal.cl/epi/html/bolets/reportes/Listeriosis/Informe%20Listeria%20brote%202008.pdf>).
- Minnesota Department of Health. (2010). Three more *E. coli* cases linked to raw milk from farm. News release. (<http://www.health.state.mn.us/news/pressrel/2010/ecoli061110.html>).
- Modi, R, Hirvi, Y., Hill, A., and Griffiths, M. W. (2001). Effect of phage on survival of *Salmonella enteritidis* during manufacture and storage of cheddar cheese made from raw and pasteurized milk. *J. Food Protect.* 64, 927-933.
- Moore, J.E., Corcoran, D., Dooley, J.S., Fanning, S., Lucey, B., Matsuda, M., McDowell, D.A., Mégraud, F., Millar, B.C., O'Mahony, R., O'Riordan, L., O'Rourke, M., Rao, J.R., Rooney, P.J., Sails, A., and Whyte, P. (2005). *Campylobacter*. *Vet. Res.* 36, 351-382.
- Moradpour, Z., Sepehrizadeh, Z., Rahbarizadeh, F., Ghasemian, A., Yazdi, M. T., and Shahverdi, A. R. (2009). Genetically engineered phage harbouring the lethal catabolite gene activator protein gene with an inducer-independent promoter for biocontrol of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 296, 67–71.
- Mossong, J., Marques, P., Ragimbeau, C., Huberty-Krau, P., Losch, S., Meyer, G., Moris, G., Stottner, C., Rabsch, W., and Schneider F. (2006). Outbreaks of

-
- monophasic *Salmonella enterica* serovar 4, (5), 12:i-in Luxemburg. *Eurosurveillance*. 12 (6), 1206-1226.
- Murphy, O., Gray, J., Gordon, S., and Bint, A. J. (1995). An outbreak of *Campylobacter* food poisoning in a health care setting. *J. Hosp. Infect.* 30, 225-228.
- Nataro, J. P., and Kaper, J. B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 11, 142–201.
- Nazarowec-White, M., and Farber, J.M. (1997). Thermal resistance of *Enterobacter sakazakii* in reconstituted dried-infant formula. *Lett. Appl. Microbiol.* 24, 9-13.
- Nuñez, M., Murillo, A., Suazo, H., Campos, J., Rodríguez, E., Espinal, O., and Avelar, G. (2009). Brote por *Saphylococcus aureus* en una guardería infantil en choluteca, Honduras. *Rev. Med. Hondur.* 77 (2), 57-98.
- Obeso, J.M., Garcia, P., Martínez, B., Arroyo-López, F.N., Garrido-Fernández, A., and Rodriguez, A. (2010). Use of logistic regression for prediction of the fate of *Staphylococcus aureus* in pasteurized milk in the presence of two lytic phages. *Appl. Environ. Microbiol.* 76 (18), 6038-6046.
- O'Flynn, G., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., and Coffey, A. (2004). Evaluation of a cocktail of three bacteriophages for biocontrol of *Escherichia coli* O157:H7. *Appl. Environ. Microbiol.* 70 (6), 3417–3424.
- Olsen, S. J., Patrick, M., Hunter, S.B., Reddy, V., Kornstein, L., MacKenzie, W.R., Lane, K., Bidol, S., Stoltman, G.A., Frye, D.M., Lee, I., Hurd, S., Jones, T.F., LaPorte, T.N., Dewitt, W., Graves, L., Weidmann, M., Schoonmaker-Bopp, D.J., Huang, A.J., Vincent, C., Bugenhagen, A., Corby, J., Carloni, E.R., Holcomb, M.E., Woron, R.F., Zansky, S.M., Dowdle, G., Smith, F., Ahrabi-Fard, S., Ong, A.R., Tucker, N., Hynes, N.A., and Mead, P. (2005). Multistate Outbreak of *Listeria monocytogenes* Infection Link to Delicatessen Turkey Meat. *Clin. Infect. Dis.* 40 (7), 962-967.
