

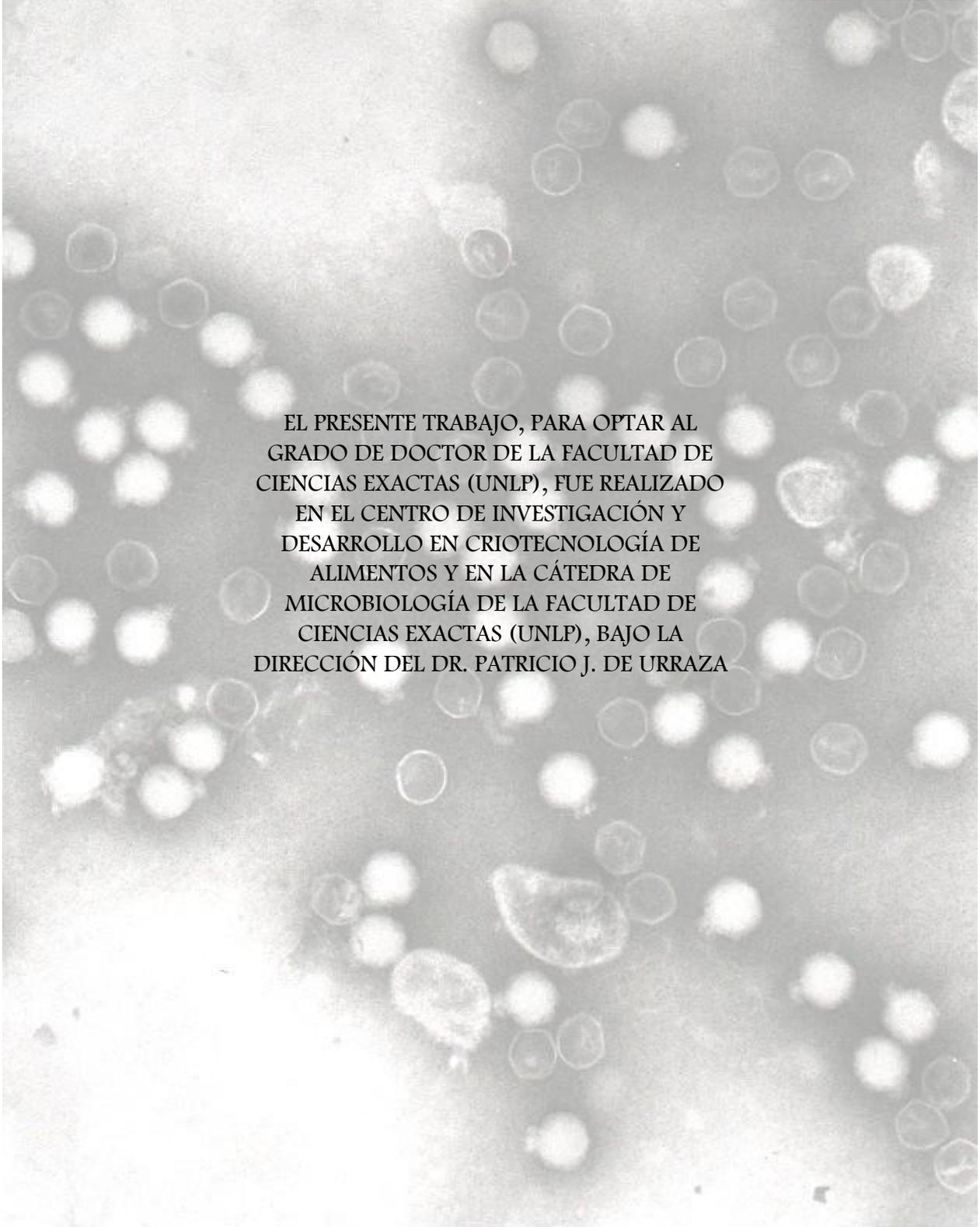
Tesis doctoral 2011

**Aislamiento y caracterización
molecular de bacteriófagos
de bacterias enteropatóge-
nas para biocontrol de en-
fermedades transmitidas por
alimentos (ETA)**

Lic. Cecilia Dini



Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Exactas
Departamento de Química
Departamento de Ciencias Biológicas



EL PRESENTE TRABAJO, PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS (UNLP), FUE REALIZADO EN EL CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO EN CRIOTECNOLOGÍA DE ALIMENTOS Y EN LA CÁTEDRA DE MICROBIOLOGÍA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS (UNLP), BAJO LA DIRECCIÓN DEL DR. PATRICIO J. DE URRAZA

Agradecimientos

 A mi director Patricio de Urraza y a mi codirectora Graciela de Antoni por darme la oportunidad de realizar este trabajo de tesis.

 A todo el grupo de microbiología del CIDCA y en especial a mis compañeros de laboratorio en la cátedra de Micro que siempre me ayudaron en todo (y que me rebautizaron Carla Beatriz).

 A Pato Bolla e Ivanna Rolny por todo el aguante en estos 5 años.

 A Emilia López, Germán Islan y Guillermo Castro por toda la ayuda que me brindaron para este trabajo de tesis.

 A toda mi familia por estar siempre conmigo.

 A mi hermana Daniela por tenerme infinita paciencia en el diseño de la tapa de la tesis.

 A Gabo, porque puedo contar con él para todo, en todo, siempre...

Índice

Introducción	1
Enfermedades transmitidas por alimentos	1
<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica	5
Bacteriófagos	10
Fagoterapia	17
Fagoterapia en animales: biocontrol de EHEC	21
Condición actual de la fagoterapia	24
Problemas a superar	25
Objetivos	27
Capítulo I Materiales y métodos	28
Cepas y aislados bacterianos	28
Cultivos y técnicas de recuento de fagos	29
Aislamiento de fagos	30
Caracterización de los aislados	31
Rango de huésped	31
Morfología por microscopía electrónica de transmisión	32
Análisis genómico	32
Morfología de las placas de lisis	34
Resistencia a la acidez	35
Parámetros del ciclo lítico	35
Efecto del uso de fagos in vitro sobre células eucariotas	36
Desarrollo de estrategias para la administración oral de fagos	39
Productos derivados de los gránulos de kefir	39
Análisis del efecto protector del PSK y los extractos a pH4	39
Estabilidad de los geles de kefir	40
Análisis del efecto protector de los geles de kefir a pH ácido	41
Efecto protector de microesferas a base de alginato y pectinas	41

Elaboración de las microesferas	41
Ensayos de resistencia a pH	42
Resistencia del fago a condiciones hostiles: etanol, H ₂ O ₂ , fuerza iónica y actividad de proteasas.	43
Protección de M1 frente a etanol, H ₂ O ₂ y pepsina.	44
Cinéticas de liberación e inactivación de fagos encapsulados en M1	45
Conservación de fagos	46
Cinética de inactivación a temperatura ambiente	46
Almacenamiento a largo plazo	46
Liofilización	47
Congelación	47
Análisis estadístico	48
Capítulo II Aislamiento y caracterización	49
Aislamiento	50
Rango de huésped	51
Morfología de los aislados	54
Análisis genómico	56
Determinación de los genes <i>stx1</i> , <i>stx2</i> y <i>cl</i> por PCR	57
Perfiles genómicos por RAPD y rep-PCR	59
Morfología de las placas de lisis	63
Resistencia a la acidez de los aislados	67
Cinética de adhesión y lisis en un ciclo.	69
Efecto del uso de fagos <i>in vitro</i> sobre células eucariotas	72
Conclusión general del capítulo II	76
Capítulo III Encapsulamiento de fagos	78
Productos derivados de los gránulos de kefir	79
Efecto protector del PSK y extractos de gránulos de kefir	79
Efecto protector de geles derivados de los extractos de gránulos de kefir	81
Efecto protector de microesferas a base de alginato y pectinas	84
Análisis del efecto protector de la matriz M1 y de la capacidad de liberación de los fagos	88

Conclusión general del capítulo III	96
Capítulo IV Conservación de fagos	98
Estabilidad de los lisados de fagos a temperatura ambiente	99
Liofilización	101
Congelación	116
Conclusión general del capítulo IV	121
Conclusión general	123
Apéndice Buffers y medios de cultivo	126
Referencias	128

Introducción

Enfermedades transmitidas por alimentos (ETA)

Las enfermedades transmitidas por alimentos son aquellas que se originan por la ingestión de alimentos infectados con agentes contaminantes en cantidades suficientes para afectar la salud del consumidor. Las ETA pueden manifestarse a través de:

Infecciones: Son enfermedades que resultan de la ingestión de alimentos que contienen microorganismos vivos perjudiciales como hongos, bacterias, virus o parásitos. Por ejemplo: salmonelosis, hepatitis viral tipo A y toxoplasmosis.

Intoxicaciones: Son las ETA producidas por la ingestión de toxinas formadas en tejidos de plantas o animales, o de productos metabólicos de microorganismos en los alimentos, o por sustancias químicas que se incorporan a ellos de modo accidental, incidental o intencional desde su producción hasta su consumo. Ocurren cuando las toxinas o venenos de bacterias o mohos están presentes en el alimento ingerido. Estas toxinas generalmente no poseen olor o sabor y son capaces de causar enfermedades después de que el microorganismo es eliminado. Algunas toxinas pueden estar presentes de manera natural en el alimento, como en el caso de ciertos hongos y animales como el pez globo. Ejemplos: botulismo, intoxicación estafilocócica o micotoxinas.

Toxi-infecciones causadas por alimentos: es una enfermedad que resulta de la ingestión de alimentos con una cierta cantidad de microorganismos causantes de enfermedades, los cuales son capaces de producir o liberar toxinas una vez que son ingeridos. Ejemplos: cólera, *Escherichia coli* enterohemorrágica.

Un brote de ETA se da cuando dos o más personas sufren una enfermedad similar después de ingerir un mismo alimento y los análisis epidemiológicos señalan al alimento como el origen de la enfermedad, que luego es confirmado por el laboratorio. Las ETA plantean una preocupación muy seria en el ámbito de la salud pública ya que no sólo repercuten en el bienestar de la población sino que también tienen impacto sobre actividades como el turismo y la comercialización de alimentos. Las ETA pueden manifestarse a través de síntomas muy variados, tales como diarreas, vómitos, mareos, náuseas, dolores de estómago o en diferentes partes del cuerpo, trastornos neurológicos, etc. En personas adultas sanas, las ETA generalmente se resuelven en el término de tres o cuatro días después de la ingesta sin secuelas ni complicaciones, pero en personas que pertenecen a lo que se considera grupo de riesgo (niños, embarazadas, ancianos e individuos inmunodeprimidos) las ETA pueden resultar en complicaciones severas y en algunos casos incluso producir la muerte.

Las bacterias que aparecen con mayor frecuencia asociadas a brotes de ETA son *Campylobacter*, *Salmonella* y *Escherichia coli* O157:H7 (<http://www.cdc.gov>, 2000).

Campylobacter: El síntoma más característico de una campylobacteriosis es la diarrea, que puede ser o no sanguinolenta, ésta puede ir acompañada de: fiebre, calambres y dolores abdominales, vómitos, náuseas, dolores de cabeza y musculares. Es la bacteria más comúnmente identificada como causante de diarreas en el mundo y tiene como principal reservorio el intestino de aves sanas. Las infecciones producidas por *Campylobacter* se asocian generalmente al consumo de pollo mal cocido, o de alimentos que hayan estado en contacto con pollos crudos. La campylobacteriosis en la mayoría de los casos se auto limita y no hay necesidad de hospitalizar al paciente, pero en algunas ocasiones puede derivar en una alteración del sistema nervioso denominada Síndrome de Guillain-Barré que en algunos casos puede dejar severos daños neurológicos.

Salmonella: Esta bacteria se encuentra en el intestino de aves, reptiles y mamíferos. Las vías por las cuales este patógeno puede transmitirse a los seres humanos son muy variadas. Los alimentos asociados a brotes de *Salmonella* incluyen huevos o alimentos derivados del huevo consumidos crudos o con insuficiente cocción, leche no pasteurizada y sus derivados, agua, carne y productos cárnicos. Los síntomas típicos la una salmonelosis incluyen fiebre, diarrea sanguinolenta o mucosa, náuseas y calambres abdominales. Aunque no es común, la infección por *Salmonella* puede derivar en una enfermedad denominada Síndrome de Reiter que incluye artritis reactiva, irritación ocular e infección urinaria. La mayoría de los pacientes se recuperan en el término de un año, pero algunos pueden tener secuelas permanentes.

Escherichia coli: Es una bacteria que presenta una gran variabilidad genética, existen variedades no patógenas que habitan normalmente en el intestino de mamíferos, y variantes patogénicas capaces de producir enfermedades entéricas o distintos tipos de infecciones extra intestinales en humanos y animales. Los aislamientos se diferencian en base a 3 antígenos de superficie principales que permiten el serotipado: los antígenos O (somáticos), H (flagelos) y K (cápsula). Se pueden distinguir 6 variantes patogénicas capaces de producir enfermedades entéricas que difieren en los factores de virulencia que poseen y, en consecuencia, en el tipo de daño producido en el huésped (Donnenberg, 2002, Nataro & Kaper, 1998, Doyle *et al.*, 2001). Éstas son:

- ▶ *E. coli* enteropatogénica (ECEP, del inglés *Enteropathogenic E. coli*): 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 (del inglés: *attachment and effacing*) e incapaces de producir toxinas Shiga (verocitotoxinas). Las cepas de ECEP típicas que causan infecciones en humanos poseen un plásmido de virulencia denominado EAF (del inglés: *EPEC adherence factor*) que les permite producir un pili y adherirse a las células epiteliales en un

patrón característico denominado *adherencia localizada*. Los principales serogrupos relacionados con enfermedad son: O55, O86, O111ab, O119, O125ac, O126, O127, O128ab, y O142.

- ▶ *E. coli* enterotoxigénica (EPEC, del inglés *Enterotoxigenic E. coli*): Las infecciones por EPEC tienen lugar a través de dos factores de virulencia: fimbrias adhesivas y endotoxinas. 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. Los serogrupos de EPEC más frecuentes son: O6, O8, O15, O20, O25, O27, O63, O78, O85, O115, O128ac, O148, O159, y O167.
- ▶ *E. coli* enteroagregativa (EAEC, del inglés *Enteroggregative E. coli*): se definen como aquellas que no secretan enterotoxinas termolábiles ni termoestables y adhieren a células HEp-2 en un patrón agregativo, reconocido por su autoaglutinación en forma de “ladrillos apilados”. Esta definición abarca tanto cepas patogénicas como no patogénicas por lo que aún se encuentra en estudio cuáles los factores responsables de la virulencia en ciertas cepas.
- ▶ *E. coli* de adherencia difusa (DAEC, del inglés *Diffuse Adhering E. coli*): se identifican por una característica forma de adherencia difuso-adherente a las líneas celulares HEp-2 o HeLa. Estas bacterias cubren la superficie uniformemente. Las DAEC generalmente no generan toxinas termoestables o termolábiles o niveles elevados de toxinas Shiga, no poseen plásmidos del factor de adherencia de EPEC ni invaden células epiteliales.
- ▶ *E. coli* enteroinvasiva (EIEC, del inglés *Enteroinvasive E. coli*): 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, multiplicación dentro de las células y la diseminación célula-a-célula (sin abandonar el medio intracelular y exponerse nuevamente a la luz intestinal) a través de la capa epitelial del colon. EIEC comparte tantas propiedades bioquímicas y patogénicas con *Shigella spp.* que las hace prácticamente indistinguibles entre sí. Los serotipos de EIEC más frecuentemente relacionados con la enfermedad son: O28ac, O29, O112, O124, O136, O143, O144, O152, O164, y O167.
- ▶ *E. coli* enterohemorrágica (EHEC, del inglés *enterohemorrhagic E. coli*): Es un subgrupo dentro de las denominadas *E. coli* productoras de toxina Shiga (STEC, del inglés *Shiga toxin-producing E. coli*). 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 Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) que se describe posteriormente. Existen numerosos serotipos descriptos de EHEC, tales como O26:H11, O103, O111, O113, y O121 entre otros, pero el principal serotipo asociado a brotes de colitis hemorrágica y SUH, es el O157:H7 (Masana *et al.*, 2010, Karmali *et al.*, 2010). Los mecanismos de infección y características de este patógeno alimentario se detallan en la siguiente sección.

En Argentina, el Ministerio de Salud de la Nación publica un boletín semanal de vigilancia donde se informan, entre otras cosas, los casos detectados de toxoinfecciones alimentarias, diarreas, diarreas agudas sanguinolentas y Síndrome Urémico Hemolítico www.msal.gov.ar/htm/site/epidemiologia.asp. En el último boletín, publicado en febrero de 2011, los casos reportados de toxoinfecciones alimentarias, diarreas y diarreas sanguinolentas han disminuido respecto a lo observado a la misma altura del año en 2010 (y también respecto al año 2009 para los dos primeros), pero los casos de SUH se mantienen en valores comparables a los de 2010.

***Escherichia coli* enterohemorrágica**

Factores de virulencia

Los factores de virulencia típicos de EHEC, que se encuentran en todas las EHEC O157:H7, son la capacidad de producir toxinas Shiga (Stx), también denominadas verocitotoxinas (VTs) por ser factores citotóxicos para células renales de mono verde africano (células Vero), la producción de *lesiones de adhesión y borrado* o lesiones de A/E, la presencia de un plásmido de aproximadamente 60 MDa denominado pO157 y las estructuras externas de la bacteria: el lipopolisacárido (LPS) y la cápsula o exopolisacárido (EPS).

Toxinas Shiga

Estas potentes citotoxinas, consideradas el principal factor de virulencia de EHEC, son holotoxinas compuestas de una sola subunidad enzimática A de aproximadamente 32 kDa en asociación con un pentámero de subunidades B de 7,7 kDa que se unen a glucolípidos específicos que actúan como receptores en la superficie de las células eucariotas. Dentro de esta familia de toxinas existen 2 grupos principales denominados Stx1 y Stx2 que poseen entre sí una identidad promedio del 55 y 57% en las secuencias de las subunidades A y B respectivamente. Las Stx1 de EHEC son en algunos casos idénticas y en otros difieren en sólo un residuo de la Stx producida por *Shigella dysenteriae* tipo I. La secuencia de esta toxina está altamente conservada a diferencia de la de Stx2 que presenta una gran variabilidad. Entre las variantes conocidas de Stx2 se encuentran Stx2c, Stx2v, Stx2vhb, Stx2e y se ha encontrado que la toxicidad de Stx2 es hasta 1000 veces mayor que la Stx1 y la variante Stx2e utiliza como receptor al glucolípidos globotetraosilceramida (Gb₄) a diferencia de Stx1 y las otras variantes de Stx2 que utilizan como receptor a la globotriaosilceramida (Gb₃) (Donnenberg, 2002).

Una misma cepa de EHEC puede expresar sólo Stx1 o Stx2 o ambas, e incluso puede tener diferentes variantes de Stx2. Estas toxinas se encuentran codificadas en diferentes profagos incorporados al genoma de la bacteria. En el caso de la cepa de colección EDL 933, que es una cepa de referencia de EHEC O157:H7, tiene incorporados a su genoma dos profagos lamboides denominados 933V y 933W que codifican para Stx1 y Stx2 respectivamente.

Las Stxs actúan inhibiendo la síntesis de proteínas. Cada una de las subunidades B es capaz de unirse a un disacárido no habitual (galactosa α 1-4 galactosa) en la secuencia terminal de trisacáridos de la Gb₃ (o Gb₄) y la toxina es incluida por endocitosis y transferida primero al aparato de Golgi y luego al retículo endoplasmático. En el citosol, la subunidad A presenta una proteólisis parcial y se desdobra en una enzima intracelular activa de 27 kDa (A1) y un fragmento de 4 kDa (A2) unido por un enlace disulfuro. La subunidad A1 es capaz de romper el enlace N-glucósido en una posición

de adenosina del RNAr de 28S que constituye las subunidades ribosómicas 60S y de esta manera inhibe la síntesis proteica e induce la muerte de células del endotelio renal, del epitelio intestinal, Vero o HeLa y todas aquellas que posean el receptores Gb₃ (o Gb₄ para Stx2e)(Doyle et al., 2001) .

Adherencia: formación de la lesión de A/E

La lesión de A/E se caracteriza por la fijación de las bacterias a las células intestinales con separación de las microvellosidades, y acumulación de actina filamentososa en el citoplasma subyacente que resulta en la formación de estructuras denominadas “pedestales” sobre las cuales se produce la adhesión íntima de la bacteria a la célula. Los genes necesarios para la formación la lesión de A/E se encuentran en la isla de patogenicidad LEE (del inglés: *locus of enterocyte effacement*) de aproximadamente 50kb que se encuentra dentro del cromosoma de la bacteria. Esta isla de patogenicidad tiene al menos 41 genes diferentes organizados en 3 regiones principales:

- i) Un sistema de secreción tipo III (SSTIII) que exporta las moléculas efectoras.
- ii) El operón *tir* que codifica para la intimina (una adhesina de la superficie de la bacteria), y para el receptor de la intimina que se trasloca a la superficie de la célula epitelial a través del SSTIII.
- iii) La producción de proteínas que se secretan a través del SSTIII y que están involucradas en la modificación de la transducción de señales celulares durante la formación de la lesión de A/E.

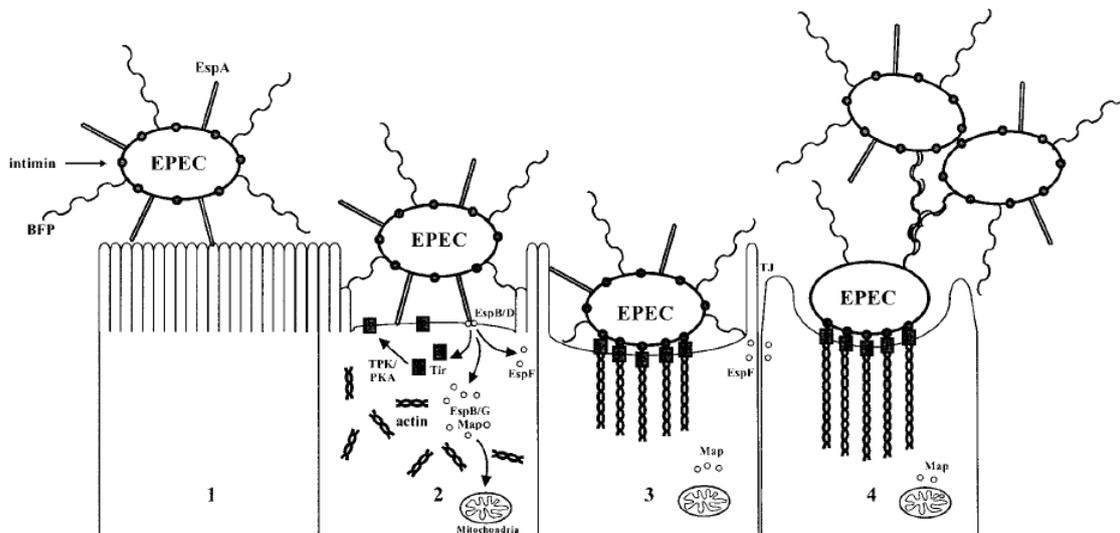
Las secuencias de los LEE de EHEC O157:H7 y de EPEC O127:H6 son prácticamente iguales, difieren sólo en la presencia de un profago de 7,5 kb en el LEE de EHEC. El tipo de lesión producida por ambas bacterias es igual, pero EPEC produce la lesión principalmente en el intestino delgado mientras que las lesiones producidas por EHEC se presentan predominantemente en el intestino grueso.

El modelo de infección planteado por Clarke et al. (2003) para EPEC presenta cuatro pasos:

- 1) Producción, bajo las condiciones ambientales correctas, de una fimbria (Bfp), intimina y filamentos de superficie (EspA) para producir la primer interacción con la célula
- 2) La bacteria, vía Bfp y EspA, por un SSTIII introduce el receptor traslocado de intimina (Tir) y un número aún no determinado de moléculas efectoras dentro de la célula eucariota. Estas moléculas efectoras activan las vías de señalización celular causando alteraciones en el citoesqueleto de la célula que resultan en la polimerización de la actina y pérdida de las microvellosidades. Tir se modifica en el interior de la célula a través de una proteína quinasa A y una tirosina proteína quinasa y se inserta en la membrana del huésped.

- 3) Los filamentos EspA se pierden de la superficie de la bacteria y la adhesina intimina se une al Tir modificado generando una adhesión íntima entre la célula y la bacteria. Debajo del sitio de unión se produce acumulación de actina y otros elementos del citoesqueleto.
- 4) La acumulación de elementos del citoesqueleto debajo de la unión bacteria-célula produce las estructuras características en forma de pedestal y muerte celular inducida por la acción de las moléculas efectoras introducidas en la célula.

El mecanismo propuesto se esquematiza a continuación:



Esquema propuesto por Clarke et al. (2003) para el mecanismo de infección de EPEC sobre células del epitelio intestinal.

Plásmido pO157

La función de los genes codificados en este plásmido de 60-MDa en la patogénesis de EHEC no ha sido dilucidada todavía, pero las cepas aisladas de la mayoría de los casos más severos de infección por EHEC poseen este plásmido. Entre los genes encontrados dentro de este plásmido se encuentra una hemolisina (denominada enterohemolisina) cuyo rol en la patogénesis de EHEC aún está sujeto a especulación. La lisis de enterocitos *in vivo* podría liberar hemoglobina y grupos hemo que podrían funcionar como fuente de hierro y favorecer el crecimiento de *E. coli*, ya que EHEC O157:H7 posee un sistema transportador de hierro especializado que le permite usar hemoglobina y grupos hemo como fuente de hierro. En este plásmido también se encuentran genes que podrían estar implicados en el mecanismo de adhesión de coli a las células epiteliales y un gen que codifica para una catalasa-peroxidasa (Donnenberg, 2002, Doyle et al., 2001, Lim *et al.*, 2010).

LPS y cápsula

Clásicamente el LPS y la cápsula son considerados factores de virulencia debido a que protegen a la bacteria de muchos factores de defensa del huésped. Además existe evidencia de que estos polisacáridos de superficie no sólo inducen la respuesta inflamatoria innata del huésped sino que también la bacteria es capaz de modular esa respuesta de manera que le resulte ventajosa (Donnenberg, 2002). Otro aporte a la virulencia fue reportado por Shifrin et al. (2008) quienes encontraron que la producción de cápsula del grupo 4 es necesaria para la eficiente colonización del intestino grueso de conejos.

Los aislados de *E. coli* que causan infecciones intestinales tienen cápsulas pertenecientes a los grupos 1 y 4, las del grupo 1 son polisacáridos acídicos que típicamente contienen ácidos urónicos, las del grupo 4 tienen estructuras diversas (Donnenberg, 2002).

Manifestaciones clínicas de la infección con EHEC

El espectro de enfermedades que pueden producirse por la infección con EHEC abarcan desde diarreas no hemorrágicas, colitis hemorrágica, SUH y Púrpura trombocitopénica trombótica (PTT), algunas personas incluso pueden tener infecciones asintomáticas.

El período de incubación posterior a la ingesta del microorganismo es generalmente de 3 o 4 días (pero puede ir desde los 2 a los 12 días) durante los que se produce la colonización del intestino grueso del huésped. La enfermedad comienza con dolores abdominales severos durante 1 o 2 días, progresando al tercer o cuarto día a diarreas sanguinolentas que duran de 4 a 10 días. Se ha documentado que de los brotes de diarrea causados por EHEC O157:H7, el 90% son sanguinolentas (Bell et al., 1994).

En general los síntomas se resuelven alrededor de una semana después de comenzar a manifestarse, pero en aproximadamente el 6% de los casos progresan a SUH (Besser et al., 1999). El SUH se define como el conjunto de insuficiencia renal aguda (pérdida rápida de la función renal), trombocitopenia (disminución en el número de plaquetas) y anemia hemolítica microangiopática (hemólisis intravascular causada por la fragmentación de glóbulos rojos normales al pasar por pequeños vasos cuyo endotelio se encuentra alterado). La mitad de los pacientes con SUH requieren diálisis y el 75% necesitan transfusiones de eritrocitos y/o plaquetas; y alrededor del 1% de los casos es fatal (Doyle et al., 1997).

El SUH afecta principalmente a niños menores de 10 años (Gamage et al., 2003) y es la principal causa de insuficiencia renal aguda (Rivas et al., 2008). Argentina es el país con mayor incidencia de SUH en el mundo, con una tasa de 13,9 casos cada 100.000 niños menores de 5 años (Leotta et al., 2008) y el 20% de los trasplantes de riñón efectuados a niños y adolescentes en el país son debido a una insuficiencia renal crónica derivada

del SUH (Palermo et al., 2009). Esta gran incidencia está probablemente asociada a los métodos de procesamiento de la carne vacuna y su alto consumo respecto a otros países.

Dosis infectiva y medios de contaminación

La dosis infectiva de esta bacteria es muy baja, no se conoce exactamente pero se presume que es del orden de unos pocos cientos de UFC (Grys *et al.*, 2005, Doyle et al., 2001). Una variedad de alimentos han sido identificados como fuente de infección por STEC: Carne y derivados insuficientemente cocidos, productos lácteos y jugos no pasteurizados, vegetales contaminados con materia fecal, agua de consumo y recreacionales, entre otros (Karmali et al., 2010, Besser et al., 1999). También ha sido descrita la transmisión animal-hombre y hombre-hombre, por la ruta fecal-oral, debido a su baja dosis infectiva (Nataro & Kaper, 1998). El ganado bovino ha sido señalado como el principal reservorio de E. coli O157:H7 a partir de 1982, cuando se produce el primer brote de SUH vinculado epidemiológicamente al consumo de hamburguesas. La contaminación de la carne proviene principalmente de su contacto con las heces del intestino vacuno durante el desposte (Fukushima & Seki, 2004, Gansheroff & O'Brien, 2000, Meichtri *et al.*, 2004, Chinen *et al.*, 2009), la de la leche por contacto fecal durante el ordeño (Griffin & Tauxe, 1991), y de vegetales y sus derivados por contacto con heces en el suelo de las plantaciones o riego con aguas servidas (Strachan et al., 2006).

Bacteriófagos

Los bacteriófagos, también conocidos como fagos, son virus que infectan específicamente a bacterias. Fueron descritos por primera vez por Frederick Twort en 1915 y posteriormente, en 1917, por Félix d’Herelle, quien además hizo grandes aportes al estudio de estos microorganismos. d’Herelle les dio el nombre de *bacteriófagos* por su capacidad de lisar bacterias (del griego *phagein*: “comer”). Los fagos son los entes biológicos más abundantes de la tierra, estimados en un total de 10^{30} a 10^{32} en todo el planeta, y juegan un rol determinante en el balance de los ecosistemas bacterianos (Goyal, 2006, Kutter & Sulakvelidze, 2005).

Existen 13 familias de fagos que se clasifican de acuerdo a la naturaleza de su genoma y a sus características morfológicas (**tabla 1**) (Ackermann, 2001).

Tabla 1. Morfotipos y características básicas de las diferentes familias de fagos

Morfotipo	Forma	Ácido 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>	
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

Sc: simple cadena, dc: doble cadena, C: circular, S: superhelicoidal, L: lineal, seg.: segmentado. Imagen obtenida del trabajo publicado por H. W. Ackermann (2001).

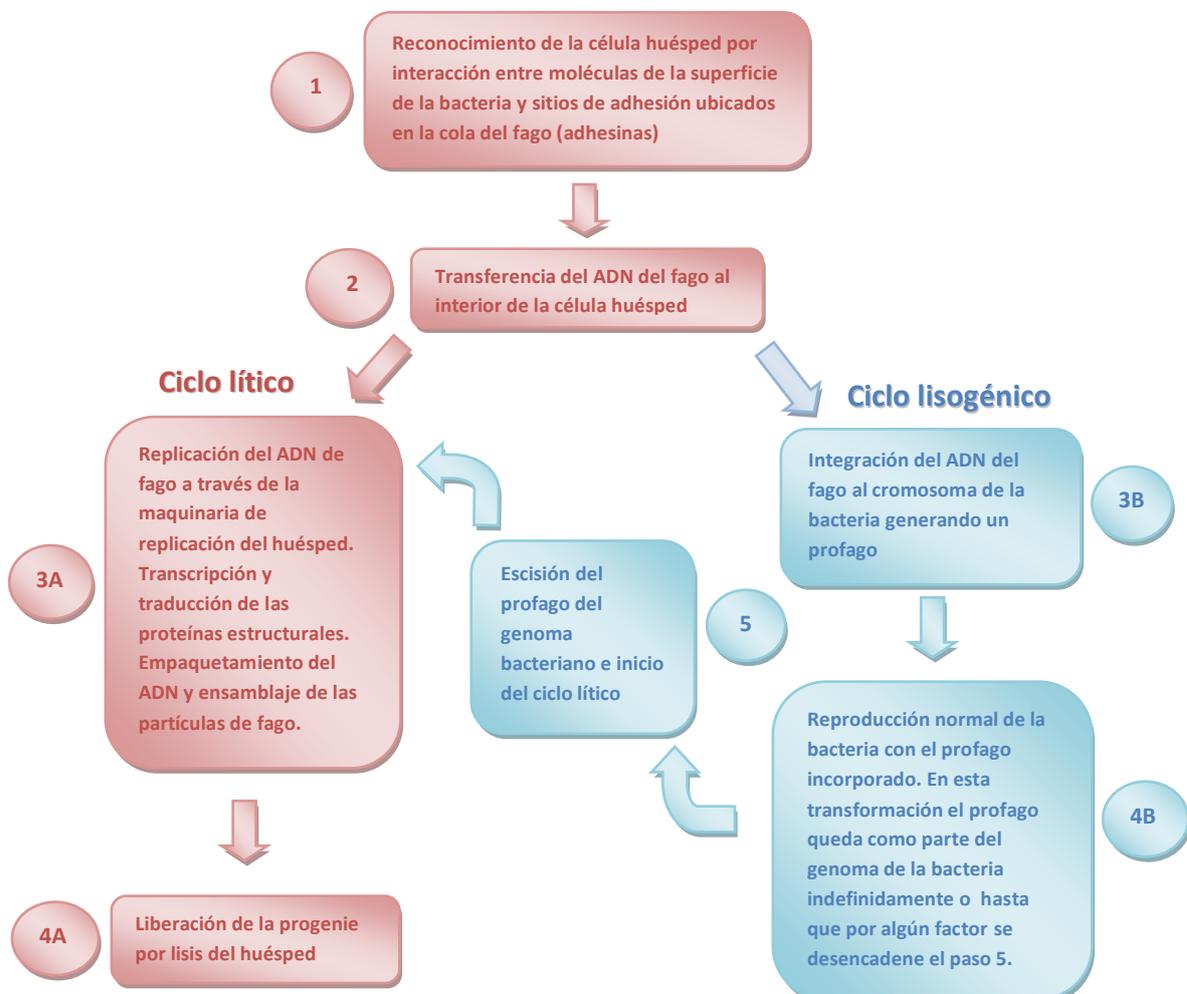
Según el trabajo publicado por H.-W. Ackermann (2001), de los aproximadamente 5100 bacteriófagos analizados por microscopía electrónica desde el año 1959, los fagos con cola representan el 96% del total y dentro de este grupo la distribución de los aislados es de 25,1% perteneciente a la familia *Myoviridae*, 60,8% a la *Siphoviridae* y 14,1% a la *Podoviridae*. Estos fagos constituyen el orden de los *Caudovirales*, y en adelante se hará referencia sólo a este grupo.

Mecanismos de replicación

Los mecanismos de replicación de fagos se pueden dividir básicamente en dos tipos:

- ▶ **Ciclo lítico:** el fago se replica en el interior de la bacteria y el proceso finaliza con la lisis del huésped inducida por el fago y la liberación de la progenie.
- ▶ **Ciclo lisogénico:** el ADN del fago se replica en el interior de la célula pero no hay liberación de viriones, y la bacteria huésped se mantiene viable.

Los procesos se representan en el siguiente diagrama, la numeración de cada paso corresponde a la que se muestra en la figura 1.



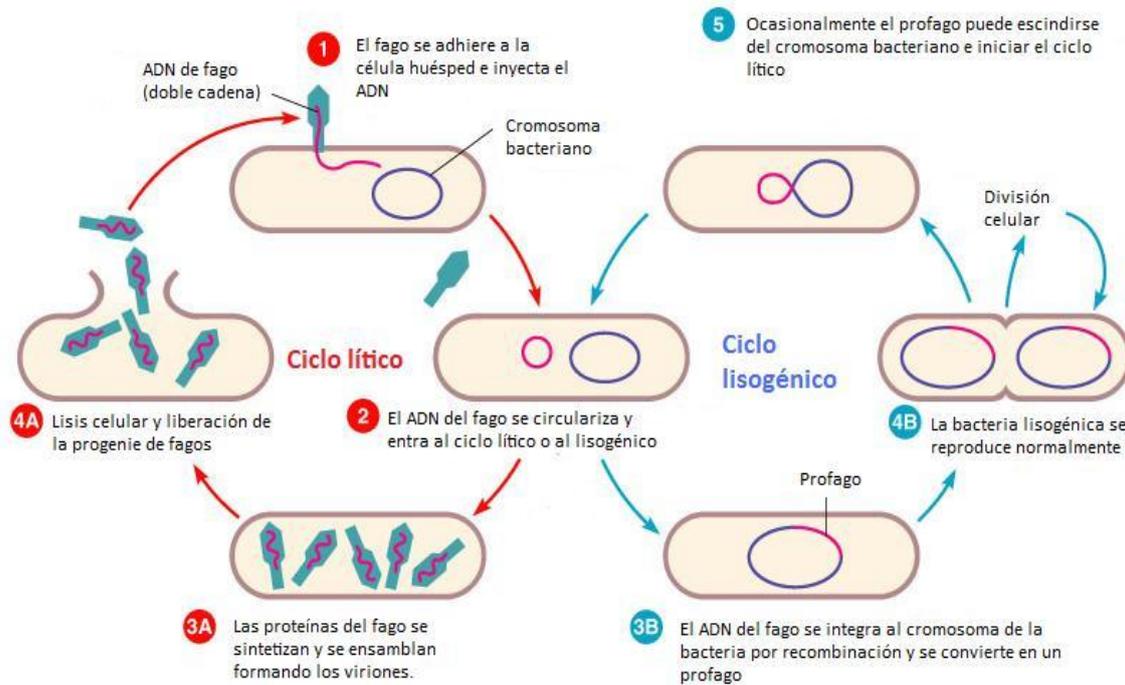


Figura 1 Esquema de los ciclos lítico y lisogénico (correspondiente al fago λ) explicados en el diagrama. Esta imagen fue obtenida del libro "Microbiology : an introduction" décima edición (Tortora et al., 2010).

El ciclo lítico

Cada uno de los pasos implicados en el ciclo lítico del fago juega un papel determinante en el predominio de un fago específico por sobre otros que poseen el o los mismos huéspedes en un ecosistema determinado. En líneas generales predominarán los fagos capaces de infectar al mayor número de huéspedes diferentes, que generen la mayor proporción de bacterias infectadas, y la mayor cantidad de viriones por célula en el menor tiempo posible. Los parámetros del ciclo lítico se determinan a través de un ensayo de *lisis en un ciclo*, donde se analiza el número de partículas de fago liberadas en un ciclo lítico. La figura 3 muestra una curva típica obtenida en este tipo de ensayo y cómo se determinan los parámetros del ciclo lítico a través de estas curvas. Las etapas de la infección que se relacionan con cada parámetro del ciclo lítico se detallan a continuación.

Reconocimiento y adsorción: Rango de huésped y eficiencia de adsorción

La adsorción del fago a la superficie de la bacteria huésped puede producirse en uno o varios pasos, en este último caso se produce una unión *reversible* por interacción de las fibras de la cola con moléculas de la superficie de la bacteria que sirve para posicionarse correctamente y posteriormente generar una unión *irreversible* de otra proteína de la cola a una molécula receptora diferente. El tipo de receptor de superficie varía considerablemente entre bacterias gram-positivas (elementos del

peptidoglicano, ácidos teicoicos y lipoteicoicos y proteínas asociadas a la pared celular) y gram-negativas (componentes de los lipopolisacáridos (LPS), y proteínas de la membrana externa como porinas y proteínas de transporte), también los componentes de cualquier matriz externa que secreta la bacteria pueden ser utilizados como receptores, tal como los antígenos k de los exopolisacáridos capsulares o las proteínas de capa S. Un mismo fago puede tener como receptores varias moléculas y poseer varias adhesinas diferentes en su estructura. Cuantas más moléculas pueda reconocer como receptores más amplio será el *rango de huésped* del fago, es decir, mayor será el número de cepas, especies y en algunos casos géneros bacterianos que podrá utilizar como huéspedes (Kutter & Sulakvelidze, 2005).

La intensidad con la que interaccione la adhesina con su receptor determinará la *eficiencia de adsorción* del fago, experimentalmente una mayor eficiencia de adsorción se observa como un mayor número de bacterias infectadas en un tiempo determinado para un mismo huésped y multiplicidad de infección (MDI, número de fagos por bacteria) y en idénticas condiciones experimentales (Clokier & Kropinski, 2009).

Replicación: Eclipse y latencia

La eficiencia en la replicación de los fagos depende tanto de la naturaleza del fago en cuestión como del tipo de huésped, ya que el proceso de replicación depende necesariamente de la maquinaria de este último. La velocidad con que se replique el ADN de un fago, se generen las proteínas de cubierta y se ensamble determinarán lo que se conoce como *período de eclipse*, que se define como el tiempo transcurrido desde la infección hasta la formación de las partículas de fago completas (infectivas). El período de eclipse se determina experimentalmente por la lisis forzada (por ejemplo con cloroformo) de las bacterias huésped a diferentes tiempos después de la infección hasta detectar partículas de fago (Clokier & Kropinski, 2009). El tiempo que transcurre desde la infección del huésped hasta la liberación de las partículas de fago por la lisis del huésped inducida por el fago se denomina *período de latencia*.

Liberación de la progenie de fagos: Tamaño de explosión

En el último paso del ciclo lítico de los fagos se liberan las partículas maduras que infectarán a otros huéspedes y comenzarán un nuevo ciclo de lisis. El número de partículas que se libera por cada bacteria infectada se denomina *tamaño de explosión*. Los tamaños de explosión para diferentes fagos, o incluso para un mismo fago en diferentes huéspedes, pueden variar desde algunas unidades hasta miles.

En la figura 2 se muestra una típica curva de lisis en un ciclo

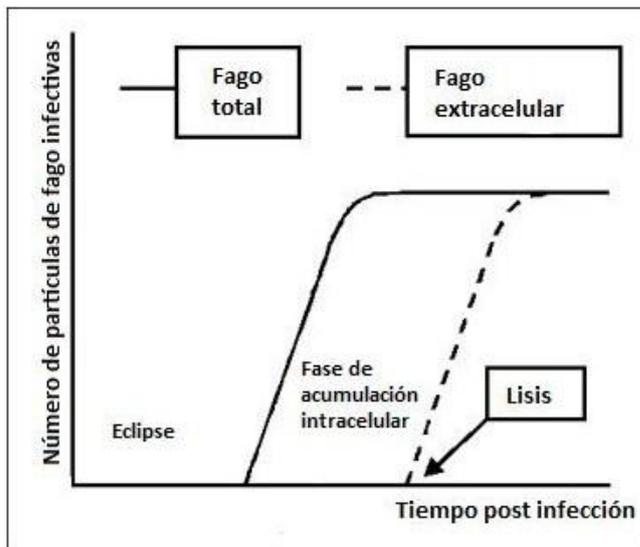


Figura 2 Esquema de una curva típica de lisis en un ciclo.

Lisis desde afuera

Existe un fenómeno denominado *lisis desde afuera* que se produce cuando una determinada bacteria se infecta con un fago en una MDI elevada (típicamente >20 pero varía para diferentes bacterias y fagos), la adsorción de un gran número de fagos a la superficie de la bacteria provoca su lisis por una desestabilización de su estructura (Abedon, 2008). Este fenómeno se observa experimentalmente como una lisis del cultivo infectado sin aumento en el número de fagos.

El ciclo lisogénico

Como se ha explicado anteriormente, muchos fagos son capaces de incorporarse en forma reversible al genoma del huésped de manera tal que no puede multiplicarse, pero permite que el ADN viral se replique como profago en sincronía con la replicación del ADN del huésped en el proceso de división celular, convirtiendo a la bacteria huésped en lo que se denomina una bacteria lisogénica.

Los profagos generan un gran aporte a la diversidad genética de las bacterias, por ejemplo *Escherichia coli* O157:H7 contiene 18 profagos, lo que constituye aproximadamente el 12% del genoma total de la bacteria (Clokier & Kropinski, 2009).

La mayoría de los profagos comparte una misma organización del genoma: se dividen en dos “bloques” de genes cada uno de los cuales controla diferentes funciones, un grupo incluye los genes que participan en la integración del ADN y el mantenimiento del estado lisogénico, mientras que el otro comprende los genes involucrados en el ciclo lítico.

Los profagos tienen una contribución muy importante en la diversidad y evolución de las bacterias ya que actúan como vectores pasivos en la transferencia de genes que

pueden alterar el fenotipo del huésped, tal como genes de virulencia, toxinas, resistencia a antibióticos, antígenos de superficie, etc.

Uno de los mecanismos mejor conocidos de regulación de la expresión de los factores para el ciclo lítico o lisogénico es el del fago λ , donde la regulación en la expresión relativa de una proteína represora denominada CI respecto a otra proteína denominada Cro determina el ciclo que seguirá el fago. En términos generales, la proteína CI en un nivel determinado de expresión se mantiene unida al promotor de los genes involucrados en el ciclo lítico impidiendo su transcripción.

Fago λ : regulación de los ciclos lítico / lisogénico

La mayoría de los eventos que regulan el ciclo de replicación que seguirá el fago λ se encuentran en un operador denominado O_R . El operador O_R contiene 5 sitios donde las proteínas reguladoras se pueden unir: dos promotores, denominados P_{RM} y P_R , y tres sitios de unión consecutivos denominados O_{R1} , O_{R2} y O_{R3} . P_{RM} se expresa durante el ciclo lisogénico y P_R durante el ciclo lítico, y cada uno está involucrado en la síntesis de una proteína reguladora, P_R en la síntesis de Cro y P_{RM} en la síntesis de CI. Cada una de estas proteínas permite la expresión de su propio promotor e inhibe el de la otra a través de diferentes mecanismos: la proteína Cro puede unirse a los sitios O_{R1} , O_{R2} y O_{R3} , pero se une más fuertemente a O_{R3} , de manera que niveles moderados de Cro ocupan O_{R3} pero dejan libres a O_{R1} y O_{R2} . La unión de Cro a O_{R3} reprime completamente a P_{RM} , ya que este promotor se solapa con O_{R3} , e induce el ciclo lítico. Cuando los niveles de Cro aumentan se ocupan los sitios O_{R1} y O_{R2} , que se solapan con P_R , de esta manera Cro limita su propia síntesis por un mecanismo de regulación negativa.

CI en cambio, se une con fuerza a O_{R1} y débilmente a O_{R2} y O_{R3} , pero CI se une cooperativamente a sitios de unión adyacentes, esto es, la unión de CI a uno de los sitios incrementa notablemente la interacción de ésta con un sitio adyacente, así la unión de CI a O_{R1} fortalece la unión de esta misma a O_{R2} . La unión a los sitios O_{R1} y O_{R2} tiene dos consecuencias: reprime al promotor P_R (que está solapado con estos dos sitios) y activa a P_{RM} (cuya expresión es aproximadamente 10 veces más fuerte cuando O_{R2} está ocupado que cuando está vacante). De esta manera CI se autoregula de manera positiva: a mayor cantidad de CI presente, más se estimula su expresión, manteniendo el estado lisogénico, pero cuando la cantidad de CI excede cierto nivel, el sitio O_{R3} comienza a ocuparse, el cual silencia parcialmente la expresión de P_{RM} .

En resumen, CI estimula la expresión de P_{RM} e inhibe la de P_R . A niveles moderados, Cro permite la expresión de P_R (porque no tiene sitios de unión que lo solapen) pero inhibe la de P_{RM} (que está solapada con O_{R3}).

Como P_{RM} es un promotor muy débil en ausencia de C_I , e inicialmente se expresa P_R dando lugar a la aparición de Cro , esto implicaría que C_I no podría aparecer. La explicación de que pueda establecerse el estado lisogénico es que C_I puede también sintetizarse a través de otro promotor P_{RE} que se regula de manera totalmente diferente a la de P_{RM} y P_R , de manera que cuando el fago va a seguir el ciclo lisogénico (figura 3), P_{RE} se expresa en niveles suficientes como para inhibir a P_R (Calendar, 2006).

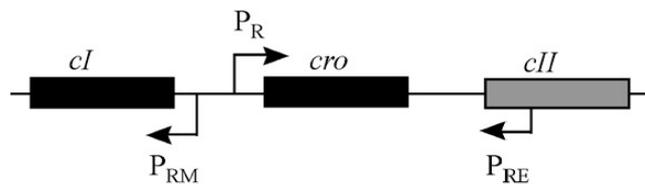


Figura 3 Esquema de la organización de los genes y promotores involucrados en los ciclos lítico y lisogénico del fago λ . Esta imagen fue obtenida del libro "Bacteriophages, biology and applications" (Kutter & Sulakvelidze, 2005).

En los trabajos publicados sobre caracterización de fagos de EHEC se han hallado tanto fagos puramente líticos (en las condiciones ensayadas) como fagos temperados. Los fagos temperados y portadores de genes de toxina Shiga (Muniesa *et al.*, 2004a, Strauch *et al.*, 2004, Muniesa *et al.*, 2000) u otros genes de virulencia presentes en EHEC (O'Flynn *et al.*, 2004) son generalmente fagos de la familia *Siphoviridae* similares al fago Lambda, aunque también se han hallado otro tipo de morfologías (Muniesa *et al.*, 2004b, Xia *et al.*, 2008), mientras que los fagos líticos pertenecen generalmente a la familia *Myoviridae* y son los que comúnmente se proponen para ser utilizados como agentes de biocontrol (Niu *et al.*, 2009, Raya *et al.*, 2006, O'Flynn *et al.*, 2004).