- OMRI. 2010, The OMRI products list. Organic Materials Review Institute. (http://www.omri.org/OMRI_products_list.html).
- Ono, K., and Yamamoto, K. (1999). Contamination of meat with *Campylobacter jejuni* in Saitama, Japan. *Int. J. Food. Microbiol.* 47, 211-219.
- Pass, M. A., Odedra, R., and Batt, R. M. (2000). Multiplex PCRs for identification of *Escherichia coli* virulence genes. *J. Clin. Microbiol.* 38, 2001-2004.
- Pearson, L.J., and Marth, E.H. (1990). *Listeria monocytogenes* - threat to a safe food supply: a review. *J. Dairy Sci.* 73 (4), 912-928.

-
- Pennington, H. (2010). Review: *Escherichia coli* O157. *Lancet*. 365, 1073–1086.
- Perroni, M.A. (2008). *Listeria monocytogenes* y su presencia en productos lácteos. *Diaeta*. 26 (123), 37-43.
- Petty, N.K., Evans, T.J., Fineran, P.C., and Salmond, G.P.C. (2007). Biotechnological exploitation of bacteriophage research. *Trends Biotechnol.* 25, 7-15.
- Privat, K., Ghalfi, H., Dortu, C., Evrard, P., and Thonart, P. (2010a). Combined use of bacteriocin-producing strains to control *Listeria monocytogenes* regrowth in raw pork meat. *Int. J. Food Sci. Technol.* 45 (5), 937-43.
- Privat, K., Dortu, C., Dubois-Dauphin, R., Vandebol, M., and Thonart, P. (2010b). Plasmid-associated bacteriocin production by *Lactobacillus* LMG21688 suppresses *Listeria monocytogenes* growth rebound in a food system. *FEMS Microbiol. Lett.* 306, 37-44.
- Quiberoni, A., Suárez, V.B., Binetti, A.G., and Reinheimer, J.A. (2011). Bacteriophage. En: Encyclopedia of dairy science (Eds.: Fuquay, J.; Fox, P., and McSweeney, P.) 2° Edición (Volumen 1), Academic Press, Elsevier Science, USA, p. 430-438.
- Quinones-Ramirez, E. I., Vazquez-Salinas, C., Rodas-Suarez, O. R., Ramos-Flores, M. O., and Rodriguez-Montano, R. (2000). Frequency of isolation of *Campylobacter* from roasted chicken samples from Mexico City. *J. Food. Prot.* 63, 117-119.
- Rakhuba, D. V., Kolomiets, E. I., Dey, E. S., and Novik, G. I. (2010). Bacteriophage receptors, mechanisms of phage adsorption and penetration into host cell. *Pol. J. Microbiol.* 59, 145-155.
- Rangel, J.M., Sparling, P.H., Crowe, C., Griffin, P.M., Swerdlow, D.L. (2005). Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks, United States, 1982-2002. *Emerg. Inf. Dis.* 11, 603-609.
- Rasooly, R., and Do, P.M. (2010). Shiga toxin Stx2 is heat-stable and not inactivated by pasteurization. *Int J Food Microbiol.* 136, 290-294.
- Raya, R., Varey, P., Oot, R., Dyen, M., Callaway, T., Edrington, T., Kutter, E., and Brabban, A. (2006). Isolation and characterization of a new T-Even bacteriophage, CEV1, and determination of its potential to reduce *E. coli* O157:H7 levels in sheep. *Appl. Environ. Microbiol.* 72 (9), 6405-6410.
- Riley, L.W., Remis, R.S., Helgerson, S.D., McGee, H.B., Wells, J.G., Davis, B.R., Hebert, R.J., Olcott, E.S., Johnson, L.M., Hargrett, N.T., Blake, P.A., Cohen, M.L. (1983). Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N. Engl. J. Med.* 308, 681-685.