Fagoterapia

Historia

El concepto de fagoterapia, el uso de fagos específicos de bacterias patógenas en el tratamiento de infecciones, fue planteado por primera vez por Félix d'Herelle en 1917, como un posible tratamiento de *Shigella dysenteriae* en el tratamiento de enfermos de difteria, y es una práctica que se ha utilizado tradicionalmente desde principios del siglo XX en los países de Europa del este. El instituto Eliava de Bacteriófagos, Microbiología y Virología, fue fundado en 1923 en la ciudad de Tbilisi, actualmente capital de la República independiente de Georgia, por el científico Giorgi Eliava con la colaboración de Félix d'Herelle y es actualmente uno de los principales institutos de investigación y desarrollo de productos comerciales de fagos. Este instituto, en sus comienzos, producía grandes cantidades de fagos para el tratamiento de infecciones bacterianas durante y después de la Segunda Guerra Mundial. La cantidad de tratamientos que se han efectuado desde entonces es enorme, pero la mayoría de los resultados obtenidos se difundieron sólo a nivel local y no han sido correctamente documentados, por lo que los trabajos que se pudieron recuperar posteriormente han recibido fuertes críticas por sus diseños experimentales, falta de información detallada y por carecer de controles (Kropinski, 2006).

Los ensayos clínicos más claramente documentados sobre el uso de fagos como agentes terapéuticos fueron publicados por el Instituto de Inmunología y Terapia Experimental (también conocido como "Instituto Hirsfeld") fundado en 1952 en Wroclaw, Polonia. Este instituto es el segundo más grande de Europa Oriental en investigación y desarrollo de terapia con fagos y se han publicado numerosos artículos que abarcan, en total, datos sobre aproximadamente 2000 pacientes infectados con una variedad de patógenos (predominantemente resistentes a antibióticos) que fueron tratados con fagos y cuyos resultados, en forma global, fueron exitosos entre del 60 al 90% de los casos (Inal, 2003).

En los países de Occidente, la producción y el uso masivo de antibióticos a partir de la década del '40 anularon casi por completo el desarrollo de la fagoterapia. La producción de algunas formulaciones de fagos se continuó sólo en forma aislada y a muy pequeña escala durante los años '50 y '60 (Kutter & Sulakvelidze, 2005).

El uso de antibióticos en forma masiva trajo aparejada la selección de bacterias resistentes a ellos, y el desarrollo de nuevos antibióticos, la aparición de bacterias multiresistentes. Una de las bacterias que genera mayor preocupación por la capacidad de adquirir resistencia a múltiples antibióticos es *Staphylococcus aureus*, un patógeno oportunista que causa numerosas muertes por infecciones intrahospitalarias. En 1944, cuando en EEUU la penicilina dejó de producirse exclusivamente para la armada y comenzó a comercializarse al público en general, ya

existían casos de pacientes con infecciones por *Staphylococcus* que no podían curarse con penicilina. Dos años después, en un hospital de Londres se anunció que este antibiótico no era efectivo en el 14% de las cepas, y para 1949 este número había ascendido al 59%. En 1955 se reportó en la revista científica suiza Schweizer Apothekenzeitung que el 75-80% de todos los estafilococos eran resistentes a la penicilina y que este número también estaba creciendo en otras partes del mundo. Ante este problema se inició inmediatamente la búsqueda de nuevos antibióticos, y la meticilina, un derivado sintético de la penicilina, se presentó como una alternativa para tratar infecciones de *Staphylococcus* resistentes a la penicilina. Esta droga comenzó a utilizarse en 1960 y apenas un año después apareció el primer caso de *Staphylococcus* resistente a meticilina. La incorporación de nuevos antibióticos fue generando la selección de cepas multiresistentes cada vez más difíciles de combatir. En la actualidad, la vancomicina es el fármaco elegido como último recurso, y a pesar de que su uso se restringe a casos extremos de multiresistencia, ya se han reportado casos de *Staphylococcus* vancomicina-resistentes en Estados Unidos y Japón (Häusler, 2006).

El problema de la multiresistencia también está presente en STEC, donde el número de bacterias resistentes a múltiples antibióticos se encuentra en crecimiento, y uno de los motivos a los que se adjudica este aumento es al uso de antibióticos no sólo para el tratamiento de infecciones en humanos y en medicina veterinaria, sino también al uso preventivo de antibióticos en animales y como factores de crecimiento (Mora et al., 2005).

La búsqueda de alternativas para el tratamiento de bacterias multiresistentes ha hecho resurgir el interés en la fagoterapia como estrategia de biocontrol de patógenos. Entre las potenciales ventajas del uso de fagos respecto a los antibióticos pueden citarse:

- La alta especificidad de infección.
- Un mecanismo de acción totalmente diferente al de los antibióticos, lo que hace a los fagos efectivos incluso frente a bacterias resistentes a múltiples antibióticos.
- Una farmacocinética tal que la dosis inicial de fagos se incrementa exponencialmente al alcanzar el foco de la infección.
- La habilidad de los fagos de mutar como respuesta ante la aparición de bacterias resistentes a la infección.
- El costo de producción.

Características de los fagos como agentes terapéuticos

Los fagos elegidos como agentes de biocontrol deben ser altamente infectivos en un amplio número de cepas del patógeno blanco (amplio rango de huésped), deben ser fagos puramente líticos (no ser capaces de recombinarse con el ADN de la bacteria

huésped como profagos), y no poseer genes de virulencia o de resistencia a antibióticos que puedan ser incorporados al genoma del huésped por transducción. Asimismo, el éxito del tratamiento con fagos depende de la elección de los fagos con las mejores características para la aplicación deseada, como por ejemplo, para ser utilizados *in vivo*, ser inocuos para la flora comensal o, para ser aplicados en forma oral, resistir el pasaje gastrointestinal y alcanzar la localización del patógeno en concentraciones suficientes como para que se produzca la infección.

Inmunogenicidad de fagos

Los fagos y el sistema inmune innato

La respuesta inmune depende de dos componentes: el sistema inmune innato y el adaptativo. El sistema inmune adaptativo se basa en mutaciones somáticas y la expansión clonal de las células T y B en respuesta a una infección. Esta expansión clonal requiere de al menos 3 a 5 días para generar un número de células suficiente para proveer un nivel efectivo de anticuerpos. En contraste, el sistema inmune innato depende de la evolución para el desarrollo de sus funciones y se hereda de forma Mendeliana. Éste incluye péptidos antimicrobianos, la vía alternativa complementaria y los fagocitos, incluidos los de los órganos del sistema reticuloendotelial, principalmente el hígado y el bazo. El sistema inmune innato es el que primero interactúa con un cuerpo extraño, como un fago, cuando el animal o la persona no han tenido una exposición previa a este agente. En experimentos en los que se ha inyectado el fago T4 en el sistema circulatorio de ratones germ-free (libres de gérmenes) prueban que más del 99% del fago inyectado fue fagocitado por el hígado 30 minutos después de la inyección (Inchley, 1969). Los fagos a ser usados como agentes terapéuticos deben entonces ser los que se seleccionen por tener la mayor duración dentro del organismo o diseñarse fagos que resistan o inactiven los componentes del sistema inmune innato (Calendar, 2006).

La interacción de los fagos con el sistema inmune de mamíferos también se ha estudiado para el desarrollo de nuevas estrategias microbiológicas para combatir el cáncer a través de la interacción específica de fagos con el tejido tumoral, induciendo la infiltración de células polimorfonucleares (PMNs), y la secreción de interleuquina-12 (IL-12) e interferón γ (Eriksson *et al.*, 2007, Kurzepa *et al.*, 2009) o para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares o autoinmunes (Gorski *et al.*, 2003).

Los fagos y el sistema inmune adaptativo

Muchos fagos son también potentes activadores (antígenos) del sistema inmune adaptativo. En los trabajos realizados por Ochs *et al.* (Ochs *et al.*, 1971, Ochs *et al.*, 1993) se probó la capacidad del fago Φ X174 de generar una respuesta inmune adaptativa en humanos sanos, y se observó la desaparición de los fagos del organismo a los 3 días de ser inyectados. En pacientes con una deficiencia inmune combinada

severa, caracterizada por la ausencia de funciones de las células B y T, se observó un tiempo más prolongado de presencia de fagos en el organismo (4 a 6 semanas), y no desarrollaron una respuesta detectable de anticuerpos contra el fago. Ochs et al. también observaron que, aunque Φ X174 es un antígeno potente, no se detectaron efectos tóxicos en el ser humano. Reacciones similares se observaron en experimentos con ratones (Biswas et al., 2002), en los que también se observó que, ante repetidas inyecciones del fago ENB6, los títulos de IgG e IgM habían crecido 3800 órdenes y 5 órdenes logarítmicos respectivamente a la tercera inyección y que los niveles de IgG no aumentaron sustancialmente después de la tercera inyección. No se presentaron reacciones anafilácticas, cambios en la temperatura corporal u otros eventos adversos en los ratones a lo largo de las múltiples inyecciones de fagos. Puede ser posible desarrollar fagos menos antigénicos mediante el uso de bibliotecas de péptidos de fagos o matrices de afinidad compuestas por anticuerpos de suero de humanos (Calendar, 2006).

Fagoterapia en alimentos

La utilización de fagos como agentes de biocontrol en el campo de la salud alimentaria es un tema al que actualmente se le está dando mucha importancia, principalmente debido a que el uso de antibióticos como conservantes y para el control de patógenos está cada vez más cuestionando por favorecer la proliferación de bacterias resistentes, y los tratamientos físicos y químicos de inactivación de bacterias pueden alterar las características organolépticas de los productos (García et al., 2008).

El tratamiento con fagos puede aplicarse en diferentes etapas a lo largo de todo el proceso de elaboración de alimentos: sobre los animales (de los que se extraen materias primas o para consumo) que actúan como reservorios (fagoterapia); sobre carcasas y productos crudos (biocontrol); sobre superficies y utensilios de producción (biosanitización), y como conservantes naturales sobre productos manufacturados perecederos para extender su vida útil (biopreservación)(García et al., 2008). La primera etapa es la más importante ya que evita la incorporación del patógeno a la cadena de producción y distribución.

Se han realizado numerosos trabajos sobre caracterización y aplicación de fagos para biocontrol de patógenos en las diferentes etapas de la producción. En el campo de la fagoterapia en animales se ha puesto principal interés en el control de *Salmonella* en aves de corral (Hurley et al., 2008, Vandeplas et al., 2010) y de *E. coli* O157:H7 en bovinos (O'Flynn et al., 2004, Viscardi et al., 2008), y en el área de biocontrol de patógenos se ha puesto énfasis en la caracterización y aplicación de fagos para *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* y *Campylobacter* (Leverentz et al., 2003, Bigwood et al., 2009, Bigwood et al., 2008, Goode et al., 2003) e incluso fueron aprobados por la *Food and Drug Administration* (FDA) dos cocktails comerciales de fagos para biocontrol de *Listeria monocytogenes* en diversos productos listos para el consumo: ListShield™,

Intralix, Inc. (www.intralix.com) y LISTEX™ P10, EBI Food Safety (www.ebifoodsafety.com). Intralix Inc. también comercializa un cocktail para biocontrol de EHEC O157:H7 denominado EcoShield™ pero éste aún no ha sido aprobado por la FDA.

Fagoterapia en animales: biocontrol de EHEC

Como se ha mencionado anteriormente, *E. coli* enterohemorrágica representa una gran amenaza en el área de la salud alimentaria y es incesante la búsqueda de métodos de control y prevención de las infecciones por EHEC. El principal reservorio de este patógeno es el ganado bovino, y la principal fuente de contagio a seres humanos es la carne vacuna contaminada e ingerida sin la suficiente cocción. Una faena realizada de manera correcta y buenas prácticas de manufactura y envasado de la carne así como la higiene en la cocina del consumidor y, la correcta cocción de la carne son varias maneras de prevenir el contagio de EHEC, sin embargo, la primera barrera de prevención, como se mencionó anteriormente, es la eliminación del patógeno antes de que pueda ser incorporado al proceso de manufactura de la carne. Con este fin se ha estudiado el efecto de la incorporación de fagos a bovinos (o modelos de rumiantes) infectados experimentalmente con EHEC (Johnson et al., 2008).

En el trabajo realizado por Sheng y colaboradores (2006), la administración oral del fago KH1 (específico de *E. coli* O157:H7) a ovejas, en dosis de $1,3 \cdot 10^{11}$ UFP a 1, 9, 10 y 11 días posteriores a la inoculación del animal con *E. coli* O157:H7, no produjo disminución del recuento de esta bacteria en las heces del animal en los 21 días totales de ensayo, a pesar de que llegaron a encontrarse títulos de fago de 10^5 - 10^6 UFP g⁻¹ en las heces. En otro trabajo se obtuvieron resultados similares, la inoculación con una alta dosis del fago DC22 de *E. coli* O157:H7 a corderos infectados experimentalmente no redujo el número de bacterias excretadas en los 27 días de ensayo, aunque en este caso, el número de fagos en las heces disminuyó de 10^6 al tercer día a niveles indetectables al día 13 (Bach, 2003). Estos ensayos demuestran que, aunque no haya una reducción en el título de EHEC, el fago alcanza el intestino de los rumiantes en un título considerable cuando se suministra en altas dosis.

Otro aspecto que se investigó fue el efecto de la administración de fagos por vía recto-anal sobre bueyes infectados experimentalmente con *E. coli* O157:H7 inoculados por la misma vía, siendo la intersección recto-anal el lugar primario de colonización de EHEC en bovinos (Naylor et al., 2003). Los fagos KH1 y SH1 se suministraron a través del agua de bebida ($5,4 \cdot 10^6$ UFP ml⁻¹ durante 4 días) y por infusión rectal e hisopado (25 ml de 10^{10} UFP ml⁻¹). Entre los días 1 y 10 de tratamiento, el recuento de EHEC en muestras de hisopados mostró una disminución de 1,5 órdenes logarítmicos. El recuento de fagos fue máximo al día 3 (10^6 UFP) y luego cayó a 10^2 UFP manteniéndose hasta el día 16. A pesar de la reducción observada, no pudo eliminarse la infección de ninguno de los animales tratados (Sheng et al., 2006), y la administración recto-anal, si bien inserta

los fagos en el lugar de colonización de EHEC, no es una vía práctica de administración para bovinos.

En ensayos más cortos, de 2 a 4 días, se informó una reducción significativamente más rápida de los contenidos de *E. coli* O157:H7 intestinales y/o en las heces de bovinos y ovinos después de la administración de dosis altas de fagos por vía oral. En el primer ensayo, la administración oral de 10^{11} UFP del fago CEV1 a ovejas 3 días después de ser inoculadas con EHEC mostraron, 2 días después del tratamiento, una reducción de 2-3 órdenes logarítmicos en los contenidos de EHEC del ciego y el recto, pero el del rumen no se modificó (Raya et al., 2006). En el segundo ensayo (Callaway et al., 2008), un cocktail de ocho fagos (en un total de $>10^{12}$ UFP) se suministró por vía oral a ovejas 2 a 3 días después de ser infectadas con *E. coli* O157:H7. Se observó una reducción del contenido de EHEC de 1,5-2 órdenes logarítmicos respecto a los controles a las 24 h de aplicada la primer dosis de fagos, pero esto no se observó después de la segunda dosis, por lo que se concluyó que el efecto anterior era transitorio. La autopsia 24 h después de la segunda dosis de fagos reveló una disminución significativa en el contenido de EHEC del ciego, pero no en el recto o el rumen. Ambos ensayos demuestran que la fagoterapia podría ser efectiva inmediatamente antes de la faena.

En el trabajo llevado a cabo por Waddel et al. (2000), se analizó el efecto de un pre-tratamiento con fagos antes de la infección con EHEC. Terneros de 7-8 semanas de edad fueron infectados por vía oral con $3 \cdot 10^9$ UFC de *E. coli* O157:H7 (día 0) y se aplicó un cocktail de seis fagos (10^{11} UFP total) en los días -7, -6, -1, 0 y 1 por vía oral, a través de un sustituto de la leche de los terneros conteniendo carbonato de calcio para regular el pH del estómago. Los terneros no tratados excretaron EHEC como mínimo 12-16 días después de la infección, mientras que los que recibieron el tratamiento dejaron de excretar EHEC abruptamente al octavo día, cuando la concentración de fagos en las heces se incrementó a 10^9 - 10^{11} UFP g^{-1} . Este aumento en el número de fagos no se observó en los controles sin EHEC, demostrando que el incremento se debió a la replicación del fago dentro de los animales. No se observaron efectos adversos en los animales por el tratamiento con fagos ni se aislaron EHEC resistentes al fago en los 16 días de ensayo. En un ensayo posterior sobre bovinos adultos con cuatro de estos fagos redujo pero no eliminó el contenido de *E. coli* O157:H7 de las heces (Niu et al., 2008), lo que sugiere que la eficacia del tratamiento depende de la edad del animal.

A pesar de algunas discrepancias en los resultados obtenidos hasta el momento, se observa en líneas generales que el modo más conveniente de administración de los fagos es por vía oral, que la aplicación de dosis altas, del orden de 10^{11} a 10^{13} UFP, son suficientes para que un número considerable de fagos alcance el intestino del rumiante (10^6 UFP o más) y que el tratamiento con fagos resulta ser más efectivo en terneros que en bovinos adultos. Estos trabajos demuestran que la fagoterapia en

bovinos es un proceso que tiene mucho potencial como método de biocontrol de EHEC.

Productos derivados de los fagos: lisinas y péptidos antimicrobianos

Lisinas

Estas enzimas son hidrolasas producidas durante el ciclo lítico del fago que actúan específicamente sobre el peptidoglicano de la pared celular permitiendo la liberación de la progenie. Estas enzimas reciben diferentes denominaciones de acuerdo con el enlace químico que destruyen: las amidasas hidrolizan el enlace N-acetil-muramil-L-alanina, las endopeptidasas rompen enlaces peptídicos cruzados, o la muramidasa que hidroliza el enlace del ácido N-acetilmurámico con la N-acetil-glucosamina. Las ventajas que presenta el uso de estas enzimas respecto a antibióticos como la penicilina o la cefalosporina, que inhiben la síntesis del peptidoglicano produciendo la lisis durante la replicación de la bacteria, es que las lisinas directamente destruyen el peptidoglicano, generando un efecto bacteriolítico en cuestión de segundos, también se ha reportado que el uso combinado de lisinas que hidrolicen diferentes enlaces tiene un efecto sinérgico (Jado *et al.*, 2003, Loeffler & Fischetti, 2003) y poseen, en prácticamente todos los casos, la misma especificidad de huésped que los fagos que las codifican, por lo que se podrían utilizar para lisar ciertas bacterias sin alterar la flora normal (Matsuzaki *et al.*, 2005). Su principal desventaja es que son incapaces de penetrar la membrana externa de las bacterias Gram-negativas por lo que su actividad antimicrobiana quedaría restringida a los Gram-positivos (Hanlon, 2007, Matsuzaki *et al.*, 2005). La eficacia *in vivo* del tratamiento con lisinas se ha estudiado en ratones infectados con *Streptococcus pyogenes* (Nelson *et al.*, 2001), *S. pneumoniae* (Jado *et al.*, 2003, Loeffler *et al.*, 2001, Loeffler & Fischetti, 2003), *Bacillus anthracis* (Schuch *et al.*, 2002) y *Streptococcus* del grupo B (Cheng *et al.*, 2005).

Péptidos antimicrobianos

Existen dos tipos de péptidos antimicrobianos de fagos: los primeros son factores similares a las lisinas que se encuentran en fagos de ADN monocatenario o ARN monocatenario que también actúan induciendo la lisis celular para liberar a su progenie, pero por mecanismos no enzimáticos. Ejemplos de éstos son la proteína E del fago ϕ X174 (Young & Young, 1982, Mendel *et al.*, 2006) que es un inhibidor específico de la reacción enzimática catalizada por la traslocasa MraY en la biosíntesis del peptidoglicano, la proteína L de MS2 (Remaut *et al.*, 1982) y la proteína A2 del fago Qb (Model *et al.*, 1979, Young *et al.*, 2000) cuyos mecanismos de acción no han sido elucidados aún. El segundo tipo de péptidos antimicrobianos son subunidades de la cola de los fagos conformadas por péptidos ensamblados que son responsables del reconocimiento y adhesión del fago a receptores específicos en la superficie de las

bacterias, de penetrar la membrana externa (en el caso de bacterias Gram-negativas) y degradar el peptidoglicano en el sitio de adhesión. La estructura mejor conocida es la cola del fago T4 (Arisaka *et al.*, 2003, Leiman *et al.*, 2003, Rossmann *et al.*, 2004, Miller *et al.*, 2003) que tiene la capacidad de penetrar la membrana externa de *E. coli* e hidrolizar el peptidoglicano (Parisien *et al.*, 2008). Otro ejemplo de estas estructuras son las fibras terminales de la cola de algunos fagos, generalmente pertenecientes a la familia *Podoviridae* que actúan como depolimerasas de los exopolisacáridos que las bacterias secretan para generar una cápsula que las envuelve o, para formar un biofilm. En ese caso el polisacárido actúa como receptor secundario del fago (en el caso de polisacáridos capsulares, el receptor es comúnmente el antígeno K), el cual es degradado para permitir que el fago alcance la membrana externa de la bacteria. El potencial uso de las depolimerasas de fagos en el control de biofilms es de mucha importancia ya que las células que crecen dentro de una matriz de exopolisacárido crecen más lentamente y son 10 veces más resistentes a la acción de antibióticos que las células planctónicas (Anwar *et al.*, 1992, Bagge *et al.*, 2004, Kutter & Sulakvelidze, 2005).

Condición actual de la fagoterapia

Productos

Existen actualmente varias compañías en el mundo dedicadas a la fabricación de cócteles comerciales de fagos o de sus productos derivados para diferentes áreas de aplicación: medicina, descontaminación (de ambientes, alimentos y utensilios), diagnóstico, veterinaria, vehiculización de genes y vacunas. En el artículo “Phage therapy” (Housby & Mann, 2009) puede encontrarse una tabla con una selección de las compañías dedicadas a este tipo de productos.

Dentro de los productos que utilizan fagos (como partículas infectivas completas) existen dos tipos de desarrollo: el primero es el que han adoptado compañías como Intralytix, BioControl, BioPhage Pharma y Novolytics que es el empleo de fagos líticos que se encuentran naturalmente en el ambiente o de mutantes espontáneos de éstos para la producción de cócteles que infecten a un gran número de cepas de un patógeno determinado, el segundo, es el adoptado por compañías como PhicoTherapeutics (UK) que generan fagos genéticamente modificados que poseen el gen de una proteína que es generalmente tóxica para bacterias o la producción de fagos genéticamente modificados para reconocer diferentes receptores o mutantes que no “destruyan” la bacteria durante la lisis aplicable a bacterias como *Clostridium difficile* que poseen toxinas intracelulares. Este último enfoque tiene la desventaja de tener un mayor número de obstáculos regulatorios por ser microorganismos genéticamente modificados.

Otro enfoque de mucho interés es la utilización de productos derivados de fagos, principalmente lisinas. La aplicación de lisinas como agentes terapéuticos tiene numerosas ventajas, entre las cuales se destaca que pueden producirse en forma muy pura, tienen actividad altamente específica, exhiben acción letal rápida, no son tóxicas y aparentemente los anticuerpos que generan no inhiben su actividad, finalmente, no se ha detectado la aparición de bacterias resistentes a estas enzimas, probablemente porque poseen numerosos sitios de acción (Housby & Mann, 2009, Kropinski, 2006).

Problemas a superar

Existen ciertas cuestiones que requieren estudios más profundos o desarrollos más avanzados para el uso extensivo de la fagoterapia en los países de occidente:

i) *Inactivación de los fagos por anticuerpos o reacciones alérgicas contra ellos.*

Este problema podría evitarse seleccionando fagos o lisinas de baja inmunogenicidad o utilizando simultáneamente fagos con diferentes antigenidades.

ii) *Aparición de bacterias mutantes resistentes al fago*

La aparición de resistencia es un problema con el que ya nos hemos encontrado con el uso de antibióticos, sin embargo en este aspecto el uso de fagos tiene varios puntos favorables respecto al uso de antibióticos: por un lado se ha demostrado que los fagos coevolucionan con las bacterias huéspedes, de manera que la aparición de bacterias resistentes trae aparejada la aparición de nuevos fagos capaces de infectarlas (Montag *et al.*, 1987, Drexler *et al.*, 1991), además, la proliferación de bacterias resistentes a un fago es mucho mayor cuando la infección se produce sobre un cultivo bacteriano puro que cuando se realiza sobre una mezcla de bacterias (algunas de las cuales no son sensibles al fago), pues su crecimiento se ve limitado por la competencia con las otras bacterias del entorno (Harcombe & Bull, 2005), y en el caso de bacterias Gram-negativas, donde el receptor se encuentra en la cápsula o es un antígeno de superficie, los mutantes resistentes carecen de cápsula o LPS y son, por lo tanto, menos virulentos. También cabe señalar que los cócteles terapéuticos de fagos pueden diseñarse conteniendo fagos que utilicen diferentes receptores, lo que reduciría la probabilidad de que aparición de mutantes resistentes, ya que aunque la bacteria generara resistencia a uno de los fagos del cóctel, seguiría siendo sensible a los otros.

iii) *Captura y transferencia de genes de virulencia o de resistencia a antibióticos*

Este problema se puede evitar seleccionando fagos que no tengan la capacidad de recombinarse con el ADN del huésped, y cuyo genoma haya sido secuenciado totalmente antes de su utilización para asegurar la ausencia de este tipo de genes.

iv) *Aprobación regulatoria*

Si bien, como ya se ha mencionado, existen cócteles de fagos aprobados por la FDA para ser utilizados como aditivos en alimentos, el uso de fagos en el campo de la medicina está aún en fase experimental en Occidente, pero el fuerte desarrollo que se está produciendo en el estudio de los fagos y sus aplicaciones y el gran problema de las bacterias multiresistentes a antibióticos puede llegar a disminuir el número de exigencias necesarias para la aprobación del uso de fagos en este campo.

Objetivos

- ▶ Aislamiento de fagos de *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC).
- ▶ Caracterización de los fagos aislados.
- ▶ Desarrollo de matrices de encapsulamiento de fagos y estudio *in vitro* de la capacidad protectora frente a la acidez para el suministro de bacteriófagos a bovinos por vía oral.
- ▶ Determinación de las condiciones óptimas de conservación de los fagos.

Cepas y aislados bacterianos

Para todos los ensayos se utilizaron las cepas WG5 (ISO 10705-2:1999) y ATCC 25922 de *E. coli* no patógena, la cepa EDL 933 (ATCC 700927) de EHEC O157:H7 y los aislados que se listan en la Tabla 1.

Tabla 1 Aislados bacterianos

Bacteria	Serotipo	Número de aislado	Origen
EHEC / STEC	O157:H7	933, 69160, 68911, 71945 , 474, 476, 537 / 448 466	1
STEC	O103:H2	646/03 118/05	2
STEC	O113:H21	870/02 889/06 370/02	2
STEC	O145:NM	002/02 1210/06	2
STEC	O26:H11	CIDCA1 395/06	2
STEC	O111:NM	67/03 207/02 534/05	2
STEC	O161:H2	154	2
STEC	O8:H19	763/02 215/06 209/03	2
STEC	O22:H16	412/03 238/04	2
STEC	O146:H28	656/04	2
STEC	O15:H27	189/01 356/02	2
STEC	O13:H6	654/04	2
STEC	O145:H25	14/00 485/03	2
STEC	O20:H19	805/03 32/05 537/04	2
STEC	O174:H28	257/03 439/04	2
STEC	ONT:H12	456	1
<i>E. coli</i> enteroinvasiva (EIEC)	-	202	1
<i>Shigella flexneri</i>	2	48	1
<i>Shigella flexneri</i>	3	2013 2019	1
<i>Shigella sonnei</i>	-	47 - 5035	1 - 3
<i>Proteus spp.</i>	-	6011	3
<i>Citrobacter freundii</i>	-	6293	3
<i>Morganella morganii</i>	-	364	3
<i>Salmonella spp.</i>	-	7452	3
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	4482, 4336	3
<i>Escherichia cloacae</i>	-	6615, 6303	3
<i>Serratia marescens</i>	-	6606	3
<i>Klebsiella spp.</i>	-	6496	3
<i>Acinetobacter spp.</i>	-	4581	3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	3

Los aislados bacterianos resaltados en negrita fueron utilizados en el aislamiento de los fagos. Origen de los aislados: 1- Hospital de Niños "Sor María Ludovica" La Plata, Buenos Aires, Argentina 2- Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud (A.N.L.I.S.) "Dr. Carlos G. Malbrán", Ciudad autónoma de Buenos Aires, Argentina. 3 - Hospital de Pediatría "Prof. Dr. Juan P. Garrahan", Ciudad autónoma de Buenos Aires, Argentina. Los aislados provenientes de las dos últimas fuentes fueron gentilmente cedidos por la Dra. Marta Rivas y por el Dr. Horacio Lopardo.

Cultivos y técnicas de recuento de fagos

Cultivos de enterobacterias

Excepto en los casos especificados, los cultivos de enterobacterias fueron crecidos a 37°C y para los casos de crecimiento en agitación se utilizó un agitador orbital a una velocidad de 180 rpm.

Recuento de fagos por “spot test”

Se incorporan 0,2 ml de cultivo en fase estacionaria de la bacteria huésped a 5 ml de agar blando del medio correspondiente, se mezcla, se incorpora a placas de agar al 1,5% p/v del mismo medio y las placas se dejan secar 10-15 min en flujo laminar. Posteriormente se realizan diluciones seriadas del lisado de fagos en buffer SM (a menos que se especifique otro diluyente) y se siembran gotas de 10 µl de cada una de las diluciones realizadas sobre las placas preparadas anteriormente. Las placas se dejan secar nuevamente 10-15 min en flujo laminar y se incuban con el agar hacia abajo a 37°C hasta la detección de placas de lisis aisladas en alguna de las diluciones sembradas (5 horas o más).

Recuento de fagos por la técnica de la “doble capa”

Se incorporan 0,2 ml de cultivo en fase estacionaria de la bacteria huésped y 0,1 ml de la dilución correspondiente de lisado de fago (tal que se obtengan entre 30 y 300 UFP por placa) realizada en buffer SM (salvo en los casos especificados) a 3,5 ml de agar blando del medio correspondiente, se mezcla y se incorpora a placas de agar del mismo medio, las placas se dejan secar 10-15 min en flujo laminar y se incuban con el agar hacia arriba durante 16-20 h a 37°C.

Nota: En todos los ensayos donde se describe el uso de un lisado de fago o simplemente el uso de fagos, se hace referencia al uso de un lisado del fago en cuestión en medio LB, filtrado por membrana de 0,45 µm. En caso contrario se especificarán las condiciones en el texto.

Cuando no se especifique el método de recuento utilizado quedará implícito que el recuento fue realizado por el método de la doble capa.

Aislamiento de fagos

El aislamiento de fagos se realizó utilizando como fuentes tres muestras de carne picada bovina comercial y una muestra de chorizo de cerdo comercial, obtenidas de carnicerías locales, y tres muestras de materia fecal vacuna, dos de ellas obtenidas de dos campos diferentes, uno ubicado en la ciudad de Gualeguaychú, Entre Ríos y el otro en la ciudad de General Alvear, Buenos Aires, y la tercera de la Facultad de Veterinaria, UNLP, La Plata, Buenos Aires.

Primer enriquecimiento

Para el aislamiento partiendo de muestras de materia fecal vacuna, 10 g de cada muestra fueron mezclados con 90 ml de caldo mEC+n y homogeneizados en Stomacher^{MT} durante 2 minutos a máxima velocidad. Para el aislamiento de carne vacuna y chacinado de cerdo, 10 g de muestra se mezclaron con 90 ml de buffer SM, se homogeneizaron en Stomacher^{MT} durante 10 minutos a máxima velocidad y posteriormente se adicionaron 10 ml de caldo mEC+n concentrado (10x).

En ambos aislamientos el material particulado fue removido por centrifugación a 4000 x g durante 15 minutos. Los sobrenadantes se pasaron a frascos estériles y se les adicionó CaCl₂ en una concentración final de 10 mM y 0,3 ml de cultivo cada uno de los nueve aislados de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) y *E. coli* productora de toxina Shiga (STEC) resaltados en negrita en la Tabla 1; 4 de serotipo O157:H7 y 5 de serotipos O111:NM, O113:H21, O103:H2, O145:H25 y O26:H11. Las mezclas se incubaron durante 16 h a 37°C sin agitación. Pasado este tiempo se les adicionó 4% (v/v) de CHCl₃, se mezclaron y se dejaron reposar 30 min a temperatura ambiente, luego se centrifugaron a 4000 x g durante 15 minutos para separar las fases y se separó la fase acuosa que constituye el primer enriquecimiento.

Se determinó la presencia de fagos por spot test en ágar TS sobre cada una de las cepas utilizadas en el primer enriquecimiento en forma individual. La presencia de fagos se detectó por la aparición de placas de lisis aisladas en alguna de las diluciones sembradas.

Segundo enriquecimiento

Un segundo enriquecimiento se llevó a cabo utilizando individualmente cada una de las cepas sobre las que se detectaron placas de lisis. A tubos con 5 ml de caldo TS suplementado con 10 mM de CaCl₂ se les incorporaron 0,5 ml de cultivo y 1 ml del primer enriquecimiento. Las mezclas se incubaron 24 h a 37°C, luego se les agregó 4% (v/v) de CHCl₃, se dejaron reposar 30 min a temperatura ambiente, se realizaron diluciones seriadas de cada uno y se obtuvieron placas de lisis aisladas sembrando la dilución correspondiente por el método de la doble capa sobre la cepa utilizada como huésped en cada enriquecimiento.

Aislamiento y purificación

De cada una de las placas de Petri del segundo enriquecimiento se extrajo una placa de lisis aislada, se pasó a un tubo con 5 ml de caldo TS y se adicionaron 0,2 ml de la cepa utilizada en el spot (en los spots donde se observaron placas de lisis con más de una morfología, se extrajo una placa de cada morfología y se pasaron a tubos individuales). Las mezclas se incubaron a 37°C hasta que los cultivos se lisaron completamente, y se realizó un aislamiento de cada una por el método de la doble capa sobre la misma cepa adicionada al tubo (como se explicó anteriormente). Nuevamente se tomó una placa de lisis aislada y se hizo un nuevo enriquecimiento. Este pasaje de placa aislada se repitió 3 veces. Después del tercer pasaje, una fracción del cultivo lisado se filtró con membrana de 0,22 µm de tamaño de poro y se mantuvo a temperatura ambiente y a la otra fracción se le adicionó 4% (v/v) de CHCl₃ y se mantuvo refrigerada a 4°C. Las fracciones filtradas se utilizaron como stock para propagar cada uno de los fagos aislados para los ensayos posteriores.

Todos los cultivos utilizados en el aislamiento fueron crecidos en caldo TS sin agitación.

Caracterización de los aislados

Rango de huésped

La susceptibilidad de las cepas WG5 (ISO 10705-2:1999), ATCC 25922 y EDL 933 (ATCC 700927) y de todos los aislados listados en la Tabla 1 a los fagos aislados se testeó por un ensayo de spot (Muniesa *et al.*, 2003b): se adicionaron 0,3 ml de un cultivo de 16 h crecido en caldo TS de la cepa a testear a 5 ml de ágar TS blando suplementado con 10 mM de CaCl₂, la mezcla se adicionó a placas de ágar TS y se dejaron secar 10-15 min en flujo laminar. Cuando las placas estuvieron secas se agregaron gotas de 10 µl de cada uno de los aislados de fago filtrados conteniendo 5.10⁸-10⁹ UFP ml⁻¹. Las placas se secaron nuevamente en flujo laminar hasta la total absorción del líquido y se incubaron 20 h a 37°C con el ágar hacia abajo. Pasado este tiempo se analizó la aparición de zonas de lisis en el césped bacteriano, considerándose como “lisis total” a la aparición de una zona de ágar traslúcido en el lugar donde se posó la gota de fago, “lisis turbia” a la aparición de una zona de depresión de la concentración de bacterias en la zona en la que se agregó la gota de lisado respecto a la pátina externa y “lisis negativa” cuando la zona donde se agregó la gota tiene igual densidad de bacterias que el césped que la rodea.

También se utilizó la técnica de “streak” (Muniesa *et al.*, 2003b) levemente modificada como otro método para determinar la sensibilidad de las bacterias a cada uno de los fagos. Para esto se utilizaron placas de Petri con una base de ágar-ágar 1,5% (p/v) sobre la cual se adicionaron 5 ml de ágar TS blando conteniendo fagos en una concentración de 1.10⁸-5.10⁸ UFP ml⁻¹. Las placas se secaron en flujo laminar durante

15 minutos y posteriormente se realizaron tres estrías de cada bacteria a testear sobre el ágar. Las estrías se realizaron picando una sola vez las bacterias (sembradas con ansa en placas de ágar TS y crecidas 20 h a 37°C) y haciendo las tres estrías consecutivamente. Una vez realizadas las estrías las placas se incubaron durante 16 h a 37°C y se determinó la aparición de crecimiento de bacterias sobre las estrías.

En los casos en los que se obtuvieron resultados contradictorios entre las técnicas de “spot” y de “streak” para un par fago-bacteria huésped, se confirmó el resultado sembrando por spot diluciones seriadas del fago sobre ágar TS blando con 0,3 ml de cultivo de la bacteria a testear. El resultado se consideró positivo cuando se observó, en alguna de las diluciones sembradas, la aparición de placas de lisis separadas.

Morfología por microscopía electrónica de transmisión

A gotas de 10 µl de lisado de fago filtrado se le realizó una tinción negativa con ácido tungstofosfórico 2% (p/v) y se posaron sobre una grilla de cobre. Las observaciones se realizaron en dos microscopios electrónicos de transmisión, ambos marca JEOL modelo JEM-1200 EXII, uno perteneciente a la Facultad de Veterinaria de la UNLP, Buenos Aires, Argentina y el otro perteneciente a INTA Castelar, Buenos Aires, Argentina.

Análisis genómico

Extracción y cuantificación de ADN

El ADN de los fagos seleccionados se extrajo utilizando un protocolo estándar (Sambrook & Russell, 2001). Un mililitro de lisado de fago filtrado conteniendo 10^8 - 10^9 UFP ml⁻¹ se incubó con una unidad de DNAsa 1 (Invitrogen, Buenos Aires, Argentina) y una unidad de RNAsa A (Biodynamics, Buenos Aires, Argentina) durante 30 minutos a 37°C en baño termostático. Posteriormente se degradó la cápside de las partículas de fago adicionando EDTA 0,5M (pH 8) en una concentración final de 20 mM, proteinasa K en concentración final de 50 µg ml⁻¹ y 0,5% (p/v) de dodecil sulfato de sodio (SDS). La mezcla se incubó 1 hora a 56°C en baño termostático. Finalmente se eliminaron las proteínas realizando una extracción con 0,5 ml de fenol equilibrado (pH 8), otra con 0,5 ml de una mezcla al 50% (v/v) de fenol equilibrado y cloroformo y una tercera extracción con 0,5 ml de CHCl₃. Después de cada extracción con fase orgánica las mezclas se centrifugaron a 3000 x g durante 5 min en una microcentrífuga Eppendorf y la fase acuosa se pasó a un tubo nuevo. El ADN extraído se precipitó utilizando acetato de potasio 3M (pH 5,5) e isopropanol (70% v/v final) o etanol absoluto (1:1 v/v final) indistintamente. Los tubos Eppendorf se centrifugaron en microcentrífuga durante 5 min a máxima velocidad, se eliminó el sobrenadante y el precipitado se lavó con 0,2 ml de etanol 70% (v/v) frío dos veces. Finalmente el pellet se dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió en 50 µl de buffer Tris-EDTA (pH 7,6).

El ADN de las bacterias huésped de cada uno de los fagos seleccionados y de la cepa EDL 933 de EHEC se extrajo utilizando el kit comercial “Illustra bacterial genomic prep mini spin” (GE Healthcare, Little Chalfont, Inglaterra) siguiendo las indicaciones del fabricante.

Todos los ADN extraídos (de fago y de bacteria) fueron cuantificados por densidad óptica a 260/280 nm utilizando un espectrofotómetro modelo ND-1000 de NanoDrop Technologies (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, Delaware, EEUU), se diluyeron en buffer TE a una concentración final de $30 \mu\text{g ml}^{-1}$ y se guardaron a -20°C hasta ser utilizados.

Preparación de muestras para PCR

Para todas las reacciones de PCR realizadas las muestras se prepararon mezclando $2 \mu\text{l}$ de buffer de PCR (10x, Invitrogen), $2 \mu\text{l}$ de dNTPs (2 mM), 1 U de TaqDNA polimerasa (Invitrogen), $1 \mu\text{l}$ de ADN molde, 15 pmol de cada primer y H_2O miliQ libre de DNAsas para ajustar el volumen a $20 \mu\text{l}$. Los productos de PCR se analizaron en geles de agarosa y las bandas fueron visualizadas con bromuro de etidio. Las concentraciones de ADN molde y de agarosa utilizadas se especifican en cada caso. En todas las corridas se utiliza como control negativo una muestra con todos los reactivos excepto el ADN molde.

Control de contaminación con ADN cromosomal del huésped

Se analizó el número de ciclos necesarios para la detección de la banda de amplificación del gen *luxS* utilizando como molde $1 \mu\text{l}$ de ADN de EDL933 diluido 1:100 en buffer TE (concentración final: $0,3 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$) y los primers específicos EDSHBAML y EDSHKPNL diseñados por Robles Luna G. (2009) con las siguientes condiciones de amplificación: 1 ciclo de 2 min a 94°C ; **N** ciclos de 45 s a 94°C , 55 s a 55°C y 45 s a 72°C (con **N** como variable a ensayar); y un ciclo final de 1 min a 72°C . Se sembraron $7 \mu\text{l}$ de los productos de PCR en agarosa 1% (p/v).

Una vez determinado el número mínimo de ciclos para amplificar *luxS* se utilizó ese número de ciclos de amplificación utilizando como molde $1 \mu\text{l}$ de ADN diluido 1:10 en buffer TE de cada uno de los fagos y de las bacterias huésped (concentración final: $3 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$) y el ADN de EDL 933 ($30 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$) como control positivo de la reacción.

*Determinación de la presencia de los genes *stx1*, *stx2* y *cl* por PCR*

La presencia de los genes *stx1* y *stx2* se determinó a través de una multiplex PCR siguiendo un protocolo estándar (Rivas et al., 2007) con los primers específicos diseñados por Pollard et al. (1990), con las siguientes condiciones de amplificación: 1 ciclo de 5 minutos a 94°C ; 30 ciclos de: 30 segundos a 94°C , 30 segundos a 58°C y 30 segundos a 72°C ; y un ciclo final de 2 min a 72°C .

Para la detección del gen *cl* se utilizaron primers específicos diseñados sobre la secuencia de este gen codificada en el genoma del fago 933W (el profago presente en la cepa de EHEC EDL 933 que codifica para la toxina Shiga 2) obtenido del GenBank (número de acceso NC_000924) y sintetizados por Invitrogen Argentina. Las secuencias son: 5'-CATCTGCAGTTCTCCATCTCTGTCATAG-3' para el primer superior, y 5'-CGGAATTCGTCTTGATGAACATGGTAG-3' para el inferior. El ciclado utilizado fue: 1 ciclo de 2 minutos a 94°C; 30 ciclos de: 45 segundos a 94°C, 45 segundos a 53°C y 45 segundos a 72 °C; y un ciclo final de 1 minuto a 72°C.

Para ambos ensayos se utilizó como molde de la reacción de PCR una dilución 1:10 en buffer TE de las muestras de ADN estandarizadas (concentración final: 3 ng μl^{-1}). Los productos de PCR se analizaron en un gel de agarosa 1,5% (p/v). Para los controles positivos de ambas reacciones de PCR se utilizó como molde el ADN extraído de la cepa EDL 933 de EHEC (30 ng μl^{-1}).

Perfiles genómicos por RAPD y rep-PCR

Para la amplificación de perfiles por RAPD se utilizaron los primers RAPD6, RAPD9 y RAPD10 (Madueno et al., 2009) con las siguientes condiciones de amplificación: 4 ciclos de baja especificidad de 5 minutos a 94°C, 5 minutos a 40°C y 5 minutos a 72°C; y 30 ciclos de alta especificidad de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 55°C y 1 minuto a 70°C; y un ciclo final de extensión de 10 minutos a 72°C.

Para la técnica de rep-PCR se usaron los primers BOX-A1R y ERIC1R (Versalovic, 1994) y las condiciones de ciclado fueron: 1 ciclo de 2 minutos a 94°C; 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 45 segundos a 40°C y 2 minutos a 72°C; y un ciclo final de 3 minutos a 72°C.

Las preparación de las muestras se realizó igual que como se describió para las muestras de amplificación de los genes de *stx* y *cl*.

Todo el volumen de cada producto de PCR fue sembrado en un gel de agarosa al 1% (p/v) y las bandas fueron reveladas con bromuro de etidio.

Nota: Los productos obtenidos de todas las reacciones de PCR se corrieron a 40 Volt con buffer TAE (1x) como buffer de corrida.

Morfología de las placas de lisis

Se analizó la morfología de las placas de lisis obtenidas en ágar Luria Bertrani (LB), ágar Triptona soja TS y ágar nutritivo (N) con y sin el agregado de 10 mM final de CaCl_2 . Para esto se adicionaron 0,3 ml de un cultivo de la bacteria utilizada como huésped de propagación de cada fago en fase exponencial ($\text{DO}_{600\text{nm}} \cong 0,3$), crecida en el medio correspondiente, a 5 ml de ágar blando del medio a testear, y se agregaron 0,1 ml de lisado de fago diluido en buffer SM a una concentración de 10^2 UFP ml^{-1} y, en los casos en los que se analizó el efecto del ion Ca^{+2} , también se añadieron 50 μl de una solución 1M de CaCl_2 filtrada por membrana de 0,45 μm de diámetro de poro. La mezcla se

colocó sobre placas de ágar del medio correspondiente y se incubaron 24 h a 37°C. Posteriormente se midió el tamaño de las placas de lisis y las placas de Petri se mantuvieron 72 h más a temperatura ambiente para determinar cambios en el tamaño o la morfología de las placas de lisis.

La cantidad relativa de polisacárido capsular formado por cultivos crecidos en los diferentes medios se determinó por tinción negativa y observación microscópica. Partiendo de cultivos de 20 h de los aislados 933 y 71945 de EHEC O157:H7 se realizó una estría de cada uno en placas de ágar LB, TS y N y las placas se incubaron 20 h a 37°C. Posteriormente se posó una gota de 10 µl de solución de nigrosina en etanol 96%, se picó la estría de bacteria con un ansa y se esparció junto con la nigrosina sobre el portaobjetos, se dejó secar al aire y se realizó una observación por microscopía óptica con objetivo de inmersión (100x).

Para determinar la cantidad relativa de cápsula de las bacterias en el halo se realizó un ensayo utilizando como huésped la cepa 71945 de O157:H7. Se adicionaron 0,3 ml de un cultivo de 20 h de esta bacteria en caldo LB a 10 ml de ágar LB blando (0,6% p/p ágar-ágar) termostatzado a 45°C, se mezcló y se vertió en una placa de Petri, la placa se dejó secar durante 10 min en flujo laminar y se adicionó 1 gota de filtrado del fago MFA45N en caldo LB (10^9 UFP ml⁻¹) en el centro de la placa. La placa se incubó a temperatura ambiente durante 72 h con el ágar hacia abajo. Luego se sumergió el ansa en cada una de las partes de la zona de lisis: en la zona donde se posó la gota (zona central, la más traslúcida), en el halo (zona clara alrededor de la gota) y en el césped bacteriano (zona periférica, opaca). Cada muestra tomada con el ansa se dispersó sobre un porta objetos con una gota de nigrosina, se dejó secar y se observó al microscopio como se describe en el párrafo anterior.

Resistencia a la acidez

Para determinar la capacidad de cada fago de tolerar la acidez, se adicionaron 0,1 ml de lisado filtrado (10^9 UFP ml⁻¹) a 0,9 ml de solución fisiológica (NaCl 0,9% p/v) ajustada al pH deseado con HCl 1,5M y la mezcla fue incubada a 37°C durante 16 h (Hazem, 2002). Como control del ensayo de incubaron 0,1 ml de lisado de fago con 0,9 ml de solución fisiológica sin el agregado de HCl (pH 7,2) a 37°C durante 16 h. Luego de la incubación, las muestras se llevaron a pH 7 con NaOH (1 M), se hicieron diluciones seriadas y se determinó el título de partículas infectivas después de la incubación a cada pH por el método de la doble capa en ágar LB.

Parámetros del ciclo lítico

Cinética de adhesión

La cinética de adhesión de los fagos a su bacteria huésped se determinó utilizando un protocolo estándar (Kropinski, 2009). Se inocularon 20 ml de caldo LB con 0,1 ml de un

cultivo de 20 h crecido en caldo LB sin agitación del huésped correspondiente al fago en estudio, el inóculo se incubó a 37°C en agitación (180 rpm) hasta una DO_{650nm} de 0,1. En un Erlenmeyer de 100 ml, denominado "C", se colocaron 9 ml de caldo LB y en otro, denominado "A", 9 ml del cultivo antes mencionado (el resto del cultivo se mantuvo en baño de hielo para recuento). Los Erlenmeyers se dejaron en agitación (60 rpm) a 37°C durante 5 minutos y luego se les adicionó 1 ml de lisado del fago a analizar ($1-3 \cdot 10^5$ UFP ml^{-1}) a cada uno. Se tomaron muestras de 50 μl del Erlenmeyer "A" cada 1 minuto hasta, como mínimo, los 8 minutos, y por último se tomaron dos muestras de igual volumen del Erlenmeyer "C". Cada muestra se pasó a un tubo Eppendorf con 0,95 ml de caldo LB y 5 gotas de $CHCl_3$ que se mantuvieron en hielo durante al menos 10 minutos antes de comenzar la cinética. Los tubos se mezclaron por agitación y se dejaron en hielo hasta realizar los recuentos en ágar LB por el método de la doble capa. Asimismo se determinó el título del cultivo de EHEC sembrando, por duplicado, 0,1 ml de la dilución correspondiente del cultivo (en triptona al 0,1%) en placas de ágar LB. Los datos obtenidos se graficaron para determinar la constante de adsorción de cada aislado ensayado.

Lisis en un ciclo

La construcción de la curva de lisis en un ciclo y la determinación de los parámetros del ciclo lítico del fago CA933P se realizaron siguiendo un protocolo estándar (Hyman & Abedon, 2009). Para esto se termostató a 37°C en baño de agua un tubo Eppendorf conteniendo 0,1 ml de un lisado del fago filtrado (título aproximado 10^5 UFP ml^{-1}) al que se le añadieron 0,1 ml de cultivo de EHEC 933 en fase exponencial crecida en caldo LB con agitación ($DO_{650nm} = 0,18$). La mezcla se agitó y se incubó durante 6 minutos para que se produzca la infección del fago. Se extrajeron 0,1 ml de esta mezcla y se adicionaron a 10 ml de caldo LB termostató a 37°C. Se mezcló y se extrajeron 0,4 ml de la mezcla. Inmediatamente se sembraron 2 alícuotas de 0,1 ml de lo extraído en tubos de ágar LB blando para determinar el número de bacterias infectadas por recuento por la técnica de la doble capa, y otros 0,1 ml se pasaron a un tubo con 0,9 ml de caldo LB y 10 gotas de $CHCl_3$, se mezcló por agitación y se dejó a temperatura ambiente hasta realizar los recuentos correspondientes (esta alícuota corresponde al tiempo cero de la curva de lisis en un ciclo y al número de fagos libres no adsorbidos). Se tomaron alícuotas de 0,1 ml cada 5 minutos hasta los 55 minutos y se pasaron a sendos tubos de LB/ $CHCl_3$. Finalmente se determinó el título de fagos a cada uno de los tiempos de incubación por recuento en doble capa en ágar LB.

Efecto del uso de fagos *in vitro* sobre células eucariotas

Efecto del tratamiento con fagos en el número de bacterias adheridas y totales

Para todos los ensayos se utilizó el aislado 933 de *Escherichia coli* enterohemorrágica O157:H7 y el fago MFA933P aislado de materia fecal vacuna (título inicial: $5 \cdot 10^{11}$ UFP

ml⁻¹). Se emplearon placas de 24 fosas de células Hep-2 confluentes de 48 h de incubación en medio DMEM (Dulbecco's Modified *Eagle* Medium) a 37°C en atmósfera enriquecida con 5% v/v de CO₂. A cada fosa se le extrajo el medio utilizado para el crecimiento de las células y las monocapas celulares se lavaron 3 veces con porciones de 0,5 ml de PBS estéril antes de ser infectadas.

Para la infección se utilizaron cultivos de EHEC, en un caso en fase estacionaria y en el otro, en fase exponencial (DO_{600nm} aprox. 0,5, y por recuento aprox. 5.10⁸ UFC/fosa ambos).

Cultivo en fase estacionaria: Se incorpora 1 ml de cultivo de 12 h de EHEC 933 crecido caldo TS sin agitación a 10 ml de DMEM de adhesión. Se infecta cada fosa con 0,4 ml de este cultivo.

Cultivo en fase exponencial: Se incorporan 0,5 ml de cultivo de 12 h de EHEC 933 crecido caldo TS sin agitación a 20 ml de DMEM de adhesión. Se incuba 2 h en agitación (180 rpm) a 37 °C. Se infecta cada fosa con 0,4 ml de este cultivo.

Se analizó el número de UFC totales y de UFC adheridas a las células eucariotas sin el agregado de fago y con fago a diferentes multiplicidades de infección (MDI). Cada condición se ensayó por triplicado en cada placa.

Cinética de clarificación

El tiempo de incubación necesario para que el fago produzca la infección y lisis del huésped en las condiciones de crecimiento de las células (a 37°C, con atmósfera enriquecida con 5% v/v de CO₂ y con DMEM de adhesión como medio de cultivo) se determinó a través de una cinética de clarificación de la bacteria en fase exponencial con el agregado del fago a una MDI de 0,1. Para esto se incorporaron 0,4 ml de un cultivo de EHEC 933 en fase exponencial y 0,1 ml de lisado del fago filtrado diluido en triptona 0,1% (Trp) para generar una MDI de 0,1 en cada fosa de una placa sin células, y se determinó la DO_{600nm} a diferentes tiempos.

Se realizó un control de viraje del indicador ácido-base del DMEM de adhesión incubando durante 3 h en las mismas condiciones anteriores 0,4 ml del inóculo en fase exponencial con 0,1 ml de Trp como control o 0,1 ml de la dilución correspondiente de fago para generar valores de MDI de 0,1; 1 y 10 en fosas sin células.

Ensayos de infección sobre células Hep-2

Los ensayos se realizaron infectando grupos de 6 fosas de células Hep-2 con 0,4 ml del inóculo inicial de bacterias en la fase de crecimiento correspondiente y 0,1 ml de Trp (bacteria sin fago) o 0,1 ml de la dilución correspondiente de fago para cada MDI ensayada.

Las placas se incubaron durante 90 min a 37°C en atmósfera enriquecida con 5% v/v de CO₂. De cada grupo de 6 fosas se utilizaron 3 para determinar el número de bacterias totales y las otras 3 para contar bacterias adheridas.

Determinación del número de bacterias totales por fosa

Después de la incubación se extrajo el sobrenadante de cada fosa, se pasó a un tubo Eppendorf estéril y se dejó en hielo, y a cada una de estas fosas se le adicionaron 0,5 ml de H₂O destilada estéril y se dejaron 1 h a temperatura ambiente para producir la lisis de las células Hep-2 y liberar las bacterias adheridas, las células se terminaron de desprender utilizando una pipeta y los sobrenadantes se adicionaron al tubo Eppendorf correspondiente a cada fosa.

Determinación del número de bacterias adheridas por fosa

Después de la incubación se extrajeron los sobrenadantes de cada fosa y se descartaron. Cada una de estas fosas se lavó 3 veces con porciones de 0,5 ml de PBS estéril, eliminándose los sobrenadantes de lavado, y luego se les adicionaron 0,5 ml de H₂O destilada estéril y se dejaron 1 h a temperatura ambiente para producir la lisis de las células Hep-2 y liberar las bacterias adheridas. Las células se terminaron de desprender con pipeta y los sobrenadantes se pasaron a tubos Eppendorf estériles.

En ambos casos el número de bacterias se determinó realizando diluciones seriadas del contenido de cada tubo en Trp y sembrando 0,1 ml de la dilución correspondiente en placas de ágar TS.

A fin de determinar si existe una pérdida importante de partículas de fago infectivas por adhesión inespecífica a las células eucariotas, a un grupo de 3 fosas se les adicionaron 10⁸ fagos en 0,5 ml de DMEM de adhesión sin el agregado de bacteria y después de la incubación se extrajo el sobrenadante, se hicieron diluciones seriadas en Trp y realizó un recuento fagos por el método de la doble capa en ágar TS.

Efecto del tratamiento con fagos sobre la integridad de las células Hep-2 infectadas con EHEC

Se utilizaron 6 fosas de una placa de 24 fosas con un vidrio en la base, las células se hicieron crecer sobre el vidrio hasta formar una monocapa confluyente (48 h en DMEM a 37°C en atmósfera enriquecida con un 5% de CO₂) se extrajo el medio utilizado para el crecimiento de las células en cada fosa, y las monocapas se lavaron 3 veces con 0,5 ml de PBS estéril antes de ser infectadas.

Para la infección se utilizó un cultivo que se preparó diluyendo 1:10 en DMEM de adhesión estéril un cultivo de 12 h de EHEC 933 crecido en caldo TS sin agitación (título aproximado 5.10⁸ UFC ml⁻¹). Se incorporaron 0,5 ml de esta mezcla a cada fosa con vidrio y se adicionaron 0,1 ml de Trp (bacteria sin fago) o 0,1 ml de la dilución correspondiente del fago MFA933P en Trp para generar una MDI de 1 UFP/UFC. Las

muestras para tinción se fijaron con etanol absoluto durante 5 minutos en hielo, luego se lavaron 2 veces con PBS y a cada vidrio se le agregaron 0,5 ml de naranja de acridina ($0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ en PBS), se dejó en contacto durante 5 minutos a temperatura ambiente y luego se extrajo el líquido y cada vidrio se lavó 2 veces con PBS. Los vidrios se montaron invertidos en glicerol-azida sobre un portaobjetos y se analizaron en un microscopio de fluorescencia (Leica DMLB) equipado con una cámara Leica DC100 (Leica Microscopy Systems Ltd. CH Heerbrugg, Switzerland).

Desarrollo de estrategias para la administración oral de fagos

Productos derivados de los gránulos de kefir

Permeado de suero fermentado con kefir (PSK)

El permeado de suero líquido se preparó a partir de un permeado de suero de quesería deshidratado en polvo (Ilolay) al 5% p/v en agua mineralizada. Se incorporaron gránulos de kefir al 10% p/v (10 gr gránulo en 100 ml de permeado de suero) y se dejó fermentar durante 24 h a 30°C. Posteriormente el fermento se coló para extraer los gránulos, se midió el pH con un electrodo de vidrio (obteniéndose valores de pH de aproximadamente 3,5) y se neutralizó a pH 7,0 con NaOH 1M. Las proteínas precipitadas durante la neutralización se eliminaron por filtración. Para inactivar las bacterias remanentes el fermento se llevó a ebullición a baño maría durante 30 min y se guardó en un frasco de vidrio a 4°C hasta ser utilizado.

Extractos de gránulos

Estos extractos se prepararon según el protocolo descrito por Rodrigues et al. (2005) con algunas modificaciones: se pesó 1 g de gránulos de kéfir CIDCA AGK1 (Garrote et al., 2001) y se adicionaron a 10 ml de H₂O destilada (E1:10) o a 100 ml de H₂O destilada (E1:100). Ambas mezclas se llevaron a ebullición a baño maría durante 1 h. Los sobrenadantes se fraccionaron en tubos Eppendorf y se centrifugaron en microcentrífuga durante 20 min a máxima velocidad. Los sobrenadantes de centrifugado de cada extracción se juntaron, se pasaron a sendos frascos de vidrio y se guardaron a 4°C.

Geles derivados de los extractos de gránulos

Se realizó un extracto de gránulo 1:10 (como se explica arriba). El volumen se separó en alícuotas de 5 ml en tubos de vidrio y se dejaron 9 días a 4°C. Se obtuvieron geles firmes, de un color blanco-traslúcido.

Análisis del efecto protector a pH4 del PSK y de los extractos de kefir sobre el fago CA933P

En tubos Eppendorf de 1,5 ml se colocaron 0,9 ml de: E1:10, E1:100, PSK y buffer SM

como control y se adicionaron 0,1 ml de un lisado filtrado de fago CA933P en caldo LB (título aproximado 10^{11} UFP ml^{-1}), se mezclaron y se pasaron porciones de 0,1 ml de cada tubo a 2 tubos Eppendorf con 0,9 ml de solución fisiológica (NaCl 0,9% p/v, pH 7,3), uno de cada par se acidificó a pH 4,0 (extractos, PSK y control diluidos) con HCl 1M y el otro se dejó como control a pH 7,3. También a los tubos de PSK, suero y control iniciales (a los que se les agregó el fago) se los llevó a pH 4,0 (extractos, PSK y control concentrados). Los 12 tubos se incubaron en baño de agua a 37 °C durante 18 h. Pasado este tiempo se extrajeron y los tubos de pH 4,0 se neutralizaron con NaOH 1,5M, se realizaron diluciones seriadas en buffer SM y se analizó el título de fagos remanente por spot test en ágar LB.

Análisis del efecto protector del PSK a pH 4 sobre el fago CA933P a diferentes tiempos.

Se analizó si existía una diferencia en la protección del PSK a pH 4 permitiendo el contacto del fago con el suero durante diferentes tiempos antes de ser llevado a pH ácido. En Eppendorfs de 1,5 ml se colocaron 0,9 ml de PSK y SM buffer como control y se adicionaron 0,1 ml de filtrado de fago CA933P en LB (título aproximado 10^9 UFP ml^{-1}) a cada tubo, se mezclaron y cada uno de los tubos de PSK se incubó a temperatura ambiente durante diferentes tiempos: 30 minutos, 1 h, 2 h y 3 h. Se pasaron porciones de 0,1 ml de cada tubo a 2 tubos Eppendorf con 0,9 ml de solución fisiológica (NaCl 0,9% p/v, pH 7,3), uno de cada par se llevó a pH 4,0 (extractos, PSK y control diluidos) con HCl 1M y el otro se dejó como control a pH 7,3. Los tubos se incubaron en baño de agua a 37 °C durante 16 h. Finalmente los tubos que se encontraban a pH 4 se neutralizaron con NaOH 1,5M, se realizaron diluciones seriadas de todos los tubos en buffer SM y los títulos se determinaron por el método de la doble capa en ágar LB.

Estabilidad de los geles de kefir

Se analizó cualitativamente el efecto del agregado de fagos, NaOH y CaCl_2 y de la temperatura en la estabilidad de los geles.

El efecto del agregado de fago se analizó para determinar si la capacidad de algunos fagos (como el CA933P) de hidrolizar polisacáridos capsulares afecta a los geles de kefirán. Para esto se tomaron 0,3 ml de un lisado del fago CA933P en caldo LB y se adicionaron a un tubo con 2 ml del gel de kefir, se mezcló por agitación para homogeneizar y se dejó a 4°C durante 24 h, también se realizó un control de gel sin fago al que se le adicionaron 0,3 ml de caldo LB, se mezcló y se incubó en las mismas condiciones.

Para determinar el efecto de la temperatura se tomó uno de los geles formados, se mezcló y el volumen se separó en 2 alícuotas de 2,5 ml cada una en tubos de vidrio. Uno de los tubos se guardó a 4°C y el otro se dejó a 37°C durante 24 h.

Para determinar si existe una desestabilización de los geles al neutralizar el pH con NaOH y el efecto de la adición de iones Ca^{+2} , uno de los tubos de gel se mezcló y se midió el pH del mismo con un electrodo de vidrio (valor de pH leído: 3,7), el volumen se dividió en 2 alícuotas. A una de ellas se la llevó a pH 7,3 con NaOH 1,5M (gel neutralizado) y la otra se la dejó a pH 3,7 (gel ácido). Luego se tomaron 2 alícuotas de 1 ml cada una del gel ácido y una del gel neutralizado y se pasaron a sendos tubos de vidrio. A uno de los tubos de gel ácido se le adicionaron 0,1 ml de H_2O destilada, y al otro tubo de gel ácido y al del gel neutralizado se le agregaron 0,1 ml de CaCl_2 1M como ion divalente para la estabilización. Los tres tubos se dejaron 24 h a 4°C. El efecto de la adición de diferentes cantidades de CaCl_2 al gel neutralizado se determinó tomando 4 ml del gel ácido que fue neutralizado con NaOH 1,5M separando el volumen en 4 alícuotas de 1 ml cada una en tubos de vidrio. Se agregaron concentraciones finales de 0,05; 0,1; 0,2 y 0,3 M de CaCl_2 respectivamente y se incubaron durante 24 h a 4°C.

Análisis del efecto protector de los geles de kefir a pH ácido

Se estudió el efecto protector de los geles de kéfir para los fagos expuestos a pH ácido. Para esto se neutralizaron 10 ml del gel ácido con NaOH 1,5M, se les agregó 1 ml de CaCl_2 1M y 1 ml de lisado del fago CA933P en caldo LB ($2,5 \cdot 10^9$ UFP ml^{-1}), se mezcló para homogeneizar y se separó en alícuotas de 1 ml en tubos de ensayo, los tubos se dejaron 24 h a 4°C. Luego se adicionaron a cada tubo 9 ml de solución fisiológica (NaCl 0,9% p/v) ajustada a cada pH con HCl 1M (pH 1,5 - 2,5 - 3,5 - 4,5 y 7). Se mezclaron para que el líquido moje toda la superficie de los geles y se incubaron durante 3 h a temperatura ambiente. A cada tubo se le agregaron 10 μl de NaOH saturado para aumentar el pH antes de romper el gel, se agitó hasta desarmar el gel y se llevó a pH neutro con NaOH 1,5M (excepto para los controles a pH 7 que directamente se agitaron). Las mezclas se incubaron durante 30 min a 37°C para permitir que el gel se deshiciera totalmente y se realizó un recuento de los fagos por la técnica de la doble capa en ágar LB.

Efecto protector de microesferas a base de alginato y pectinas

Elaboración de las microesferas

El diseño y la preparación de las microesferas estuvieron a cargo del Dr. Guillermo R. Castro y el Licenciado Germán A. Islan del grupo de Nanobiomateriales en el Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI-CONICET).

Se utilizaron como materiales de partida pectina de bajo metoxilo (BM) (C.P.Kelco, grado de esterificación (GE) = 33%), Pectina de alto metoxilo (AM) (Sigma, GE = 78 %), Alginato de Sodio (Monsanto), y Goma Guar (Nutrial).

Se prepararon soluciones acuosas de los respectivos polímeros utilizados (alginato o pectina BM) con una concentración final del 2 % (p/v) para el alginato y 3 % (p/v) para la pectina BM. La solución de pectina BM fue llevada a pH 6,5 con buffer MES (ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico, Sigma-Aldrich) 50 mM. A la solución acuosa de cada polímero se le adicionó un lisado del fago CA933P en caldo LB, filtrado con membrana de 0,45 μm , a una concentración final de 10^8 - 10^9 UFP ml^{-1} .

Las formulaciones que presentan una emulsión se prepararon mezclando 790 μl de la solución acuosa del respectivo polímero (sin fago) con 10 μl de solución de Tween 20 (Anedra) al 1% (v/v). La mezcla se homogeneizó por agitación y se añadió ácido oleico al 10% (v/v). Finalmente se adicionó el lisado de fago antes mencionado a una concentración final de 10^8 - 10^9 UFP ml^{-1} .

Las microesferas se prepararon añadiendo gotas de cada una de las formulaciones de biopolímero con fago a una solución de CaCl_2 0,5 M en buffer MES pH= 6,0 a 0°C.

Las formulaciones que presentan un *coating* (esferas con una capa externa de un polímero diferente, o de distinta concentración que el que conforma la estructura de la microesfera) se prepararon por goteo las formulaciones de alginato o pectina de bajo metoxilo (BM) sobre soluciones acuosas del polímero correspondiente (pectina de alto metoxilo (AM) o goma guar) al 0.2 % (p/v) conteniendo CaCl_2 a una concentración final de 0,5 M.

Todas las esferas se dejaron madurar durante 12 h a 4°C en la misma solución de CaCl_2 donde se formaron, y finalmente fueron filtradas y guardadas a 4°C hasta ser utilizadas en los ensayos posteriores.

Ensayos de resistencia a pH

Para los ensayos de resistencia a pH ácido de las diferentes formulaciones de fago se colocaron en tubos Eppendorf 0,9 ml de solución fisiológica (NaCl 0,9%) ajustada pH 1,60 con HCl 1M o sin ajustar (pH 7,09), se adicionaron 10 esferas de muestra en tubos con solución fisiológica a cada pH, se mezclaron y se incubaron durante 30 minutos a 25°C (ensayo A) o a 37°C en baño termostático (ensayo B). Pasado este tiempo, las esferas que se encontraban a pH 1,60 se colaron, se lavaron con H_2O destilada y se pasaron a tubos Eppendorf con 0,9 ml de solución fisiológica a pH 7,09. Las esferas de todos los tubos, en ambos ensayos, se rompieron mecánicamente con una espátula metálica, se mezclaron y se dejaron 1 h a temperatura ambiente para permitir la difusión de los fagos desde el polímero a la solución. Los títulos se obtuvieron por recuento por el método de la doble capa en ágar LB. También se realizó una cinética de inactivación del fago libre (sin matriz) a 37°C y pH 1,6. Para esto se tomaron 2 tubos con 3 ml de solución fisiológica a pH 1,60 cada uno y termostatizados a 37°C en baño de agua. Se les adicionaron a cada uno 3 μl de un lisado del fago CA933P en LB filtrado por membrana de 0,45 μm ($1,52 \cdot 10^{10}$ UFP ml^{-1}), se mezclaron y se dejaron a 37°C. Se

tomaron muestras de 180 μl de cada tubo a los 5, 10 y 15 minutos de incubación, cada alícuota se pasó a un tubo Eppendorf con 820 μl de PBS pH 9,7 obteniéndose un pH final de 7,3 – 7,5. Se realizaron recuentos por duplicado de cada muestra por el método de la doble capa en ágar LB.

Resistencia del fago a condiciones hostiles

Se analizó el efecto la exposición del fago CA933P a un solvente orgánico (etanol 96%), un medio fuertemente reactivo (H_2O_2) y un medio de alta fuerza iónica (soluciones de NaCl) así como la acción de las proteasas pepsina, tripsina y α -quimotripsina presentes comúnmente en el sistema digestivo de mamíferos. Para los ensayos se utilizó un lisado del fago CA933P en caldo LB (título $6,35 \cdot 10^9$ UFP ml^{-1}).

Etanol, H_2O_2 y NaCl

Para determinar el efecto desnaturalizante del etanol se realizó una cinética de inactivación del fago incorporando 0,1 ml del lisado de fago en 1 ml de EtOH 96%, se mezcló y se incubó a temperatura ambiente. Se tomaron alícuotas de 0,1 ml cada 30 segundos y se pasaron a tubos de ensayo con 10 ml PBS, se realizaron diluciones seriadas en buffer SM y recuento en ágar LB por el método de la doble capa.

Para analizar la actividad desnaturalizante del peróxido, a tubos Eppendorf conteniendo 1 ml de una solución compuesta por 25 mM de H_2O_2 y 2,5 mM de CuSO_4 se les incorporaron 10 μl de lisado del fago CA933P, la mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos y posteriormente se tomaron 0,1 ml de la mezcla y se incorporaron a 10 ml de PBS, se realizaron diluciones seriadas de todos los tubos en buffer SM y se analizó el título de fagos infectivos remanentes por recuento en ágar LB.

El efecto de la fuerza iónica sobre la estabilidad del fago se determinó incorporando 10 μl de lisado de fago en 990 μl de soluciones de NaCl 1,2M, 3M y 4,5M respectivamente, se mezclaron y se dejaron reposar 30 min a temperatura ambiente. Se tomaron alícuotas de 0,1 ml de cada mezcla y se pasaron a tubos Eppendorf con 9,9 ml de SM buffer. Se realizaron diluciones seriadas y se determinó del título de fagos remanentes por recuento en ágar LB. Se analizó también el efecto de alta fuerza iónica (NaCl 4,5M) a tiempos más largos, el ensayo se realizó igual que como se describió anteriormente con incubaciones de 60, 90 y 120 min.

Proteasas

Para determinar si las enzimas tripsina y α -quimotripsina (ambas extraídas de páncreas bovino, Sigma-Aldrich, EEUU) son capaces de actuar sobre el fago CA933P, se colocaron 0,8 ml de buffer fosfato (pH 7,2) en tubos Eppendorf y se adicionaron 0,1 ml de la enzima respectiva (tripsina 1 mg ml^{-1} y α -quimotripsina 2 mg ml^{-1}) y 10 μl de fago

(10^8 UFP ml⁻¹). Se incubaron a diferentes tiempos (2,5; 4; 7 y 24 h) a 37°C en agitación a 120 rpm. Se adicionaron 0,1 ml de suero fetal bovino (SFB, laboratorios PAA, Austria) para detener la reacción y se realizaron diluciones seriadas en buffer SM y recuento de fagos por spot test en LB.

Para determinar si el SFB inhibe realmente la reacción, se colocaron en otra serie de tubos 0,8 ml de buffer fosfato (pH 7,2), 0,1 ml de la enzima respectiva, 10 µl de lisado de fago y 0,1 ml de SFB y se incubaron en las mismas condiciones. Se realizaron diluciones seriadas en buffer SM y recuento de fagos por spot test en LB.

Por último, para determinar si el SFB interfiere en la capacidad infectiva de los fagos, se colocaron en tubos Eppendorf 0,9 ml de buffer fosfato (pH 7,3), 10 µl de lisado de fago y 0,1 ml de SFB y se incubó en las mismas condiciones anteriores. Se realizaron diluciones seriadas en buffer SM y se realizó un recuento de los fagos remanentes por spot test en ágar LB.

Como confirmación de la falta de actividad de la tripsina y la α -quimotripsina sobre el fago CA933P se realizó otro ensayo utilizando 1 ml de tripsina líquida comercial 0,25% (1X) en EDTA.4Na (Invitrogen) a la que se le adicionaron 10 µl de lisado de fago y una solución de α -quimotripsina preparada disolviendo 3 mg de esta enzima en 1 ml de buffer fosfato (pH 7,3) a la que se le adicionaron 10 µl de lisado de fago. Se utilizó el buffer fosfato con fago sin enzimas como control. Los tubos se incubaron en las mismas condiciones anteriores, se realizaron diluciones seriadas en buffer SM y análisis del título de fagos por spot test en LB.

Para determinar el efecto de la actividad de la pepsina (extraída de mucosa gástrica de porcinos, Sigma-Aldrich, EEUU) sobre el fago CA933P se colocaron en un tubo Eppendorf 0,9 ml de solución fisiológica pH 2,5 y 0,1 ml de pepsina (5 mg ml⁻¹, pH 4,4), se termostató a 37°C, se le adicionaron 10 µl de fago CA933P (10^{10} UFP ml⁻¹) y se incubó durante 10 min a 37°C. Se realizó un control de inactivación por pH colocando en un tubo Eppendorf con 0,9 ml de solución fisiológica pH 2,5, 0,1 ml de solución fisiológica pH 4,4, y 10 µl de fago, y como control del ensayo se utilizó un tubo Eppendorf con 990 µl de solución fisiológica pH 7 al que se le adicionaron 10 µl de lisado de fago, y ambos tubos se incubaron en las mismas condiciones mencionadas.

Los títulos de fagos remanentes en cada caso se determinaron realizando un spot test en ágar LB por quintuplicado de cada tubo.

Protección de M1 frente a etanol, H₂O₂ y pepsina:

Se analizó si existía un efecto protector de la matriz sobre fago frente agentes desnaturalizantes diferentes a la acidez. Se probó la resistencia del fago CA933P frente a etanol 96% (v/v), al H₂O₂ y a la presencia de pepsina cuando se éste se encontraba incluido dentro de la matriz M1 (tabla 3.2, pág. 85).

Para determinar el efecto del etanol se fijó un tiempo de exposición de las esferas con fago frente a este solvente de acuerdo al resultado de la cinética de inactivación del fago sin matriz. Para esto se colocaron en tubos Eppendorf 10 esferas de la formulación M1 y se les adicionaron 0,9 ml de EtOH 96%, se mezclaron y se dejaron en contacto durante 5 minutos a temperatura ambiente, luego las microesferas se colaron, se lavaron con H₂O destilada y se pasaron a un tubo de ensayo con 10 ml de PBS.

Para analizar la actividad desnaturalizante del peróxido, a un tubo Eppendorf conteniendo 0,9 ml de una solución 25mM H₂O₂ + 2,5 mM de CuSO₄ se le incorporaron 10 esferas de la formulación M1. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos y posteriormente las esferas se colaron, se lavaron con H₂O destilada y se pasaron a un tubo conteniendo 10 ml de PBS.

En ambos ensayos, las esferas en los tubos de PBS se rompieron mecánicamente con espátula y se dejaron 1 h a temperatura ambiente. Luego se realizaron diluciones seriadas en buffer SM y se analizó el título remanente de fagos infectivos por recuento en ágar LB.

Para determinar la protección ofrecida por M1 frente a la acción de la pepsina se colocaron 10 esferas en un tubo Eppendorf ($1,56 \cdot 10^7$ UFP por microesfera) en las mismas condiciones mencionadas para la incubación del fago solo con pepsina (0,5 mg ml⁻¹ final de pepsina). Se incubó durante 10 minutos a 37°C y luego se extrajeron las esferas, se lavaron con H₂O destilada y se pasaron a tubos Eppendorf con 990 µl de buffer SM, se rompieron mecánicamente con espátula, se dejaron reposar 1 h a temperatura ambiente para permitir la difusión del fago y luego se realizaron diluciones seriadas en buffer SM y recuento de fagos por spot test en ágar LB.

Se determinó también el efecto protector de la matriz M1 sobre los fagos en las mismas condiciones de incubación con pepsina que las mencionadas anteriormente, pero incubando durante 30 min, 60 min, 90 min, 2 h y 3 h.

Por último se analizó el efecto protector de la matriz M1 por incubación durante 3 h en las mismas condiciones anteriores pero con concentraciones finales de pepsina de 1,5 mg ml⁻¹; 3,2 mg ml⁻¹ y 4,2 mg ml⁻¹. Se utilizó como control un tubo Eppendorf con solución fisiológica (NaCl 0,9% p/v) a pH 7. Se analizó el título de fagos infectivos de cada tubo después de la incubación por spot test sobre ágar LB por quintuplicado.

Cinéticas de liberación e inactivación por pH de fagos encapsulados en M1

En primer lugar se determinó el número total de fagos liberados por esfera sin ruptura mecánica de las mismas. Para esto se incorporaron 10 microesferas de M1 a 10 ml de PBS en un frasco de 50 ml, se incubó en agitación a 180 rpm en durante 20 h a 37°C y

se midió el título de fagos liberados por esfera por recuento del sobrenadante en ágar LB.

Se realizaron cinéticas de liberación de fagos de la matriz M1 a diferentes temperaturas, para esto se colocaron 20 esferas de la formulación M1 en frascos con 20 ml de PBS (pH 7,2) termostatizados a la temperatura correspondiente (19°C, 30°C ó 37°C) y se dejaron en agitación a 100 rpm a la misma temperatura. Se tomaron muestras de 0,2 ml del líquido a distintos tiempos incorporando, después de cada toma, 0,2 ml de PBS termostatizado a la temperatura correspondiente para mantener el volumen constante. Se realizaron diluciones seriadas en buffer SM de las muestras tomadas a cada tiempo y recuento en ágar LB.

Se estudió la cinética de inactivación por la acidez del fago encapsulado en M1, para esto se colocaron 10 esferas de esta formulación en tubos Eppendorf con 0,9 ml de solución fisiológica (NaCl 0,9% (p/v)) a pH 1,6. Los tubos se agitaron y se incubaron a 37°C en baño termostático. Se extrajeron pares de tubos Eppendorf a diferentes tiempos y las esferas de cada tubo se colaron, se lavaron con H₂O destilada y se pasaron a tubos con 0,9 ml de buffer SM. Las esferas se rompieron mecánicamente con espátula y se dejaron 1 h a temperatura ambiente, luego se realizaron diluciones seriadas de cada tubo en buffer SM y se analizó el título remanente de fagos infectivos por recuento en ágar LB.

Conservación de fagos

Cinética de inactivación a temperatura ambiente

Se realizó un enriquecimiento del fago CA933 en caldo LB en agitación a 37°C utilizando EHEC 933 como bacteria huésped. El lisado se filtró por membrana de 0,45 µm de poro y se colocó en un tubo de vidrio estéril. Inmediatamente después de ser filtrado y a diferentes tiempos de almacenamiento del cultivo a temperatura ambiente, se tomaron dos alícuotas de 0,1 ml cada una del lisado, se realizaron diluciones seriadas en buffer SM y recuento por el método de la doble capa en ágar LB.

Almacenamiento a largo plazo

Se analizó por recuento por el método de la doble capa en ágar LB, el título de fagos inicial y remanente después de diferentes tiempos de almacenamiento (1 año y 2 años) de dos lisados del fago CA933P, filtrados por membrana de 0,45 µm de diámetro de poro mantenidos a temperatura ambiente en tubos de vidrio estéril con tapa a rosca.

Liofilización

Para todos los ensayos de liofilización, las muestras fueron preparadas en ampollas de vidrio esterilizadas en autoclave con tapón de algodón. Las suspensiones se mantuvieron en un freezer a -80°C durante 24 h y luego fueron deshidratadas durante 48 h en un equipo de liofilización Heto FD4 (Lab Equipment, Denmark). Las ampollas extraídas del liofilizador fueron selladas a la llama y conservadas a 4°C durante el tiempo especificado en cada caso.

Para comparar el efecto protector de la sacarosa respecto a la trehalosa, se tomó un lisado del fago CA933P y se diluyó en solución fisiológica a una concentración final de $7,45 \cdot 10^9$ UFP ml^{-1} . Se adicionaron porciones de 0,4 ml de esta mezcla a cada ampolla ($2,98 \cdot 10^9$ UFP en cada ampolla) y se adicionaron 44 μl de soluciones 3M de sacarosa y 3M de trehalosa a las ampollas correspondientes. Después de la liofilización, el contenido de cada ampolla se resuspendió en 0,2 ml de solución fisiológica y se determinó el número remanente de partículas infectivas por ampolla por recuento en ágar LB.

Para todos los ensayos de análisis de la protección ofrecida durante el proceso de liofilización por sistemas simples y complejos, se adicionaron a cada ampolla 180 μl de cada uno de los sistemas a probar: buffer SM, buffer SM diluido al 10% (v/v) en agua miliQ (buffer SM 1:10), PBS, PSK, gel E1:10, E1:100, caldo LB, caldo TS, leche fluida descremada comercial estéril y pentacepa (PC), este último es un conjunto de bacterias lácticas y levaduras derivadas de kefir resuspendidas en leche descremada comercial estéril, y los cultivos fueron crecidos, mezclados y resuspendidos siguiendo un protocolo descrito previamente (Bolla et al., 2011). Para los sistemas con sacarosa se colocaron en la ampolla los volúmenes de solución de sacarosa 3M necesarios para obtener concentraciones finales (en 200 μl) de 0,1; 0,3 y 0,5M y el volumen se completó a 180 μl con PBS, buffer SM ó buffer SM 1:10, según corresponda. A todas las ampollas se les adicionaron 20 μl de lisado de fago en caldo LB filtrado, proporcionando una concentración final de $5 \cdot 10^7$ UFP por ampolla, se mezclaron y se liofilizaron. Los liofilizados se almacenaron a 4°C y a diferentes tiempos de almacenamiento se extrajeron pares de ampollas de cada condición, se resuspendieron con 0,2 ml de buffer SM cada una y se determinó el número remanente de partículas infectivas por ampolla por el método de la doble capa en ágar LB.

Congelación

Para analizar la estabilidad de los fagos durante el proceso de congelación y almacenamiento a -20°C y a -80°C , se utilizaron tubos Eppendorf con cada uno de los sistemas a probar: PBS, buffer SM, buffer SM 1:10, (los buffers se probaron con y sin el agregado de sacarosa), PSK y gel E1:10. Las muestras fueron preparadas de la misma

manera que las utilizadas para la liofilización. Los tubos de guardaron en freezers de -20°C y -80°C respectivamente y a diferentes tiempos de almacenamiento se descongelaron a temperatura ambiente y se determinó el número remanente de partículas infectivas por recuento en ágar LB.

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, y por análisis de varianza se determinó que existían diferencias significativas entre dos o más resultados, se aplicó un test de Fisher de mínima diferencia significativa ($LSD_{0,05}$) con un nivel de significación del 5% ($p < 0,05$) para determinar cuáles eran los resultados que diferían significativamente.

Aislamiento y caracterización Capítulo II

*L*os bacteriófagos son los entes biológicos más abundantes sobre la tierra, es por ello que cuando se inicia la búsqueda de nuevos bacteriófagos para ser utilizados como agentes terapéuticos, la cantidad de posibles fuentes de aislamiento a explorar es enorme y es importante escoger aquella de la que se puedan obtener los fagos con las mejores características para ese fin, por lo que el aislamiento en sí constituye la primer etapa de selección. En este trabajo se consideraron como fuentes óptimas de aislamiento las muestras provenientes del propio nicho ecológico donde quiere aplicarse el tratamiento, es decir, muestras de materia fecal vacuna o naturalmente contaminadas con ésta para el aislamiento de fagos de EHEC como potenciales agentes de biocontrol en el intestino de bovinos, ya que éstos no sólo serán infectivos para la flora bacteriana específica que se quiere eliminar, sino que también son fagos adaptados al ambiente en el que se quieren aplicar, por lo que probablemente tengan una mejor capacidad infectiva y mayor rendimiento en el ciclo lítico respecto a fagos aislados de otras fuentes

Los aislados obtenidos en este trabajo fueron caracterizados y seleccionados de acuerdo a su potencial como agentes terapéuticos para ser administrados a bovinos por vía oral. Para la caracterización se determinó la morfología de los aislados por microscopía electrónica y los perfiles de amplificación de ADN obtenidos por RAPD y rep-PCR, y la selección se llevó a cabo analizando propiedades tales como rango de huésped (siendo preferibles aquellos que presentaran rangos de huésped amplios y que en principio no resultaran infectivos para *E. coli* no patógena), tolerancia a la acidez para resistir el pasaje gastrointestinal, ausencia de amplificación por PCR de los factores de virulencia o de los genes del mecanismo de lisogenia normalmente encontrados en fagos de EHEC y eficiencia en la infección (a través del tamaño de las placas de lisis). Se analizó también el efecto del uso de fagos sobre cultivos de células eucariotas de la línea Hep-2 (células epiteliales derivadas de carcinoma laríngeo) frente a la infección de EHEC.

Aislamiento

Se obtuvo un total de 20 fagos aislados que fueron nombrados de acuerdo a la muestra de la que fueron obtenidos: CA, CB, CC para las diferentes muestras de carne picada, CH para la muestra de chorizo de cerdo y MFA, MFB y MFC para las muestras de materia fecal vacuna, y un número identificando el aislado de STEC/EHEC con el que se enriquecieron. Para fagos aislados de la misma placa en el primer enriquecimiento se añadió una letra final que refiere a la característica de la placa de lisis: D para placas *difusas*, N para placas *nítidas*, H para placas con un *halo* alrededor y P para placas *pequeñas*. Por ejemplo, el fago denominado CA933P fue aislado de la muestra A de carne picada, con la cepa de EHEC 933 y se aisló de una placa pequeña. Los aislados obtenidos se listan en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1 Fagos aislados

Nombre del aislado	Cepa huésped del enriquecimiento
CHA60, CB60P, CB60H, MFA60D, MFA60N	Aislado clínico 69160 (O157:H7)
CA911, MFA911	Aislado clínico 68911 (O157:H7)
MFA45D, MFA45N	Aislado clínico 71945 (O157:H7)
CA933N, CA933P, CA933D, MFA933H, MFA933P	Aislado clínico 933 (O157:H7)
CBO103, CCO103	Aislado clínico 646/03 (O103:H2)
CBO113, CCO113	Aislado clínico 870/02 (O113:H21)
CCO26, MFCO26	Aislado de alimento CIDCA1 (O26:H11)

Rango de huésped

Los fagos seleccionados como agentes terapéuticos de STEC y EHEC deben ser inocuos para las cepas de *E. coli* no patogénicas, ya que de lo contrario, su administración a bovinos resultaría en un desbalance de su flora intestinal normal (Tanji et al., 2005). A fin de descartar rápidamente aislados de fagos capaces de infectar a *E. coli* no patogénica se realizó un spot sobre las cepas WG5 y ATCC 25922. A los aislados de fago incapaces de infectar estas cepas se les realizó un ensayo de rango de huésped sobre la cepa EDL 933 (cepa modelo de EHEC) y sobre todos los aislados Gram-negativos listados en la Tabla 1. El rango de huésped de los fagos sobre los patógenos de la tabla 1 se ensayó por dos técnicas diferentes, por la técnica de “spot” de fagos sobre el césped bacteriano y por la técnica de “streak” que consiste en hacer estrías de la bacteria a testear sobre ágar blando con el fago a estudiar incorporado. Los resultados dudosos o que presentaron discrepancia entre los dos métodos utilizados se confirmaron por siembra de diluciones seriadas del fago sobre ese huésped y determinación de la aparición de placas de lisis aisladas.

Se observó una discrepancia en el 16% de los resultados obtenidos por los métodos de “streak” y de “spot”, el 11% de éstas resultaron en la inhibición del crecimiento bacteriano por la técnica de “streak” y no inhibición del crecimiento por “spot”. La mayoría de los resultados obtenidos por la técnica de spot fueron los que se confirmaron por detección de placas aisladas sembrando diluciones del fago, lo que indicaría que la técnica de “spot” da resultados más fiables que el “streak”. Esta alta proporción de resultados no congruentes también fue observada por Muniesa et al. (2003b) quienes, a pesar de esto, consideran que esta técnica es de mucha utilidad, principalmente porque es rápida y pueden testearse un gran número de cepas utilizando un número relativamente pequeño de placas de Petri, lo que simplifica considerablemente los ensayos. Debe destacarse, sin embargo, que sólo puede utilizarse en forma cualitativa para comparar la amplitud en el rango de huésped de diferentes fagos, pero no aseverarse la capacidad o incapacidad de infectar determinadas cepas.

Uno de los puntos discutibles de la técnica de “streak” es el hecho de que una cepa sensible al fago, pero con un alto porcentaje de resistentes, aparecerá como una zona de disminución de la turbidez en el césped bacteriano por la técnica de spot pero se verá crecimiento de la bacteria por “streak”, lo que daría un falso negativo por esta última técnica. El otro punto es que la técnica de “streak” requiere concentraciones altas de fagos dentro del ágar y esto puede generar falsos positivos debido a la aparición de *lisis desde afuera*, sobre todo en la segunda y tercer estría donde la MDI es cada vez mayor, mientras que por spot puede utilizarse un número relativamente bajo de fagos para el ensayo, e incluso utilizando lisados de fagos del orden de 10^9 UFP

ml^{-1} (aproximadamente 10^7 UFP en la gota de $10 \mu\text{l}$), se obtiene una $\text{MOI} \leq 1$ en el volumen de ágar ocupado por la gota.

En los ensayos de rango de huésped sobre las cepas de *E. coli* no patogénica se observó que ninguno de los aislados de fago fue capaz de infectar a la cepa ATCC 25922 pero los aislados CHA60, CCO26, MFCO26 y MFA911 fueron infectivos para la cepa WG5 y por lo tanto se excluyeron de los ensayos de selección posteriores. Este tipo de fagos, sin embargo, podría ser utilizado en aplicaciones tales como descontaminación de superficies o como aditivos de alimentos (Kudva *et al.*, 1999, O'Flynn *et al.*, 2004) o en el tratamiento de infecciones superficiales (O'Flaherty *et al.*, 2009), donde la perturbación de bacterias relacionadas con STEC y EHEC no es un problema.

Para todos los demás fagos se ensayó el rango de huésped sobre todos los aislados Gram-negativos listados en la tabla 1. Los resultados de los ensayos de rango de huésped se resumen en la Tabla 2.2, los (+) representan lisis total, las (T) lisis turbia confirmada por spot de diluciones seriadas del fago y los (-) los casos en que no se observó lisis o en los que la depresión en la densidad de la pátina bacteriana sobre la gota dio un resultado negativo en el aislamiento de placas de lisis por siembra de diluciones seriadas, también se detalla el número de cepas sensibles a cada fago y el número de serotipos diferentes que es capaz de infectar cada uno. Los serotipos O111:NM, O145:NM, O8:H19, O161:H2, O20:H19, O15:H27 y O146:H28 de STEC y los aislados diferentes a STEC y EHEC (excepto *Shigella* y *Pseudomonas*) fueron excluidos de la tabla 2.2 porque ninguno de los fagos aislados fue capaz de infectarlos.

Tabla 2.2 Rango de huésped

Cepas	Fagos de O157												Fagos de no-O157				
	CB60P	CA933P	CA911	MFA933H	CA933D	CA933N	MFA45D	CB60H	MFA60D	MFA60N	MFA45N	MFA933P	CBO103	CBO113	CCO103	CCO113	
O157:H7	EDL 933	T	-	-	-	-	-	-	+	+	T	+	-	-	-	-	-
	69160	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	933	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	68911	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	71945	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	474	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	T	-	-	-	-
	476	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	537	T	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	448	T	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	T	T	-	-
	466	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
O113:H21	870/02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	T	+	+
	889/06	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	370/02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
O103:H2	646/03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	T	+	+
	118/05	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
O145:H25	14/00	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	485/03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
O26:H11	CIDCA1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	395/06	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	T	-	T
O13:H6	654/04	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-
O174:H28	257/03	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-
	439/04	T	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-
O22:H16	412/03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	238/04	T	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ONT:H12	456	T	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>Sh. flexneri</i> 2	48	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Sh. flexneri</i> 3	2013	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2019	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Sh. sonnei</i>	47	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EIEC	202	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>Ps. aeruginosa</i> n°serotipos infectados	-	-	T	-	T	+	+	+	+	+	+	+	T	-	-	+	+
n° cepas infectadas	-	5	4	6	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	4	3
	-	12	11	14	9	9	9	9	10	10	10	10	9	2	3	4	3

El signo (+) representa lisis total, (T) que la lisis es turbia, y (-) que no hay lisis

Los datos de la tabla 2.2 muestran que los fagos aislados utilizando EHEC O157:H7 como bacteria huésped (fagos de O157) tienen en su mayoría rangos de huésped muy estrechos y casi idénticos, excepto para el caso de los fagos CB60P, CA911 y CA933P. Los rangos de huésped de los fagos de no-O157 también son similares entre sí e incluyen serotipos de STEC como O26:H11 y O113:H21 que no son infectados por los fagos de O157. El rango de huésped más amplio de STEC y EHEC se observó para el fago CA911 que fue capaz de infectar un total de 14 cepas de 6 serotipos diferentes. Los fagos CB60P y CA933P también exhibieron rangos de huésped amplios y este último fue el único fago de O157 capaz de infectar el serotipo O13:H26 y el único de todos los fagos aislados capaz de infectar *Shigella flexneri* 2 y *Shigella flexneri* 3.

De todos los patógenos Gram negativos analizados diferentes a *E. coli*, sólo se observó infección por parte de algunos fagos sobre *Shigella* (género estrechamente relacionado con EIEC), y sobre *Pseudomonas aeruginosa*, la cual fue sensible a muchos de los fagos aislados (*Myoviridae* y *Podoviridae*) y en casi todos los casos se observaron zonas de lisis muy claras por spot sobre esta bacteria. La existencia de fagos capaces de infectar *Ps. Aeruginosa* y *E. coli* ya se ha reportado anteriormente (Jensen et al., 1998). Los fagos capaces de infectar géneros diferentes de *E. coli* pueden ser útiles para eliminar otros patógenos además de STEC y EHEC, pero se debe considerar que los fagos con baja especificidad de infección pueden ser infectivos para otras bacterias que no se quieren alterar y que no hayan sido tenidas en cuenta en los ensayos de rango de huésped.

Los fagos CBO103, CBO113, CCO103, CCO113 y CB60P exhibieron, sobre la mayoría de las cepas testeadas, zonas de lisis muy turbias en los ensayos de spot. Esto puede deberse a dos motivos: o bien los fagos tienen un comportamiento lisogénico sobre ciertas cepas, o esas cepas exhiben un alto porcentaje de bacterias resistentes a la infección por estos aislados.

Los rangos de huésped más amplios se obtuvieron para los aislados CA911 (*Myoviridae*) y CA933P (*Podoviridae*), y este último, además de STEC y EHEC, fue capaz de infectar a patógenos de otros géneros (*Shigella flexneri* y *Pseudomonas aeruginosa*)

Morfología de los aislados

Se analizó la morfología de los fagos aislados por microscopía electrónica de transmisión y los fagos se clasificaron taxonómicamente por familias de acuerdo a las reglas propuestas por el International Committee on Taxonomy of Viruses (2000).

En la figura 2.1 se muestran las diferentes morfologías observadas y el tamaño promedio de partícula para cada uno de los fagos. Las imágenes corresponden al primer fago listado a la derecha de cada fotografía. Se analizaron todos los fagos

seleccionados por rango de huésped (no infectivos para *E. coli* WG5), y el fago MFA911. No pudieron obtenerse imágenes de los otros 3 fagos infectivos para WG5.

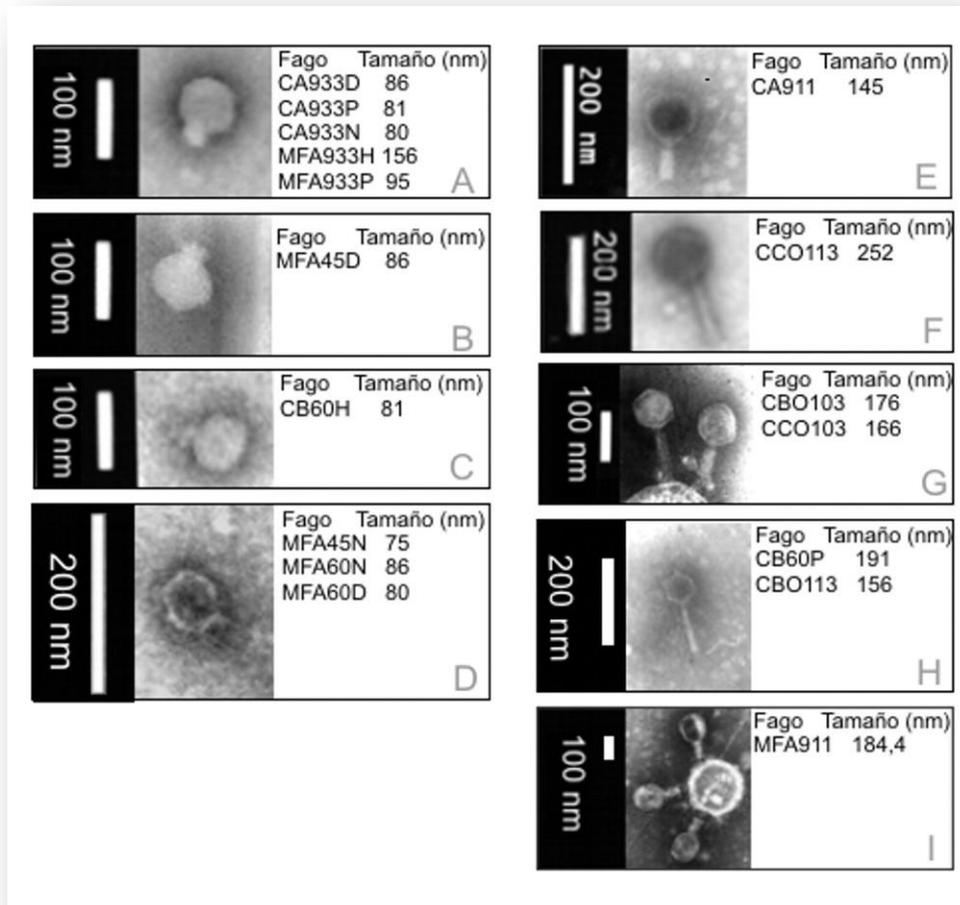


Figura 2.1 A-I Morfologías observadas para los diferentes aislados. Las fotografías corresponden al primer aislado mencionado para cada morfología.