-

-
- Rissland, J., Kielstein, J.T., Stark, K., Wichmann-Schauer, H., Stümpel, F., and Pulz, M. (2013). The EHEC O104:H4 outbreak in Germany 2011 - lessons learned? *Gesundheitswesen*. 75 (4), 184-189.
- Rivas, M., Miliwebsky, E., Chinen, I., Deza, N., and Leotta, G.A. (2006). Epidemiología del síndrome urémico hemolítico en Argentina. Diagnóstico del agente etiológico, reservorios y vías de transmisión. *Medicina*. 66 (3), 27-32.
- RKI (Robert Koch Institut). (2008). Zum Auftreten mehrerer EHEC-Infektionen nach Rohmilchverzehr in einem Ferienlager. *Epidemiologisches Bulletin*. 11, 16-18.
- Roels, T. H., Wickus, B., Bostrom, H. H., Kazmierczak, J. J., Nicholson, M. A., Kurzynski, T. A., and Davis, J. P. (1998). A foodborne outbreak of *Campylobacter jejuni* (O:33) infection associated with tuna salad: a rare strain in an unusual vehicle. *Epidemiol. Infect.* 121, 281-287.
- Rodríguez, D., Tauxe, R., and Rowe, B. (1990). Internacional Increase in *Salmonella enteritidis*: A new Epidemia? *Epidemiology and Infectious*. 105, 21-27.
- Rohwer, F., and Edwards, R. (2002). The Phage Proteomic Tree: a Genome-Based Taxonomy for Phage. *J. Bacteriol.* 184 (16), 4529-4535.
- Rothschild, M. (2010). Sally Jackson cheese confirmed as outbreak source. Food Safety News. (http://beforeitsnews.com/story/319/970/Sally_Jackson_Cheese_Confirmed_as_Outbreak_Source.html).
- Roy, B., Ackermann, H., Pandian, S., Picard, G., and Goulet, J. (1993). Biological inactivation of adhering *Listeria monocytogenes* by listeriophages and a quaternary ammonium compound. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 2914-2917.
- Rubeglio, E., and Tesone, S. (2007). *Escherichia coli* O157 H7: presencia en alimentos no cárnicos. *Arch. Argent. Pediatr.* 105 (3), 193-194.
- Ryser, E.T. (1999). Foodborne listeriosis. p. 299-358. In: Ryser, E.T., and Marth, E.H. eds., *Listeria, Listeriosis, and food safety*, 2nd ed. New York: Marcel Dekker.
- Sakaguchi, Y., Hayashi, T., Kurokama, K., Nakayama, K., Oshima, K., Fujinaga, Y., Ohnishi, M., Ohtsubo, E., Hattori, M., and Oguma, K. (2005). The genome sequence of *Clostridium botulinum* type C neurotoxina-converting phage and the molecular mechanisms of unstable lysogeny. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 102, 17472-17477.
- Sambrook, J., and Russell, D. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press. ISBN 978-0-87969-577-4.
- Schlech, W.F. (2000). Foodborne Listeriosis. *Clin. Infect. Dis.* 31, 770-775.
-

-
- Schwartz, B., Ciesielski, C.A., Broome, C.V., Gaventa, S., Brown, G.R., Gellin, B.G., Hightower, A.W., and Mascola, L. (1988). Association of sporadic listeriosis with consumption of uncooked hot dogs and undercooked chicken. *Lancet*. 2, 779-782.
- Scott, E., and Bloomfield, S.F. (2008). The survival and transfer of microbial contamination via cloths, hands and utensils. *J. Appl. Microbiol.* 68, 271-278.
- Shakoor, S., Zaidi, A., and Hasan, R. (2012). Tropical Bacterial Gastrointestinal Infections. *Infect. Dis. Clin. N. Am.* 26 (2), 437-453.