Todos los fagos aislados pertenecen al orden de los *Caudovirales* (fagos con cola): 10 aislados pertenecen a la familia *Podoviridae* (cápside con simetría icosaédrica, cola corta y rígida) morfotipo C1 (cabeza isométrica) (Ackermann, 2001). Se observan cuatro morfologías diferentes (Fig. 2.1 A-D). Los otros 7 aislados pertenecen a la familia *Myoviridae* (cápside con simetría icosaédrica, cola rígida y contráctil), 6 de los aislados presentan el morfotipo A1 (cabeza isométrica) con cuatro morfologías diferentes (fig. 2.1 E-H), y el quinto aislado, MFA911, pertenece al morfotipo A2 (cabeza elongada, relación largo/ancho de la cápside: 1,3-1,8) fig. 2.1 I.

Todos los fagos de no-O157 analizados pertenecen a la familia *Myoviridae* y la mayoría de los fagos de O157, a la familia *Podoviridae*; dentro de estos últimos, resulta

llamativo el hecho de que todos los fagos obtenidos utilizando el aislado 933 de EHEC O157:H7 como huésped comparten la misma morfología, aunque con diferentes tamaños de partícula, a pesar del hecho de haber sido aislados de diferentes fuentes (figura 2.1 A).

Análisis genómico

Se analizaron dos aspectos del genoma de los fagos que no fueron infectivos para *E. coli* WG5. El primero fue la selección en base a la detección de los genes *stx1* y *stx2* que codifican para las toxinas Shiga 1 y 2 respectivamente, y que son los genes de virulencia más frecuentemente hallados entre los fagos de STEC y EHEC, y del gen *ci* que codifica para la proteína represora CI del fago λ , a fin de descartar en forma preventiva aquellos aislados que resulten positivos para la amplificación cualquiera de estos genes. El segundo aspecto fue la caracterización a través del análisis y comparación de los perfiles genómicos de los fagos obtenidos por las técnicas de RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) y rep-PCR (repetitive sequence-based polymerase chain reaction).

Como ya se ha mencionado en la introducción, las toxinas Shiga presentes en STEC y EHEC están codificadas por profagos insertos en el genoma de la bacteria; estos profagos son *lamboides*, es decir que la morfología y la estructura genética de las partículas de fago libres son similares a las del fago λ . El fago λ es un fago temperado y requiere, para comenzar y para mantener el ciclo lisogénico, de la presencia de la proteína represora CI, codificada en el gen *ci* del genoma del fago, que reprime la transcripción de los genes tardíos responsables del ciclo lítico. El mecanismo de selección del fago λ que define el ciclo reproductivo a seguir (lítico o lisogénico) se describe en detalle en la introducción general (ver la sección “Fago λ : regulación de los ciclos lítico / lisogénico”). Aunque CI no es el único factor involucrado en el desarrollo del ciclo lisogénico, es indispensable para que éste se produzca, y por este motivo se analizó también la presencia del gen *ci* en los aislados de fago seleccionados a fin de determinar si existe un indicio de la capacidad de éstos de entrar en el ciclo lisogénico a través del mecanismo utilizado por el fago λ .

Por otro lado, debido a que los huéspedes con los que se propagaron los fagos aislados codifican para *Stx1* o *Stx2* (o para ambas), y para CI, cualquier contaminación del ADN de fago con ADN cromosomal de la bacteria huésped daría un falso positivo en la detección de los genes *stx* y *ci*. Para controlar la ausencia de ADN cromosomal, los ADN de los fagos se utilizaron como moldes para la amplificación por PCR del promotor del gen *luxS* con primers específicos (Robles Luna, 2009). *LuxS* es una proteína involucrada en el sistema de señalización que regula la síntesis de autoinductor 2 (AI2) en el proceso de “quórum sensing”, y está presente en diversas bacterias Gram-positivas y

Gram-negativas (incluidas STEC y EHEC), y conservada con un alto grado de homología (Donnenberg, 2002). Como el gen *luxS* es específico de bacterias, y la amplificación por PCR con el primer utilizado tiene una alta sensibilidad de detección, la ausencia de amplificación se considera ausencia de contaminación detectable de ADN cromosomal.

Determinación de los genes stx1, stx2 y cl por PCR

Para la amplificación del gen *luxS* en las condiciones antes mencionadas, se determinó que el número mínimo de ciclos de amplificación necesarios para la detección de una banda nítida con una concentración de ADN molde de EHEC EDL933 de $0,3 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ fue de 24. Utilizando este número de ciclos se analizó la presencia de bandas para todos los ADN de fagos ($3 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$). Todos los fagos resultaron negativos para la amplificación de *luxS*.

De todos los fagos ensayados, 5 resultaron positivos en la amplificación de los genes *stx1* o *stx2*, como se muestra en la figura 2.2 A. Los fagos que mostraron amplificación del gen *stx2* fueron tres de los cuatro fagos propagados usando el aislado 69160 de EHEC O157:H7 como huésped, y los únicos positivos para esta toxina. Los fagos que amplificaron *stx1* fueron ambos propagados utilizando el aislado 646/03 de EHEC serotipo O103:H2.

La amplificación del gen *cl* fue positiva para los fagos CBO103 y CCO113 (Fig. 2.2 B), en la misma figura se muestra la amplificación mostrada por los aislados bacterianos utilizados como huéspedes para los fagos analizados. La amplificación, en todos los casos, corresponde al fragmento de 511 pb esperado de acuerdo a la posición de los primers dentro de la secuencia gen *cl* del fago 933W sobre la que fueron diseñados, excepto para el aislado bacteriano 933 de EHEC O157:H7 que amplificó un fragmento de mayor tamaño.

Los resultados de las reacciones de amplificación de *cl*, *stx1* y *stx2* se resumen en la tabla 2.3.

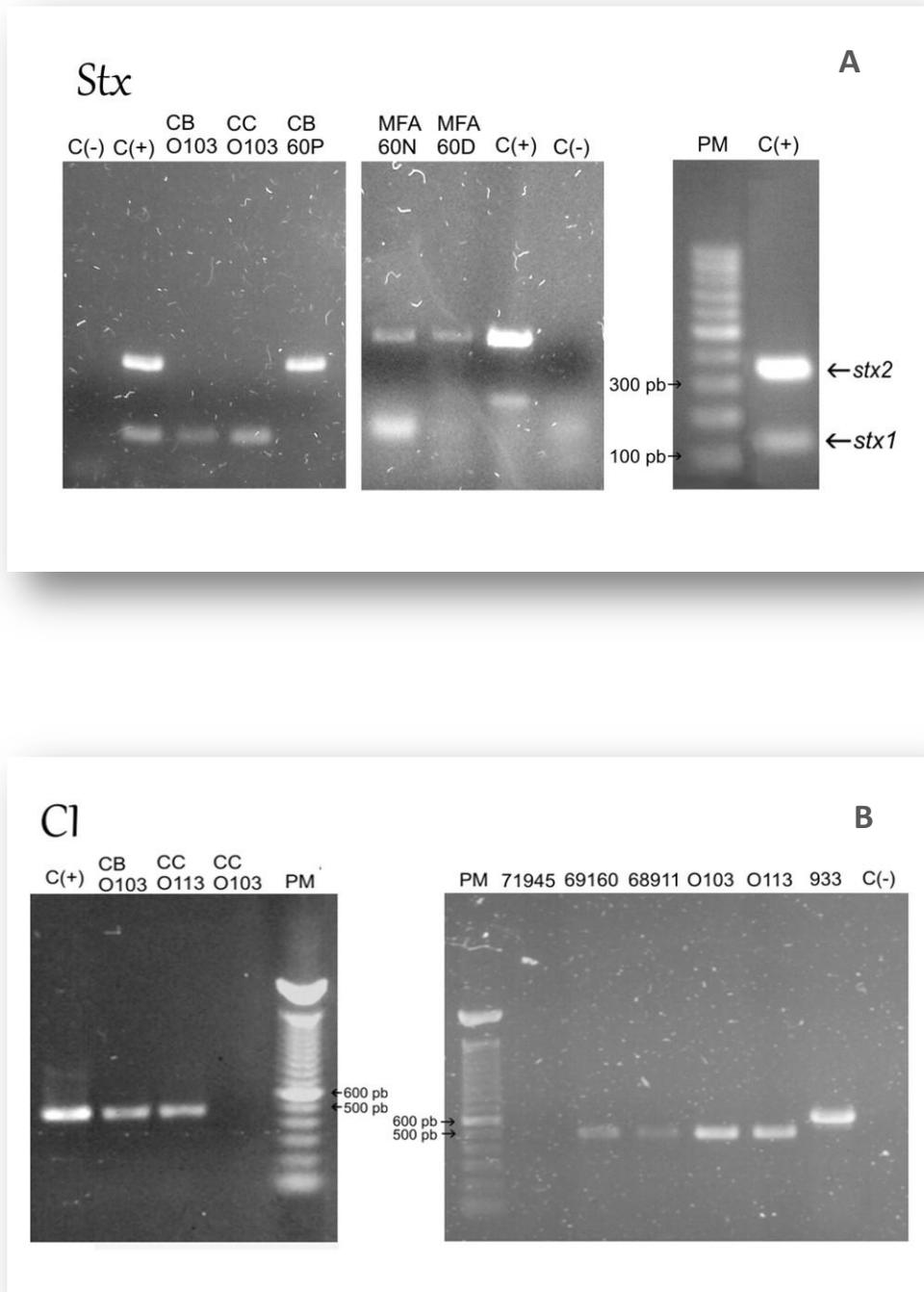


Figura 2.2 Fotografías de las bandas obtenidas por amplificación por PCR de los genes: *stx1* y *stx2* (A) y *cl* (B) y electroforesis en geles de agarosa. Los nombres de las calles corresponden a los nombres del fago o aislado bacteriano que se analiza y PM es el marcador de peso molecular (100 bp ladder, Invitrogen, Argentina). El control positivo C (+) corresponde a la amplificación utilizando como molde el ADN de la cepa EDL933 de EHEC O157:H7, y C(-) es el control negativo de amplificación que corresponde a la reacción sin el agregado de ADN molde.

La amplificación de los genes *stx* y *cl* reveló que todos los fagos positivos para *stx1* y/o *cl* fueron fagos de no-O157 pertenecientes a la familia *Myoviridae*, y los positivos para *stx2* fueron fagos de O157 (uno perteneciente a la familia *Myoviridae* y dos a la familia *Podoviridae*) todos aislados con el mismo huésped. Se había reportado en trabajos anteriores la presencia de los genes *stx1* y *stx2* en fagos de ambas familias (Willshaw *et al.*, 1987, Muniesa *et al.*, 2000, Allison *et al.*, 2003, Muniesa *et al.*, 2003a, Muniesa *et al.*, 2004a, Muniesa *et al.*, 2004b, Garcia-Aljaro *et al.*, 2006). Todos los fagos positivos para *stx* o *cl* están contraindicados para cualquier tipo de terapia con fagos ya que representan un riesgo por la posibilidad de traspasar genes por transferencia horizontal (Brussow, 2005, Kropinski, 2006, Parisien *et al.*, 2008), y aunque la amplificación o no amplificación de determinado gen por PCR no es una prueba absoluta de la presencia o ausencia de dicho gen en el ADN del fago, es un buen método de selección rápida de fagos aptos como agentes terapéuticos, siendo la secuenciación total del ADN del fago el paso final obligatorio antes de su implementación en fagoterapia (Brussow, 2005, O'Flaherty *et al.*, 2009).

Perfiles genómicos por RAPD y rep-PCR

Los diferentes perfiles genómicos obtenidos por RAPD y rep-PCR con cada uno de los primers ensayados se muestran en la figura 2.3. Se asignó una letra (que aparece sobre las calles de las corridas en la figura 2.3) a cada uno de los perfiles diferentes obtenidos con cada uno de los primers, y en la tabla 2.3 se muestran los fagos agrupados de acuerdo al conjunto de perfiles de RAPD y rep-PCR que exhibieron, y dentro de cada grupo se detalla la morfología y el resultado obtenido en la amplificación de *stx1*, *stx2* y *cl* de cada aislado. Los fagos que conforman el grupo I son fagos de O157 cuya serie de perfiles tienen poca o ninguna similitud entre sí o con miembros de los otros grupos. Dentro de este grupo, el fago CB60P en particular, tiene perfiles RAPD y ERIC1R no sólo diferentes a los de otros fagos O157 sino que además son únicos respecto a los perfiles obtenidos con todos los demás fagos. Los miembros del grupo II son fagos de O157 que producen perfiles de amplificación idénticos con los primers RAPD6, RAPD10 y ERIC1R, y dentro de este grupo, los fagos propagados con el aislado 933 de O157:H7 (resaltados en gris en la tabla 2.3) tienen también perfiles BOXA1R idénticos, difiriendo algunos sólo en los perfiles obtenidos con el primer RAPD9, estos resultados concuerdan con las similitudes observadas en la morfología de los mismos por microscopía electrónica (fig. 2.1 A). El grupo III contiene fagos aislados con huéspedes de serotipos O103:H2 y O113:H21 (fagos de no-O157), sus perfiles son similares entre sí (aunque con menor homología que los del grupo II) y diferentes a los de los fagos de O157.

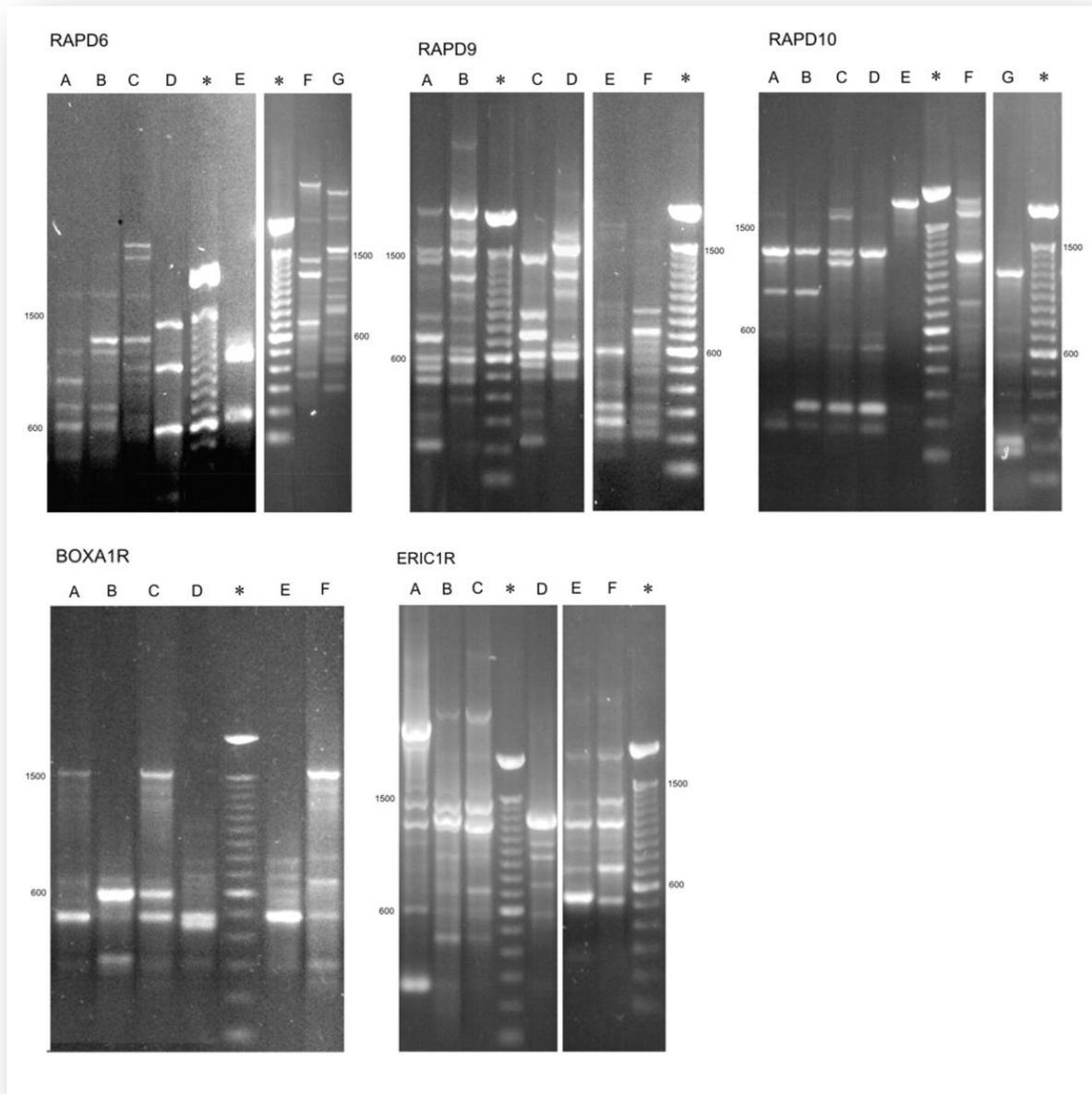


Figura 2.3 Las líneas A-F corresponden a los diferentes patrones de amplificación obtenidos para los fagos seleccionados por RAPD y rep-PCR con los primers especificados en cada caso. Los * corresponden al marcador de peso molecular (100 bp ladder, Invitrogen, Argentina).

Tabla 2.3 Resultados de la caracterización de fagos por PCR

Group	Fago	<i>stx</i>	<i>cl</i>	RAPD 6	RAPD 9	RAPD 10	ERIC1R	Box-A1R	Familia	
I	CB60P	<i>stx2+</i>	-	F	C	F	D	B	M	
	CA911	-	-	-	A	G	B	B	M	
	MFA45N	-	-	A	B	A	A	C	P	
	MFA45D	-	-	B	B	B	A	A	P	
	MFA60D	<i>stx2+</i>	-	C	A	C	B	B	P	
II	MFA60N	<i>stx2+</i>	-	G	B	D	C	C	P	
	CB60H	-	-	G	B	D	C	A	P	
	MFA933H	-	-	G	D	D	C	F	P	
	MFA933P	-	-	G	B	D	C	F	P	
	CA933N	-	-	G	D	D	C	F	P	
	CA933P	-	-	G	B	D	C	F	P	
	CA933D	-	-	G	B	D	C	F	P	
	III	CCO113	-	+	E	F	E	E	E	M
		CBO113	-	-	D	E	E	F	D	M
		CBO103	<i>stx1+</i>	+	-	F	E	E	D	M
CCO103		<i>stx1+</i>	-	E	-	E	E	-	M	

Resultados de la amplificación de *stx* y *cl* por PCR y de los perfiles obtenidos por RAPD y rep-PCR mostrados en la figura 2.3. El signo (-) representa que no hay amplificación. Familias: (M) *Myoviridae*, (P) *Podoviridae*. Todos los fagos resaltados en gris tienen la misma morfología y difieren sólo en sus perfiles RAPD9.

Las diferencias observadas en los perfiles de los fagos de O157 respecto a los de no-O157 se corresponden con las diferencias obtenidas en los rangos de huésped, ya que, como se ha visto previamente, los serotipos infectados por los fagos del grupo III difieren considerablemente de aquellos en los que hacen blanco los fagos de O157.

Puede observarse también que la clasificación realizada se ve reflejada en los perfiles obtenidos con el primer RAPD10, que muestran un patrón característico para los miembros del grupo II y otro para los del grupo III, mientras que los fagos del grupo I muestran una diversidad total en los perfiles amplificados con este primer.

Para los 16 aislados seleccionados se observó que los perfiles obtenidos con los primers RAPD6 y RAPD10 fueron similares en número de bandas y capacidad de diferenciación que aquellos obtenidos por rep-PCR, pero la amplificación con el primer RAPD9 produjo perfiles con un mayor número de bandas y fue el único que permitió diferenciar algunos de los fagos aislados con EHEC 933, los cuales son todos fagos de O157 con la misma morfología de partícula.

Como ya se había mencionado en trabajos anteriores, RAPD resultó ser una técnica reproducible y muy sencilla de diferenciación entre fagos específicos de determinada bacteria huésped (Perez *et al.*, 1998, Barrangou *et al.*, 2002, Shivu *et al.*, 2007), y representa una ventaja al momento de trabajar con un número grande de aislados en tiempo de análisis y preparación de las muestras respecto a la obtención de perfiles genómicos utilizando enzimas de restricción, lo cual requiere altas cantidades de ADN muy puro y tiene, en muchos casos, la limitación de no poder utilizarse para fagos cuyo ADN está metilado.

En este trabajo se propuso por primera vez el uso de rep-PCR como complemento de los perfiles obtenidos por RAPD (Dini & De Urraza, 2010). El uso conjunto de ambas técnicas de amplificación proporcionó mejores herramientas para la diferenciación entre aislados, ya que al análisis de la discrepancia de los perfiles obtenidos con diferentes primers se suman las diferencias que se presentan entre diferentes técnicas de amplificación. Debe tenerse en cuenta que para obtener resultados consistentes (en tamaño, número e intensidad de las bandas obtenidas) para un fago y comparables entre fagos, deben mantenerse todas las condiciones constantes en los diferentes ensayos y esto incluye la cantidad de ADN molde utilizado; por este motivo la cantidad de ADN utilizada fue estandarizada para todas las muestras en este trabajo.

Morfología de las placas de lisis

Se analizó el tamaño y morfología de las placas de lisis obtenidas en diferentes medios de cultivo, el efecto de la adición de CaCl_2 en cada uno de estos aspectos y la aparición de cambios en la morfología de las placas en el tiempo.

El crecimiento de los fagos en medios semisólidos puede considerarse como una aproximación de la capacidad de éstos de esparcirse en medios naturales estructurados, tales como biofilms, mucosas, etc, donde las bacterias se encuentran inmersas en la matriz, en un orden determinado o al azar, con una capacidad de movimiento limitada (Abedon & Culler, 2007a, Abedon, 2008). Esta capacidad de propagación se ve reflejada en el tamaño de las placas de lisis, ya que un gran tamaño de placa puede deberse a una o varias de estas características: una buena capacidad de difusión del fago en medio semisólido, buena capacidad de adhesión a la bacteria huésped, un gran tamaño de explosión (liberación de un gran número de partículas de fago por cada bacteria infectada), o un tiempo de latencia corto (rápida liberación de la progenie) (Abedon, 2008). Cualquiera de estas características es deseable en fagos a ser utilizados como agentes terapéuticos, por este motivo se analizó el tamaño de las placas de lisis en diferentes medios *in vitro* como una medida de la capacidad de cada uno de los fagos de propagarse *in vivo* en un medio estructurado, tal como el epitelio intestinal de los rumiantes, y alcanzar más rápidamente a las bacterias huésped (STEC y/o EHEC) que se encuentran adheridas al epitelio (Moxley, 2004, Abedon & Culler, 2007b). Debe tenerse en cuenta que para que la comparación sea válida deben mantenerse constantes parámetros como el espesor de la capa de ágar, el huésped y las condiciones de crecimiento (temperatura, tiempo de incubación de las placas, concentración inicial de bacteria huésped, etc.).

Por otro lado se analizó el efecto de la adición de CaCl_2 al medio de cultivo porque se ha descrito que la adhesión de algunos fagos a la bacteria huésped (como el fago P1) es dependiente de la presencia de pequeñas cantidades del ion Ca^{+2} (Birge, 2006). El efecto de la adición de un cofactor que facilite la adsorción del fago al huésped debería generar un aumento en el número de bacterias infectadas, una mayor cantidad de progenie de fagos, y por lo tanto, un mayor tamaño de las placas de lisis.

El último aspecto analizado fue la aparición de halos alrededor de las placas de lisis. Estos halos son zonas claras alrededor de las placas de lisis cuya aparición se atribuye a la difusión de depolimerasas que rompen la cápsula de las bacterias disminuyendo la opacidad del césped bacteriano (Bessler *et al.*, 1975, Kwiatkowski *et al.*, 1982, Tomlinson & Taylor, 1985, Hughes *et al.*, 1998). La formación de halos es una característica deseable en fagos elegidos como agentes terapéuticos ya que en patógenos como STEC y EHEC, la cápsula está descrita como un factor de virulencia (Russo, 2002) y se ha reportado que incrementa la adhesión de la bacteria a determinadas superficies (Hassan & Frank, 2004, Sharma *et al.*, 2005). Se analizó

cualitativamente el tamaño del halo obtenido en los diferentes medios de cultivo a fin de seleccionar aquellos fagos que generen el mayor tamaño de halo en los medios ensayados.

Los tamaños de placa promedio obtenidos para cada fago en cada uno de los medios se muestran en la tabla 2.4. Los fagos que mostraron placas de lisis significativamente más grandes ($p < 0,05$) entre aquellos aislados utilizando el mismo huésped aparecen marcados en negrita en la tabla 2.4. Los fagos de no-O157: CCO103, CCO113, CBO103 y CBO113 y el fago CB60P, todos pertenecientes a la familia *Myoviridae*, se omitieron en la tabla 2.4 debido a que formaron placas de lisis diminutas en todos los medios ensayados. Este tipo de placas puede ser el resultado de períodos de latencia muy largos, tamaños de explosión pequeños y/o baja tasa de adsorción de los fagos a la bacteria huésped (Abedon, 2008) o puede indicar que se trata de fagos temperados. Esta última posibilidad concuerda con el hecho de que los spots realizados para determinar rango de huésped estos fagos mostraron zonas de lisis turbias en casi todos los huéspedes testeados (Guttman et al., 2005), y cuatro de ellos resultaron positivos en la amplificación de *stx* y/o *cl*. Independientemente de cuál sea el motivo, todas estas características resultan indeseables para fagos que van a utilizarse como agentes terapéuticos, y por lo tanto fueron excluidos de las caracterizaciones posteriores.

No se observaron diferencias en el tamaño ni en la morfología de las placas de lisis con el agregado de CaCl_2 por lo que se concluye que ninguno de los fagos es dependiente del ion Ca^{+2} para la adsorción al huésped.

Entre los fagos propagados utilizando el aislado 69160 de EHEC O157:H7, se observó que los fagos MFA60D y CB60H generan placas de lisis significativamente mayores ($p < 0,05$) que MFA60N en los 3 medios analizados. Entre los fagos de la cepa 933, el fago CA933P formó placas significativamente más grandes que el resto en ágar TS, mientras que los fagos MFA933H y MFA933P (aislados de materia fecal vacuna) mostraron placas significativamente mayores que los fagos aislados de carne en ágar LB. El fago CA911 no se comparó con ningún otro por ser el único de los fagos seleccionados por rango de huésped que fue aislado con la cepa 68911 de O157:H7.

Todos los fagos formaron halos en ágar N y mostraron un gran aumento en el tamaño de los halos después 72 h a temperatura ambiente (figura 2.4), excepto el fago MFA60N que mostró un crecimiento notablemente menor al resto de los fagos. En ágar TS se observó un crecimiento moderado de los halos alrededor de las placas de lisis en todos los fagos de 933 (fig. 2.4). Los únicos fagos que formaron halos en ágar LB fueron aquellos aislados de la cepa 71945, y mostraron un crecimiento moderado de los mismos después de 72 h a T ambiente.

Tabla 2.4 Tamaño de placa promedio en diferentes medios

Fago	Huésped	Tamaño de placa (mm)		
		N	TS	LB
CA911	68911	4,1 **	3,9	3,5
MFA45N	71945	4,7 **	3,5	3,8 *
MFA45D		5,0 **	2,9**	3,4 *
MFA60D	69160	4,9 **	4,0	4,6
MFA60N		2,4 *	2,4	3,0
CB60H		4,6 **	4,1	4,8
MFA933H	933	4,5 **	4,3 *	4,2
MFA933P		4,6 **	4,1 *	4,1
CA933N		4,7 **	4,3 *	3,7
CA933P		4,8 **	5,8 *	3,1
CA933D		5,5 **	4,8 *	3,6

Los valores resaltados en negrita corresponden a los tamaños de placas significativamente mayores ($P < 0,05$) entre aquellos obtenidos con los distintos fagos aislados con el mismo huésped y en el mismo medio. *Crecimiento moderado del halo después de 72 h a Tamb, **gran aumento del tamaño de halo después de 72 h a Tamb.

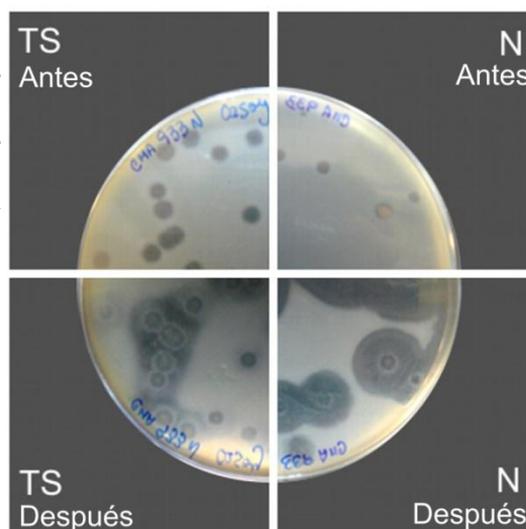


Figura 2.4 Placas de lisis del fago CA933N en ágar TS y ágar N antes y después de 72 h a temperatura ambiente. En TS se observa un crecimiento moderado del halo y en N un gran incremento en el tamaño del halo después de 72 h (como se describe en la Tabla 5). Cada par de cuadrantes “antes y después” son imágenes especulares de la misma placa de ágar.

Entre los fagos de EHEC 933 se observa un crecimiento similar del halo en cada uno de los medios utilizados independientemente de cuál es el fago analizado. Asimismo, es notorio el hecho de que sólo los fagos de EHEC 71945 fueron capaces de formar halos en medio LB, lo que sugiere que estos resultados pueden deberse a diferencias en el crecimiento de las bacterias en los diferentes medios analizados y no a diferencias entre los fagos que las infectan.

Para determinar si las diferencias observadas en el tamaño de halo entre los diferentes medios se corresponden con una diferencia en la cantidad de cápsula generada por las bacterias en cada medio, se realizó una tinción negativa de los huéspedes crecidos en LB, TS y N.

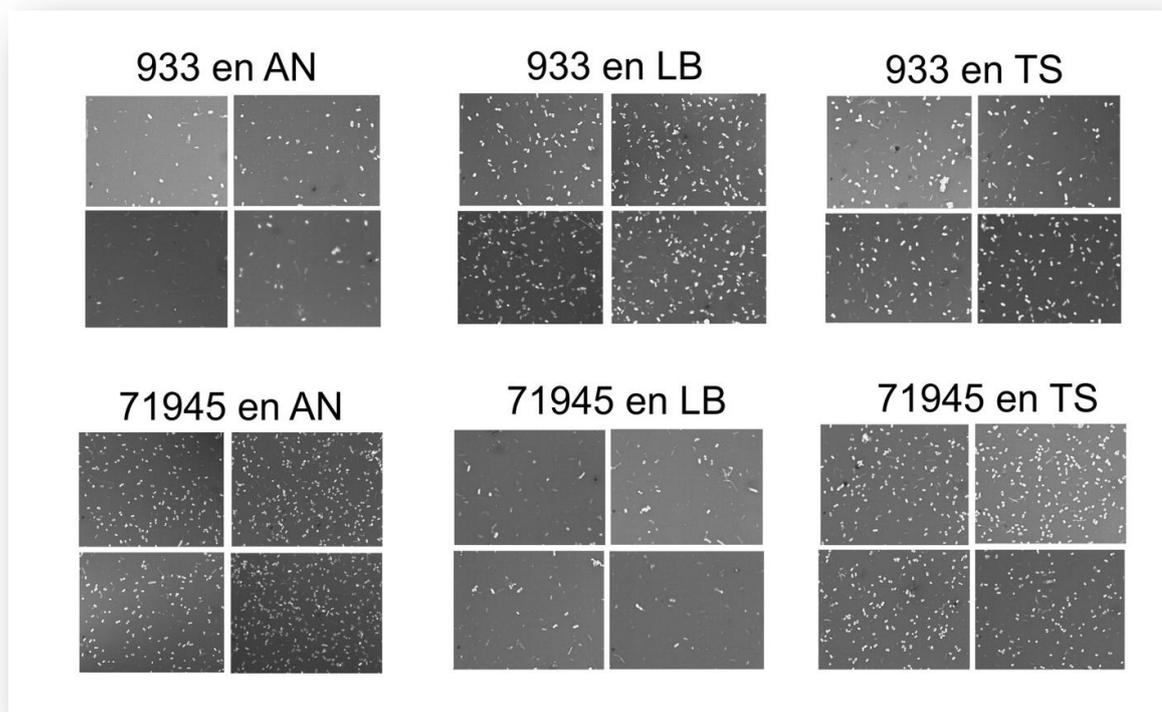


Figura 2.5 Tinción negativa con nigrosina de los aislados 933 y 71945 de EHEC O157:H7 crecidos en ágar nutritivo (AN), ágar Luria Bertrani (LB) y ágar tiptona soja (TS). Se muestran cuatro campos de observación por microscopía óptica para cada una de las condiciones ensayadas.

En la figura 2.5 se observan fotografías de cuatro campos de cada una de las bacterias en los diferentes medios. La cápsula se observa como una envoltura blanco brillante alrededor de las bacterias, las bacterias sin cápsula o con cápsulas tan finas que no pueden ser observadas por microscopía óptica se ven de un blanco-grisáceo opaco.

En la tinción negativa de EHEC 933 puede observarse en forma cualitativa una mayor producción de cápsula en medio LB, algo menos en TS y prácticamente no se ve cápsula en N, estos dos últimos resultados concuerdan con lo observado en medio líquido por Hassan y Frank (2004) para un aislado de *E. coli* O157:H7. Sin embargo, esta observación no se extendió al aislado 71945 de EHEC O157:H7, que mostró un comportamiento diferente respecto a la cantidad de cápsula observada por tinción en los distintos medios, lo que sugiere que este comportamiento varía entre cepas, incluso entre aislados del mismo serotipo.

Esta diferencia observada por microscopía concuerda con los tamaños de halo obtenidos para los fagos de 933, siendo mayores en ágar N, donde se observa menor cantidad de cápsula y por lo tanto la zona de depolimerización es más extensa, de tamaño intermedio, donde la cantidad de cápsula observada es mayor que para el ágar

N, y no se forma halo en medio LB, donde puede verse, en forma cualitativa, una mayor producción de cápsula.

La formación de halos extensos por parte de los fagos de 71945 en medio LB también puede explicarse por una cuestión de cantidad de cápsula producida (o cantidad de sustrato a hidrolizar por la depolimerasa), ya que, a la inversa de lo observado para 933, se ve cualitativamente que la producción de cápsula de esta bacteria en medio LB es menor que para los otros dos medios ensayados. Sin embargo, la aparición de halos extensos en ágar nutritivo no se corresponde con la cantidad de cápsula producida en este medio y puede deberse a una mayor capacidad de hidrólisis de exopolisacárido capsular de los fagos de esta bacteria respecto a otros.

En el ensayo de tinción negativa de las diferentes zonas dentro de la placa: lisis central, donde se posó la gota de lisado de fago, halo alrededor de la misma y césped bacteriano para el fago MFA45N sobre EHEC 71945 en ágar LB blando, se observa una clara diferencia en el espesor de la cápsula para las bacterias resistentes a la lisis en la zona central y en el halo en comparación con lo observado para en el césped bacteriano (Figura 2.6).

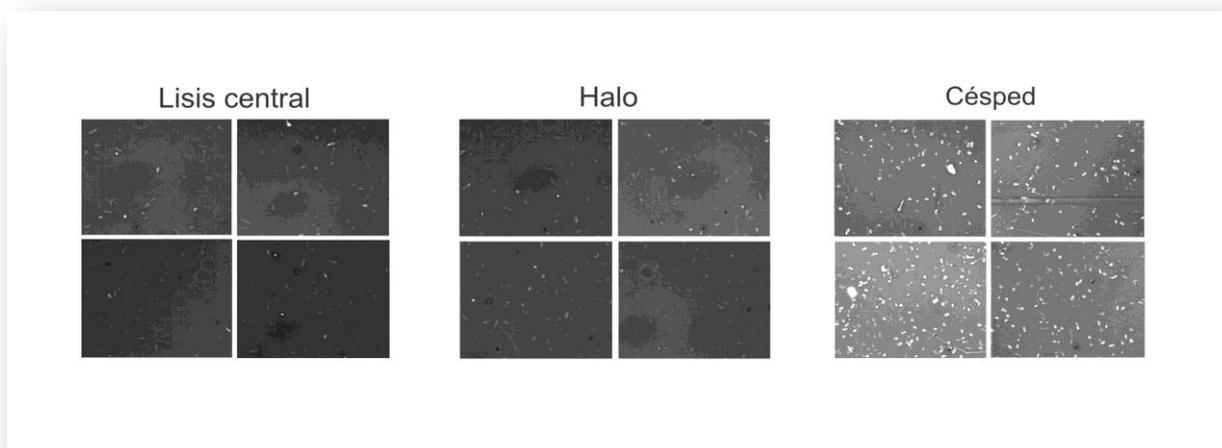


Figura 2.6 Tinción negativa con nigrosina de EHEC O157:H7 71945 de una placa de ágar LB blando obtenida de: la zona donde se posó de la gota el lisado del fago MFA54N (lisis central), el halo producido alrededor de la lisis central (halo) y el césped bacteriano fuera del halo (césped). Se muestran cuatro campos de observación por microscopía óptica para cada condición ensayada.

Resistencia a la acidez de los aislados

Los fagos seleccionados como agentes de biocontrol de STEC y EHEC para ser utilizados *in vivo* en bovinos, además de cumplir con los requerimientos de ser inocuos para la

flora normal, totalmente líticos y no portar genes indeseables, deben, para poder ser suministrados por vía oral, tolerar la acidez extrema del tracto gastrointestinal y alcanzar el intestino vacuno en concentración suficiente como para permitir la infección y lisis del patógeno (Tanji et al., 2005, Callaway et al., 2008, Denou *et al.*, 2009). Para esto, los aislados seleccionados se sometieron a valores de pH en el rango de 1 a 7 durante 16 h y pasado este tiempo se determinó el título de partículas infectivas.

En las incubaciones a pH 5, 6 y 7 todos los fagos mantuvieron el título inicial. A pH 4 se observó la mayor diferencia en la resistencia de los diferentes fagos, con una caída en los títulos de entre 3 y 5 órdenes de magnitud, y no se detectaron partículas viables a pH 3 o inferiores. Los descensos observados en el título de los diferentes fagos después de la incubación a pH 4 se muestran en la figura 2.7.

El fago CA911 mostró una caída en el título de fagos de 3,1 órdenes de magnitud a pH 4, descenso equivalente al observado para los fagos MFA933P y CA933N (marcados en naranja en la figura 2.7), pero significativamente inferior ($p < 0,05$) que el observado para todos los demás fagos. La barra correspondiente al descenso de título mostrado por el fago MFA45D está marcada en naranja más claro porque este fago resultó ser significativamente menos resistente que CA911 pero comparable a los fagos MFA933P y CA933N, y más resistente que todos los marcados en celeste ($p < 0,05$). Los tres fagos aislados de EHEC 69160 fueron poco resistentes a la acidez, con caídas en el título de entre 4 y 5,3 órdenes de magnitud a pH 4, y entre ellos, el fago MFA60D resultó ser significativamente más resistente ($p < 0,05$) que los otros dos a este pH.

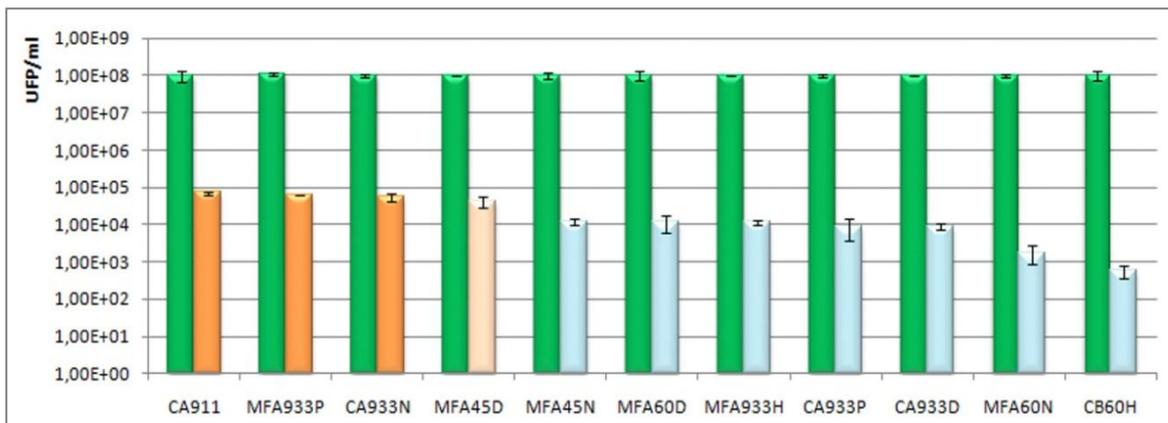


Figura 2.7 Las barras celestes y anaranjadas representan los títulos de fagos obtenidos después de la incubación a pH 4. Las barras anaranjadas corresponden a los títulos obtenidos a pH 4 que son significativamente mayores que el resto ($p < 0,05$), la barra naranja más clara es a su vez significativamente menor que la de CA911 ($p < 0,05$). El título inicial en todos los casos fue de 10^8 UFP ml^{-1} representado con las barras color verde.

Los resultados obtenidos concuerdan con lo observado por Jamalludeen et al. (2007): una resistencia total de los fagos hasta pH 5, y diferentes sensibilidades de cada aislado a pH 4, con pérdidas de título de fagos de entre 10^3 y 10^5 UFP ml⁻¹ en 16 h de incubación. Ningún aislado resistió valores de pH menores o iguales a 3 por lo que, para la administración oral, los fagos deben incluirse necesariamente en una matriz resistente al ácido que funcione como vehículo, o disminuir de alguna manera las condiciones extremas de acidez del estómago. En este sentido se ha propuesto la administración conjunta de los fagos con bicarbonato como otra estrategia para la administración oral (Chibani-Chennoufi *et al.*, 2004, Tanji et al., 2005).

Aunque los fagos no resistan valores de pH tan bajos como se desearía, los aislados más resistentes a la acidez podrían aplicarse a otro tipo de tratamientos, como la biopreservación de alimentos ácidos o su uso conjunto con ácidos en tratamientos de descontaminación (Choi *et al.*, 2009, Laury *et al.*, 2009).

Los fagos seleccionados por tener mayor resistencia a la acidez fueron CA911, MFA933P, CA933N y MFA45D.

Cinética de adhesión y lisis en un ciclo

De los 9 bacteriófagos seleccionados por no ser infectivos para la cepa WG5 de *E. coli* no patógena, no amplificar los genes *stx1*, *stx2* o *cl* y generar placas de lisis grandes y nítidas, se eligieron los aislados con rango de huésped más amplio (CA933P y CA911) y más resistentes a la acidez (CA911, MFA933P y MFA45D), que a su vez mostraran diferencias en sus perfiles de amplificación genómica obtenidos por RAPD y rep-PCR y formación de halos extensos alrededor de las placas de lisis en diferentes medios. El proceso de selección se discute en forma más detallada en la conclusión general de este capítulo. Los aislados más promisorios como agentes de biocontrol fueron CA911, CA933P, MFA933P y MFA45D, el primero perteneciente a la familia *Myoviridae* y los otros 3 de la familia *Podoviridae*. En este trabajo de tesis se buscó estudiar el potencial de los fagos *Podoviridae* como agentes de biocontrol de EHEC por ser una familia que no ha sido explotada con ese fin.

Se realizó una cinética de adhesión del fago CA933P que fue el que presentó el mayor rango de huésped dentro de los fagos *Podoviridae* aislados con esta bacteria huésped y se comparó con la cinética obtenida para otro de los aislados del mismo huésped, el MFA933P, que pertenece a la misma familia morfológica con un rango de huésped más estrecho. Asimismo se determinó para el aislado CA933P la curva de lisis en un ciclo sobre EHEC 933 y se obtuvieron los parámetros del ciclo lítico *constante de adsorción*, *período de eclipse* y *tamaño de explosión*.

Las rectas de cinética de adhesión obtenidas por regresión lineal de los datos experimentales se muestran en la figura 2.8. Se observa que a los 8 minutos de comenzada la infección, queda libre (sin adherir) menos del 20% de los fagos CA933P iniciales, mientras que para el aislado MFA933P este valor es de aproximadamente el 40%. Esto puede deberse a dos motivos, que pueden darse separadamente o en forma simultánea: el primero es que ambos aislados reconozcan los mismos receptores de superficie de la bacteria huésped, pero que el aislado CA933P presente una mayor fuerza de interacción, lo que daría como resultado una mayor eficiencia en la adhesión; el otro es que el reconocimiento de un mayor número de receptores de superficie por parte del fago CA933P aumente la probabilidad de adhesión del fago en las cercanías del huésped, esto último concuerda con el hecho de que el aislado CA933P presenta un mayor rango de huésped que el MFA933P.

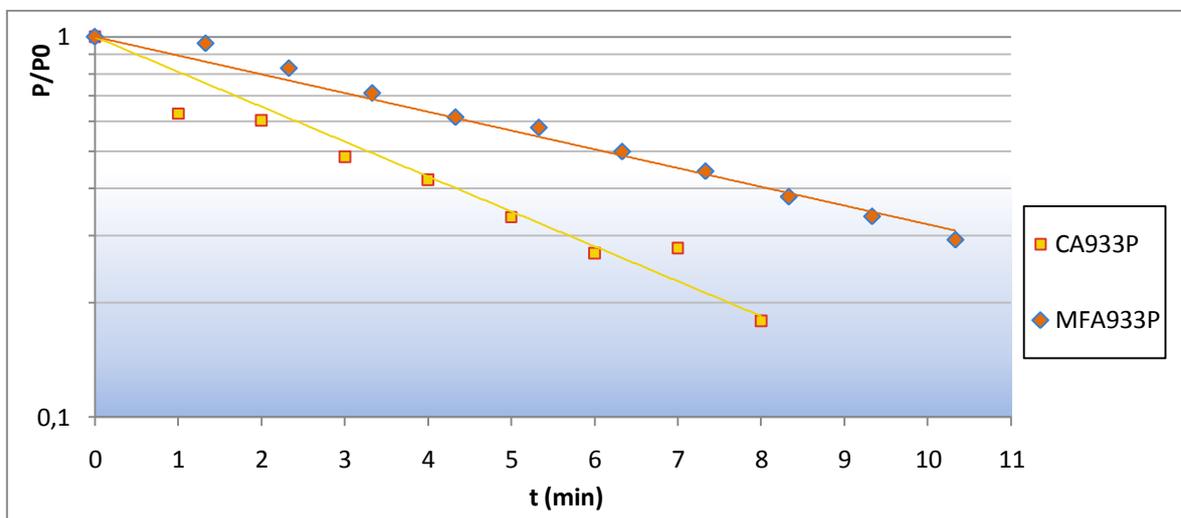


Figura 2.8 Cinéticas de adhesión de los fagos CA933P y MFA933P sobre el aislado 933 de EHEC O157:H7

En las cinéticas de adhesión de fagos líticos, la representación del logaritmo de la fracción o del porcentaje de fagos libres (no adheridos) respecto al tiempo, corresponde a una recta de pendiente negativa cuya ecuación puede plantearse como $\log P = \log P_0 - kBt/2,3$, donde P_0 es el número inicial de partículas de fago, P el número de fagos libres (no adsorbidos) al tiempo t , B es la concentración de bacteria huésped, y k es lo que se denomina *constante de adsorción*. Estas rectas pueden llegar hasta 0 (adhesión total) o hacerse constantes en un valor determinado donde no se produce más adhesión a pesar de la existencia de fagos libres (valor de saturación). Los valores de k encontrados normalmente son del orden de 10^{-9} ml/min para fagos como el colifago T4 (Kasman et al., 2002) que reconoce varios cientos de receptores celulares, hasta valores del orden de 10^{-11} ml/min para fagos como M13 que reconocen 2 o 3 receptores por célula.

Las constantes de adhesión k , calculadas a partir de las ecuaciones de las regresiones obtenidas de las rectas de la figura 2.8 fueron de **$8,16 \times 10^{-9}$ ml/min** para el fago CA933P y de **$5,78 \times 10^{-9}$ ml/min** para el fago MFA933P, lo que indica una mayor velocidad de adhesión del primero a EHEC 933.

La curva de lisis en un ciclo obtenida para el aislado CA933P se muestra en la figura 2.9. La "E" señalada en violeta marca el valor del período de eclipse del fago, es decir, el tiempo desde que se produce la infección hasta que aparecen partículas de fago maduras dentro de la bacteria huésped. El período de eclipse calculado fue de 10,3 minutos. Para el cálculo del tamaño de explosión (número de fagos producidos por bacteria infectada) se utilizó la ecuación descrita por Wang (2006), que calcula el tamaño de explosión (b) como: $b \text{ (UFP/UFC)} = F \text{ (UFP)} / (T - U) \text{ (UFC)}$, siendo F el número total de fagos después de un ciclo de replicación (marcado en rojo en la figura 2.9), T el número total de fagos iniciales (adsorbidos + no adsorbidos) y U el número de fagos no adsorbidos. La diferencia entre T y U es el número de fagos adsorbidos, determinado experimentalmente como el número de UFC infectadas. El tamaño de explosión del fago CA933P calculado de esta manera fue de **$b = 376 \text{ UFP/UFC}$** .