- Sharma, M., Ryu, J.H., and Beuchat, L. (2005). Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in biofilm on stainless steel by treatment with an alkaline cleaner and a bacteriophage. *J. Appl. Microbiol.* 99, 449-459.
- Shih, D.Y. (2000). Isolation and identification of enteropathogenic *Campylobacter* spp. from chicken samples in Taipei. *J. Food. Prot.* 63, 304-308.
- SIRVETA/INPPAZ/OPS/OMS. (2004). Brotes de enfermedades transmitidas por alimentos. www.panalimentos.org/sirveta.
- Skurnik, M., Pajunen, M., and Kiljunen, S. (2007). Biotechnological challenges of phage therapy. *Biotechnol Lett.* 29, 995-1003.
- Soni, K. A., and Nannapaneni, R. (2010). Removal of *Listeria monocytogenes* biofilms with bacteriophage P100. *J. Food Protect.* 73, 1519-1524.
- Sorensen, M. C. H., van Alphen, L. B., Harboe, A., Li, J., Christensen, B. B., Szymanski, C. M., and Brondsted, L. (2011). Bacteriophage F336 recognizes the capsular phosphoramidate modification of *Campylobacter jejuni* NCTC11168. *J. Bacteriol.* 193 (23), 6742–6749.
- Strachan, N.J.C., Dunn, G.M., Mary, E., Locking, M.E., Reid, T.M.S., and Ogden, I.D. (2006). *Escherichia coli* O157: burger bug or environmental pathogen? *Int. J. Food Microbiol.* 112, 129–137.
- Stuart, J., Sufi, F., McNulty, C., and Park, P. (1997). Outbreak of *Campylobacter enteritis* in a residential school associated with bird pecked bottle tops. *Commun. Dis. Rep. CDR Rev.* 7, 38-40.
- Su, C., and Brandt, L. J. (1995). *Escherichia coli* O157:H7 infection in humans. *Ann. Intern. Med.*, 123, 698–714.
- Sulakvelidze, A. (2013). Using lytic bacteriophages to eliminate or significantly reduce contamination of food by foodborne bacterial pathogens. *J. Sci. Food Agric.* 93, 3137-3146.

-
- Sulakvelidze, A., and P. Barrow. (2005). Phage therapy in animals and agribusiness, p. 335–380. In E. Kutter and A. Sulakvelidze (ed.), *Bacteriophages: biology and applications*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Sulakvelidze, A., and E. Kutter. (2005). Bacteriophage therapy in humans, p. 381–436. In E. Kutter and A. Sulakvelidze (ed.), *Bacteriophages: biology and application*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Tanji, Y, Shimada, T., Yoichi, M., Miyanaga, K., Hori, K., and Unno, H. (2004). Toward rational control of *Escherichia coli* O157:H7 by a phage cocktail. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64, 270–274.
- Tasara, T., and Stephan, R. (2006). Cold stress tolerance of *Listeria monocytogenes*: A review of molecular adaptive mechanisms and food safety implications. *J. Food Protect.* 69 (6), 1473-1484.
- Tirado, C., and Schmidt, K. (2000). WHO Surveillance Programme for Control of Foodborne Infections and Intoxications in Europe. Seventh Report (http://www.bfr.bund.de/internet/7threport/7threp_fr.htm).
- Tomat, D.; Migliore, L.; Aquili, V.; Quiberoni, A.; and Balagué, C. (2013a). Phage biocontrol of enteropathogenic and shiga toxin-producing *Escherichia coli* in meat products. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 3 (20), 1-10.
- Tomat, D., Mercanti, D., Balagué, C., Quiberoni, A. (2013b). Phage biocontrol of enteropathogenic and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* during milk fermentation. *Lett. Appl. Microbiol.* 57, 3-10.
- Van Acker, J., de Smet, F., Muyldermans, G., Anne Naessens, A., and Lauwers, S. (2001). Outbreak of necrotizing enterocolitis associated with *Enterobacter sakazakii* in powdered milk formula. *J. Clin. Microbiol.* 39 (1), 293-297.