El fago CA933P, al igual que los demás aislados obtenidos pertenecientes a la familia *Podoviridae*, tiene características que lo asemejan a fagos del grupo T7, que se consideran fagos totalmente líticos e infectivos sólo para bacterias Gram negativas, incluso muchos de los fagos del tipo T7 se han descrito como fagos de *E. coli*, *Shigella* y *Pseudomonas* y algunos son infectivos para cepas que poseen cápsula (como el fago K1-5 de *E. coli* (Scholl et al., 2001)), e incluso los parámetros de ciclo lítico obtenidos para CA933P son comparables a los obtenidos para fagos de este tipo como el ϕ IBB-PF7A cuyo período de eclipse es de 10 minutos y tiene un tamaño de explosión de 153 UFP/UFC, aunque la constante de adsorción de este último es considerablemente menor a la de CA933P (Sillankorva et al., 2008).

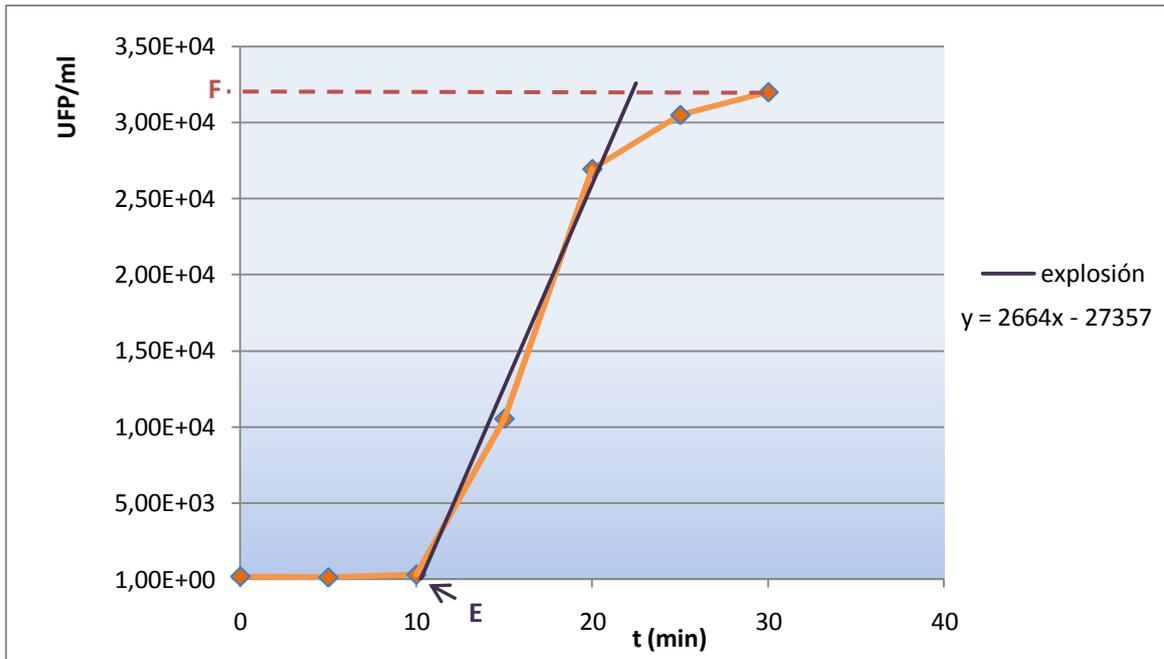


Figura 2.9 Curva de lisis en un ciclo del fago CA933P. La flecha con la letra E señala el tiempo correspondiente al período de eclipse y F marca el título final de fagos después de la explosión. A la derecha del gráfico aparece la ecuación de la recta correspondiente a la explosión (línea violeta).

Efecto del uso de fagos *in vitro* sobre células eucariotas

Una vez seleccionados los fagos más aptos para ser utilizados como agentes de biocontrol de STEC y EHEC se analizó la efectividad de la aplicación de uno de ellos, el fago MFA933P aislado de materia fecal vacuna con buena tolerancia a la acidez, en el tratamiento de infecciones *in vitro* de EHEC sobre células de la línea Hep-2. Esta es una línea celular derivada de carcinoma laríngeo humano en la que se puede observar la formación de la lesión de adhesión y borrado (o lesión A/E) producida por la infección con EHEC. Es sabido que los bovinos son portadores asintomáticos de EHEC, pero se ha determinado que la bacteria se encuentra adherida en la parte terminal del recto de estos animales a través de la formación de pedestales por lesiones A/E (Nart et al., 2008). Se analizó la efectividad del tratamiento con fagos en dos multiplicidades de infección (MDI) diferentes con las bacterias en dos condiciones fisiológicas diferentes: en fase de crecimiento exponencial y en fase estacionaria.

El tiempo de incubación necesario para que el fago produzca la infección y lisis del huésped en las condiciones de crecimiento de las células (a 37°C, con atmósfera enriquecida con 5% v/v de CO₂ y con DMEM de adhesión como medio de cultivo) se determinó a través de una cinética de clarificación de la bacteria en fase exponencial con el agregado del fago a una MDI de 0,1 (el valor de MDI más bajo entre los ensayados) por medida de la DO a una longitud de onda de 600 nm a diferentes tiempos (figura 2.10). Se observa que 90 min de incubación son suficientes para que se

produzca la infección y lisis del cultivo a 37°C en DMEM de adhesión y atmósfera con 5% CO₂. No se observó viraje del indicador ácido-base del DMEM de adhesión para ninguno de los valores de MDI ensayados (10, 1 y 0,1) después de 3 h de incubación en las condiciones anteriores, mientras que el tubo control (sin fago) viró al color de la forma ácida del indicador (amarillo). El tiempo de incubación se estandarizó a 90 min para los ensayos posteriores.

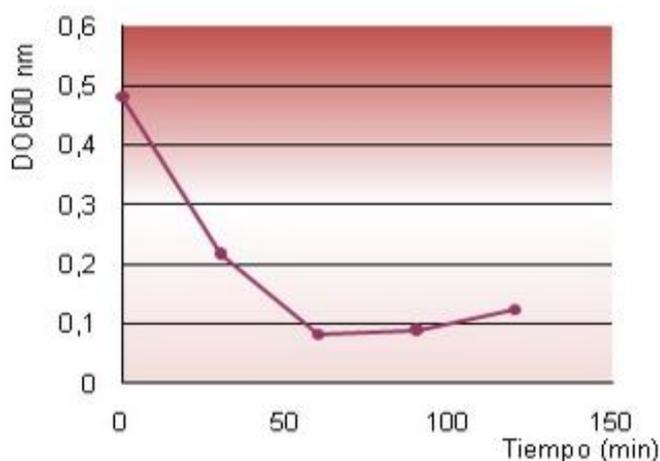


Figura 2.10 Cinética de clarificación de EHEC 933 en las condiciones de incubación de las células Hep-2 por medida de la absorbancia del cultivo a una longitud de onda de 600 nm.

Para determinar si existe una pérdida importante de partículas de fago infectivas por adhesión inespecífica a las células eucariotas, a un grupo de 3 fosas se les adicionaron 10⁸ fagos en 0,5 ml de DMEM de adhesión sin el agregado de bacteria y se analizó el título de fagos en el sobrenadante después de las 3 h de incubación. No se observó un descenso significativo en el número de fagos por pegado inespecífico sobre las células eucariotas.

Luego se determinó el número de bacterias totales y adheridas a valores de MDI de 1 y 0,1 UFP/UFC y sin el agregado de fago utilizando cultivos de EHEC 933 en diferentes condiciones de crecimiento (fase exponencial o fase estacionaria). Los títulos promedio de bacterias totales y adheridas después de la incubación se muestran en la tabla 2.5.

Tabla 2.5 Recuentos promedio de bacterias totales y adheridas sin fago y con el agregado de fago.

	Fase exponencial		Fase estacionaria	
	Bacterias totales	Bacterias adheridas	Bacterias totales	Bacterias adheridas
Sin fago	1,35.10 ⁸	1,36.10 ⁵	5,33.10 ⁸	7,35.10 ⁴
MDI 1 UFP/UFC	1,75.10 ⁷	1,07.10 ⁴	1,12.10 ⁷	7,46.10 ⁴
MDI 0,1 UFP/UFC	1,50.10 ⁷	7,54.10 ³	2,48.10 ⁷	4,03.10 ⁴

Los valores de recuentos están expresados en unidades de UFC/ml.

Por análisis estadístico de los recuentos obtenidos en cada caso sin fago y con el agregado del fago a diferentes valores de MDI se determinó que el agregado de fago disminuyó significativamente ($p < 0,05$) el número de bacterias totales por fosa en placas inoculadas con cultivos en las dos fases de crecimiento y el número de bacterias adheridas cuando las células fueron infectadas con un cultivo en fase exponencial de crecimiento, pero en ninguno de los casos se observó diferencia entre los recuentos obtenidos a MDI 1 y 0,1. Cuando la infección se efectuó con el cultivo en fase estacionaria no se observó diferencia significativa ($p < 0,05$) en el número de bacterias adheridas con o sin el agregado de fagos a diferentes MDI.

Se analizaron cualitativamente los cambios en la morfología de las células y la integridad de la monocapa de células Hep-2 por tinción con naranja de acridina y microscopía de fluorescencia de las células infectadas con EHEC 933 sin fagos y con la adición de fagos a un valor de MDI de 1 UFP/UFC. Los resultados se muestran en la figura 2.11.

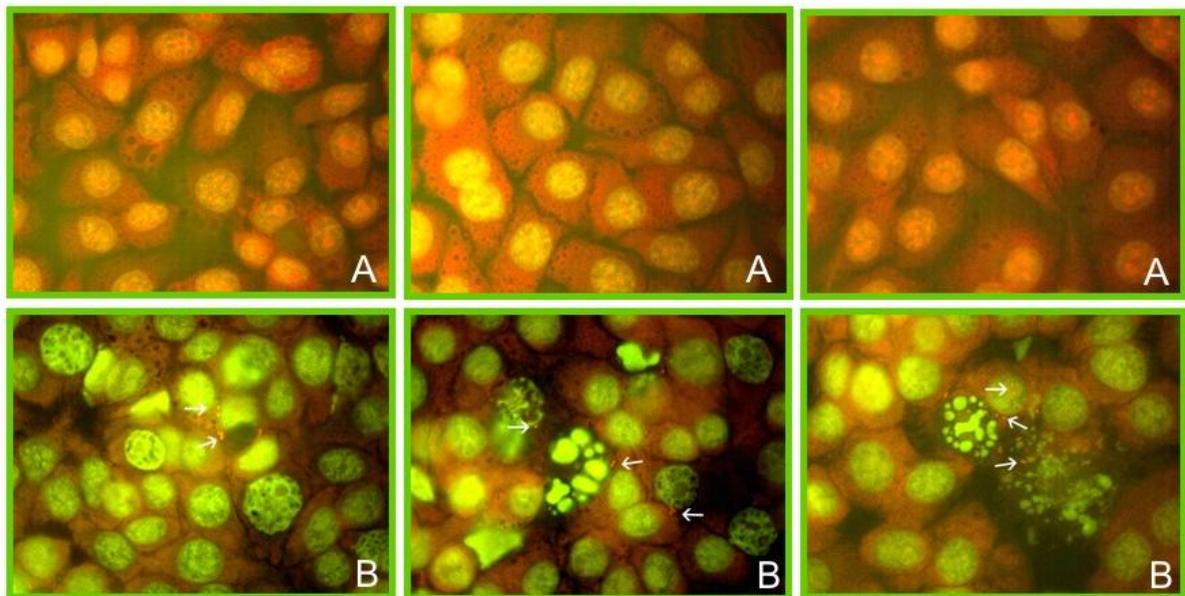


Figura 2.11 Observación microscópica de las células infectadas con EHEC 933 y teñidas con naranja de acridina: A.- Células tratadas con fago a una MDI de 1, B.- Células sin fago. Las flechas indican las bacterias presentes en la zona de lisis celular.

Se observa una diferencia notoria en la integridad de las células infectadas y tratadas con fagos respecto al control sin fagos en cultivos infectados con EHEC. Puede observarse que las células tratadas con fagos mantienen su forma (alargada) y siguen confluentes mientras que las células que no fueron tratadas con fagos están

redondeadas y despegadas y hay bacterias acumuladas en las zonas donde se ve mayor daño celular.

El fago MFA933P ya había demostrado ser efectivo en la infección de EHEC en condiciones de laboratorio, y estos resultados obtenidos *in vitro* sobre un cultivo celular dan indicios de la efectividad del tratamiento de EHEC en condiciones que se asemejan un poco más a las esperadas en el intestino del bovino. En estas condiciones el tratamiento con fagos logró disminuir la adhesión de las bacterias a las células Hep-2 cuando éstas se encontraban en fase exponencial de crecimiento, y se observó, en forma cualitativa, que se mantuvo la integridad del tejido después del tratamiento con fagos. Estos resultados son alentadores, aunque debe considerarse que es sólo una aproximación ya que existen muchas variables presentes en el sistema *in vivo* que se escapan a este tipo de modelos por lo que finalmente la efectividad del tratamiento debe determinarse directamente sobre el bovino.

Conclusión general del capítulo II

Se obtuvieron un total de 20 bacteriófagos de STEC y EHEC aislados de materia fecal vacuna, carne bovina picada y chorizo de cerdo. Las dos primeras fuentes de aislamiento se eligieron a fin de seleccionar fagos que se encuentran naturalmente en el intestino de bovinos (la carne picada se eligió porque la contaminación de la carne proviene principalmente del contacto de la misma con las heces del intestino vacuno durante la faena (Elder et al., 2000)). Es de esperarse que los fagos presentes naturalmente en el intestino de bovinos sean más efectivos en su aplicación como agentes terapéuticos que los fagos aislados de otros ambientes.

Se seleccionaron inicialmente 16 de los 20 fagos porque no fueron infectivos para las cepas de *E. coli* no patógena testeadas, y de entre ellos, sólo 10 fueron negativos en la amplificación de *stx1*, *stx2* y *cl*. Uno de estos 10 aislados fue un fago de no-O157 de la familia *Myoviridae*, pero fue preventivamente descartado como posible agente de biocontrol por su similitud en la morfología de las placas de lisis y los perfiles de RAPD y rep-PCR con los otros fagos de no-O157, todos los cuales fueron positivos para alguno de estos genes.

Los 9 fagos restantes, uno perteneciente a la familia *Myoviridae* y los otros 8 a la *Podoviridae*, formaron placas de lisis grandes y nítidas. Los rangos de huésped más amplios se obtuvieron para los aislados CA911 (*Myoviridae*) y CA933P (*Podoviridae*), aunque este último no fue específico para STEC y EHEC. El aislado CA911 fue además uno de los que mostró mayor resistencia a la acidez, junto con MFA933P y CA933N. El fago MFA933P mostró, a su vez, un tamaño de placa significativamente mayor que el de CA933N. El fago MFA45D también mostró una alta resistencia a la acidez y fue el único aislado que generó halos en los 3 medio ensayados.

Los fagos seleccionados para formar un cóctel terapéutico, además de los expuesto anteriormente, también deben tener mecanismos de infección lo más diferentes posibles entre sí, de manera que una bacteria que genere resistencia a uno de los fagos del cóctel siga siendo sensible a los demás. Esta diversidad puede, en principio, verse reflejada en la diversidad de perfiles obtenidos por RAPD y rep-PCR. Se observó una alta similitud en todos los perfiles de los fagos propagados con EHEC 933, por lo que el aislado CA933N se descartó por no poseer ni la máxima resistencia a la acidez, ni el mayor tamaño de placas, ni el mayor rango de huésped entre los fagos de 933.

Esta selección dejó como mejores candidatos para su aplicación en fagoterapia en bovinos a los aislados CA911, CA933P, MFA933P y MF45D. También debe destacarse que, como no es frecuente el reporte de fagos de STEC y EHEC pertenecientes a la familia *Podoviridae*, éstos nunca fueron propuestos como agentes de biocontrol para estas bacterias. Sin embargo en la selección realizada en este trabajo, los miembros de esta familia resultaron tener características que los convierten en candidatos

promisorios para ser utilizados como agentes de biocontrol de STEC y EHEC, e indican que se trata muy probablemente de fagos del grupo T7 que son considerados fagos totalmente líticos (Calendar, 2006) y el análisis *in vitro* del uso de uno de estos fagos sobre cultivos de células eucariotas dio indicios de la efectividad del tratamiento *in vivo* con fines terapéuticos.

El uso de fagos para la reducción o eliminación de STEC y EHEC en bovinos (su principal reservorio) requiere del desarrollo de vías convenientes de administración de los fagos a los animales. Como se ha mencionado en la introducción, existen varios trabajos realizados sobre la efectividad del tratamiento de STEC y EHEC con fagos en bovinos y otros rumiantes y en general se observa que, de los métodos de administración propuestos, la vía oral es la manera más práctica y rápida de suministrarlos, sobre todo pensando en una aplicación masiva del tratamiento donde se deben inocular cientos de animales, y el suministro se puede realizar a través del alimento o el agua de bebida. Si bien se ha observado que existe la posibilidad de que un número suficiente de fagos atraviese el sistema gástrico y llegue al intestino vacuno por consumo directo en el agua de bebida (o con la adición de HCO_3^- para amortiguar el ácido estomacal), las cantidades que deben adicionarse al agua son muy grandes, ya que las dosis ingeridas deben ser del orden de 10^{11} - 10^{13} UFP (Waddell et al., 2000). Además los ensayos sobre rumiantes infectados experimentalmente no reflejan con exactitud lo que se observa en la realidad, ya que la alta proporción de EHEC/STEC que se genera en el intestino del rumiante por infección artificial implica que la probabilidad de encuentro fago/"bacteria blanco" es relativamente alta, y una vez producido el primer ciclo de infección la replicación del fago aumenta cada vez más esta probabilidad. Las EHEC/STEC presentes naturalmente en el intestino de bovinos son una mínima proporción de su flora intestinal total, y aunque un número pequeño de bacterias es suficiente para producir el contagio a humanos, esta baja proporción de la "bacteria blanco" requiere un alto número de fagos para que éstos efectivamente produzcan la infección y lisis.

Con el fin de lograr maximizar el número de fagos capaces de alcanzar el intestino del bovino se exploraron diferentes alternativas para proteger al fago del pH extremadamente ácido del estómago durante la administración oral a bovinos. Para esto se desarrollaron matrices de encapsulamiento para los fagos y se estudió la protección ofrecida frente a la acidez y a la acción de ciertas enzimas digestivas. Estas matrices deben ser aptas para el consumo por parte de los bovinos, por lo que se exploraron sistemas cuyos componentes fueran todos de origen natural y normalmente aceptados para el consumo, como son los productos derivados de los gránulos de kefir, el ácido oleico y los polisacáridos como pectinas y alginato.

Productos derivados de los gránulos de kéfir

El kefir es una bebida láctea fermentada, naturalmente carbonatada, con un sabor ligeramente ácido y de consistencia cremosa. La fermentación comienza mediante la adición de granos de kefir a la leche fresca. Los granos o gránulos son insolubles en agua y de tamaño y forma irregular, variando de 0,3-3,5 cm de diámetro. Cuando se suspenden en leche, los gránulos se hinchan para formar un producto gelatinoso conocido como kefirán, un polisacárido compuesto por glucosa y galactosa en idénticas proporciones sintetizado principalmente por *Lactobacillus kefiranofaciens*, uno de los microorganismos presentes en los gránulos de kefir (Hui, 2006).

Una de las alternativas analizadas para aumentar la resistencia del fago al pasaje gastrointestinal fue la administración conjunta del fago con productos derivados de los gránulos de kefir que contienen kefirán. Dado que el producto fermentado de kefir puede alcanzar valores de pH del orden de 3 (datos experimentales), este polisacárido es naturalmente resistente a estos valores de pH y por lo tanto, la inclusión del fago en productos conteniendo este polisacárido, es una buena alternativa para su administración, ya que además de la posible protección ejercida a valores de pH ácidos, el kefirán tiene conocidas propiedades beneficiosas para la salud (Hui, 2006).

Efecto protector del PSK y extractos de gránulos de kefir

El permeado de suero es un subproducto que proviene de la extracción parcial de las proteínas del suero de queso y se procesa en muy pocas plantas a nivel mundial (Argentina posee algunas). Resulta un producto líquido, de color verde amarillento, de pH 5,6 – 6,5 y con un contenido aproximado de 18 % de sólidos, compuesto de 16 % de lactosa, 0,60 % de proteínas, 0,20 % de grasa; 1,20 % de cenizas y 0,36 % de ácido láctico. Su contenido de lactosa lo convierte en un producto factible de ser fermentado por los gránulos de kefir y muy económico. Se estudió la existencia de un efecto protector del permeado de suero fermentado con kefir y neutralizado con NaOH sobre los fagos a pH ácido. También se analizó la existencia de un efecto protector del kefirán extraído de gránulos de kéfir en H₂O destilada (líquido) y de los geles formados por estos extractos.

Al permeado de suero fermentado con kefir y neutralizado se lo referirá en adelante como PSK y a los extractos obtenidos de los gránulos de kefir en agua al 10% p/v y al 1% p/v se los nombrará como E1:10 y E1:100 respectivamente. Se denomina “concentrado” al fago incluido en PSK, extracto o buffer SM acidificado a pH 4, y “diluido” al fago incluido en la matriz neutra (PSK o extracto) o en buffer SM (control) adicionado a un tubo con solución fisiológica a un pH final de 4. Los valores de pH 7 corresponden al fago diluido en solución fisiológica a pH neutro. Se analizó el efecto protector a pH ácido de estos tres sistemas y los títulos obtenidos por spot test

después de las incubaciones en las diferentes condiciones con PSK, E1:10 y E1:100 se muestran en la tabla 3.1.

Tabla 3.1 Efecto protector de productos derivados de kefir a pH 4.

	pH7 (UFP/ml)	pH 4 concentrado (UFP/ml)	pH 4 diluido (UFP/ml)
control	2,50E+09	6,00E+06	7,50E+05
E 1:10	7,50E+08	< 1E+04	<1E+05
E 1:100	2,00E+08	2,00E+04	<1E+05
PSK	2,30E+09	2,70E+04	<1E+05

Títulos de fago obtenidos después de la incubación durante 18 h del fago incluido en la matriz a pH 4 (concentrado), del fago en la matriz neutra adicionada a solución fisiológica pH 4 (diluido) o en solución fisiológica a pH 7. El control corresponde al fago en buffer SM.

Se observa un leve descenso (entre 0,5 y 1 orden logarítmico) en los títulos obtenidos por spot test después de las 18 h de incubación a pH 7 en los dos extractos de gránulos, este descenso puede deberse a una adhesión inespecífica del fago a la matriz. También se advierte una mayor resistencia del fago con el PSK llevado a pH 4 respecto a los extractos llevados a ese mismo pH, pero todos muestran un título menor que el control (con PSK se obtiene un título de fagos 2,5 órdenes menor que el control), y lo mismo sucede cuando se diluyen las matrices.

Se analizó el efecto de una pre-incubación de los fagos con PSK antes de ser llevados a pH ácido para determinar si un contacto más prolongado con la matriz neutra producía una mejora en la protección. Los resultados obtenidos por recuento de los fagos pre-incubados con PSK a diferentes tiempos se muestran en la figura 3.6. Puede observarse que existe un descenso en el título de los fagos pre-incubados con PSK y expuestos a pH 4 a medida que aumenta el tiempo de pre-incubación. El análisis estadístico de los datos muestra que el título obtenido con una pre-incubación con PSK de 30 minutos resultó ser significativamente mayor ($p < 0,05$) que para todos los demás tiempos e incluso respecto al control de fago libre, mientras que una pre-incubación de 3h provoca un descenso en el título de fagos significativamente mayor que el del control, y lo mismo se observa para el fago pre-incubado 3 h a pH 7. Esto puede deberse a la adhesión inespecífica de los fagos a la matriz que no permite su total detección por recuento.

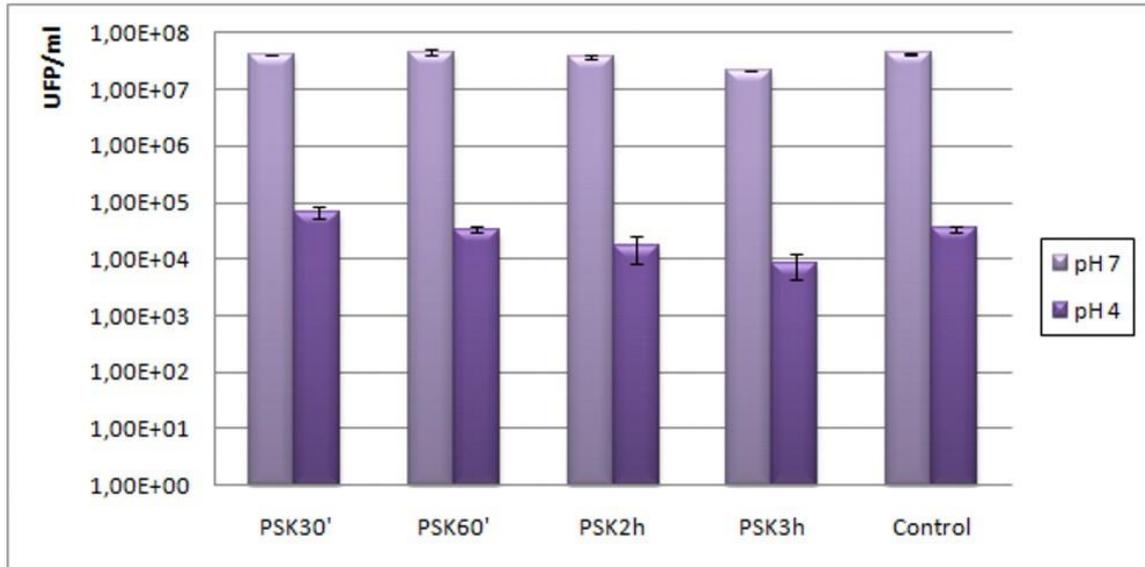


Figura 3.6 Título de fagos pre-incubados durante diferentes tiempos con PSK y posteriormente incubados a pH 7 y 4 durante 16 h a 37°C.

Si bien se determinó que existe un efecto protector sobre el fago frente al pH ácido del permeado de suero fermentado con kéfir y pre-incubando 30 min, este efecto no es relevante cuando se compara con los valores obtenidos en ausencia de la matriz por lo que la protección ofrecida probablemente no sea suficiente para mejorar el pasaje del fago a través del estómago del bovino.

Efecto protector de geles derivados de los extractos de gránulos de kefir

Los gránulos de kefir se encuentran formados por aproximadamente un 24% del polisacárido kefirán (Hui, 2006). La extracción de este polisacárido puede realizarse sumergiendo los gránulos en agua y llevándolos a ebullición. Este extracto, al enfriarse bajo ciertas condiciones, forma geles de un color blanco traslúcido y de pH ácido (por datos obtenidos experimentalmente, estos valores oscilan entre 3,5 y 4). La naturaleza ácida de los geles indica que estas estructuras son estables a valores bajos de pH lo que los convierte en posibles matrices de encapsulamiento de fagos para aumentar su tolerancia a la acidez, y su origen natural e inocuo para animales y personas los hace potencialmente útiles para la aplicación en fagoterapia en bovinos.

En primer lugar se analizó la influencia sobre la estabilidad de los geles derivados de kefir de factores tales como:

- 1) *El agregado de fago*: Se analizó si la capacidad de algunos fagos (como el CA933P) de hidrolizar polisacáridos capsulares afecta a los geles de kefirán. Para esto se comparó la estabilidad de un gel al que se le adicionó un lisado del

fago CA933P en caldo LB respecto a uno al que sólo se le agregó caldo LB, ambos tubos se dejaron a 4°C durante 24 h.

- 2) *La temperatura*: Se determinó cuál es la estabilidad de un gel refrigerado a 4°C respecto a uno incubado a 37°C, que es la condición en la que se encontraría después de la ingesta por parte del bovino. Para esto se mezcló el gel formado en un tubo, y el volumen se separó en 2 alícuotas iguales, una de las cuales se guardó a 4°C y la otra se dejó a 37°C durante 24 h.
- 3) *NaOH y agregado de CaCl₂*: Está descrito que en ciertos casos los ácidos de bajo peso molecular pueden actuar como estabilizantes de la estructura de geles de polisacáridos (Hui, 2006). Se analizó si existe tal estabilización a pH ácido y, en tal caso, si puede reemplazarse el efecto estabilizante de los protones consumidos durante la neutralización con iones Ca⁺², ya que los iones divalentes como el Ca⁺² se utilizan para estabilizar estructuras de geles de polisacáridos como alginato o pectinas (Hui, 2006). Se comparó cualitativamente la estabilidad de los geles: con su acidez natural (pH 3,7) o llevado a pH 7,3 con NaOH, ambos adicionados con 0,1M de CaCl₂, respecto a la del gel ácido sin Ca⁺² (con el agregado de agua destilada para mantener constante el porcentaje de hidratación del gel). Los tres tubos se dejaron 24 h a 4°C.
- 4) *NaOH y agregado de diferentes cantidades de CaCl₂*: Se tomaron 4 ml del gel ácido, se neutralizaron con NaOH 1,5M y se separaron en 4 alícuotas de 1 ml cada una a las que se les agregó una concentración final de 0,05; 0,1; 0,2 y 0,3M de CaCl₂ respectivamente. Los tubos se dejaron 24h a 4°C.

En el análisis de la estabilidad de los geles en diferentes condiciones se observó que el agregado de fagos no generó, en forma cualitativa, diferencias en la consistencia de los geles (se mantienen firmes con y sin el agregado del mismo) y que el aumento de temperatura desestabiliza a la estructura, ya que se observó que el gel mantenido a 4°C durante 24 h estaba firme mientras que el que se incubó a 37°C estaba totalmente líquido.

En los ensayos de estabilidad del gel neutralizado con el agregado CaCl₂ se observó que en todas las condiciones (gel ácido con y sin CaCl₂ y gel neutralizado con CaCl₂) los geles se mantuvieron firmes después de 24 h a 4°C, pero en la incubación posterior de los tubos a temperatura ambiente, tanto el gel ácido con H₂O como el gel neutralizado se volvieron líquidos cuando se deslizaron al girar los tubos, mientras que el gel neutralizado con CaCl₂ agregado perdió firmeza pero mantuvo su estructura de gel.

Los geles extraídos de 4°C con 0,05; 0,1; 0,2 y 0,3 M de CaCl₂ se encontraron todos gelificados. Nuevamente se dejaron a temperatura ambiente para determinar el tiempo de estabilidad de cada uno. El gel con 0,3 M de CaCl₂ duró firme 1h y 30 min. Los demás duraron 3 h como geles, y entre ellos se determinó en forma cualitativa que el más estable fue el que contenía 0,1M de CaCl₂.

En líneas generales se observa que el agregado de un lisado de fagos CA933P no afecta a la estabilidad aparente del gel y que los geles son estables a 4°C pero su estabilidad disminuye con el aumento de temperatura. El agregado de CaCl₂ en una concentración final de 0,1 M fue el que mostró mayor estabilidad en los geles neutralizados.

Para analizar la capacidad protectora de los geles de kefir frente a la acidez se comparó la pérdida de título de fagos libres a pH ácido respecto la observada para las partículas encapsuladas en geles de kefir neutralizados y con 0,1M final de CaCl₂. Los resultados de los ensayos de protección se muestran en la figura 3.7. Se observó que la protección es total hasta pH 2,5 ya que no hay diferencia en el título de fagos ($p < 0,05$) comparado con el del control a pH 7, mientras que el fago libre muestra una leve caída en el título a pH 3,5 y una caída abrupta (de aproximadamente 5,5 órdenes) a pH 2,5. Para los fagos incluidos en la matriz se observa que la caída de título se produce recién a pH 1,5, e incluso a este valor de pH el número de fagos infectivos remanentes es significativamente mayor ($p < 0,05$) cuando el fago se encuentra incluido en el gel que cuando está libre.

También se observó una pérdida considerable de la estructura del gel cuando éste es sometido a pH 1,5, por lo que la caída en el título de fagos a ese pH podría deberse a que la pérdida de estructura favorece la difusión de los protones al interior de la matriz.

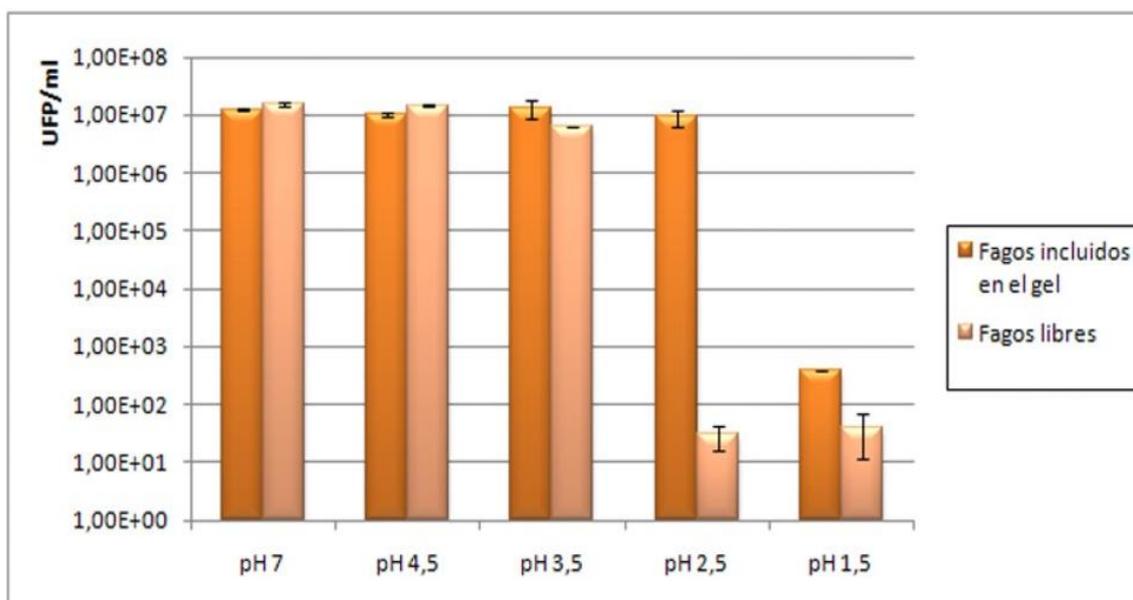


Figura 3.7 Título de fagos libres o incluidos en 1 ml de gel de kefir después de ser incubados durante 3 h a temperatura ambiente a los diferentes valores de pH.

Efecto protector de microesferas a base de alginato y pectinas

La microencapsulación de principios activos es una técnica que se utiliza regularmente en la industria farmacéutica, cosmética y de alimentos. Los biopolímeros de carbohidratos utilizados como matrices para la microencapsulación son sustancias no tóxicas y biodegradables capaces de formar geles. Dentro de los polímeros comúnmente utilizados como matrices se encuentran el *alginato* y las *pectinas*. El alginato es un copolímero complejo, extraído de las algas marinas pardas, compuesto por unidades de ácido β -D-manopiranosilurónico y ácido α -L-glucopiranosilurónico unidos (1 \rightarrow 4). En presencia de cationes divalentes, el alginato forma estructuras de geles donde las zonas de unión se estabilizan por acción de estos cationes que proveen puentes electrostáticos cruzados entre ciertas regiones de moléculas adyacentes. A valores de pH extremadamente bajos (por debajo del pKa del grupo carboxilato), se pierde la repulsión electrostática y el compuesto precipita (Hui, 2006). La pectina, un polisacárido asociado a la pared celular de las plantas superiores, es un glicano predominantemente lineal que consiste en unidades de ácido α -D-galactopiranosilurónico, algunos de los cuales están presentes en forma de metil ésteres. Comercialmente, las pectinas se categorizan de acuerdo a su grado de esterificación como bajo metoxilo (BM, <50% de esterificación) o alto metoxilo (AM, >50% de esterificación), cuya designación también define las condiciones óptimas para la gelificación. Las pectinas BM gelifican en presencia de cationes divalentes con una estructura similar a la que presenta el alginato (Hui, 2006).

Las matrices formadas por estos biopolímeros en presencia de calcio son resistentes a valores de pH muy bajos, lo que permite llevar a los fagos encapsulados a valores más bajos de pH que con los geles de kefir sin perder la estructura de la matriz.

Se ensayó la microencapsulación de fagos en 8 formulaciones diferentes de biomatrices naturales aptas para el consumo (Imeson, 1997) diseñadas para actuar como sistemas de protección del fago a valores de pH extremadamente ácidos y se testeó la protección ofrecida al fago por cada formulación frente a la acidez a 25°C y a 37°C. La composición de todas las formulaciones obtenidas con el fago CA933P se describe en la tabla 3.2

Tabla 3.2 Composición de las matrices

Polímero	Tratamiento	Muestra
Pectina BM	Emulsión con ácido oleico	M1
Pectina BM	Sin tratamiento posterior	M2
Alginato	Emulsión con ácido oleico	M3
Alginato	Sin tratamiento posterior	M4
Pectina BM	<i>Coating</i> con pectina AM	M5
Pectina BM	<i>Coating</i> con goma guar	M6
Alginato	<i>Coating</i> con pectina AM	M7
Alginato	<i>Coating</i> con goma guar	M8

En las figuras 3.8 y 3.9 se muestran los resultados de los títulos de fago obtenidos después someter a las diferentes formulaciones a pH 1,60 a 37°C y 25°C durante 30 minutos. Los resultados obtenidos a pH 7,0 reflejan la cantidad de fago encapsulado en cada una de las matrices, siendo seleccionadas como las mejores aquellas que proporcionen el mayor título de partículas infectivas de fago después de la incubación a pH ácido y la mayor capacidad de encapsulamiento de fagos. Se observa que en las matrices de alginato el número de fagos encapsulados es alto (alrededor de 10^6 UFP por esfera) para todas las formulaciones (coating, emulsión o sin tratamiento), mientras que en el caso de la pectina, cuando se encuentra emulsionada con ácido oleico (M1) es capaz de encapsular una concentración alta de fagos (comparable a la observada para las formulaciones de alginato), mientras que con los demás tratamientos esa capacidad se reduce en forma notable. El título bajo de fagos observado para estas matrices a pH 7 también podría deberse a que el fago se adhiere tan intensamente a la matriz que una gran proporción de las partículas de fago incluidas en la esfera no se detectan en el recuento. Se referirá como capacidad de

encapsulamiento de fagos a la capacidad de inclusión de fagos capaces de difundir desde el interior de la matriz y ser detectados por recuento en placa.

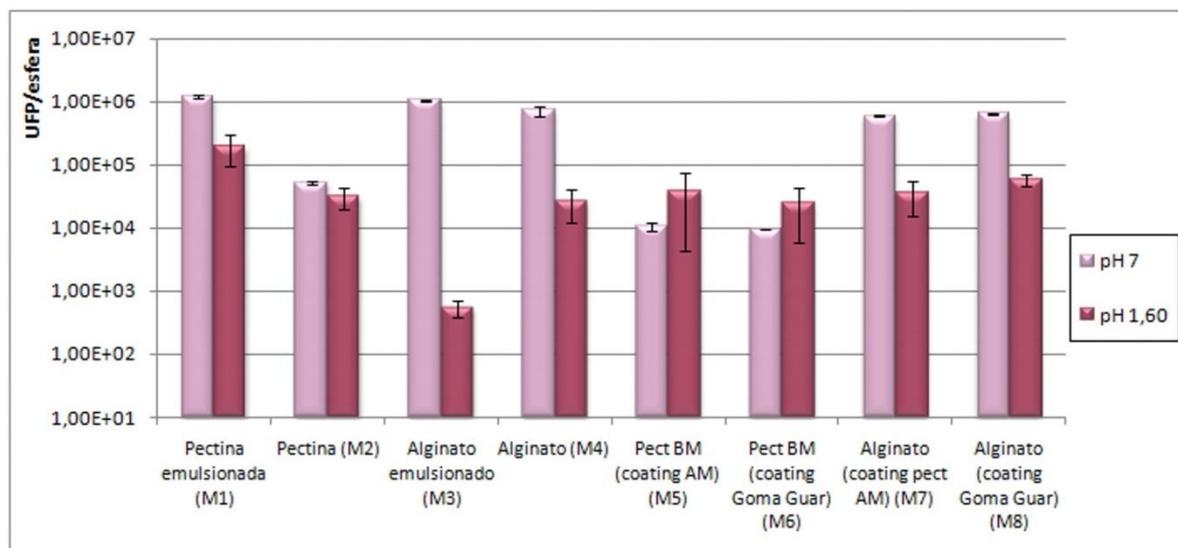


Figura 3.8 Título de fagos por esfera obtenido después de la incubación de las diferentes formulaciones a pH 7 (control) y pH 1,60 durante 30 minutos a 25°C.

En las figuras 3.8 y 3.9 se observa que todas las formulaciones protegieron mejor a 25°C que a 37°C. Esto era esperable ya que se observó experimentalmente que el aumento de la temperatura genera un incremento en el volumen de las esferas, y esto probablemente facilite la difusión de los protones hacia el interior de la estructura donde se encuentran los fagos.

Aunque el incremento de la temperatura disminuyó el grado de protección a la acidez en todas las formulaciones, las matrices M1, M2, M5 y M6 ofrecieron una mejora notable en la resistencia del fago a la acidez a 37°C respecto al fago libre, ya que en este último caso, con una concentración inicial de aproximadamente 10^7 UFP ml^{-1} , no se detectaron partículas de fago infectivas después de 10 minutos de incubación en esas condiciones.

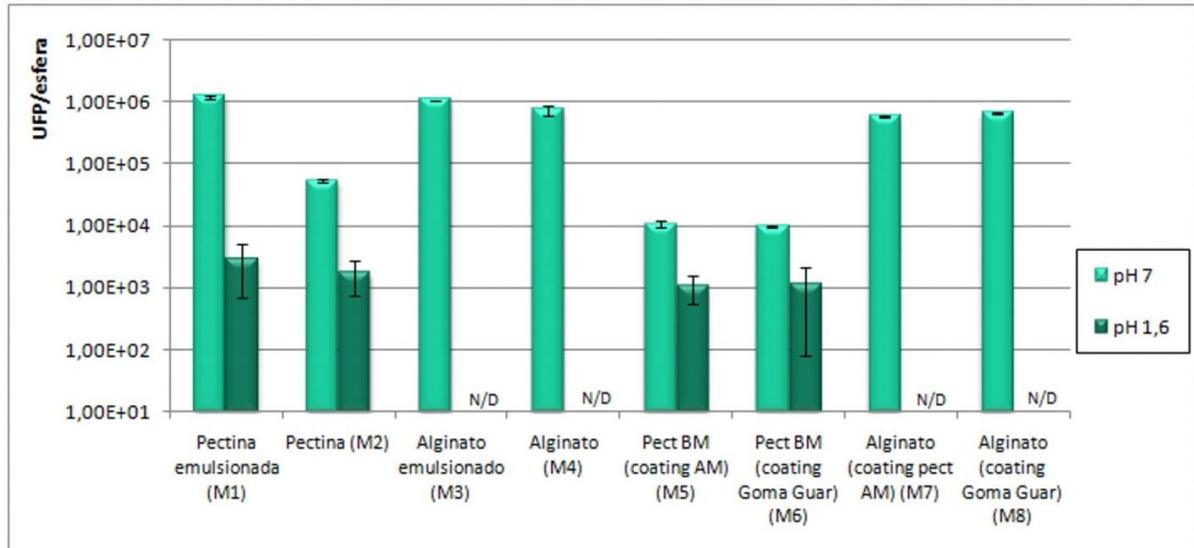


Figura 3.9 Título de fagos por esfera obtenido después de la incubación de las diferentes formulaciones a pH 7 (control) y pH 1,6 durante 30 minutos a 37°C. El rótulo N/D indica que no se detectan partículas infectivas por esta técnica de recuento (título $<10^1$).

Por análisis estadístico (ANOVA y $LSD_{0,05}$) se determinó que la pectina emulsionada (M1) produce una cantidad significativamente mayor de fagos remanentes después de la incubación a pH 1,6 y 25°C que cualquiera de las otras formulaciones. En la incubación a pH ácido a 37°C, las formulaciones M2, M5 y M6 mostraron una menor caída en el título de fagos que M1, pero no hubo diferencia significativa ($p < 0,05$) en el número final de UFP después de la incubación. Se adoptó como criterio de selección la eficiencia en el encapsulamiento de fagos y la diferencia en el número final de fagos infectivos después de la incubación a pH 1,6, pues a los fines prácticos, lo importante es obtener un mayor número de fagos activos después del pasaje gástrico aunque la caída en el título de fagos respecto al número inicial sea mayor. Además, si bien la temperatura interna normal del animal es de 37°C, no es esperable que la exposición de las microesferas a la acidez y la temperatura sea tan abrupta como la que se produce en el laboratorio, por lo que se consideró que M1 (pectina emulsionada) es potencialmente mejor que las otras matrices para la administración de fagos a bovinos por ser la que generó un mayor título de fagos remanentes infectivos después de la incubación a pH 1,60 a 25°C con una capacidad de encapsulamiento de fagos superior al de las demás formulaciones que tuvieron algún efecto protector. Las esferas obtenidas con la formulación M1 se muestran en la figura 3.10.



Figura 3.10 Esferas de la formulación M1 (pectina emulsionada). Diámetro promedio de las esferas: 2,2 mm.

El uso de este tipo de matrices tiene como principal ventaja que el tamaño de las esferas permite la ingesta de un gran número de partículas que pueden ser suministradas a través del agua de bebida y que, por su tamaño, una gran proporción de ellas no entrarían dentro del ciclo de rumia (Relling, 2003), lo que permitiría la llegada de un gran número de fagos directamente al abomaso (estómago verdadero) y a su vez, la llegada de un número apreciable de partículas infectivas al intestino del bovino.

Análisis del efecto protector de la matriz M1 y de la capacidad de liberación de los fagos

Con el fin de analizar la efectividad de la formulación M1 en la protección ofrecida al fago, se ensayaron diferentes condiciones desestabilizantes para el sistema: acidez, medios con solventes orgánicos (etanol), con agentes reductores fuertes (H_2O_2), medios de fuerza iónica elevada (altas concentraciones de NaCl) o la acción de proteasas comúnmente encontradas en el sistema digestivo de mamíferos. También se estudiaron características como la facilidad de la matriz para liberar a los fagos a diferentes temperaturas y la conservación de los fagos encapsulados en el tiempo.

Efecto protector de M1

En la figura 3.11 se muestra la cinética de inactivación del fago (sin matriz) con etanol 96% (v/v). Se observa una rápida caída en el título de fagos por acción del solvente, con una pérdida total del fago a los 90 segundos de contacto. Para determinar si existe

un efecto protector de la matriz M1 frente al etanol 96% (v/v), se analizó la presencia de partículas infectivas tomando un tiempo arbitrario de contacto de las esferas con el etanol en base a la cinética obtenida para el fago libre. Las microesferas se dejaron en contacto con el solvente durante de 5 minutos, y a este tiempo no se observó un efecto protector por parte de la matriz M1 sobre el fago encapsulado (no se detectaron partículas infectivas).

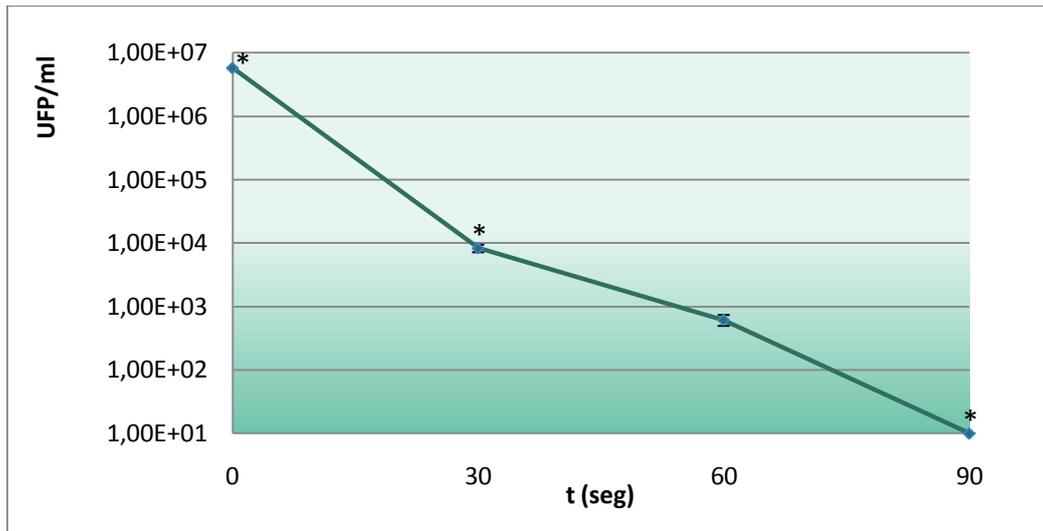


Figura 3.11 Cinética de inactivación del fago CA933P libre en etanol 96% (v/v). Los * indican los puntos donde la barra de error queda detrás del marcador del dato.

En la determinación del efecto desnaturante del H_2O_2 se observó una caída en el título de fagos de 3,43 log para el fago sin matriz, y de 3,34 log para el fago encapsulado en las esferas de M1 por lo que no se produjo un efecto protector apreciable por parte de esta formulación sobre el fago encapsulado.

En cuanto al efecto de un medio con alta fuerza iónica, no se detectaron cambios en el título de fagos en ninguna de las concentraciones de NaCl ensayadas (1,2M, 3M y 4,5M) ni en los tiempos de exposición analizados (30, 60, 90 y 120 min). El fago mantiene totalmente la infectividad en un medio de fuerza iónica extrema (NaCl 4,5M) durante al menos 120 min. Esto es un resultado importante porque, como se ha descrito previamente en bibliografía, con soluciones de sales de sodio, NaCl (5%) y $NaHCO_3$ (10%), se puede activar el reflejo de cierre del surco reticular en bovinos de dos años de edad con alta efectividad, lo que evita que la ingesta atraviese el proceso de rumia (Devuyst, 1975, Riek, 1954, Radostits, 2000). El surco reticular (gotera esofágica) es una estructura anatómica de los terneros, corderos, cabritos y otras especies de rumiantes, cuya máxima funcionalidad se manifiesta en la etapa de lactante. El cierre de este surco genera un canal que asegura que los alimentos lácteos (leche, sustituto lácteo o suero reconstituido) se dirijan directamente al abomaso

(estómago verdadero), eludiendo su pasaje al retículo–rumen, lugar donde se cumplen los procesos de coagulación de la caseína y la primera etapa de la hidrólisis lipídico–proteica de la leche. En este trabajo se propone la administración de las microesferas a través de soluciones de NaCl al 5% para bebida como estrategia de suministro de fagos a los bovinos previo a la faena (el NaHCO_3 en este caso no es aplicable porque la estructura de las microesferas se desestabiliza a valores de pH por encima de 6 aproximadamente).

En el análisis de la actividad de proteasas del tracto digestivo de rumiantes sobre el fago CA933P, se observó que ni la tripsina ($2,5 \text{ mg ml}^{-1}$) ni la α -quimotripsina (3 mg ml^{-1}) produjeron un descenso en el número de fagos infectivos después de 24 h de incubación a 37°C pero la acción de la pepsina ($0,5 \text{ mg ml}^{-1}$) sí resultó en un descenso en el número de partículas de fago libres después de 10 minutos de incubación a pH 2,5. En la figura 3.12 se muestra el título de fagos infectivos remanentes después de la incubación durante 10 minutos del fago libre y encapsulado en microesferas de la matriz M1 en esas condiciones (pH 2,5 y pepsina a pH 2,5).

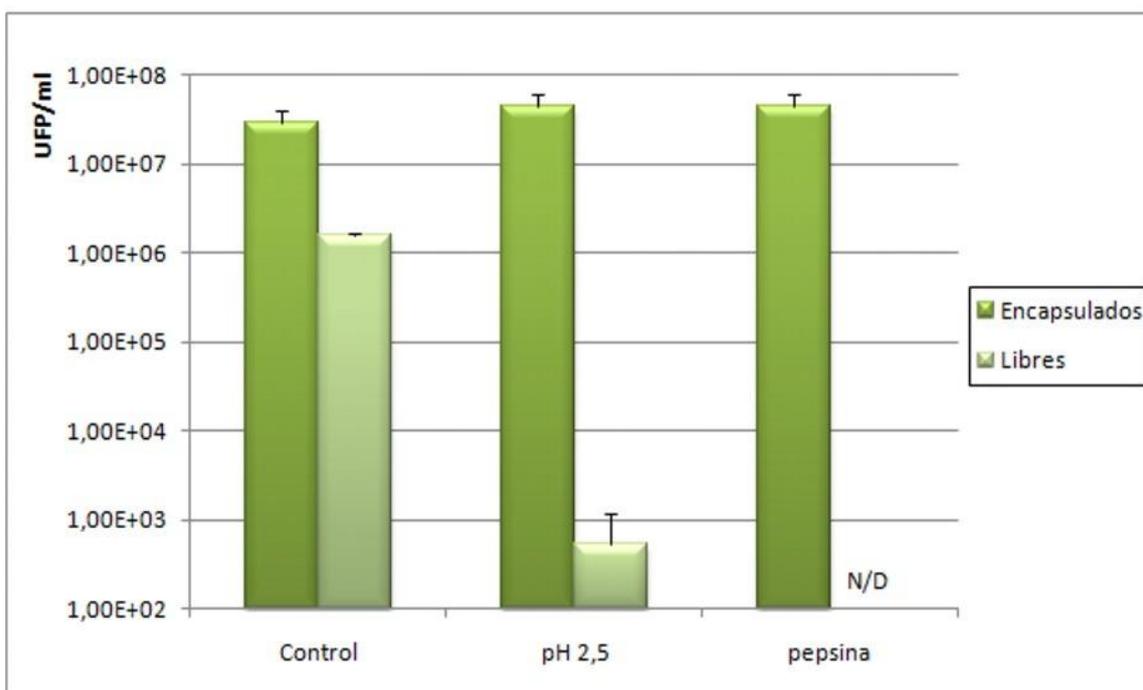


Figura 3.12 Título remanente de fagos encapsulados y libres después de la incubación durante 10 minutos a 37°C con: solución fisiológica (0,9% NaCl) a pH 7 (control), solución fisiológica a pH 2,5 y con pepsina ($0,5 \text{ mg ml}^{-1}$) a pH 2,5. El título N/D indica que la cantidad de fagos es no detectable por esta técnica ($<10^2 \text{ UFP ml}^{-1}$).

Se observa que el título de fagos se mantiene en todas las condiciones cuando está encapsulado, mientras que la incubación a pH 2,5 del fago libre produjo un descenso

de aproximadamente 3,5 órdenes logarítmicos y una pérdida total de partículas infectivas en presencia de pepsina ($0,5 \text{ mg ml}^{-1}$) al mismo pH.

Para determinar cuál es el efecto protector de la matriz M1 frente a esta enzima a tiempos más largos se realizó una cinética incubando los fagos encapsulados a diferentes tiempos con pepsina en las mismas condiciones que el ensayo anterior. Los datos obtenidos se esquematizan en la figura 3.13.

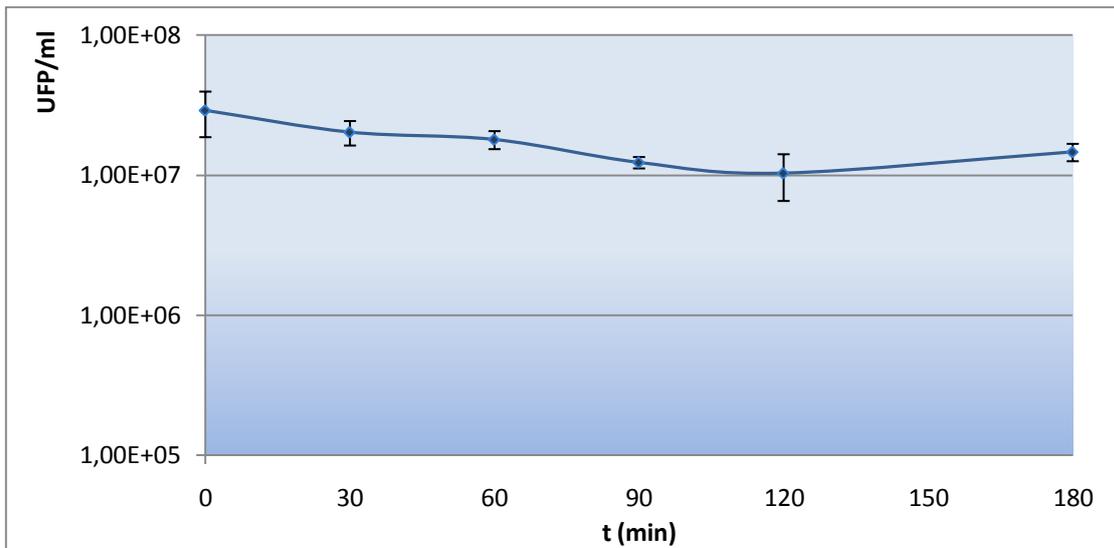


Figura 3.13 Efecto de la incubación del fago encapsulado en microesferas de M1 con pepsina ($0,5 \text{ mg ml}^{-1}$) a pH 2,5 y 37°C en el tiempo.

Se observa una retención prácticamente total del número de partículas de fago infectivas después de 3 h de incubación de las esferas a 37°C con pepsina ($0,5 \text{ mg ml}^{-1}$) a pH 2,5, por lo que se ensayaron concentraciones más altas de esta enzima ($1,5$; $3,2$ y $4,2 \text{ mg ml}^{-1}$), siendo $3,2 \text{ mg ml}^{-1}$ la concentración de pepsina normalmente utilizada para simular los jugos gástricos. Las microesferas se incubaron durante 3 h a 37°C con las diferentes concentraciones de pepsina a pH 2,5, y en solución fisiológica a pH neutro como control. Los resultados se muestran en la figura 3.14.

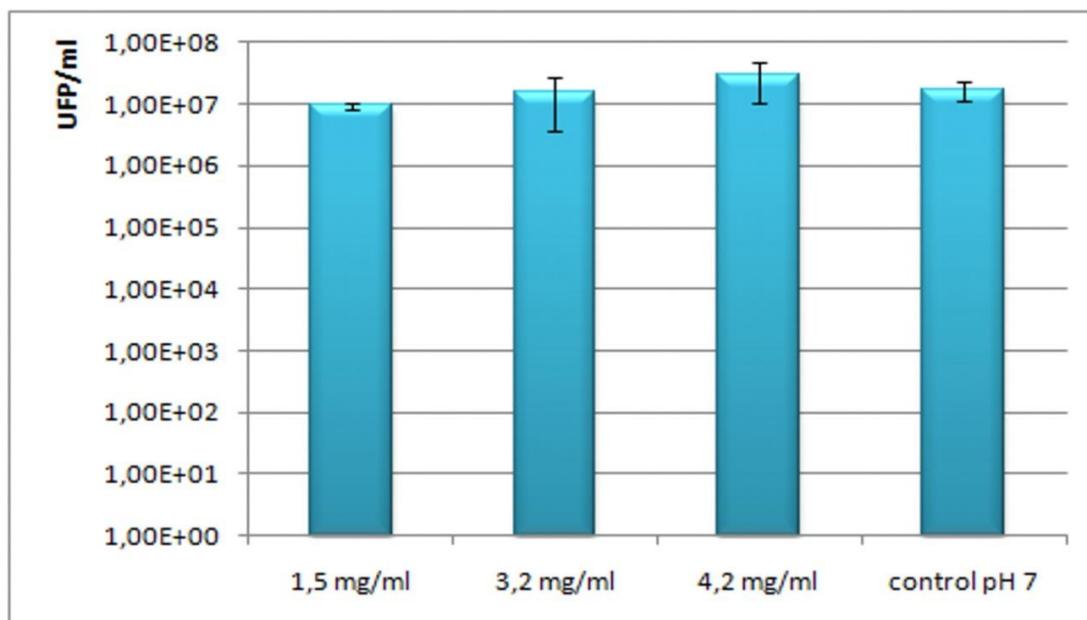


Figura 3.14 Título de fagos remanente después de 3 h de incubación del fago encapsulado en la pectina emulsionada (M1) con diferentes concentraciones de pepsina a pH 2,5 y sin pepsina a pH 7 como control.

Nuevamente se observa una protección total de la matriz M1 al fago frente a la pepsina a todas las concentraciones ensayadas, en el análisis estadístico de los datos se determinó que no existen diferencias significativas entre los títulos remanentes después de la incubación con las distintas concentraciones de pepsina ni con el control.

Los resultados demuestran que esta formulación no sólo aumentó significativamente el número de fagos capaces de resistir un pH del orden de 1,6 sino que también protegió totalmente al fago frente a una concentración de pepsina de $4,2 \text{ mg ml}^{-1}$ (superior a la normalmente encontrada en los jugos gástricos) a pH 2,5 durante 3 h, mientras que frente a una concentración de $0,5 \text{ mg ml}^{-1}$ de la enzima en las mismas condiciones el fago libre se inactivó totalmente en 10 minutos. Esta capacidad de protección es superior a la encontrada utilizando microesferas de alginato con coating de quitosano, de acuerdo a los resultados publicados por Ma et al. (2008), quienes demostraron que el tratamiento con pepsina a una concentración final de $3,2 \text{ mg ml}^{-1}$ y pH 2,4 resultó en una inactivación total del fago encapsulado a las 2 h de tratamiento. También se reportó que la incubación del fago encapsulado en alginato-quitosano sin enzima a pH 2,4 redujo el título de fagos en 0,67 unidades logarítmicas al cabo de 5 minutos, mientras que con la formulación M1 desarrollada en este trabajo de tesis, la incubación durante 10 minutos a pH 2,5 mantuvo totalmente el título de partículas infectivas. Cabe destacar que el fago Félix O1 encapsulado en las microesferas de

alginato-quitosano (Ma et al., 2008), tiene una sensibilidad a la acidez similar a la del fago CA933P, desestabilizándose considerablemente a valores de pH por debajo de 4.

Esta diferencia en la protección ofrecida a pH ácido de la formulación M1 a base de pectina respecto a la formulación a base de alginato (Ma et al., 2008) se observó para todas las matrices desarrolladas en este trabajo, donde todas las formulaciones a base de pectina (M1, M2, M5 y M6) otorgaron protección al fago CA933P a 37°C frente a pH 1,6 mientras que ninguna de las matrices a base de alginato fue capaz de proteger al fago en esas condiciones (como se observa en la figura 3.9).

Por último se analizó el efecto protector de M1 en el tiempo frente a la acidez (pH 1,6). En la figura 3.15 se muestra la cinética de inactivación del fago en M1 a pH 1,60 y 37°C. Se observa una caída de 0,5 órdenes en los primeros 30 minutos de incubación y luego una caída abrupta entre los 30 y los 45 minutos. A los 75 minutos el título de fagos se encuentra en 10^2 UFP/ml y a tiempos posteriores no se detectan fagos activos.

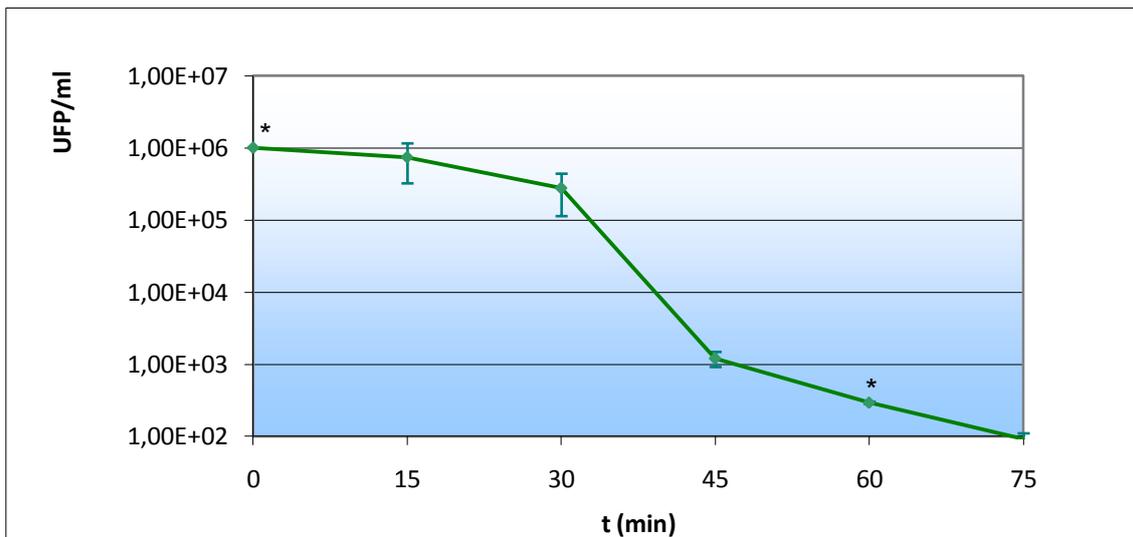


Figura 3.15 Cinética de inactivación del fago CA933P encapsulado en microesferas de pectina emulsionada (M1) a pH 1,6. Los * indican los puntos donde la barra de error queda detrás del marcador.

El tiempo que la formulación M1 mantiene un título aceptable de partículas infectivas es relativamente corto respecto al tiempo que se esperaría que las microesferas pasen dentro del estómago del bovino, sin embargo, en términos de acidez, las condiciones de ensayo posiblemente sean más severas que las encontradas naturalmente en el estómago, ya que la exposición de las esferas al ácido estomacal, por los sólidos encontrados en su interior, probablemente no sea tan directa como en los ensayos *in vitro*. Además, el pH del estómago (abomaso) del rumiante puede regularse a través del tipo de alimento que se le proporciona, como se sugiere en el trabajo publicado

por Stanford et al. (2010), y de esta manera disminuir el estrés al que se someten los fagos.

Liberación de los fagos desde el interior de la matriz y conservación de las microesferas

Para determinar el efecto de la temperatura en la difusión de los fagos desde el interior de las microesferas se realizaron cinéticas de liberación de fagos de la formulación M1 (pectina emulsionada) en PBS a 19°C, 30°C y 37°C, las curvas obtenidas se muestran en la figura 3.16.

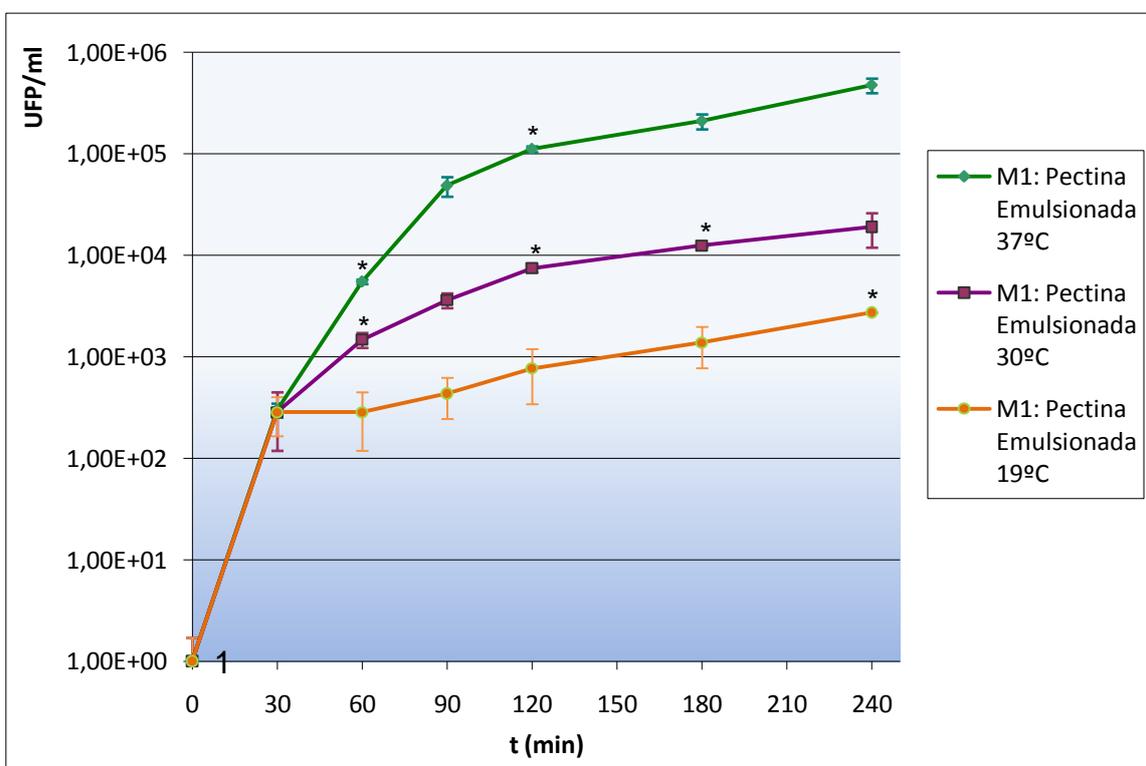


Figura 3.16 Cinética de liberación del fago CA933P de las esferas de pectina emulsionada (M1) en PBS a diferentes temperaturas. Los * indican los puntos donde la barra de error queda detrás del marcador del dato.

Se observa que no hay diferencia significativa en los primeros 30 minutos en la liberación de fagos observada para las tres temperaturas ensayadas. Este comportamiento podría deberse a la desorción de fagos adheridos a la superficie, mientras que la separación de las curvas podría estar representando la difusión de los fagos desde el interior de las esferas. Como era de esperarse, la liberación resultó más sencilla cuanto mayor fue la temperatura, hecho que concuerda con que la protección observada de M1 sobre el fago a pH ácido fue menor a 37°C que a 25°C. Como ya se había mencionado, probablemente la expansión de la estructura de la microesfera al

augmentar la temperatura permite que los protones difundan con mayor facilidad al interior de la matriz y, por el mismo motivo, que los fagos se liberen más fácilmente desde el interior de la estructura.

En 4 h (240 min) se libera casi todo el contenido de fagos de la esfera a 37°C, siendo el título de fagos obtenido por extracción exhaustiva en PBS de 10^6 UFP por esfera. Esto indica que se esperaba que en la condición *in vivo* las microesferas sean capaces de liberar a los fagos, ya que en el intestino del bovino el fago se encontrará en un ambiente a 37°C y en presencia de iones fosfato a un valor de pH levemente alcalino. Los iones fosfato permiten la liberación de las partículas de fago desde el interior de las microesferas porque su capacidad de secuestrar iones Ca^{+2} desestabiliza a la matriz facilitando su difusión.

Por último se analizó el título de fagos dentro de un grupo de esferas M1 mantenidas a 4°C. Se determinó que se produjo un descenso de sólo 0,54 órdenes logarítmicos en 133 días de almacenamiento refrigerado, lo que indica que esta formulación además de proteger al fago notablemente ante ciertos factores como la acidez o la presencia de pepsina, es una formulación estable en el tiempo, lo que la convierte en una herramienta muy promisoriosa para la administración oral de fagos a bovinos para biocontrol de EHEC.

Conclusión general del capítulo III

En este capítulo se buscó desarrollar métodos para proteger a los fagos de la acidez en su administración a bovinos por vía oral. Se exploraron inicialmente matrices derivadas de gránulos de kefir (extractos y geles) ya que estos se multiplican fácilmente y son una fuente continua de materia prima, además de ser, no sólo inocuos, sino con propiedades beneficiosas demostradas para la salud. También se analizó la protección ofrecida por un fermento de kefir a pH neutro (PSK), utilizando permeado de suero de quesería como fuente de crecimiento, ya que es un producto económico que no afecta a la salud del animal ni del consumidor.

Los extractos de gránulos de kefir no mostraron protección al fago a pH 4, y el descenso en el título de fagos remanentes luego de la incubación a pH ácido fue superior al observado con el PSK, por lo que estos sistemas se descartaron rápidamente. Para el caso del PSK se observó una leve protección del fago a pH 4 realizando una pre-incubación de 30 minutos, pero los resultados obtenidos no parecen suficientes como para generar un aumento en el número de partículas de fago capaces de atravesar una condición de acidez extrema como es el tracto gastrointestinal del rumiante.

Los geles derivados del extracto de kefir E1:10 ofrecieron protección al fago frente a la acidez, observándose una retención total en el título de partículas infectivas hasta pH 2,5 y una diferencia notable en el título de fagos remanentes respecto al fago libre después de la incubación a pH 1,5, sin embargo se observó una desestabilización de la matriz a ese valor de pH. También se observó en forma cualitativa que la estabilidad de estos geles decrece con el aumento de temperatura y pierden totalmente la estructura a 37°C, lo que implica que su utilización no es factible para el suministro de fagos a mamíferos ya que, durante la ingesta, el gel perdería su estructura tanto por la temperatura corporal del rumiante como por el efecto de la acidez de los jugos gástricos. De todos modos esta matriz podría utilizarse como método de incorporación de fagos como biocidas a sistemas de menor temperatura y acidez no tan extrema, como podría ser el caso de alimentos ácidos, ya que la protección a pH 2,5 y superiores es notoria y se agregaría valor al alimento por adición de un prebiótico como el kefirán.

A raíz de las limitaciones encontradas con los geles de kefir se exploraron otro tipo de matrices capaces de soportar valores de pH del orden de 1,5 sin perder la integridad. Se ensayó la encapsulación de fagos en microesferas a base de alginato y pectinas y se determinó que la mejor formulación fue M1 (pectina emulsionada con ácido oleico) que presentó el mayor título de fagos remanentes después de la incubación a 25°C a pH 1,6 ($p < 0,05$) y el mayor porcentaje de encapsulamiento ($p < 0,05$) respecto a todas las demás formulaciones de pectina. Esta matriz, además de aumentar significativamente el número de fagos capaces de resistir la acidez extrema, protegió

totalmente al fago frente a una concentración de pepsina de $4,2 \text{ mg ml}^{-1}$ (superior a la normalmente encontrada en los jugos gástricos), siendo que una concentración de $0,5 \text{ mg ml}^{-1}$ de la enzima en las mismas condiciones inactivó totalmente al fago libre, lo cual representa un avance significativo respecto a los resultados obtenidos por Ma et al. (2008) con microesferas de alginato-quitosano, con un fago cuya sensibilidad al pH es similar a la del aislado CA933P.

Las proteasas intestinales tripsina y α -quimotripsina, en concentraciones de $2,5 \text{ mg ml}^{-1}$ y 3 mg ml^{-1} respectivamente, no generaron descenso en el número de partículas infectivas de fago después de 24 h de incubación a 37°C . Tampoco se observó sensibilidad del fago a valores elevados de fuerza iónica, manteniendo totalmente el título después de ser incubado en una solución de NaCl 4,5M durante 2 h, lo que convierte a esta formulación en plausible de ser administrada al bovino en soluciones de NaCl 5% para activar el reflejo de la gotera esofágica y evitar el proceso de rumia (Devuyt, 1975, Riek, 1954, Radostits, 2000) llegando en forma más directa al intestino del animal.

Por otro lado se observó que los fagos se liberaron casi en su totalidad desde el interior de las microesferas después de 4 h a 37°C en presencia de fosfatos. Esta condición simularía la situación de la microesfera dentro del intestino del animal, lo que también posiciona a esta formulación como muy promisoría para su aplicación en fagoterapia en bovinos. También se observó una gran estabilidad en el título de fagos por microesfera en el almacenamiento refrigerado de M1 a 4°C .

Los resultados obtenidos muestran que la formulación M1 presenta excelentes cualidades para ser ensayada como medio de protección para los fagos durante el pasaje gastrointestinal en su aplicación como agentes de biocontrol de EHEC en bovinos por vía oral.

El uso de bacteriófagos para biocontrol de patógenos ha tenido un fuerte desarrollo en Occidente en la última década, y este desarrollo plantea la necesidad de contar con técnicas de conservación que permitan el almacenamiento a largo plazo de las formulaciones de fago. El mayor crecimiento en el área de la fagoterapia se ha registrado en el campo de la industria alimentaria, por lo que las técnicas de conservación utilizadas en estos casos deben ser tales que permitan que estas formulaciones puedan ser aplicadas en productos para el consumo.

La liofilización es un método ampliamente utilizado para la conservación y transporte de productos biológicos. Para este proceso se suelen utilizar lioprotectores (Lp) que disminuyen el daño producido durante los procesos de congelación y deshidratación y el almacenamiento posterior. En general se utilizan como Lp sistemas naturales complejos, como la leche descremada, que aportan simultáneamente varios componentes, tales como lactosa y proteínas, que pueden actuar como protectores durante uno o ambos procesos y son aptos para el consumo. La liofilización de fagos podría resultar un método muy útil para su administración como agentes terapéuticos y por este motivo es importante la búsqueda de formulaciones de fago estables durante la liofilización y el almacenamiento de los productos liofilizados.

En este capítulo se analizó la estabilidad del fago CA933P perteneciente a la familia Podoviridae en diferentes condiciones de almacenamiento. Se estudió el efecto del uso de sistemas complejos de origen natural (sueros, extractos y cultivos de bacterias probióticas) respecto a sistemas simples como sales y azúcares en su rol como crio- y lioprotectores en los procesos de congelación y liofilización respectivamente y durante su conservación en el tiempo. También se comparó la estabilidad en el tiempo de los productos obtenidos con estos procesos de conservación respecto a la de los lisados mantenidos a temperatura ambiente a fin de determinar las mejores condiciones de conservación de fagos para stock y para su utilización como agentes terapéuticos.

Estabilidad de los lisados de fagos a temperatura ambiente

Cuando se trabaja con bacteriófagos, es muy común mantener los lisados de fago filtrados a temperatura ambiente, ya que si éstos son manipulados cuidadosamente para evitar la contaminación, los títulos no disminuyen notablemente a corto plazo. Si bien es lógico y esperable que a mayor temperatura los procesos de degradación afecten más a las partículas de fago, el impacto de la temperatura en la velocidad de inactivación de las partículas es un factor que debe conocerse para determinar que tan estricto debe ser su control durante el almacenamiento a largo plazo.

Se analizó la estabilidad a diferentes tiempos de un lisado del fago CA933P en medio LB, filtrado por membrana de 0,45 μm y almacenado a temperatura ambiente, para determinar el ritmo de caída del título en esas condiciones y se determinó cómo afecta el almacenamiento a temperatura ambiente a la estabilidad del fago a largo plazo (1 y 2 años de almacenamiento).

En la figura 4.16 se muestra la evolución en el tiempo de un lisado del fago CA933P en caldo LB filtrado y almacenado a temperatura ambiente. Al cabo de 230 días de almacenamiento se observa que el título de fagos desciende progresivamente y en forma significativa ($p < 0,05$) en cada punto analizado.

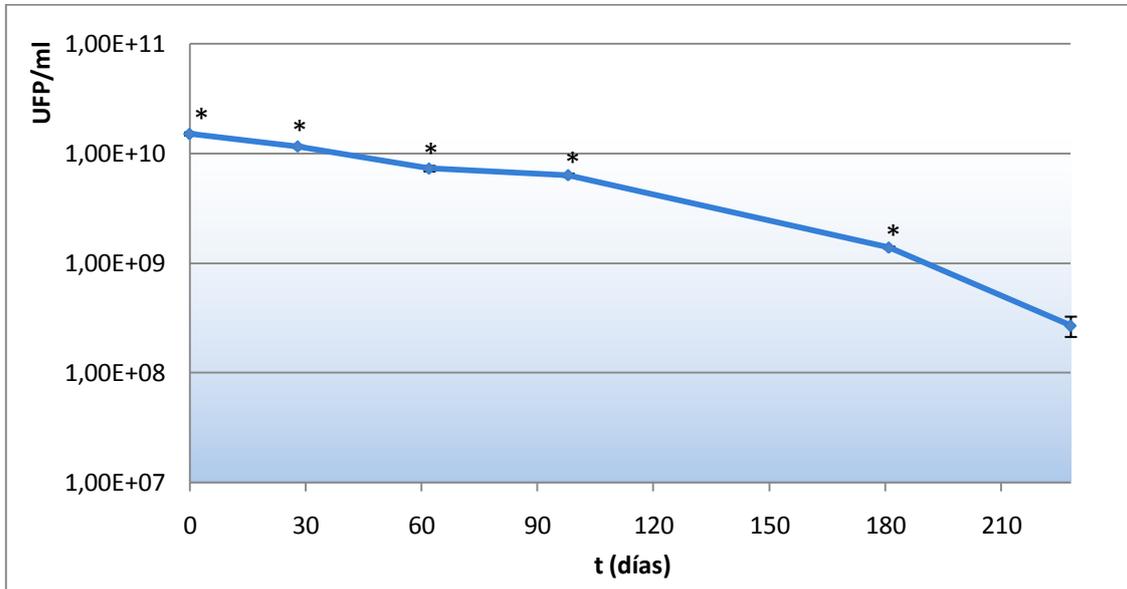


Figura 4.16 Título de fagos en el tiempo de un lisado de CA933P en caldo LB filtrado por membrana de 0,45 μm y almacenado a temperatura ambiente. Los * indican los puntos donde la barra de error queda oculta detrás del marcador del dato.

La caída de título observada durante los primeros 100 días de almacenamiento fue de 0,38 log, pero a los 180 días la pérdida total fue 1,03 órdenes logarítmicos, es decir que en esos 80 días subsiguientes la pérdida fue de 0,65 log (a razón de 0,81 log en 100

días), y de los 180 a los 230 días, la pérdida fue de 0,71 log (a razón de 1,42 log en 100 días), lo que indica que, dentro del plazo de tiempo ensayado, la velocidad en el descenso del número de partículas infectivas tiende a aumentar con el tiempo. La pérdida total obtenida en los 230 días de almacenamiento fue de 1,75 log, lo que representa una pérdida considerable de partículas de fago para un plazo relativamente corto de tiempo de stock.

Para determinar el efecto de estas condiciones de almacenamiento en la estabilidad de los fagos a largo plazo, se analizó la pérdida de título de dos lisados de este fago, mantenidos a temperatura ambiente durante 1 y 2 años respectivamente. Los resultados se muestran en la tabla 4.1. Se observa que para el caso del lisado almacenado durante 1 año se produjo una pérdida de 6 log en el título de fagos, mientras que no se detectaron placas de lisis después de 2 años de almacenamiento.

Tabla 4.1 Títulos del fago CA933P almacenado a diferentes tiempos a temperatura ambiente

inicial (UFP ml ⁻¹)	final (UFP ml ⁻¹)	almacenamiento
10 ¹⁰	9,35.10 ³	1 año
8.10 ⁹	N/D	2 años

N/D indica que el recuento no fue detectable por recuento por el método de la doble capa (<10¹ UFP ml⁻¹).

El análisis de la estabilidad a temperatura ambiente del fago CA933P muestra que la velocidad de pérdida de partículas infectivas tiende a hacerse cada vez más pronunciada en el tiempo, observándose una caída total de 1,75 log en el título de fagos después de 230 días de almacenamiento en estas condiciones. Esta hipótesis concuerda con el resultado obtenido después de 1 año de almacenamiento a temperatura ambiente, donde se observó un descenso de aproximadamente 6 órdenes logarítmicos en el título de este fago.

Estos resultados demuestran que es muy riesgoso mantener los lisados sin control de la temperatura porque puede llevar a la pérdida total del stock (como se observó para el lisado que se mantuvo 2 años a temperatura ambiente). Es por esto que es necesario determinar las condiciones óptimas de conservación para los aislados y realizar stocks que aseguren la estabilidad de los mismos a largo plazo.

Liofilización

La liofilización es un proceso que consiste principalmente en 2 pasos: la congelación de la muestra y la posterior deshidratación de la muestra congelada aplicando vacío. Este último paso puede subdividirse a su vez en 2 etapas: el secado primario, que consta de la sublimación del agua congelada, y el secado secundario que es la eliminación del agua adsorbida no congelada. Dado que es escasa la bibliografía que trata específicamente la liofilización de fagos, en este trabajo se ha considerado al fago como una proteína de gran tamaño (por la naturaleza proteica de su estructura) para el análisis de los fenómenos ocurridos durante este proceso.

La desnaturalización de las proteínas durante la liofilización puede producirse en las distintas etapas del proceso por motivos como: estrés por las bajas temperaturas, por el proceso de congelación (formación de cristales dendríticos, saltos de pH y de fuerza iónica o separación de fases) o por el secado (remoción de la esfera de hidratación)(Wang, 2000). Estos efectos pueden minimizarse (o anularse) utilizando estabilizantes que actúen protegiendo a la proteína durante el proceso de congelación (crioprotector) o congelación y secado (lioprotector).

Se analizó el efecto crio- y lioprotector de compuestos comúnmente utilizados con este fin y de compuestos que no han sido probados y que, por sus características, podrían tener un efecto beneficioso en este proceso. En primer lugar se analizó el efecto lioprotector de dos disacáridos no reductores comúnmente utilizados como estabilizantes para proteínas: sacarosa y trehalosa (Matejtschuk, 2007, Wang, 2000), en una concentración final de 0,3M que es el valor mínimo descrito para generar exclusión preferencial (exclusión de las moléculas de azúcar de la primer esfera de hidratación de la proteína) (Arakawa et al., 2001), este efecto se describe con mayor detalle más adelante en este capítulo. Luego se comparó la protección ofrecida por sistemas simples, como buffer SM y PBS, y el efecto producido por la adición de sacarosa en diferentes concentraciones, con el de sistemas complejos como los extractos de gránulos de kefir, el gel de extracto de gránulos de kefir o el permeado de suero de quesería fermentado con kefir (la obtención de estos tres sistemas se detalla en el capítulo I).

Los gránulos de kéfir son matrices de polisacáridos sobre las que crecen microorganismos tales como bacterias lácticas, levaduras y hongos en forma simbiótica y el fermento producido por estos gránulos en leche tiene características probióticas (Lopitz-Otsoa et al., 2006). Como ya se ha mencionado en el capítulo III, estos gránulos están compuestos en parte por kefirán, que es un polisacárido de conocidas características beneficiosas (Vinderola *et al.*, 2006, Rodrigues et al., 2005).

El permeado de suero surge de la eliminación parcial de las proteínas del suero de leche y es un subproducto de la industria de quesos que pocas veces se reutiliza. Este permeado es rico en lactosa, y por lo tanto, una fuente de crecimiento para bacterias

lácticas tales como las presentes en los gránulos de kefir (Koutinas et al., 2009). El fermento producido contiene lactosa, kefirán y bacterias lácticas, todos productos naturales potencialmente útiles como lioprotectores, y es un producto económico y fácil de elaborar.

Por último se estudió el posible efecto estabilizante producido por la presencia de microorganismos (bacterias y levaduras) en el proceso de liofilización de fagos, para esto se utilizó un cóctel de bacterias probióticas y levaduras aisladas de kefir formulado previamente en nuestro laboratorio (Bolla et al., 2011) y mencionado en el texto como “pentacepa” (PC). El PC, además de un posible efecto estabilizante durante la liofilización del fago, podría aportar nuevas propiedades al producto liofilizado respecto al fago solo como agente terapéutico, ya que se ha probado su capacidad antagónica frente a *Shigella* (Bolla et al., 2011) y un efecto antagónico sobre EHEC O157:H7 de *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114 (Hugo et al., 2008) que es uno de los microorganismos que componen el PC.

Sistemas simples

El mecanismo propuesto a través del cual los carbohidratos estabilizan a las proteínas durante el proceso de secado es por reemplazo de las moléculas de agua de su superficie (Allison *et al.*, 1996, Allison *et al.*, 1998) a través de la formación de puentes de hidrógeno entre la proteína y el carbohidrato, manteniendo estables los grupos polares de la misma una vez que el proceso de secado se completa (Carpenter & Crowe, 1989, Wang, 2000). Se ha descrito también que el tamaño del carbohidrato utilizado influye en la capacidad del mismo de formar puentes de hidrógeno con la proteína, siendo los de mayor tamaño menos eficientes en este sentido (Rey & May, 2004). Otro mecanismo de estabilización proporcionado por lioprotectores como los disacáridos es la formación de sistemas amorfos que permiten mejorar la interacción de la proteína con el estabilizante (Wang, 2000). Es por esto último que en muchos sistemas la trehalosa funciona mejor que la sacarosa, ya que la primera aporta una alta temperatura de transición vítrea, y, por lo tanto, un estado amorfo estable en un mayor rango de temperaturas (Crowe *et al.*, 1996, Crowe *et al.*, 1992). Por otro lado se ha descrito que los disacáridos (entre otros tipos de compuestos), ofrecen protección a las proteínas durante la congelación a través de un proceso denominado “exclusión preferencial”, donde los disacáridos son repelidos por los grupos hidrofóbicos de las proteínas en medio líquido, manteniendo de esta manera una alta proporción de H₂O no congelada en la esfera primaria de hidratación después del proceso de congelación y se ha observado que este proceso requiere de concentraciones altas del disacárido (0,3M como mínimo) (Day & Stacey, 2007, Arakawa et al., 2001).

El análisis de la protección ofrecida por la trehalosa respecto a la sacarosa en el proceso de liofilización del fago CA933P reveló que no hay diferencias en el grado de

protección ofrecido por ambos azúcares. En los dos casos se observó un descenso de 2,65 log en el número de partículas infectivas después de la liofilización. Dado que resultó indistinto el uso de cualquiera de los dos disacáridos, se continuó utilizando sacarosa para las demás comparaciones, porque su costo es menor y por lo tanto resulta más accesible para su utilización a gran escala.

En la figura 4.1 se muestran los resultados del título de fagos antes y después del proceso de liofilización utilizando dos sistemas buffer diferentes (SM y PBS) con y sin el agregado de sacarosa en una concentración final de 0,3M. Puede observarse que la menor inactivación de fagos se produce cuando el fago se encuentra en buffer SM.

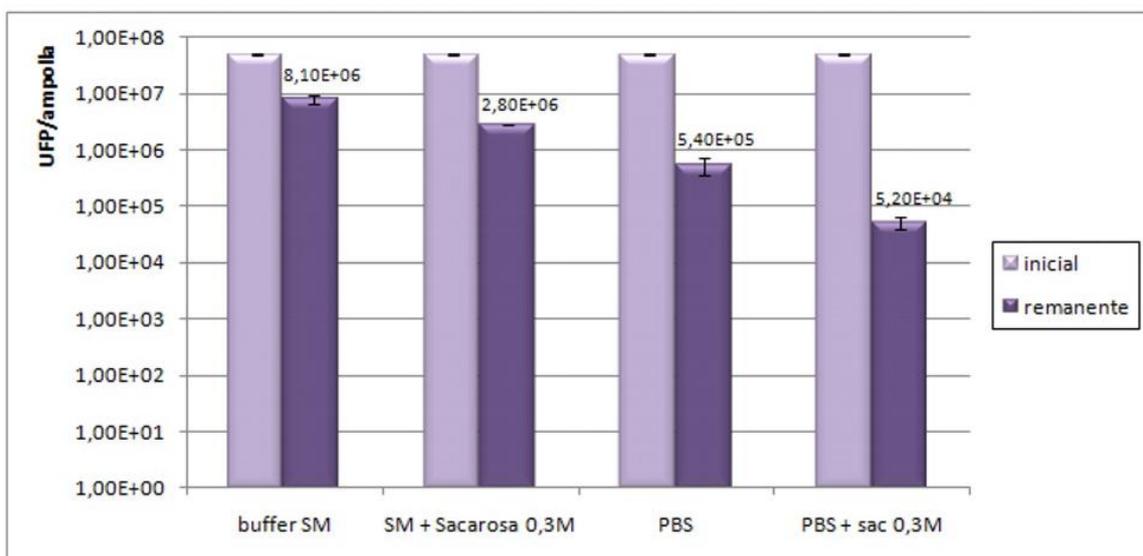


Figura 4.1 Título de fagos antes (inicial) y después (remanente) del proceso de liofilización con diferentes aditivos. En todas las condiciones el título inicial de fagos es de 5.10^7 UFP/ampolla

Este resultado podría deberse a dos aspectos relacionados con la liofilización de proteínas, y que suponen mejor al buffer SM en comparación con el PBS: el primero es que durante el proceso de cristalización (en el congelamiento) en las zonas del preparado que se congelan más lentamente la concentración de sales sufre un aumento notable que puede afectar la estructura de la proteína (Matejtschuk, 2007), entonces la concentración de sales inorgánicas en general debe mantenerse lo más baja posible. En este sentido, el buffer SM contiene aproximadamente $7,8 \text{ g l}^{-1}$ de sales inorgánicas ($\text{NaCl} + \text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) mientras que el PBS contiene aproximadamente $9,9 \text{ g l}^{-1}$ ($\text{NaCl} + \text{KCl} + \text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{KH}_2\text{PO}_4$), y aunque ya se ha mencionado la alta resistencia de este fago a fuerzas iónicas elevadas generadas por muy altas concentraciones de NaCl (ver capítulo III), no se conoce con exactitud el efecto de altas concentraciones de estas sales en particular. El segundo aspecto, más general y aplicable a cualquier

proteína, es que el uso de determinados sistemas buffer donde una de las sales tiene una solubilidad muy diferente a la de la otra, provoca un salto del pH (una pérdida repentina del poder regulador) durante el proceso de cristalización debido a la precipitación parcial de la sal de menor solubilidad, y éste es el caso del buffer fosfato, presente en el PBS. Por este motivo está descrito que es preferible el uso de buffers de histidina, citrato o Tris, siendo este último el sistema presente en el buffer SM (Matejtschuk, 2007).

Puede verse también en la figura 4.1 que el agregado de sacarosa al PBS y al buffer SM en una concentración final de 0,3M tiene un efecto negativo en el número de fagos remanentes activos. Está descrito que el agregado de concentraciones relativamente altas (alrededor de 0,5M) de disacáridos como sacarosa o trehalosa son buenos lioprotectores porque estabilizan a las proteínas tanto en la congelación como en la deshidratación, y que el agregado de concentraciones pequeñas (alrededor de 0,1M) estabiliza el proceso de deshidratación (y tiene buenos resultados si se usa conjuntamente con un crioprotector) (Rey & May, 2004).

Una aproximación para determinar en qué paso de la liofilización se produce la pérdida de compuesto activo es utilizar ensayos de “congelación-descongelación” y análisis de pérdida de actividad o viabilidad del compuesto o microorganismo, lo que da una idea de la pérdida actividad durante la cristalización previa a la deshidratación (Date et al., 2010). Se compararon las pérdidas de infectividad del fago CA933P por congelación a -80°C y descongelación a temperatura ambiente con PBS y PBS adicionado con sacarosa 0,3M. El resultado se muestra en la figura 4.2. Durante el proceso de congelado-descongelado con PBS no se observa una diferencia significativa en el número de fagos infectivos remanentes respecto al título de fago inicial (antes del proceso de congelación), lo que implica que la desestabilización producida ocurre durante el proceso de deshidratación en la liofilización. El agregado de sacarosa produjo un descenso de 0,48 log después del proceso de congelación, mientras que después del proceso de liofilización en las mismas condiciones el descenso observado fue de 2,98 log, por lo que se deduce que la sacarosa está desestabilizando al fago tanto durante la congelación como durante la deshidratación en el proceso de liofilización.

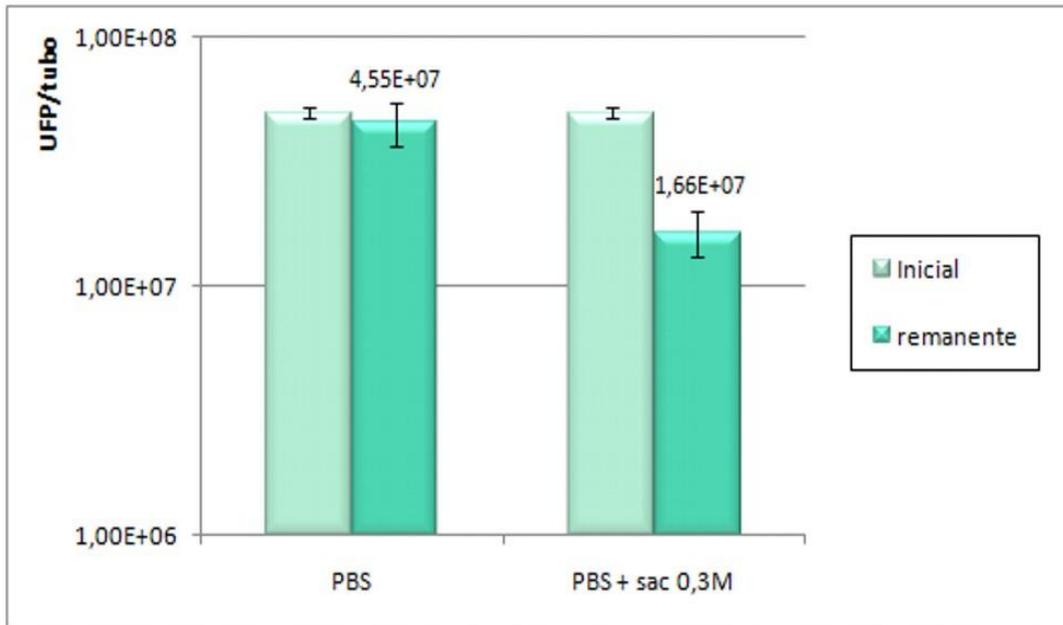


Figura 4.2 Título de fagos antes (inicial) y después (remanente) del proceso de congelación a -80°C y descongelación a temperatura ambiente en PBS y PBS con sacarosa 0,3M (PBS + sac 0,3M).

Se analizó también el efecto del agregado de sacarosa al PBS en la estabilidad del fago liofilizado durante el almacenamiento a 4°C de las ampollas selladas. La figura 4.3 muestra el número de fagos infectivos remanentes después del proceso de liofilización y almacenamiento a 4°C a diferentes tiempos. Se observa que, a pesar de que el agregado de sacarosa produce un descenso en el título de fagos debido al daño producido durante el proceso de liofilización, existe un efecto protector de la sacarosa durante el almacenamiento a 4°C de los productos liofilizados, y este descenso inicial se ve compensado con una estabilidad en el título durante al menos 120 días de almacenamiento a 4°C , mientras que el PBS solo produce un descenso progresivo en el número de partículas infectivas, con una pérdida total de 2,41 log después de 120 días de almacenamiento respecto al producto liofilizado inicial.

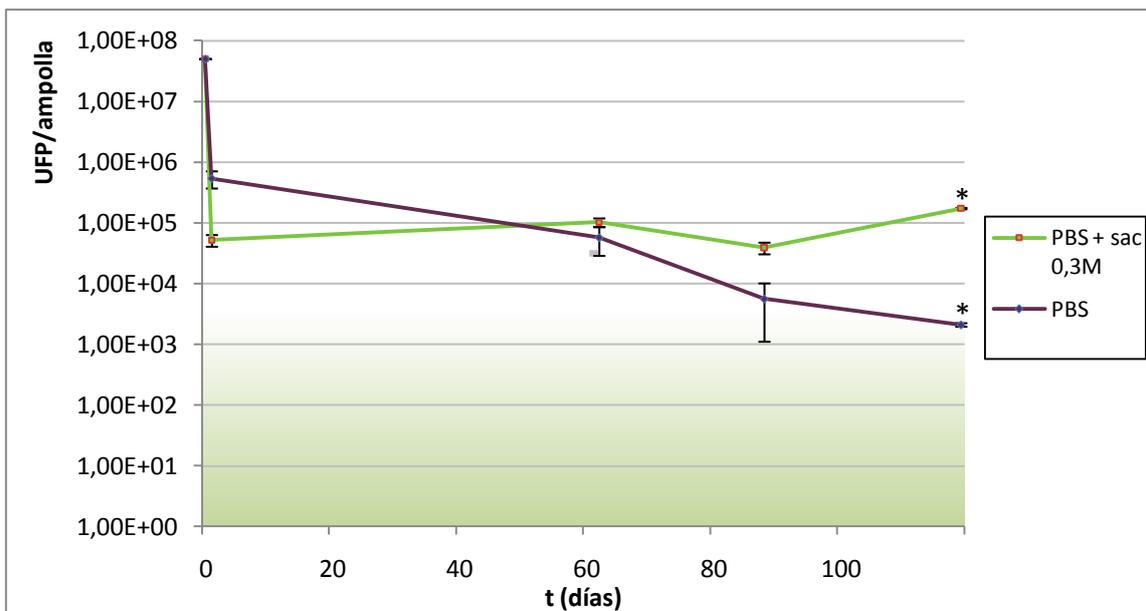


Figura 4.3 Título de fagos liofilizados con PBS y PBS con sacarosa 0,3M almacenados a 4°C a diferentes tiempos. Los * indican los puntos donde la barra de error queda tapada por el marcador del dato.