- Viazis, S., and Diez-Gonzalez, F. (2011). Enterohemorrhagic *Escherichia coli*: The Twentieth Century's Emerging Foodborne Pathogen: A Review. *Adv. Agronomy.* 111, 1-50.
- Viazis, S., Akhtar, M., Feirtag, J., and Diez-Gonzalez, F. (2010). Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 viability on hard surfaces by treatment with a bacteriophage mixture. *Int. J. Food Microbiol.* 145 (1), 37-42.
- Velilla, A.; Terzolo, H.; Feingold, S. (2004). Avances en el Diagnóstico Molecular de *Salmonella*. PCR aplicado a la Avicultura y a la microbiología de alimentos. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Estación Experimental Agropecuaria Balarce. Argentina. (<http://www.inta.gov.ar/balarce/info/documentos>)
-

- /ganaderia/otras/aves/salmonella.htm).
- Wagner P.L., and Waldor, M. K. (2002). Bacteriophage control of bacterial virulence. *Infect. Immun.* 70, 3985-3993.
- Wagner P.L., Acheson, D.W.K., and Waldor, M. K. (1999). Isogenic lysogens of diverse Shiga toxin2-encoding bacteriophages produce markedly different amounts of shiga toxins. *Infect. Immun.* 67, 6710-6714.
- Waldvogel, F. A. (2001). *Staphylococcus aureus* (including staphylococcal toxic shock), p. 2069-2092. In: Mandell, J.L., Bennett, J.E., and Dolin, R. (ed.), Principles and practice of infectious diseases. Churchill Livingstone, Philadelphia, PA.
- Waldor, M. K., and Mekalanos, J. J. (1996). Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. *Science.* 272, 1910-1914.
- Wang, G., Zhao, T., and Doyle, M.P. (1997). Survival and growth of *Escherichia coli* O157:H7 in unpasteurized and pasteurized milk. *J. Food Prot.* 60, 610-613.
- Wang, I. N. (2006). Lysis timing and bacteriophage fitness. *Genetics.* 172, 17-26.
- Weiler, N., Leotta, G., Zarate, M., Manfredi, E., Alvarez, M., and Rivas, M. (2011). Brote de intoxicación alimentaria asociado al consumo de leche ultrapasteurizada en la República del Paraguay. *Rev. Arg. Microbiol.* 43, 33-36.
- Wendel, A.M., Johnson, D.H., Sharapov, U., Grant, J., Archer, J.R., Monson, T., Koschmann, C., and Davis, J.P. (2009). Multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with consumption of packaged spinach, August-September 2006: the Wisconsin investigation. *Clin. Infect. Dis.* 48, 1079-1086.
- WHO. (1998). Zoonotic non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC). Report of a WHO Scientific Working Group Meeting, Geneva, Switzerland.
- WHO/CSR/APH/98.8. (1998). Zoonotic non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC). Report of a WHO Scientific Working Group Meeting, 23–26 June, Berlin, Germany.
- Wiggins, B.A., and Alexander, M. (1985). Minimum bacterial density for bacteriophage replication: implications for significance of bacteriophages in natural ecosystems. *Appl. Environ. Microbiol.* 49, 19-23.
- Yu, S., Ko, K., Chen, C., and Syu, W. (2000). Characterization of the distal tail fiber locus and determination of the receptor for phage AR1, which specifically infects *Escherichia coli* O157:H7. *J. Bacteriol.* 182, 5962-5968.

Zuber, S., Boissin-Delaporte, C., Michot, L., Iversen, C., Diep, B., Brüßow, H., and Breeuwer, P. (2008). Decreasing *Enterobacter sakazakii* (Cronobacter spp.) food contamination level with bacteriophages: prospects and problems. *Microbial Biotechnol.* 1(6), 532-543.