Dada la estabilización observada durante el almacenamiento a 4°C del fago liofilizado con sacarosa respecto al buffer sin agregado de azúcar, se analizó el efecto de la adición de diferentes concentraciones de sacarosa en la pérdida de partículas infectivas durante el proceso de liofilización utilizando buffer SM (que generó menos pérdida en el título de fagos de que PBS). Los resultados se muestran en la figura 4.4.

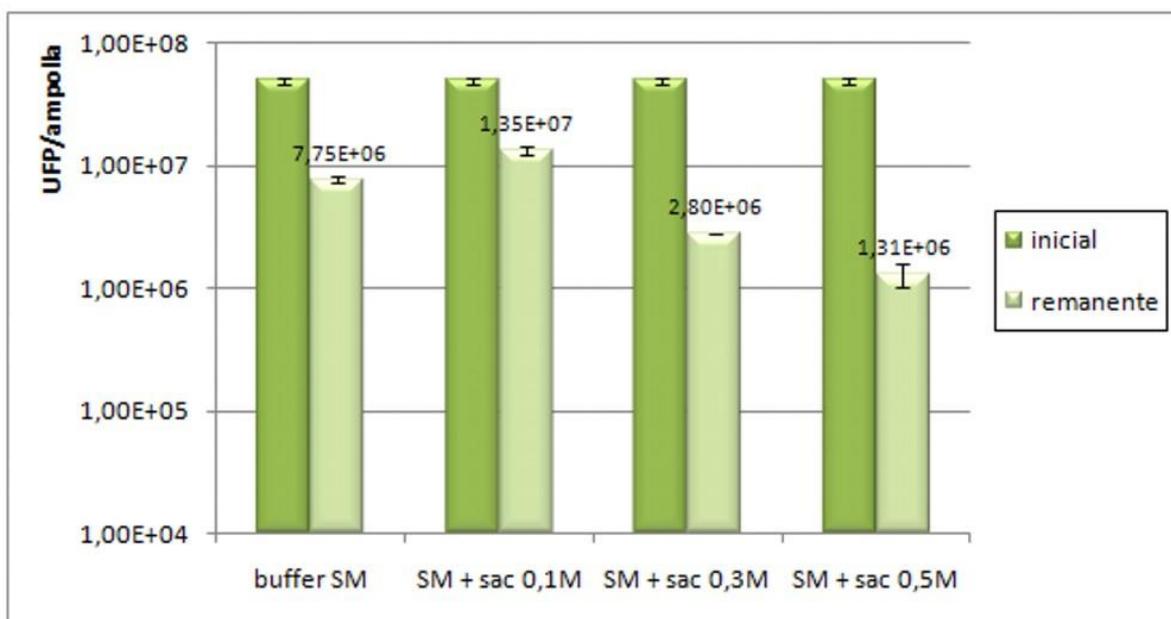


Figura 4.4 Títulos de fago antes (inicial) y después (remanente) del proceso de liofilización con buffer SM y diferentes concentraciones de sacarosa.

Se observa que el agregado de sacarosa en una concentración final de 0,1M protegió al fago durante el proceso de liofilización respecto al buffer sin sacarosa, y el aumento en la concentración de este azúcar produjo un descenso cada vez mayor en el título de fagos remanentes luego del proceso de liofilización, resultando inferiores a los títulos obtenidos sin la adición de sacarosa. Este mismo efecto fue observado por Puapermpoonsiri et al. (2010) sobre un fago de *Pseudomonas aeruginosa* de la familia *Myoviridae* y uno de *Staphylococcus aureus* perteneciente a la familia *Siphoviridae* que reportaron una mayor pérdida de partículas infectivas con el agregado de concentraciones altas de sacarosa (0,5M) respecto a la adición de bajas concentraciones (0,1M). Esta diferencia fue adjudicada a que una mayor concentración de azúcar produce mayor pérdida de agua no congelada adsorbida sobre la superficie de los fagos durante el proceso de secado, lo que probablemente reduce la estabilidad de las partículas. Los autores atribuyeron el cambio en la cantidad de agua eliminada a una diferencia en la porosidad de los liofilizados obtenidos, siendo menos porosos aquellos liofilizados que “colapsaron” durante el proceso de secado, ya que la disminución en la porosidad del producto dificulta la eliminación del agua no congelada durante el proceso de secado manteniendo un porcentaje de humedad residual que parece necesario para que el fago se mantenga estable. Este tipo de liofilizado “colapsado” fue el que se observó con la menor concentración de sacarosa (0,1M) (Puapermpoonsiri et al., 2010).

A diferencia de lo expuesto en el trabajo de Puapermpoonsiri et al. (2010), donde se adjudica la pérdida de actividad de los fagos de *Ps. aeruginosa* y *S. aureus* al proceso de secado, en este trabajo se observó que la desestabilización del fago CA933P durante la liofilización en presencia de altas concentraciones de sacarosa (0,5M) se produce tanto durante la etapa de congelación a -80°C como durante el proceso de secado. En la figura 4.5 se observa que el agregado de una concentración 0,1M de sacarosa al buffer SM no produce un cambio significativo ($p < 0,05$) en el título de fagos antes y después del proceso de congelación a -80°C mientras que la adición de sacarosa en una concentración de 0,5M produce un descenso de 0,26 log. En el proceso de liofilización, el descenso observado en el título de fagos en buffer SM con sacarosa 0,1 M fue de 0,57 log mientras que con sacarosa 0,5 M el descenso fue de 1,58 log (figura 4.4) por lo que se deduce que en la adición de sacarosa en baja concentración (0,1M) la pérdida de partículas infectivas se produce durante el proceso de secado, mientras que la adición de sacarosa en alta concentración (0,5M) reduce el título de fagos tanto en el proceso de secado como en el de congelación (ya que el descenso de título observado fue mayor para la liofilización que para la congelación a -80°C).

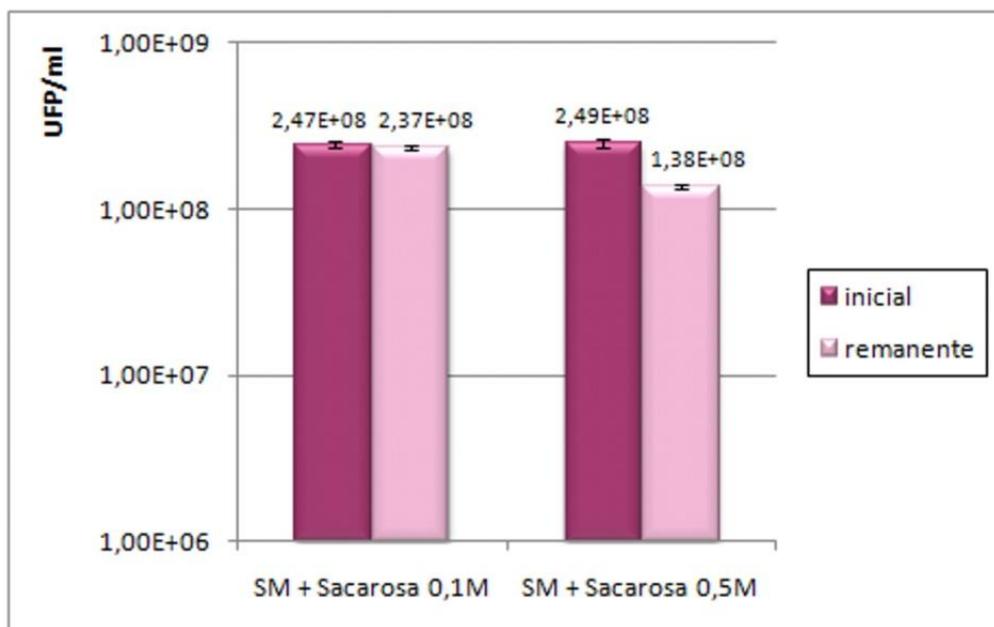


Figura 4.5 Título inicial y remanente de fagos después del proceso de congelación a -80°C y descongelación a temperatura ambiente con sacarosa en baja concentración (0,1M) y alta concentración (0,5M).

Otro mecanismo conocido de estabilización de proteínas aportado por lioprotectores es la formación de un sistema amorfo (no cristalino) durante la liofilización, ya que se mantiene una estructura similar a la observada en medio líquido pero los valores extremos de viscosidad alcanzados en el estado vítreo retardan enormemente la velocidad de pérdida de estructura de las proteínas (Wang, 2000). Matejtschuk (2007) postula que la concentración de sales inorgánicas durante el proceso de liofilización de proteínas debe mantenerse lo más bajo posible ya que su adición reduce la temperatura de transición vítrea de la formulación y disminuye el límite de temperatura a la cual se puede llevar a cabo el secado primario.

Para estudiar el efecto producido por la disminución en la concentración de sales inorgánicas durante el proceso de liofilización, se determinó el número de partículas infectivas remanentes en buffer SM respecto al uso del mismo buffer diluido al 10% (v/v) en H_2O miliQ y se analizó el efecto de la adición de sacarosa 0,1M al buffer diluido. Los títulos de fago obtenidos después del proceso de liofilización en estas condiciones se muestran en la figura 4.6.

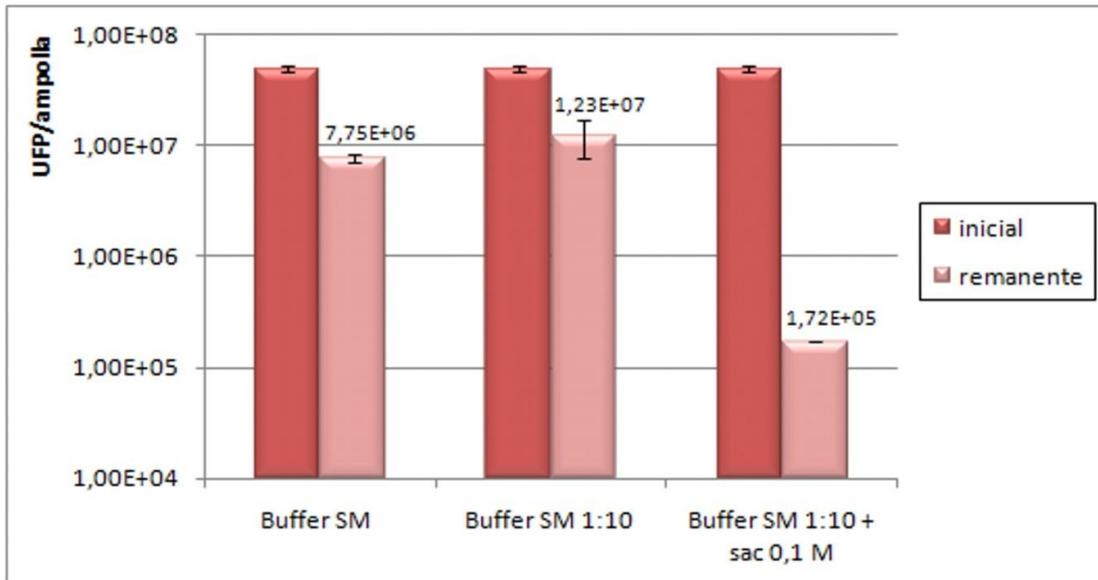


Figura 4.6 Título de fagos antes (inicial) y después (remanente) del proceso de liofilización con buffer SM y buffer SM diluido al 10% (v/v) en H₂O miliQ (SM 1:10) con y sin el agregado de sacarosa 0,1M.

El efecto de dilución del buffer no generó diferencias significativas en el título de fagos después de la liofilización, por lo que se descarta que la concentración de sales sea desestabilizante en este sistema (al menos de las sales que conforman este buffer), sin embargo la adición de sacarosa en una concentración final de 0,1M al buffer diluido generó un descenso pronunciado (2,46 log) en el título de fagos, a diferencia de lo que ocurre con el buffer sin diluir donde la adición de sacarosa tiene un efecto estabilizante, por lo que se deduce que el mecanismo de estabilización a través del cual está actuando la sacarosa depende de la concentración de sales del medio.

El efecto del uso de buffer SM con sacarosa 0,1M y en buffer diluido 1:10 en el almacenamiento refrigerado de los productos liofilizados se muestran en la figura 4.7.

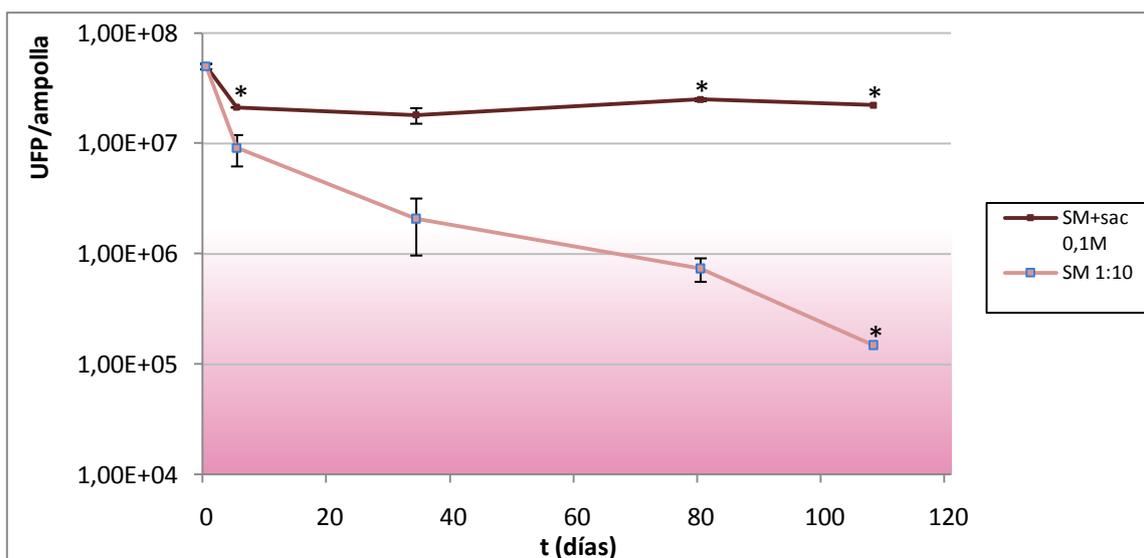


Figura 4.7 Título de fagos liofilizados con SM 1:10 y SM con sacarosa 0,1M (SM+sac 0,1M) almacenados a 4°C a diferentes tiempos. Los * indican los puntos donde la barra de error queda detrás del marcador del dato.

Nuevamente el agregado de sacarosa mantiene estable el título de fagos durante el almacenamiento a 4°C del producto liofilizado, mientras que el buffer diluido muestra una caída progresiva en el título de partículas infectivas durante los 110 días de almacenamiento refrigerado, produciéndose una caída total de 1,78 log en la concentración de fagos respecto al producto recién liofilizado.

En líneas generales se observa que para el proceso de liofilización del fago CA933P el uso de PBS produce menor estabilidad que el uso de buffer SM, y que esta desestabilización se produciría durante el proceso de secado. La sacarosa tuvo un efecto estabilizante durante la liofilización respecto a los buffers sin sacarosa cuando se adicionó a bajas concentraciones (0,1M) y no mostró descenso en el número de partículas infectivas después del proceso de congelación a -80°C, mientras que la adición de sacarosa en alta concentración (0,5M) afectó negativamente al proceso de congelación, y al secado, siendo este último paso el que genera la mayor pérdida en el título de fagos en todos los casos.

El análisis del almacenamiento refrigerado de los productos liofilizados muestra que existe un efecto estabilizante de las dos concentraciones de sacarosa estudiadas (0,1M y 0,3M). Los azúcares son los estabilizantes más comúnmente utilizados para proteínas en estado sólido, ya la interacción vía puentes de hidrógeno con las proteínas permite el remplazo de las moléculas de agua de la esfera de hidratación primaria permitiendo que la proteína mantenga su estructura después de la deshidratación, además la adición de azúcares genera sólidos amorfos en esas condiciones, aunque esto último no siempre le aporta estabilidad a los liofilizados en el tiempo (Wang, 2000, Rey & May, 2004).

La dilución de las sales en el buffer no tuvo un efecto protector durante la liofilización y tuvo un efecto negativo en el almacenamiento del producto liofilizado. La adición de sacarosa en baja concentración (0,1M) al buffer diluido mostró un descenso notable en el número de partículas infectivas remanentes.

Sistemas complejos

El uso de este tipo de aditivos se planteó en este trabajo con la idea de aprovechar sistemas naturales de grado alimentario que puedan servir como excipientes para la liofilización de fagos con fines terapéuticos, ya que la mayoría de estos productos utilizados comúnmente como lioprotectores, como leche en polvo o peptona, no son aceptables para uso terapéutico por ser altamente viscosos para ser resuspendidos con facilidad (Puapermpoonsiri et al., 2010).

Se ensayaron como lioprotectores complejos para la liofilización del fago CA933P el extracto de gránulo de kefir (E1:100), el gel elaborado a partir del extracto (E1:10), el permeado de suero fermentado con kefir y neutralizado con NaOH (PSK), leche descremada comercial estéril (UHT) y un cultivo de pentacepa (Bolla et al., 2011) en leche estéril, caldo LB y caldo TS. Estos sistemas complejos pueden aportar simultáneamente varios componentes crio- y lioprotectores de diferente composición química, como polímeros y polioles (el kefirán y otros polisacáridos de origen bacteriano podrían aportar este tipo de compuestos), disacáridos (lactosa) y proteínas e hidrolizados proteicos (como peptona, triptona, y proteínas de origen bacteriano) (Wang, 2000, Matejtschuk, 2007, Kutter & Sulakvelidze, 2005).

En la figura 4.8 se observa cómo afectan las diferentes condiciones ensayadas al título de fagos al cabo del proceso de liofilización. Para todos los sistemas estudiados se observa una caída significativa en el número de fagos respecto al título inicial ($p < 0,05$). El menor descenso se produjo al utilizar el cóctel de bacterias y levaduras de kefir en leche (PC), con una caída de 0,71 log en el título de fagos, que resultó significativamente menor que la observada para los extractos de gránulos de kéfir sin gelificar (E1:100) y gelificado (E1:10). La leche, el suero fermentado (PSK) y los dos medios de cultivo ensayados produjeron un descenso comparable ($p < 0,05$) en el número de partículas infectivas (de aproximadamente 1,4 log) y este descenso no resultó significativamente diferente al producido con los extractos E1:100 y E1:10, que fue de aproximadamente 2,45 log.

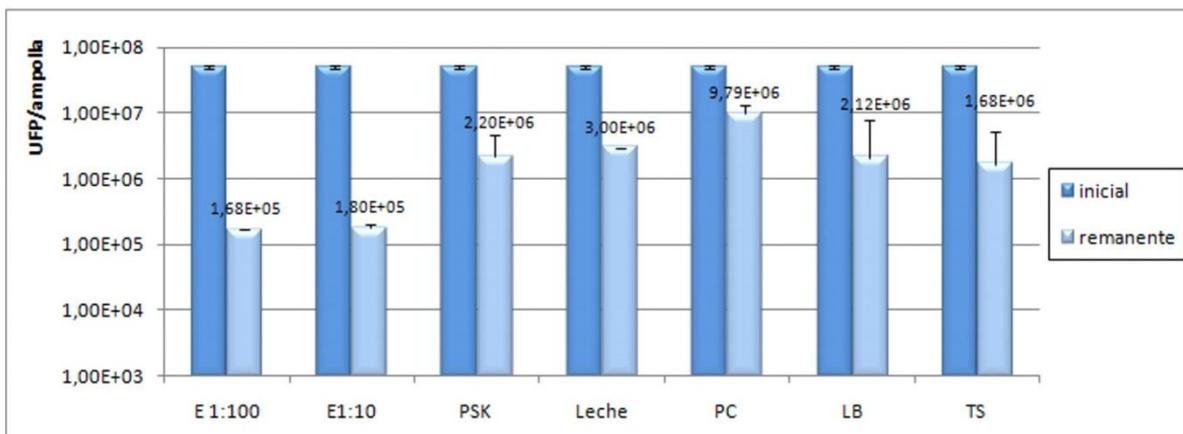


Figura 4.8 Título de fagos antes (inicial) y después (remanente) del proceso de liofilización con diferentes aditivos.

Posteriormente se analizó la estabilidad de los liofilizados potencialmente pro- o prebióticos (PC, PSK y E1:10) en el almacenamiento refrigerado a 4°C durante 120 días (E1:100 no se determinó por ser similar en composición y comportamiento a E1:10). Los resultados obtenidos se muestran en la figura 4.9.

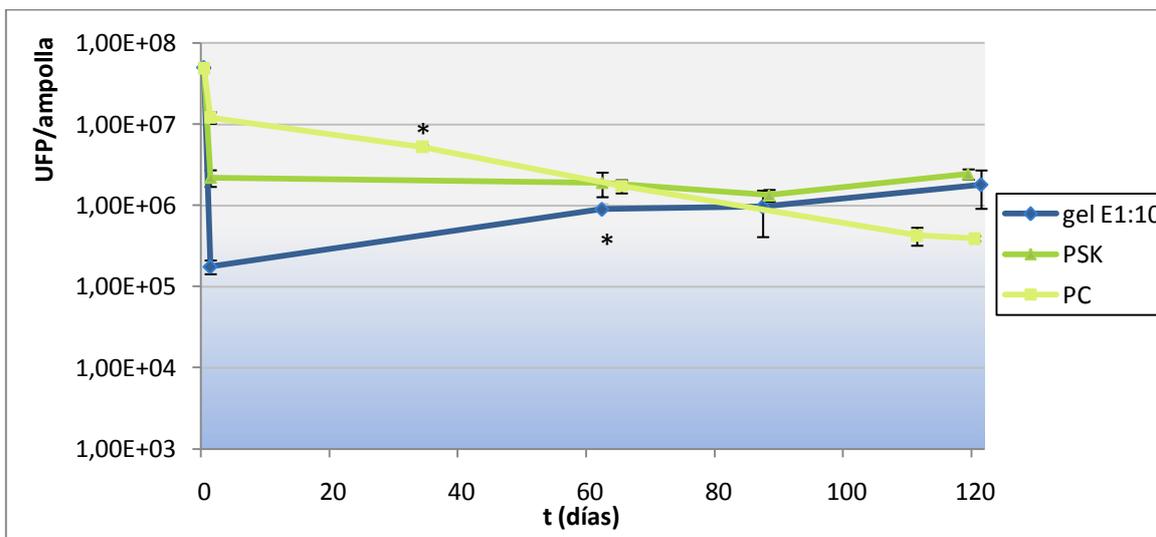


Figura 4.9 Título de fagos liofilizados en gel E1:10, PSK y PC y almacenados a 4°C a diferentes tiempos. Los * indican los puntos donde la barra de error queda detrás del marcador del dato.

Las caídas de título observadas inmediatamente después del proceso de liofilización son pronunciadas para el caso del PSK y el gel E1:10, este último representa un caso particular debido a que la liofilización se realiza con el fago incorporado a un medio estructurado y se genera un liofilizado compacto y “colapsado” que resulta muy difícil de resuspender (figura 4.10), por lo que la caída pronunciada en el primer punto de la cinética se debe no sólo a la pérdida en el título de fagos sino también a una falta de

homogeneidad de la muestra resuspendida. En los puntos subsiguientes la muestra fue mezclada intensamente hasta total homogeneidad de la fase líquida. Teniendo en cuenta esto, el E1:10 y el PSK tienen un comportamiento similar, con una caída inicial y una posterior estabilidad durante el almacenamiento refrigerado, que representa una pérdida total de aproximadamente 1,4 log. En el caso del PC los resultados son inversos a los anteriores, la caída inicial observada no es muy pronunciada (de 0,61 log), pero se observa una pérdida progresiva en el título de fagos durante el almacenamiento refrigerado, con una disminución total de 1,49 log durante los 120 días de almacenamiento del producto liofilizado.

Otro aspecto que se analizó fue, en forma cualitativa, la apariencia del producto liofilizado obtenido en las diferentes condiciones ensayadas. Los estabilizantes utilizados durante la liofilización no sólo deben cumplir la función de mantener la actividad/viabilidad de lo que se quiere liofilizar sino que también se busca que estos compuestos sean capaces de mantener la estructura del producto liofilizado (o torta de liofilización) sin que éste colapse o se produzcan salpicaduras en las paredes de la ampolla por la ebullición de la muestra cuando se deshidrata aplicando vacío. Otro aspecto que debe tenerse en cuenta es la facilidad de resuspensión de la muestra, pues un liofilizado de estructura compacta y no colapsado pero muy difícil de resuspender tampoco es deseable, por lo que los excipientes utilizados también deben generar productos que sean sólidos amorfos, pues éstos se disuelven con mayor facilidad que los sólidos cristalinos (Wang, 2000). En la figura 4.10 se muestran las tortas de liofilización obtenidas con PBS, PBS con sacarosa 0,3M, PSK, gel E1:10 y PC. En los liofilizados obtenidos con PBS (figura 4.10 A) se puede apreciar que las paredes de las ampollas están cubiertas del liofilizado (en todos los liofilizados utilizando buffer o buffer diluido se observó lo mismo) y el mismo tipo de liofilizado se obtuvo utilizando medios de cultivo (TS y LB). En el caso de PBS con sacarosa 0,3M y del PSK, no se observa liofilizado sobre las paredes de la ampolla pero sí se observa que la torta de liofilización tiene un aspecto espumoso que tampoco es deseable en los productos liofilizados (fig. 4.10 B y D); esto mismo se observó para todos los liofilizados con sacarosa. En todos los casos, los liofilizados utilizando buffer con y sin la adición de sacarosa y los ensayos utilizando PSK, LB y TS como lioprotectores se resuspendieron inmediatamente con el agregado del buffer. Con el gel de kefir se observa una torta de liofilización más estructurada (figura 4.10 C), en la ampolla de la derecha se observa la torta colapsada (despegada de las paredes) y en la de la izquierda se observa un liofilizado compacto, sin salpicaduras, con poros pequeños y un espesor constante de la torta en toda la superficie, pero extremadamente difíciles de resuspender y homogeneizar. Los liofilizados con PC se muestran en la figura 4.10 E, donde se observan tortas de liofilización estructuradas, con pocas salpicaduras y poros pequeños, al igual que lo observado para los liofilizados en leche, que fueron fáciles de resuspender, aunque su disolución no fue inmediata como ocurrió en el caso de buffers, PSK y medios de cultivo.

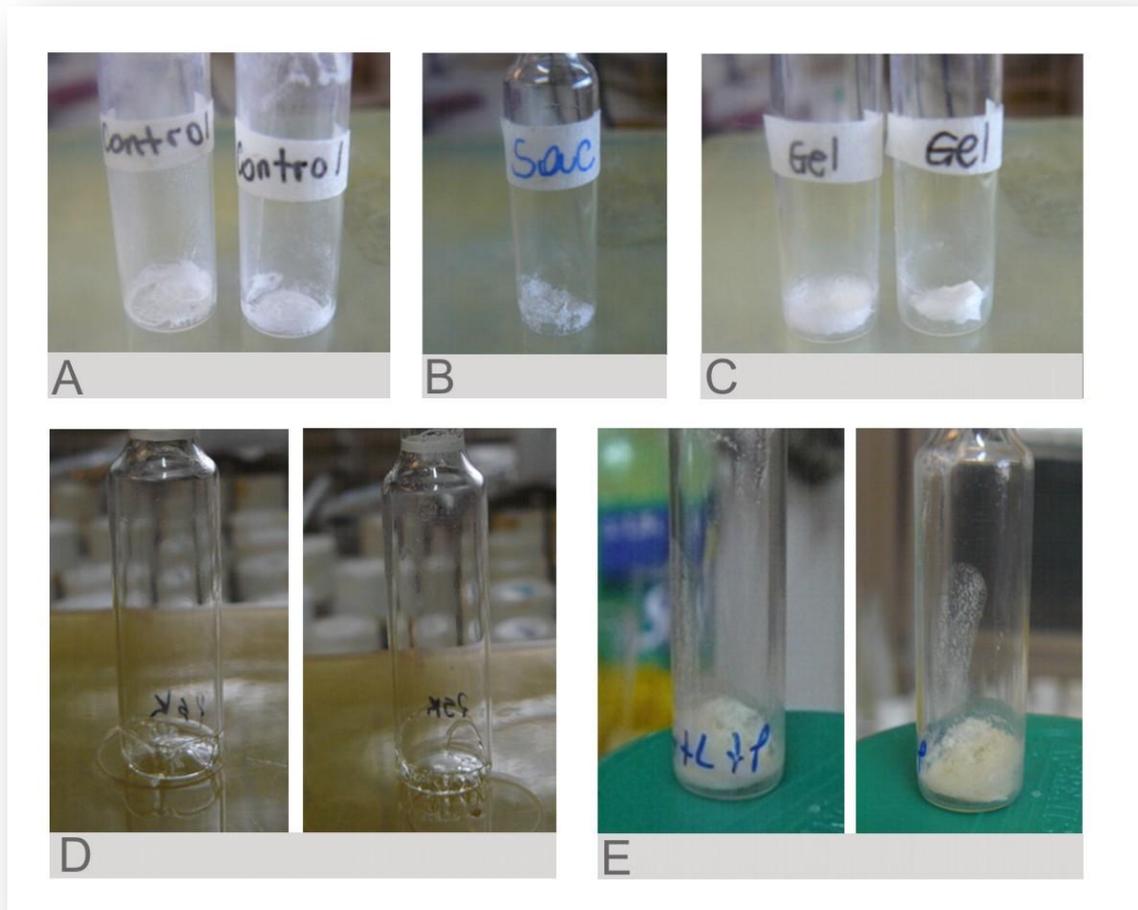


Figura 4.10 Fotografías de las ampollas de los fagos liofilizados con: **A.-** PBS, **B.-** PBS con sacarosa 0,1M, **C.-** E1:10, **D.-** PSK, **E.-** PC

Para todos los sistemas complejos ensayados como lioprotectores se observó un descenso significativo en los recuentos de fagos obtenidos después del proceso de liofilización respecto al número inicial de partículas infectivas. Entre los sistemas ensayados, los extractos de kéfir líquido (E1:100) y gelificado (E1:10) fueron los sistemas que generaron las mayores caídas en el título de fagos durante la liofilización. Estos valores no difirieron significativamente de los obtenidos con leche, TS, LB o PSK pero sí se observó una protección significativamente mayor con el uso del cóctel de microorganismos PC. Este sistema, sin embargo, no logró mantener el título de fagos durante el almacenamiento refrigerado de los productos liofilizados, mientras que el PSK y el E1:10 resultaron ser buenos estabilizantes en ese sentido. El PSK no difirió significativamente en el grado de protección ofrecido durante la liofilización respecto al PC y, a diferencia del E1:10, ambos formaron productos fáciles de reconstituir.

Los trabajos publicados sobre conservación de fagos muestran en general datos muy dispares (Clark, 1962, Puapermpoonsiri et al., 2010, Schade & Caroline, 1944,

Ackermann *et al.*, 2004), y a pesar de que existen ciertas sustancias que tienen conocidas propiedades crio- y lioprotectoras, son tantas las variables que influyen en la conservación de sistemas biológicos que es necesario ajustar empíricamente las mejores condiciones para preservar a cada fago en particular (Kutter & Sulakvelidze, 2005). Uno de los crioprotectores más utilizados para la liofilización de bacteriófagos es la leche descremada (Kutter & Sulakvelidze, 2005) porque es un sistema complejo que aporta crioprotectores naturales como proteínas y azúcares (Clokie & Kropinski, 2009). Con esta lógica se ha estudiado la protección ofrecida por otros sistemas complejos tales como extractos de tejidos animales y yema de huevo, pero no se obtuvieron mejoras considerables en la estabilidad de los fagos respecto a los que se había descrito previamente (Schade & Caroline, 1944).

En este trabajo se presentan nuevos sistemas, el PSK y el PC, que protegen de manera comparable a la leche descremada durante el proceso de liofilización, y que, para el caso del PSK, permite mantener el título de fagos durante el almacenamiento del producto liofilizado. Los resultados obtenidos en el uso de este tipo de sistemas como métodos de conservación no pudieron superar a los observados para el buffer SM con sacarosa 0,1M, que dejó el título de fagos remanentes más alto después del proceso de liofilización ($p < 0,05$) y produjo estabilidad en este título durante el almacenamiento del producto liofilizado, pero resultan interesantes desde el punto de vista terapéutico porque los productos resultaron fáciles de resuspender y por sus características potencialmente pro- o prebióticas podrían aportar un mecanismo de biocontrol diferente al aportado por el fago en el uso del producto para biocontrol.

El PSK generó estabilidad durante el almacenamiento del liofilizado, pero desde el punto de vista terapéutico existen dos diferencias fundamentales respecto al PC. La primera es que se conoce la composición exacta de este último, lo que permite estandarizar los productos con mayor facilidad y regulatoriamente siempre es más sencilla la aprobación de productos estandarizados, y la segunda es que el PC tiene propiedades probióticas comprobadas cuando se encuentra formulado tal como se utiliza en este trabajo, mientras que el tratamiento efectuado al fermento de kefir en permeado de suero para formular el PKS podría afectar la capacidad prebiótica del kefirán, por lo que se debería reevaluar esa capacidad en las nuevas condiciones.

Congelación

La congelación es un método de conservación menos drástico que la liofilización, ya que se somete a la muestra al proceso de cristalización del agua pero se evita la deshidratación por vacío, que suele ser la parte de la liofilización donde se pierde la mayor cantidad de actividad de los productos biológicos. Por otro lado, el almacenamiento y transporte de las muestras liofilizadas tiene la ventaja de poder realizarse a temperatura ambiente sin mayores pérdidas.

En general, para el almacenamiento a largo plazo de muestras que no necesitan ser transportadas, el método de conservación elegido es la congelación, por su sencillez y porque la pérdida de viabilidad o actividad (dependiendo del caso) es en general baja, y los productos suelen ser estables en el tiempo. A raíz de esto se estudió como segundo método de conservación del fago CA933P la congelación a distintas temperaturas (-20°C y -80°C) y se analizaron los títulos de fagos remanentes después del proceso de congelación y durante 120 días de almacenamiento congelado. Se estudiaron como medios para la congelación aquellos que proporcionaron estabilidad durante el almacenamiento refrigerado de los liofilizados o que tienen conocidas propiedades crioprotectoras (como la sacarosa).

En primer lugar se analizó la estabilidad del fago en el almacenamiento a -20°C y -80°C con PBS y el efecto del agregado de sacarosa a este medio en una concentración final de 0,3M. Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 4.11 y 4.12.

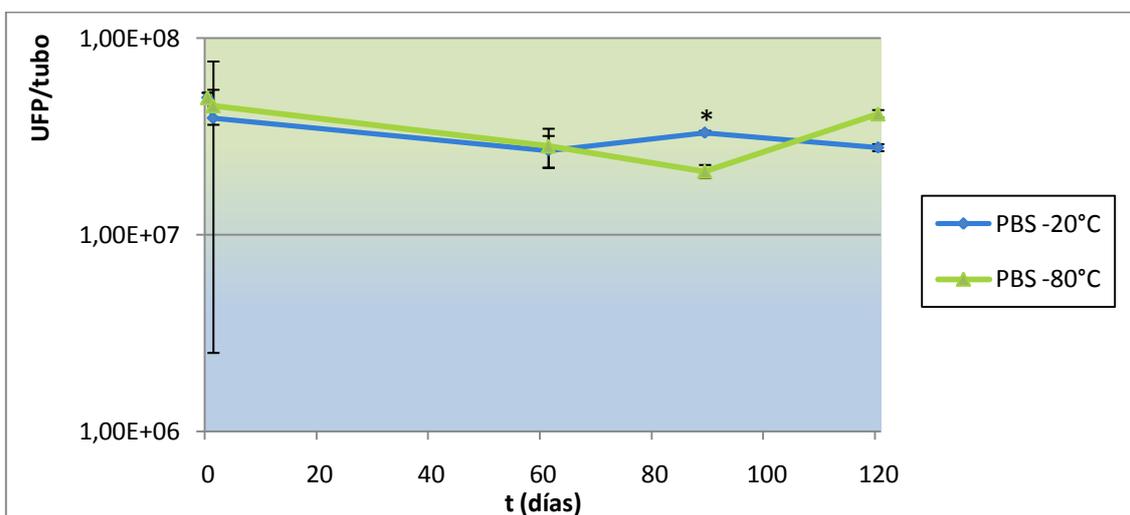


Figura 4.11 Título de fagos congelados y almacenados a -20°C y -80°C en PBS a diferentes tiempos. El * indica el punto donde la barra de error queda tapada por el marcador del dato.

Se observa una retención casi total del título de fagos por tubo al cabo de 120 días de almacenamiento para PBS a -20°C y -80°C (fig. 4.11). La adición de sacarosa no produjo

inactivación del fago durante el proceso de congelación a -20°C pero se observa una caída de 0,36 log en el título del fago después de 120 días de almacenamiento. En la congelación a -80°C se produjo un descenso de 0,48 log en el título de fagos, lo que ya se había observado para el proceso de liofilización en estas condiciones, y luego, a lo largo de los 120 días de almacenamiento, tiene un comportamiento similar al observado a -20°C en las mismas condiciones (fig. 4.12).

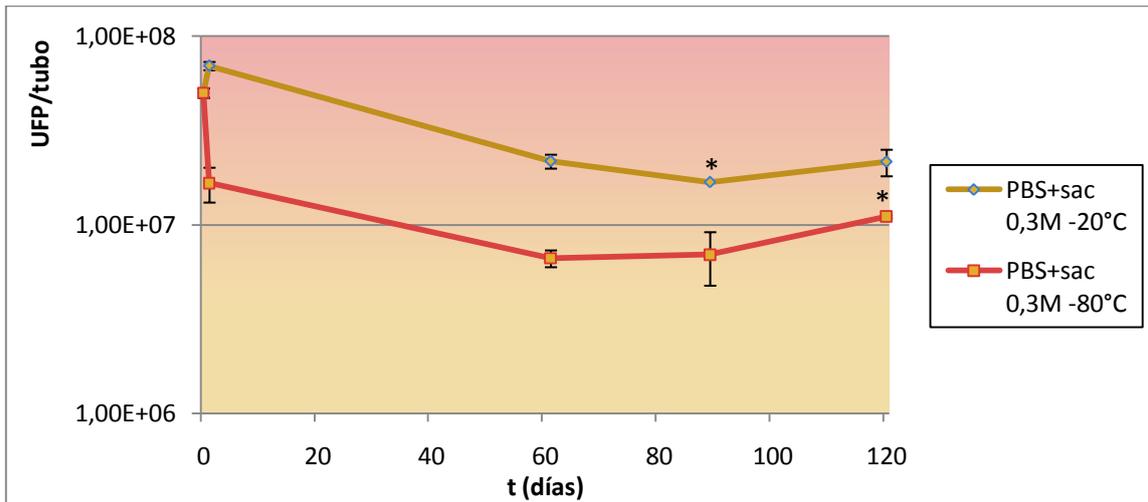


Figura 4.12 Título de fagos congelados y almacenados a -20°C y a -80°C en PBS con sacarosa 0,3 M (PBS+sac 0,3M) a diferentes tiempos. Los * indican los puntos donde la barra de error está tapada por el marcador del dato.

Por otro lado se estudió la conservación a -20°C y a -80°C del fago en una solución de baja salinidad (buffer SM diluido 1:10) y en buffer SM con el agregado de concentraciones finales de sacarosa de 0,1M y 0,5M. Los resultados se muestran en las figuras 4.13 y 4.14.

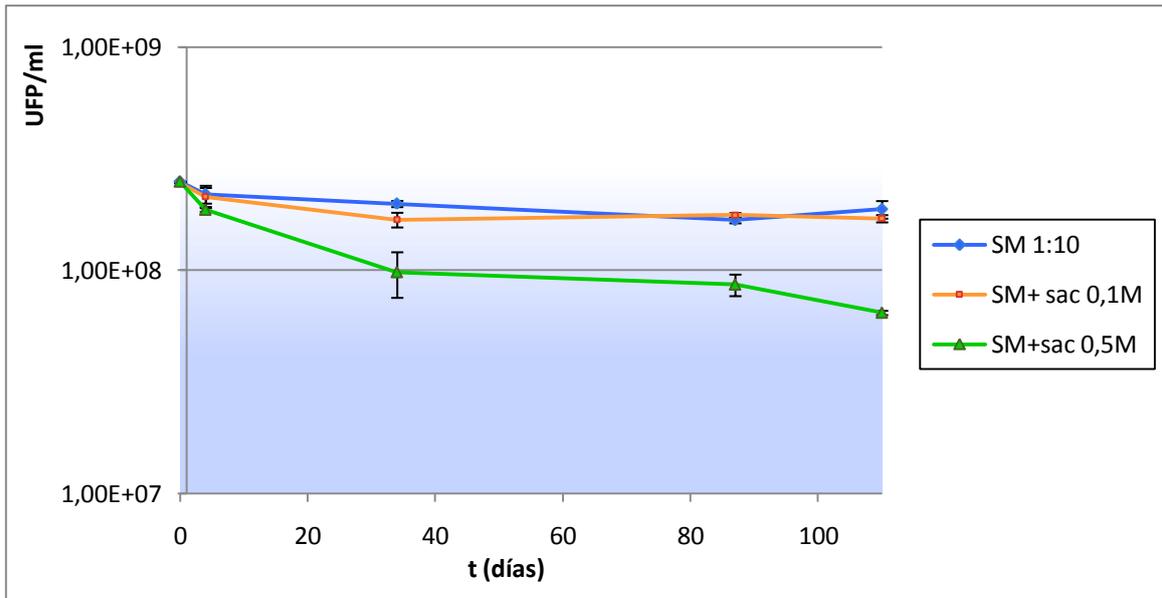


Figura 4.13 Título de fagos congelados y almacenados a -20°C con SM diluido 1 en 10, SM con sacarosa 0,1 M y SM con sacarosa 0,5M a diferentes tiempos.

Se observa que en la congelación a -20°C y a -80°C hay una pérdida muy leve en el título de fagos para el buffer SM diluido 1:10 o con sacarosa en una concentración final de 0,1M. Luego el título se mantiene en los 120 días de almacenamiento congelado a -20°C mientras que a -80°C se observa un descenso en el tiempo, más pronunciado para SM1:10 que para SM con sac. 0,1M. El agregado de sacarosa a una concentración final de 0,5M produjo un descenso progresivo en el título de fagos durante los 120 días de almacenamiento congelado a -20°C , y a -80°C se verificó un descenso inicial en el título de fagos de aproximadamente 0,3 log y luego se mantuvo constante durante el almacenamiento.

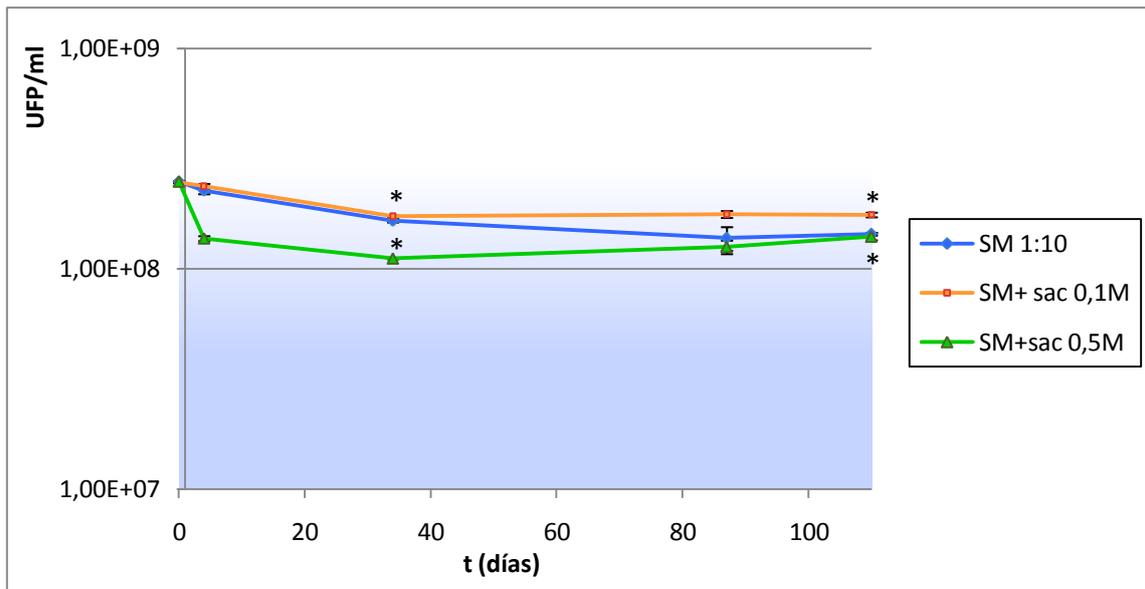


Figura 4.14 Título de fagos congelados y almacenados a -80°C con SM 1:10, SM con sacarosa 0,1 M y SM con sacarosa 0,5M a diferentes tiempos. Los * indican los puntos donde la barra de error queda detrás del marcador del dato.

La comparación entre las curvas obtenidas para concentraciones de 0,3 y 0,5M de sacarosa en PBS y SM respectivamente a -80°C (figuras 4.12 y 4.14) muestra en ambos casos que a esta temperatura hay una caída inicial en el título de fagos debida al proceso de congelación seguida de una estabilización en este título durante el almacenamiento. Comparativamente, cuando las muestras son congeladas a -20°C en las mismas condiciones (figuras 4.12 y 4.13), no hay pérdida significativa en el número de fagos durante la congelación pero sí se observa una caída durante el almacenamiento, la cual se hace más pronunciada a mayor concentración de sacarosa.

Los resultados obtenidos para la conservación del fago CA933P a ambas temperaturas demuestran que es mejor el agregado de concentraciones bajas de sacarosa (0,1M) contrariamente a lo que se encuentra descrito en forma general para proteínas (Rey & May, 2004) ya que para estas moléculas se ha postulado que la sacarosa sólo actúa como crioprotector a concentraciones altas ($\sim 0,5\text{M}$). Sin embargo al simplificar el análisis de los bacteriófagos considerándolos como proteínas en su comportamiento frente a la congelación y la liofilización, debe tenerse en cuenta que la complejidad en la estructura y el tamaño de los mismos puede influir notablemente en los fenómenos de interacción con los crioprotectores.

Se analizó también el uso de sistemas complejos (PSK y gel E1:10) como crioprotectores para el almacenamiento del fago a -20°C y -80°C . El caso de E1:10 es un caso particular dentro de los estudiados porque durante la congelación en este sistema agua se cristaliza desde la estructura del gel. La figura 4.15 muestra el comportamiento del fago en dichos sistemas a ambas temperaturas.

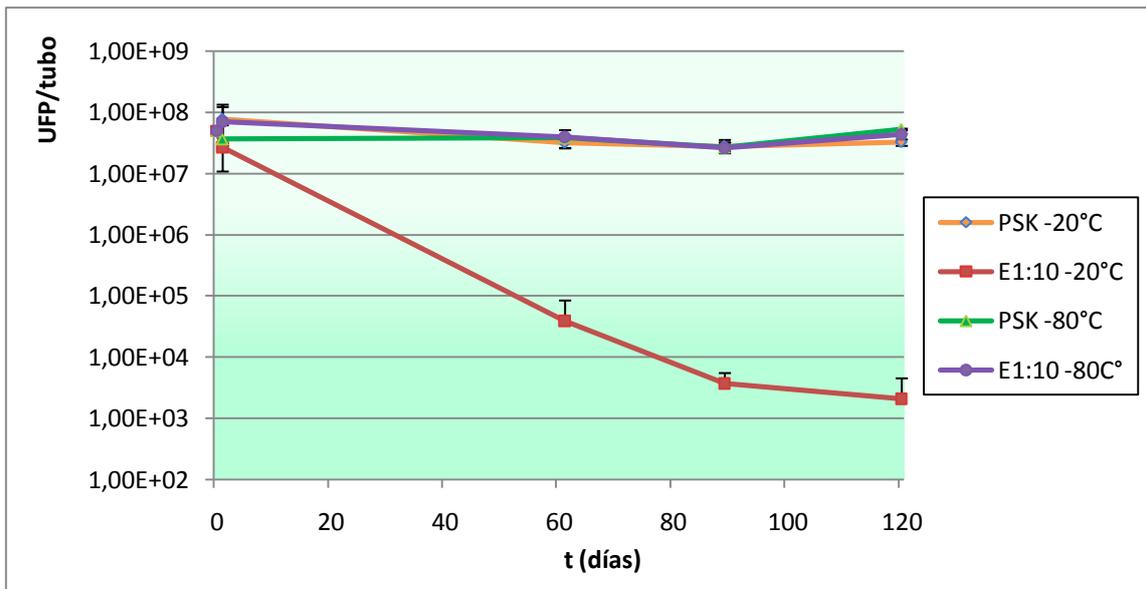


Figura 4.15 Título de fagos congelados y almacenados a -20°C y -80°C con PSK y E1:10 a diferentes tiempos.

Se puede observar que el PSK no produce un cambio significativo en el número de fagos infectivos durante los 120 días de almacenamiento tanto a -20°C como a -80°C , mientras que el comportamiento del gel E1:10 difiere marcadamente entre las dos temperaturas. En este sistema no se observa un descenso en el título de fagos por el proceso de congelación en sí para ninguna de las dos temperaturas, pero a -80°C no produce pérdidas significativas en el número de fagos infectivos al cabo de 120 días de almacenamiento, mientras que a -20°C el título desciende considerablemente en el tiempo, con una pérdida total de aproximadamente 4,4 log. Este comportamiento es similar al observado para los almacenamientos congelados a -20°C con los buffers PBS y SM con sacarosa 0,3M y 0,5M respectivamente, pero para el caso del gel este descenso es mucho más pronunciado.

Conclusión general del capítulo IV

En este capítulo se abordaron diferentes métodos de conservación aplicados al fago CA933P de la familia *Podoviridae* y se estudió la sensibilidad del fago en el almacenamiento a temperatura ambiente y su estabilidad frente a diferentes procesos de conservación, se analizó el efecto producido por la adición de moléculas de actividad crio- y lioprotectora conocidas y de otras potencialmente útiles con este fin, y la estabilidad durante el almacenamiento en las diferentes condiciones.

En primer lugar se determinó que el almacenamiento a temperatura ambiente no es aconsejable debido a que la velocidad de degradación de los fagos tiende a aumentar con el tiempo. El almacenamiento durante un año en estas condiciones produjo un descenso en el título de fagos de aproximadamente 6 log y después de 2 años no se detectaron partículas infectivas.

En el uso de sistemas simples de protección para el proceso de liofilización del fago CA933P los mejores resultados se obtuvieron utilizando buffer SM adicionado con sacarosa 0,1M (la concentración más baja ensayada). Este resultado concuerda con lo observado por Puapermpoonsiri et. al (2010) quienes obtuvieron mejores resultados en la liofilización de fagos de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* con sacarosa 0,1M respecto al uso de sacarosa 0,5M. El agregado de sacarosa también logró mantener el título de fagos de los liofilizados refrigerados en los 120 días de almacenamiento en las dos concentraciones estudiadas (0,1M y 0,3M). Los azúcares son los estabilizantes más ampliamente utilizados para mantener la actividad de las proteínas en estado sólido en el tiempo, ya que son las mismas características de los excipientes que estabilizan durante el proceso de secado las que se citan como deseables para mantener la integridad de las proteínas durante el almacenamiento en estado sólido (formación de puentes de hidrógeno y de sistemas amorfos) (Wang, 2000).

La dilución del buffer SM no tuvo un efecto desestabilizante durante la liofilización, pero resultó muy llamativo el hecho de que la adición de sacarosa en una concentración de 0,1M tuviera un efecto negativo tan marcado en el buffer diluido y actuara de forma contraria sobre el buffer sin diluir, lo que indica que existe una relación entre la concentración de sales del medio y la actividad lioprotectora de la sacarosa.

En el uso de sistemas complejos, la menor caída en el título de fagos durante el proceso de liofilización se observó con el uso del cóctel de microorganismos PC, aunque éste no logró mantener el título de fagos durante el almacenamiento refrigerado del producto, mientras que el PSK, por su parte, generó una pérdida algo mayor que el PC durante el proceso de liofilización pero otorgó estabilidad al producto liofilizado durante el almacenamiento a 4°C. Estos sistemas no superaron al buffer SM

con sacarosa 0,1M como métodos de conservación, pero son sistemas que permitieron mantener un título de fagos aceptable y resultan interesantes desde el punto de vista terapéutico, ya que se formaron productos fáciles de resuspender y por sus características potencialmente pro- o prebióticas podrían aportar un mecanismo de biocontrol diferente al aportado por el fago en el uso terapéutico del mismo. Ambas formulaciones presentan ventajas en este sentido: el PSK aportó estabilidad del producto en el tiempo, lo que resulta necesario para que éste se pueda comercializar, pero el PC es una formulación cuya composición se conoce con exactitud, lo cual es deseable en formulaciones a ser utilizadas con fines terapéuticos y además tiene comprobadas características probióticas tal como se ha utilizado en este trabajo (Bolla et al., 2011), mientras que el PKS requirió ser neutralizado e inactivado antes de su aplicación por lo que debería evaluarse su posible capacidad prebiótica en estas condiciones.

Para el caso de la conservación de fagos por congelación se observó, en general, una mayor estabilidad del fago a -20°C que a -80°C (excepto para el caso del gel E1:10). El agregado de sacarosa dio buen resultado a baja concentración (0,1M) a ambas temperaturas, pero a concentraciones más altas tuvo un efecto negativo, tal como se había observado en la liofilización. A -80°C la adición de sacarosa 0,5M muestra un descenso en el título debido al proceso de congelación, este efecto es contrario a lo que se esperaría para la congelación de proteínas donde en general se describe que una alta concentración de sacarosa tiene un efecto crioprotector. Nuevamente se remarca que los fagos no pueden analizarse estrictamente como proteínas porque son sistemas muy complejos donde la interacción de las proteínas con el medio está condicionada por un efecto muy fuerte de interacción de las proteínas entre sí en la estructura del fago, por lo que es esperable que haya ciertos aspectos de estos procesos que tengan un efecto diferente sobre el fago del que tendrían sobre las proteínas libres.

El PSK mostró una buena actividad crioprotectora durante el proceso de congelación a las dos temperaturas ensayadas, y logró estabilizar el título de fagos durante el almacenamiento refrigerado a -80°C .

Conclusión general

En este trabajo se analizaron *in vitro* varios aspectos relacionados con la selección y el uso de fagos como agentes de biocontrol de EHEC en bovinos. En primer lugar se planteó un método de selección de fagos de acuerdo a su potencial para ser utilizados como agentes terapéuticos en ganado bovino de acuerdo a características como el rango de huésped, la especificidad de infección sobre cepas patógenas, el tamaño de las placas de lisis, la formación de halos, la resistencia a la acidez y la diversidad en los patrones de amplificación genómica por RAPD y rep-PCR. Se descartaron aquellos capaces de infectar a alguna de las cepas de *E. coli* no patógena testeadas, amplificar genes de virulencia o que mostraran indicios de ser fagos temperados (como la formación de placas de lisis diminutas o turbias, o amplificación del gen *cl*). Este fue el primer trabajo en plantear el uso de rep-PCR como método complementario de RAPD en el análisis de los perfiles genómicos de fagos aumentando el poder de diferenciación entre los aislados (Dini & De Urraza, 2010).

A partir de este método de selección se eligieron como mejores candidatos para biocontrol de EHEC en bovinos a los aislados MFA933P y MFA45D, obtenidos de materia fecal vacuna, y los aislados CA933P y CA911, extraídos de carne picada bovina comercial, los tres primeros pertenecientes a la familia morfológica *Podoviridae* y el último de la familia *Myoviridae*. En este trabajo se propuso por primera vez el uso de fagos *Podoviridae* como agentes de biocontrol (Dini & De Urraza, 2010) ya que los fagos de esta familia presentaron muy buenas características para ser utilizados con fines terapéuticos. Los ensayos posteriores se realizaron sobre el fago CA933P por ser, entre los fagos *Podoviridae* seleccionados, el que presentó el rango de huésped más amplio.

La sensibilidad mostrada por los aislados a valores de pH por debajo de 3 indica que para la administración oral de los fagos se requiere una protección de los fagos a la acidez. Por este motivo se planteó el encapsulamiento de los fagos en matrices resistentes a valores de pH similares a los encontrados en el estómago del bovino que sean capaces de protegerlos de la acidez durante el pasaje por el abomaso.

Se desarrolló una matriz resistente a la acidez (M1) de grado alimentario capaz de mantener la infectividad del fago encapsulado incluso después de la incubación a un valor de pH extremadamente bajo (pH 1,6). Esta matriz, además protegió totalmente al fago frente a una concentración de pepsina de 4,2 mg ml⁻¹ (superior a la normalmente encontrada en los jugos gástricos), siendo que una concentración de 0,5 mg ml⁻¹ de la enzima en las mismas condiciones inactivó totalmente al fago libre. Estos resultados representan una mejora considerable respecto a los datos obtenidos por

Ma et al. (2008) con la encapsulación de fagos en microesferas de alginato-quitosano, con un fago cuya sensibilidad al pH es similar a la del aislado CA933P.

Además del problema de la acidez de los jugos gástricos, el pasaje previo de los fagos por los tres “pre-estómagos” del rumiante (el retículo, el rumen y el omaso) probablemente disminuya el número de fagos capaces de alcanzar el intestino del bovino. Para evitar este problema se propuso la administración de los fagos encapsulados a través del agua de bebida con un 5% de NaCl, ya que se ha reportado que esta concentración de NaCl puede activar en bovinos de dos años de edad un reflejo que se encuentra naturalmente en los terneros en etapa de amamantamiento y que permite el pasaje directo de la ingesta al abomaso evitando el proceso de rumia (Devuyt, 1975, Riek, 1954, Radostits, 2000).

Por otro lado se observó una total liberación de los fagos del interior de las microesferas después de 4 h a 37°C en presencia de fosfatos, condición que simularía la situación de la microesfera dentro del intestino del animal y se observó una gran estabilidad en el título de fagos durante el almacenamiento refrigerado de las microesferas a 4°C, por lo que la formulación M1 presenta excelentes cualidades para ser ensayada como medio de protección para los fagos durante el pasaje gastrointestinal en su aplicación como agentes de biocontrol de EHEC en bovinos por vía oral.

Por último se determinaron las mejores condiciones de almacenamiento del fago CA933P para su conservación como stocks o como agentes terapéuticos. El método de conservación más adecuado para este fago resultó ser el uso de buffer SM adicionado con sacarosa 0,1M ya que produjo la mayor estabilidad durante el proceso de liofilización (y un producto fácil de resuspender) y no provocó pérdidas en la congelación a -20°C o a -80°C, y los productos obtenidos por ambos métodos fueron estables en el tiempo. Entre los sistemas complejos ensayados, el PSK y el PC son sistemas novedosos que produjeron una retención aceptable en el título de fagos durante la liofilización y resultan interesantes desde el punto de vista terapéutico del producto liofilizado ya que podrían aportar un mecanismo de biocontrol diferente al aportado por el fago con este fin.

En resumen, en este trabajo de tesis se planteó un método de selección de fagos para ser utilizados como agentes de biocontrol de EHEC en bovinos, y se desarrolló una propuesta para la optimización del suministro de fagos por vía oral a través de su microencapsulamiento en una matriz apta para el consumo que mostró muy buenos resultados en los ensayos de protección *in vitro*. Por último se estudiaron sistemas de conservación para estos agentes terapéuticos, obteniéndose los mejores resultados con un sistema de buffer SM-sacarosa 0,1M tanto para la congelación como para la liofilización en la preparación de fagos para stock, y se planteó el uso de sistemas

estabilizantes nuevos, potencialmente pre- o probióticos, para generar productos liofilizados que podrían funcionar a través de la combinación de la actividad del fago y la del pro- o prebiótico con fines terapéuticos.

Apéndice

Buffers y medios de cultivo

Buffers

Buffer SM

NaCl	100 mM
MgSO ₄ ·7H ₂ O	8 mM
Tris-HCl	50 mM
Gelatina	2% (p/v)
pH	7,5

Buffer Tris-EDTA (TE)

Tris-Hcl (pH 7,6)	100 mM
EDTA (pH 8)	10 mM
pH	7,6

Buffer de PCR (10x)

Tris-HCl	200 mM
KCl	500 mM
pH	8,3

Buffer TAE (stock 50x)

Tris base	242 g
EDTA 0,5M (pH 8)	100 ml
Acido acético glacial	57,1 ml
H ₂ O destilada	hasta 1 l

PBS (*phosphate buffered saline*)

NaCl	137 mM
KCl	2,7 mM
Na ₂ HPO ₄	10 mM
KH ₂ PO ₄	2 mM

Buffer fosfato (0,1M)

Na ₂ HPO ₄	68,2 mM
NaH ₂ PO ₄	31,6 mM
pH	7,2

Medios de cultivo

Caldo mEC+n: caldo *Escherichia coli* modificado con novobiocina (Merck, Darmstadt, Alemania)

Caldo TS: caldo triptona soja (Biokar Diagnostics, Allone, Francia)

Caldo LB: caldo Luria Bertrani (1% (p/v) de triptona, 0,5% (p/v) de extracto de levadura, 1% (p/v) de NaCl)

Caldo nutritivo (Biokar Diagnostics, Allone, Francia)

Ágar de los diferentes medios (por ej. ágar TS): caldo del medio correspondiente con 1,5% (p/v) de ágar-ágar.

Ágar blando de los diferentes medios (por ej. ágar TS blando): caldo TS con 0,6% (p/v) de ágar-ágar.

Todos los ágar blandos utilizados se fundieron en baño de agua y se termostataron a 42-45°C antes de adicionárseles las bacterias y/o fagos, en caso contrario se indicará la condición particular para el ensayo.

Todos los medios y buffers fueron esterilizados en autoclave 15 min a 121°C

Referencias

- Abedon, S. T., (2008) *Bacteriophage ecology : population growth, evolution, and impact of bacterial viruses*, p. xviii, 508 p. Cambridge University Press, Cambridge ; New York.
- Abedon, S. T. & R. R. Culler, (2007a) Bacteriophage evolution given spatial constraint. *J Theor Biol* **248**: 111-119.
- Abedon, S. T. & R. R. Culler, (2007b) Optimizing bacteriophage plaque fecundity. *J Theor Biol* **249**: 582-592.
- Ackermann, H.-W., D. Tremblay & S. Moineau, (2004) Long-term bacteriophage preservation. *World Federation for Culture Collections Newsletter* **38**: 35-40.
- Ackermann, H. W., (2001) Frequency of morphological phage descriptions in the year 2000. Brief review. *Arch Virol* **146**: 843-857.
- Allison, H. E., M. J. Sergeant, C. E. James, J. R. Saunders, D. L. Smith, R. J. Sharp, T. S. Marks & A. J. McCarthy, (2003) Immunity profiles of wild-type and recombinant shiga-like toxin-encoding bacteriophages and characterization of novel double lysogens. *Infect Immun* **71**: 3409-3418.
- Allison, S. D., A. Dong & J. F. Carpenter, (1996) Counteracting effects of thiocyanate and sucrose on chymotrypsinogen secondary structure and aggregation during freezing, drying, and rehydration. *Biophys J* **71**: 2022-2032.
- Allison, S. D., T. W. Randolph, M. C. Manning, K. Middleton, A. Davis & J. F. Carpenter, (1998) Effects of drying methods and additives on structure and function of actin: mechanisms of dehydration-induced damage and its inhibition. *Arch Biochem Biophys* **358**: 171-181.
- Anwar, H., J. L. Strap & J. W. Costerton, (1992) Establishment of aging biofilms: possible mechanism of bacterial resistance to antimicrobial therapy. *Antimicrob Agents Chemother* **36**: 1347-1351.
- Arakawa, T., S. J. Prestrelski, W. C. Kenney & J. F. Carpenter, (2001) Factors affecting short-term and long-term stabilities of proteins. *Adv Drug Deliv Rev* **46**: 307-326.
- Arisaka, F., S. Kanamaru, P. Leiman & M. G. Rossmann, (2003) The tail lysozyme complex of bacteriophage T4. *Int J Biochem Cell Biol* **35**: 16-21.
- Bach, S. J., McAllister T. A., Veira D. M., Gannon V. P. J., Holley R. A., (2003) Effect of bacteriophage DC22 on Escherichia coli O157:H7 in an artificial rumen system (Rusitec) and inoculated sheep. *Animal Research* **52**: 89-101.
- Bagge, N., M. Hentzer, J. B. Andersen, O. Ciofu, M. Givskov & N. Hoiby, (2004) Dynamics and spatial distribution of beta-lactamase expression in Pseudomonas aeruginosa biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* **48**: 1168-1174.
- Barrangou, R., S. S. Yoon, F. Breidt Jr, Jr., H. P. Fleming & T. R. Klaenhammer, (2002) Characterization of six Leuconostoc fallax bacteriophages isolated from an industrial sauerkraut fermentation. *Appl Environ Microbiol* **68**: 5452-5458.
- Bell, B. P., M. Goldoft, P. M. Griffin, M. A. Davis, D. C. Gordon, P. I. Tarr, C. A. Bartleson, J. H. Lewis, T. J. Barrett, J. G. Wells & et al., (1994) A multistate outbreak of Escherichia coli O157:H7-associated bloody diarrhea and hemolytic uremic syndrome from hamburgers. The Washington experience. *JAMA* **272**: 1349-1353.
- Besser, R. E., P. M. Griffin & L. Slutsker, (1999) Escherichia coli O157:H7 gastroenteritis and the hemolytic uremic syndrome: an emerging infectious disease. *Annu Rev Med* **50**: 355-367.
- Bessler, W., F. Fehmel, E. Freund-Molbert, H. Knuferrmann & S. Stirm, (1975) Escherichia coli capsule bacteriophages. IV. Free capsule depolymerase 29. *J Virol* **15**: 976-984.

- Bigwood, T., J. A. Hudson & C. Billington, (2009) Influence of host and bacteriophage concentrations on the inactivation of food-borne pathogenic bacteria by two phages. *FEMS Microbiol Lett* **291**: 59-64.
- Bigwood, T., J. A. Hudson, C. Billington, G. V. Carey-Smith & J. A. Heinemann, (2008) Phage inactivation of foodborne pathogens on cooked and raw meat. *Food Microbiol* **25**: 400-406.
- Birge, E. A., (2006) *Bacterial and bacteriophage genetics*, p. 577 p. Springer, New York.
- Biswas, B., S. Adhya, P. Washart, B. Paul, A. N. Trostel, B. Powell, R. Carlton & C. R. Merrill, (2002) Bacteriophage therapy rescues mice bacteremic from a clinical isolate of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Infect Immun* **70**: 204-210.
- Bolla, P. A., L. Serradell Mde, P. J. de Urza & G. L. De Antoni, (2011) Effect of freeze-drying on viability and in vitro probiotic properties of a mixture of lactic acid bacteria and yeasts isolated from kefir. *J Dairy Res* **78**: 15-22.
- Brussow, H., (2005) Phage therapy: the *Escherichia coli* experience. *Microbiology* **151**: 2133-2140.
- Calendar, R., (2006) *The bacteriophages*, p. xiii, 746 p. Oxford University Press, Oxford ; New York.
- Callaway, T. R., T. S. Edrington, A. D. Brabban, R. C. Anderson, M. L. Rossman, M. J. Engler, M. A. Carr, K. J. Genovese, J. E. Keen, M. L. Looper, E. M. Kutter & D. J. Nisbet, (2008) Bacteriophage isolated from feedlot cattle can reduce *Escherichia coli* O157:H7 populations in ruminant gastrointestinal tracts. *Foodborne Pathog Dis* **5**: 183-191.
- Carpenter, J. F. & J. H. Crowe, (1989) An infrared spectroscopic study of the interactions of carbohydrates with dried proteins. *Biochemistry* **28**: 3916-3922.
- Clark, W. A., (1962) Comparison of several methods for preserving bacteriophages. *Appl Microbiol* **10**: 466-471.
- Clarke, S. C., R. D. Haigh, P. P. Freestone & P. H. Williams, (2003) Virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*, a global pathogen. *Clin Microbiol Rev* **16**: 365-378.
- Clokie, M. R. J. & A. M. Kropinski, (2009) *Bacteriophages : methods and protocols*. Humana Press, New York.
- Crowe, J. H., F. A. Hoekstra & L. M. Crowe, (1992) Anhydrobiosis. *Annu Rev Physiol* **54**: 579-599.
- Crowe, L. M., D. S. Reid & J. H. Crowe, (1996) Is trehalose special for preserving dry biomaterials? *Biophys J* **71**: 2087-2093.
- Cheng, Q., D. Nelson, S. Zhu & V. A. Fischetti, (2005) Removal of group B streptococci colonizing the vagina and oropharynx of mice with a bacteriophage lytic enzyme. *Antimicrob Agents Chemother* **49**: 111-117.
- Chibani-Chennoufi, S., J. Sidoti, A. Bruttin, E. Kutter, S. Sarker & H. Brussow, (2004) In vitro and in vivo bacteriolytic activities of *Escherichia coli* phages: implications for phage therapy. *Antimicrob Agents Chemother* **48**: 2558-2569.
- Chinen, I., S. Epsztejn, C. L. Melamed, L. Aguerre, E. Martinez Espinosa, M. M. Motter, A. Baschkier, E. Manfredi, E. Miliwebsky & M. Rivas, (2009) Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 in beef and chicken burgers, and chicken carcasses in Buenos Aires, Argentina. *Int J Food Microbiol* **132**: 167-171.
- Choi, Y. M., O. Y. Kim, K. H. Kim, B. C. Kim & M. S. Rhee, (2009) Combined effect of organic acids and supercritical carbon dioxide treatments against nonpathogenic *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* and *E. coli* O157:H7 in fresh pork. *Lett Appl Microbiol* **49**: 510-515.
- Date, P. V., A. Samad & P. V. Devarajan, (2010) Freeze thaw: a simple approach for prediction of optimal cryoprotectant for freeze drying. *AAPS PharmSciTech* **11**: 304-313.
- Day, J. G. & G. Stacey, (2007) *Cryopreservation and freeze-drying protocols*, p. xi, 347 p. Humana Press, Totowa, N.J.

- Denou, E., A. Bruttin, C. Barretto, C. Ngom-Bru, H. Brussow & S. Zuber, (2009) T4 phages against *Escherichia coli* diarrhea: potential and problems. *Virology* **388**: 21-30.
- Devuyst, A., (1975) El reflejo de cierre de la gotera esofágica. *Zootecnia* **24**: 241-242.
- Dini, C. & P. J. De Urraza, (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.
- Donnenberg, M. S., (2002) *Escherichia coli : virulence mechanisms of a versatile pathogen*, p. xxv, 417 p., [418] p. of plates. Academic Press, Amsterdam ; London.
- Doyle, M. P., L. R. Beuchat & T. J. Montville, (1997) *Food microbiology : fundamentals and frontiers*, p. xvi, 768 p. ASM Press, Washington, D.C.
- Doyle, M. P., L. R. Beuchat & T. J. Montville, (2001) *Food microbiology : fundamentals and frontiers*. ASM Press, Washington, D.C.
- Drexler, K., J. Dannull, I. Hindennach, B. Mutschler & U. Henning, (1991) Single mutations in a gene for a tail fiber component of an *Escherichia coli* phage can cause an extension from a protein to a carbohydrate as a receptor. *J Mol Biol* **219**: 655-663.
- Elder, R. O., J. E. Keen, G. R. Siragusa, G. A. Barkocy-Gallagher, M. Koochmarai & W. W. Laegreid, (2000) Correlation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 prevalence in feces, hides, and carcasses of beef cattle during processing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 2999-3003.
- Eriksson, F., W. D. Culp, R. Massey, L. Egevad, D. Garland, M. A. Persson & P. Pisa, (2007) Tumor specific phage particles promote tumor regression in a mouse melanoma model. *Cancer Immunol Immunother* **56**: 677-687.
- Fukushima, H. & R. Seki, (2004) High numbers of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* found in bovine faeces collected at slaughter in Japan. *FEMS Microbiol Lett* **238**: 189-197.
- Gamage, S. D., J. E. Strasser, C. L. Chalk & A. A. Weiss, (2003) Nonpathogenic *Escherichia coli* can contribute to the production of Shiga toxin. *Infect Immun* **71**: 3107-3115.
- Gansheroff, L. J. & A. D. O'Brien, (2000) *Escherichia coli* O157:H7 in beef cattle presented for slaughter in the U.S.: higher prevalence rates than previously estimated. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 2959-2961.
- Garcia-Aljaro, C., M. Muniesa, J. Jofre & A. R. Blanch, (2006) Newly identified bacteriophages carrying the stx2g Shiga toxin gene isolated from *Escherichia coli* strains in polluted waters. *FEMS Microbiol Lett* **258**: 127-135.
- Garcia, P., B. Martinez, J. M. Obeso & A. Rodriguez, (2008) Bacteriophages and their application in food safety. *Lett Appl Microbiol* **47**: 479-485.
- Garrote, G. L., A. G. Abraham & G. L. De Antoni, (2001) Chemical and microbiological characterisation of kefir grains. *J Dairy Res* **68**: 639-652.
- Goode, D., V. M. Allen & P. A. Barrow, (2003) Reduction of experimental *Salmonella* and *Campylobacter* contamination of chicken skin by application of lytic bacteriophages. *Appl Environ Microbiol* **69**: 5032-5036.
- Gorski, A., K. Dabrowska, K. Switala-Jelen, M. Nowaczyk, B. Weber-Dabrowska, J. Boratynski, J. Wietrzyk & A. Opolski, (2003) New insights into the possible role of bacteriophages in host defense and disease. *Med Immunol* **2**: 2.
- Goyal, S. M., (2006) *Viruses in foods*, p. xvii, 345 p. Springer, New York.
- Griffin, P. M. & R. V. Tauxe, (1991) The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. *Epidemiol Rev* **13**: 60-98.
- Grys, T. E., M. B. Siegel, W. W. Lathem & R. A. Welch, (2005) The StcE protease contributes to intimate adherence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 to host cells. *Infect Immun* **73**: 1295-1303.
- Guttman, B., R. Raya & E. Kutter, (2005) Basic Phage Biology. In: *Bacteriophages : biology and applications*. E. Kutter & A. Sulakvelidze (eds). Boca Raton, FL: CRC Press, pp. 42-79.

- Hanlon, G. W., (2007) Bacteriophages: an appraisal of their role in the treatment of bacterial infections. *Int J Antimicrob Agents* **30**: 118-128.
- Harcombe, W. R. & J. J. Bull, (2005) Impact of phages on two-species bacterial communities. *Appl Environ Microbiol* **71**: 5254-5259.
- Hassan, A. N. & J. F. Frank, (2004) Attachment of Escherichia coli O157:H7 grown in tryptic soy broth and nutrient broth to apple and lettuce surfaces as related to cell hydrophobicity, surface charge, and capsule production. *Int J Food Microbiol* **96**: 103-109.
- Häusler, T., (2006) *Viruses vs. superbugs : a solution to the antibiotics crisis?*, p. xiv, 292 p. Macmillan, Basingstoke.
- Hazem, A., (2002) Effects of temperatures, pH-values, ultra-violet light, ethanol and chloroform on the growth of isolated thermophilic Bacillus phages. *New Microbiol* **25**: 469-476.
- Housby, J. N. & N. H. Mann, (2009) Phage therapy. *Drug Discov Today* **14**: 536-540.
- <http://www.cdc.gov>, (2000) Centers for disease control and prevention. In: Health Care on the Internet. pp. 82.
- Hughes, K. A., I. W. Sutherland, J. Clark & M. V. Jones, (1998) Bacteriophage and associated polysaccharide depolymerases--novel tools for study of bacterial biofilms. *J Appl Microbiol* **85**: 583-590.
- Hugo, A. A., E. Kakisu, G. L. De Antoni & P. F. Perez, (2008) Lactobacilli antagonize biological effects of enterohaemorrhagic Escherichia coli in vitro. *Lett Appl Microbiol* **46**: 613-619.
- Hui, Y. H., (2006) *Handbook of food science, technology, and engineering*. Taylor & Francis, Boca Raton.
- Hurley, A., J. J. Maurer & M. D. Lee, (2008) Using bacteriophages to modulate Salmonella colonization of the chicken's gastrointestinal tract: lessons learned from in silico and in vivo modeling. *Avian Dis* **52**: 599-607.
- Hyman, P. & S. T. Abedon, (2009) Practical methods for determining phage growth parameters. *Methods Mol Biol* **501**: 175-202.
- Imeson, A., (1997) *Thickening and gelling agents for food*, p. xii, 320p. Blackie, London ; New York.
- Inal, J. M., (2003) Phage therapy: a reappraisal of bacteriophages as antibiotics. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* **51**: 237-244.
- Inchley, C. J., (1969) The activity of mouse Kupffer cells following intravenous injection of T4 bacteriophage. *Clin Exp Immunol* **5**: 173-187.
- International Committee on Taxonomy of Viruses., M. H. V. Van Regenmortel & International Union of Microbiological Societies. Virology Division., (2000) *Virus taxonomy : classification and nomenclature of viruses : seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, p. xii, 1162 p. Academic Press, San Diego.
- Jado, I., R. Lopez, E. Garcia, A. Fenoll, J. Casal & P. Garcia, (2003) Phage lytic enzymes as therapy for antibiotic-resistant Streptococcus pneumoniae infection in a murine sepsis model. *J Antimicrob Chemother* **52**: 967-973.
- Jamalludeen, N., R. P. Johnson, R. Friendship, A. M. Kropinski, E. J. Lingohr & C. L. Gyles, (2007) Isolation and characterization of nine bacteriophages that lyse O149 enterotoxigenic Escherichia coli. *Vet Microbiol* **124**: 47-57.
- Jensen, E. C., H. S. Schrader, B. Rieland, T. L. Thompson, K. W. Lee, K. W. Nickerson & T. A. Kokjohn, (1998) Prevalence of broad-host-range lytic bacteriophages of Sphaerotilus natans, Escherichia coli, and Pseudomonas aeruginosa. *Appl Environ Microbiol* **64**: 575-580.
- Johnson, R. P., C. L. Gyles, W. E. Huff, S. Ojha, G. R. Huff, N. C. Rath & A. M. Donoghue, (2008) Bacteriophages for prophylaxis and therapy in cattle, poultry and pigs. *Anim Health Res Rev* **9**: 201-215.

- Karmali, M. A., V. Gannon & J. M. Sargeant, (2010) Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC). *Vet Microbiol* **140**: 360-370.
- Kasman, L. M., A. Kasman, C. Westwater, J. Dolan, M. G. Schmidt & J. S. Norris, (2002) Overcoming the phage replication threshold: a mathematical model with implications for phage therapy. *J Virol* **76**: 5557-5564.
- Koutinas, A. A., H. Papapostolou, D. Dimitrellou, N. Kopsahelis, E. Katechaki, A. Bekatorou & L. A. Bosnea, (2009) Whey valorisation: a complete and novel technology development for dairy industry starter culture production. *Bioresour Technol* **100**: 3734-3739.
- Kropinski, A. M., (2006) Phage Therapy - Everything Old is New Again. *Can J Infect Dis Med Microbiol* **17**: 297-306.
- Kropinski, A. M., (2009) Measurement of the rate of attachment of bacteriophage to cells. *Methods Mol Biol* **501**: 151-155.
- Kudva, I. T., S. Jelacic, P. I. Tarr, P. Youderian & C. J. Hovde, (1999) Biocontrol of *Escherichia coli* O157 with O157-specific bacteriophages. *Appl Environ Microbiol* **65**: 3767-3773.
- Kurzepa, A., K. Dabrowska, G. Skaradzinski & A. Gorski, (2009) Bacteriophage interactions with phagocytes and their potential significance in experimental therapy. *Clin Exp Med* **9**: 93-100.
- Kutter, E. & A. Sulakvelidze, (2005) *Bacteriophages : biology and applications*, p. 510 p. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Kwiatkowski, B., B. Boschek, H. Thiele & S. Stirm, (1982) Endo-N-acetylneuraminidase associated with bacteriophage particles. *J Virol* **43**: 697-704.
- Laury, A. M., M. V. Alvarado, G. Nace, C. Z. Alvarado, J. C. Brooks, A. Echeverry & M. M. Brashears, (2009) Validation of a lactic acid- and citric acid-based antimicrobial product for the reduction of *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella* on beef tips and whole chicken carcasses. *J Food Prot* **72**: 2208-2211.
- Leiman, P. G., S. Kanamaru, V. V. Mesyanzhinov, F. Arisaka & M. G. Rossmann, (2003) Structure and morphogenesis of bacteriophage T4. *Cell Mol Life Sci* **60**: 2356-2370.
- Leotta, G. A., E. S. Miliwebsky, I. Chinen, E. M. Espinosa, K. Azzopardi, S. M. Tennant, R. M. Robins-Browne & M. Rivas, (2008) Characterisation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 strains isolated from humans in Argentina, Australia and New Zealand. *BMC Microbiol* **8**: 46.
- Leverentz, B., W. S. Conway, M. J. Camp, W. J. Janisiewicz, T. Abuladze, M. Yang, R. Saftner & A. Sulakvelidze, (2003) Biocontrol of *Listeria monocytogenes* on fresh-cut produce by treatment with lytic bacteriophages and a bacteriocin. *Appl Environ Microbiol* **69**: 4519-4526.
- Lim, J. Y., J. Yoon & C. J. Hovde, (2010) A brief overview of *Escherichia coli* O157:H7 and its plasmid O157. *J Microbiol Biotechnol* **20**: 5-14.
- Loeffler, J. M. & V. A. Fischetti, (2003) Synergistic lethal effect of a combination of phage lytic enzymes with different activities on penicillin-sensitive and -resistant *Streptococcus pneumoniae* strains. *Antimicrob Agents Chemother* **47**: 375-377.
- Loeffler, J. M., D. Nelson & V. A. Fischetti, (2001) Rapid killing of *Streptococcus pneumoniae* with a bacteriophage cell wall hydrolase. *Science* **294**: 2170-2172.
- Lopitz-Otsoa, F., A. Rementeria, N. Elguezabal & J. Garaizar, (2006) Kefir: a symbiotic yeasts-bacteria community with alleged healthy capabilities. *Rev Iberoam Micol* **23**: 67-74.
- Ma, Y., J. C. Pacan, Q. Wang, Y. Xu, X. Huang, A. Korenevsky & P. M. Sabour, (2008) Microencapsulation of bacteriophage felix O1 into chitosan-alginate microspheres for oral delivery. *Appl Environ Microbiol* **74**: 4799-4805.
- Madueno, L., B. M. Coppotelli & I. S. Morelli, (2009) Effect of the inoculant strain *Sphingomonas paucimobilis* 20006FA on the bacterial composition of a phenanthrene-degrading consortium. *Rev Argent Microbiol* **41**: 65-72.
- Masana, M. O., G. A. Leotta, L. L. Del Castillo, B. A. D'Astek, P. M. Palladino, L. Galli, E. Vilacoba, C. Carbonari, H. R. Rodriguez & M. Rivas, (2010) Prevalence, characterization, and

- genotypic analysis of *Escherichia coli* O157:H7/NM from selected beef exporting abattoirs of Argentina. *J Food Prot* **73**: 649-656.
- Matejschuk, P., (2007) Lyophilization of proteins. *Methods Mol Biol* **368**: 59-72.
- Matsuzaki, S., M. Rashel, J. Uchiyama, S. Sakurai, T. Ujihara, M. Kuroda, M. Ikeuchi, T. Tani, M. Fujieda, H. Wakiguchi & S. Imai, (2005) Bacteriophage therapy: a revitalized therapy against bacterial infectious diseases. *J Infect Chemother* **11**: 211-219.
- Meichtri, L., E. Miliwebsky, A. Gioffre, I. Chinen, A. Baschkier, G. Chillemi, B. E. Guth, M. O. Masana, A. Cataldi, H. R. Rodriguez & M. Rivas, (2004) Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in healthy young beef steers from Argentina: prevalence and virulence properties. *Int J Food Microbiol* **96**: 189-198.
- Mendel, S., J. M. Holbourn, J. A. Schouten & T. D. Bugg, (2006) Interaction of the transmembrane domain of lysis protein E from bacteriophage phiX174 with bacterial translocase *MraY* and peptidyl-prolyl isomerase *SlyD*. *Microbiology* **152**: 2959-2967.
- Miller, E. S., E. Kutter, G. Mosig, F. Arisaka, T. Kunisawa & W. Ruger, (2003) Bacteriophage T4 genome. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**: 86-156.
- Model, P., R. E. Webster & N. D. Zinder, (1979) Characterization of Op3, a lysis-defective mutant of bacteriophage f2. *Cell* **18**: 235-246.
- Montag, D., I. Riede, M. L. Eschbach, M. Degen & U. Henning, (1987) Receptor-recognizing proteins of T-even type bacteriophages. Constant and hypervariable regions and an unusual case of evolution. *J Mol Biol* **196**: 165-174.
- Mora, A., J. E. Blanco, M. Blanco, M. P. Alonso, G. Dhabbi, A. Echeita, E. A. Gonzalez, M. I. Bernardez & J. Blanco, (2005) Antimicrobial resistance of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* O157:H7 and non-O157 strains isolated from humans, cattle, sheep and food in Spain. *Res Microbiol* **156**: 793-806.
- Moxley, R. A., (2004) *Escherichia coli* O157:H7: an update on intestinal colonization and virulence mechanisms. *Anim Health Res Rev* **5**: 15-33.
- Muniesa, M., J. E. Blanco, M. De Simon, R. Serra-Moreno, A. R. Blanch & J. Jofre, (2004a) Diversity of *stx2* converting bacteriophages induced from Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from cattle. *Microbiology* **150**: 2959-2971.
- Muniesa, M., M. de Simon, G. Prats, D. Ferrer, H. Panella & J. Jofre, (2003a) Shiga toxin 2-converting bacteriophages associated with clonal variability in *Escherichia coli* O157:H7 strains of human origin isolated from a single outbreak. *Infect Immun* **71**: 4554-4562.
- Muniesa, M., L. Moce-Llivina, H. Katayama & J. Jofre, (2003b) Bacterial host strains that support replication of somatic coliphages. *Antonie Van Leeuwenhoek* **83**: 305-315.
- Muniesa, M., J. Recktenwald, M. Bielaszewska, H. Karch & H. Schmidt, (2000) Characterization of a shiga toxin 2e-converting bacteriophage from an *Escherichia coli* strain of human origin. *Infect Immun* **68**: 4850-4855.
- Muniesa, M., R. Serra-Moreno & J. Jofre, (2004b) Free Shiga toxin bacteriophages isolated from sewage showed diversity although the *stx* genes appeared conserved. *Environ Microbiol* **6**: 716-725.
- Nart, P., S. W. Naylor, J. F. Huntley, I. J. McKendrick, D. L. Gally & J. C. Low, (2008) Responses of cattle to gastrointestinal colonization by *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun* **76**: 5366-5372.
- Nataro, J. P. & J. B. Kaper, (1998) Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* **11**: 142-201.
- Naylor, S. W., J. C. Low, T. E. Besser, A. Mahajan, G. J. Gunn, M. C. Pearce, I. J. McKendrick, D. G. Smith & D. L. Gally, (2003) Lymphoid follicle-dense mucosa at the terminal rectum is the principal site of colonization of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in the bovine host. *Infect Immun* **71**: 1505-1512.

- Nelson, D., L. Loomis & V. A. Fischetti, (2001) Prevention and elimination of upper respiratory colonization of mice by group A streptococci by using a bacteriophage lytic enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 4107-4112.
- Niu, Y. D., R. P. Johnson, Y. Xu, T. A. McAllister, R. Sharma, M. Louie & K. Stanford, (2009) Host range and lytic capability of four bacteriophages against bovine and clinical human isolates of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. *J Appl Microbiol* **107**: 646-656.
- Niu, Y. D., Y. Xu, T. A. McAllister, E. A. Rozema, T. P. Stephens, S. J. Bach, R. P. Johnson & K. Stanford, (2008) Comparison of fecal versus rectoanal mucosal swab sampling for detecting *Escherichia coli* O157:H7 in experimentally inoculated cattle used in assessing bacteriophage as a mitigation strategy. *J Food Prot* **71**: 691-698.
- O'Flaherty, S., R. P. Ross & A. Coffey, (2009) Bacteriophage and their lysins for elimination of infectious bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **33**: 801-819.
- O'Flynn, G., R. P. Ross, G. F. Fitzgerald & A. Coffey, (2004) Evaluation of a cocktail of three bacteriophages for biocontrol of *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol* **70**: 3417-3424.
- Ochs, H. D., S. D. Davis & R. J. Wedgwood, (1971) Immunologic responses to bacteriophage phi-X 174 in immunodeficiency diseases. *J Clin Invest* **50**: 2559-2568.
- Ochs, H. D., S. Nonoyama, Q. Zhu, M. Farrington & R. J. Wedgwood, (1993) Regulation of antibody responses: the role of complement and adhesion molecules. *Clin Immunol Immunopathol* **67**: S33-40.
- Palermo, M. S., R. A. Exeni & G. C. Fernandez, (2009) Hemolytic uremic syndrome: pathogenesis and update of interventions. *Expert Rev Anti Infect Ther* **7**: 697-707.
- Parisien, A., B. Allain, J. Zhang, R. Mandeville & C. Q. Lan, (2008) Novel alternatives to antibiotics: bacteriophages, bacterial cell wall hydrolases, and antimicrobial peptides. *J Appl Microbiol* **104**: 1-13.
- Perez, T., J. Albornoz & A. Dominguez, (1998) An evaluation of RAPD fragment reproducibility and nature. *Mol Ecol* **7**: 1347-1357.
- Pollard, D. R., W. M. Johnson, H. Lior, S. D. Tyler & K. R. Rozee, (1990) Rapid and specific detection of verotoxin genes in *Escherichia coli* by the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* **28**: 540-545.
- Puapermpoonsiri, U., S. J. Ford & C. F. van der Walle, (2010) Stabilization of bacteriophage during freeze drying. *Int J Pharm* **389**: 168-175.
- Radostits, O. M., (2000) *Veterinary medicine : a textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses*, p. xxvii, 1877 p. Saunders, London.
- Raya, R. R., P. Varey, R. A. Oot, M. R. Dyen, T. R. Callaway, T. S. Edrington, E. M. Kutter & A. D. Brabban, (2006) Isolation and characterization of a new T-even bacteriophage, CEV1, and determination of its potential to reduce *Escherichia coli* O157:H7 levels in sheep. *Appl Environ Microbiol* **72**: 6405-6410.
- Relling, A. E., Mattioli, G. A. , (2003) *Fisiología Digestiva y Metabólica de los Rumiantes*. EDULP.
- Remaut, E., P. D. Waele, A. Marmenout, P. Stanssens & W. Fiers, (1982) Functional expression of individual plasmid-coded RNA bacteriophage MS2 genes. *EMBO J* **1**: 205-209.
- Rey, L. & J. C. May, (2004) *Freeze-drying/lyophilization of pharmaceutical and biological products*, p. vxvi, 613 p. Marcel Dekker, New York.
- Riek, R. F., (1954) The influence on sodium salts on the closure of the oesophageal groove in calves. *Australian Veterinary Journal* **30**: 29-37.
- Rivas, M., G. Leotta & I. Chinen, (2007) Diagnóstico y caracterización de *Escherichia coli* O157 productor de toxina Shiga a partir de alimentos. In.: Departamento Bacteriología Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas A.N.L.I.S. "Dr. Carlos G. Malbrán" Centro Regional de Referencia del WHO Global Salm Surv para América del Sur., pp.
- Rivas, M., S. Sosa-Estani, J. Rangel, M. G. Caletti, P. Valles, C. D. Roldan, L. Balbi, M. C. Marsano de Mollar, D. Amoedo, E. Miliwebsky, I. Chinen, R. M. Hoekstra, P. Mead & P. M.

- Griffin, (2008) Risk factors for sporadic Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in children, Argentina. *Emerg Infect Dis* **14**: 763-771.
- Robles Luna, G., (2009) Construcción de genes reporteros para el estudio de la regulación de la virulencia en *Shigella*. In: Tesina de grado. Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, pp.
- Rodrigues, K. L., L. R. Caputo, J. C. Carvalho, J. Evangelista & J. M. Schneedorf, (2005) Antimicrobial and healing activity of kefir and kefir extract. *Int J Antimicrob Agents* **25**: 404-408.
- Rossmann, M. G., V. V. Mesyanzhinov, F. Arisaka & P. G. Leiman, (2004) The bacteriophage T4 DNA injection machine. *Curr Opin Struct Biol* **14**: 171-180.
- Russo, T., (2002) Capsule and Lipopolysaccharide. In: *Escherichia coli : virulence mechanisms of a versatile pathogen*. M. S. Donnenberg (ed). Amsterdam ; Boston: Academic Press, pp. 379-403.
- Sambrook, J. & D. W. Russell, (2001) *Molecular cloning : a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Schade, A. L. & L. Caroline, (1944) The preparation of a polyvalent dysentery bacteriophage in a dry and stable form: II. Factors affecting the stabilization of dysentery bacteriophage during lyophilization. *J Bacteriol* **48**: 179-190.
- Scholl, D., S. Rogers, S. Adhya & C. R. Merrill, (2001) Bacteriophage K1-5 encodes two different tail fiber proteins, allowing it to infect and replicate on both K1 and K5 strains of *Escherichia coli*. *J Virol* **75**: 2509-2515.
- Schuch, R., D. Nelson & V. A. Fischetti, (2002) A bacteriolytic agent that detects and kills *Bacillus anthracis*. *Nature* **418**: 884-889.
- Sharma, M., J. H. Ryu & L. R. Beuchat, (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.
- Sheng, H., H. J. Knecht, I. T. Kudva & C. J. Hovde, (2006) Application of bacteriophages to control intestinal *Escherichia coli* O157:H7 levels in ruminants. *Appl Environ Microbiol* **72**: 5359-5366.
- Shifrin, Y., A. Peleg, O. Ilan, C. Nadler, S. Kobi, K. Baruch, G. Yerushalmi, T. Berdichevsky, S. Altuvia, M. Elgrably-Weiss, C. Abe, S. Knutton, C. Sasakawa, J. M. Ritchie, M. K. Waldor & I. Rosenshine, (2008) Transient shielding of intimin and the type III secretion system of enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli* by a group 4 capsule. *J Bacteriol* **190**: 5063-5074.
- Shivu, M. M., B. C. Rajeeva, S. K. Girisha, I. Karunasagar & G. Krohne, (2007) Molecular characterization of *Vibrio harveyi* bacteriophages isolated from aquaculture environments along the coast of India. *Environ Microbiol* **9**: 322-331.
- Sillankorva, S., P. Neubauer & J. Azeredo, (2008) Isolation and characterization of a T7-like lytic phage for *Pseudomonas fluorescens*. *BMC Biotechnol* **8**: 80.
- Stanford, K., T. A. McAllister, Y. D. Niu, T. P. Stephens, A. Mazzocco, T. E. Waddell & R. P. Johnson, (2010) Oral delivery systems for encapsulated bacteriophages targeted at *Escherichia coli* O157:H7 in feedlot cattle. *J Food Prot* **73**: 1304-1312.
- Strachan, N. J., G. M. Dunn, M. E. Locking, T. M. Reid & I. D. Ogden, (2006) *Escherichia coli* O157: burger bug or environmental pathogen? *Int J Food Microbiol* **112**: 129-137.
- Strauch, E., C. Schaudinn & L. Beutin, (2004) First-time isolation and characterization of a bacteriophage encoding the Shiga toxin 2c variant, which is globally spread in strains of *Escherichia coli* O157. *Infect Immun* **72**: 7030-7039.
- Tanji, Y., T. Shimada, H. Fukudomi, K. Miyanaga, Y. Nakai & H. Unno, (2005) Therapeutic use of phage cocktail for controlling *Escherichia coli* O157:H7 in gastrointestinal tract of mice. *J Biosci Bioeng* **100**: 280-287.

- Tomlinson, S. & P. W. Taylor, (1985) Neuraminidase associated with coliphage E that specifically depolymerizes the Escherichia coli K1 capsular polysaccharide. *J Virol* **55**: 374-378.
- Tortora, G. J., B. R. Funke & C. L. Case, (2010) *Microbiology : an introduction*, p. 1 v. (various pagings). Pearson Benjamin Cummings, San Francisco, CA.
- Vandeplas, S., R. Dubois Dauphin, Y. Beckers, P. Thonart & A. Thewis, (2010) Salmonella in chicken: current and developing strategies to reduce contamination at farm level. *J Food Prot* **73**: 774-785.
- Versalovic, J., Schneider, M. De Bruijn, F.J. Lupski, J.R., (1994) Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction *Meth Mol Cell Biol* **5**: 25-40.
- Vinderola, G., G. Perdigon, J. Duarte, E. Farnworth & C. Matar, (2006) Effects of the oral administration of the exopolysaccharide produced by Lactobacillus kefirnofaciens on the gut mucosal immunity. *Cytokine* **36**: 254-260.
- Viscardi, M., A. G. Perugini, C. Auriemma, F. Capuano, S. Morabito, K. P. Kim, M. J. Loessner & G. Iovane, (2008) Isolation and characterisation of two novel coliphages with high potential to control antibiotic-resistant pathogenic Escherichia coli (EHEC and EPEC). *Int J Antimicrob Agents* **31**: 152-157.
- Waddell T, M. A., Johnson RP, Pacan J, Campbell S, Perets & M. J. A, Holtslander B and Poppe C, (2000) Control of Escherichia coli O157:H7 infection of calves by bacteriophages. In: Proceedings of the 4th International Symposium and Workshop on Shiga toxin (verocytotoxin)-producing Escherichia coli (VTEC 2000). Kyoto, Japan, pp.
- Waddell, T., A. Mazzocco, R. Johnson, J. Pacan, S. Campbell, A. Perets, J. MacKinnon, B. Holtslander & C. Poppe, (2000) Control of Escherichia coli O157:H7 infection of calves by bacteriophages. In: Proceedings of the 4th International Symposium and Workshop on Shiga toxin (verocytotoxin)-producing Escherichia coli (VTEC 2000). Kyoto, Japan, pp.
- Wang, I. N., (2006) Lysis timing and bacteriophage fitness. *Genetics* **172**: 17-26.
- Wang, W., (2000) Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals. *Int J Pharm* **203**: 1-60.
- Willshaw, G. A., H. R. Smith, S. M. Scotland, A. M. Field & B. Rowe, (1987) Heterogeneity of Escherichia coli phages encoding Vero cytotoxins: comparison of cloned sequences determining VT1 and VT2 and development of specific gene probes. *J Gen Microbiol* **133**: 1309-1317.
- Xia, L., L. Su, J. Sun & Y. Yan, (2008) [Biologic characteristics of eight Podoviridae Stx2-converting phage]. *Wei Sheng Wu Xue Bao* **48**: 1121-1125.
- Young, I., I. Wang & W. D. Roof, (2000) Phages will out: strategies of host cell lysis. *Trends Microbiol* **8**: 120-128.
- Young, K. D. & R. Young, (1982) Lytic action of cloned phi X174 gene E. *J Virol* **44**: 993-1002.