

Descontaminación de superficies sólidas mediante cócteles fágicos para prevenir la contaminación cruzada por *Escherichia coli* enteropatógena y shigatoxigénica

David Tomat¹, Andrea Quiberoni², Claudia Balagué¹

¹Área de Bacteriología - Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas - U.N.R. Rosario, Argentina

²Instituto de Lactología Industrial - Facultad de Ingeniería Química - UNL - CONICET. Santa Fe, Argentina
dtomat@fbioyf.unr.edu.ar



Introducción

En nuestra región resulta especialmente importante controlar la diseminación de enterobacterias patógenas productoras de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA), tales como *Shigella* spp, *Salmonella* spp y *E. coli* enteropatógena y shigatoxigénica, entre otras. Los patógenos transmitidos por los alimentos, especialmente en carnes y productos lácteos, son los responsables de importantes brotes en todo el mundo (Mead y col., 1999; DeWaal y col., 2009; EFSA, 2010; Farrokh y col., 2012). El potencial terapéutico de los bacteriofagos ha sido explorado desde que éstos fueron descubiertos por Félix d'Hérelle (Summers, 1999). Respecto de su potencial aplicación en el biocontrol de patógenos contaminantes de alimentos, la ventaja de los bacteriofagos es que son las unidades autorreplicantes más abundantes en nuestro medio ambiente y están presentes en números significativos en el agua y alimentos (Sulakvelidze & Barrow 2005). En carnes frescas y otros productos cárnicos se pueden detectar más de 10^8 bacteriofagos viables por gramo, por lo que son consumidos habitual-

mente en una gran cantidad (Kennedy & Bitton 1987). Además, la especificidad de los bacteriofagos puede ser una característica ecológicamente favorable para el control de cepas de *E. coli* patógenas en alimentos, dado que permite aplicar el fago en un producto lácteo o cárnico sin comprometer la calidad de éste o la viabilidad de la microflora normal intestinal. Adicionalmente, su introducción en un producto cárnico constituiría un enfoque menos agresivo que las tecnologías actualmente aplicadas. Además, los fagos se pueden utilizar como una alternativa ecológica o en complemento para reducir el uso de compuestos químicos tóxicos para la descontaminación de superficies sólidas, como mesadas de trabajo y equipamiento de procesamiento de alimentos empleados en la industria cárnica. Tomando en consideración la creciente resistencia a los antibióticos de algunos patógenos, la estrategia natural de control biológico por medio de bacteriofagos -debido a su capacidad de actuar constantemente, incluso durante la fabricación y el almacenamiento de alimentos- se convierte en una herramienta muy interesante para ser considerada. El objetivo del presente estudio fue evaluar la actividad lítica de los bacteriofagos en medio líquido frente a cepas patógenas de *E. coli*, así como determinar la eficiencia de biocontrol de cócteles fágicos para eliminar patógenos contaminantes en superficies sólidas de procesamiento de productos cárnicos.

Materiales y métodos

Bacterias y fagos

La cepa *E. coli* DH5 α fue empleada como receptora para propagar los bacteriofagos ensayados en este estudio. Se utilizaron tres cepas adicionales en los experimentos. Dos de ellas, la *E. coli* enteropatógena (EPEC920) (eae) y la *E. coli* shigatoxigénica O157:H7 (STEC464) (stx2 y eae), fueron aisladas de coprocultivos, identificadas usando el sistema API-20E (Biomérieux, Buenos Aires, Argentina) y caracterizadas por PCR. La tercera cepa fue

E. coli shigatoxigénica no-0157:H7 (ARG4827; serogrupo O18; stx1 y stx2) (Balagué y col. 2006). Las cepas de *E. coli* se reactivaron en caldo Hershey (8 g l⁻¹ Caldo Bacto-nutritivo, 5 g l⁻¹ Bacto-peptona, 5 g l⁻¹ NaCl y 1 g l⁻¹ glucosa) (Difco, Detroit, Michigan, USA) suplementado con MgSO₄ (5 mmol l⁻¹) (Cicarelli, San Lorenzo, Santa Fe, Argentina) (Hershey-Mg).

A partir de 50 coprocultivos de pacientes tratados en el Hospital Centenario de Rosario y usando la cepa *E. coli* DH5 α , se aislaron los fagos DT1, DT5 y DT6. Brevemente, una porción de materia fecal (5 g) se agregó a 10 ml de un cultivo de DH5 α (OD600 = 1.0) desarrollado en caldo Hershey-Mg y se incubó a 37°C por 12 h. Luego, se agregó 0,5 ml de cloroforma (Cicarelli), se mezcló y se centrifugó a 4,000 \times g por 10 min. El sobrenadante se esterilizó por filtración (0,45- μ m) (Gamafil S.A., Buenos Aires, Argentina) (Kennedy & Bitton, 1987). Los aislamientos de bacteriofagos se realizaron por la técnica de doble capa de agar (Jamalludeen y col. 2007). Para aislar y purificar los fagos, se tomaron placas de lisis claras y bien definidas del soft agar y se colocaron en 5 ml de caldo Hershey-Mg y se propagaron infectando *E. coli* DH5 α , seguidamente se ensayaron por la técnica de doble capa. Estos pasos se repitieron tres veces hasta obtener stocks fágicos puros.

Challenge con fagos individuales y cócteles

Para estudiar la lisis celular en medio líquido se inocularon 50 μ l de un cultivo de 16-18 h de la cepa sensible a ensayar (a saber DH5 α , EPEC920, STEC no-0157 ARG4827 y STEC464 O157:H7) en 5 ml de caldo Hershey-Mg fresco, incubando a 37°C. Cuando se alcanzó una DO600nm = 0,1 se agregó 0,1 ml del fago a ensayar (DT1, DT5 ó DT6, según corresponda), se mezcló suavemente y los cultivos se incubaron a 4 y 37°C. Para la cepa STEC no-0157 ARG4827 se utilizó el fago DT5 en lugar de DT1 debido a que no es sensible a este último. A tiempos preestablecidos (2, 6 y 24 h) se tomaron alícuotas de 100 μ l, se hicieron diluciones decimales y se plaquearon en agar Hershey-Mg para el recuento de células viables. Para monitorear el desarrollo normal del

cultivo y evaluar la reducción de células viables a cada punto de muestreo se incubaron tubos control de cada cepa sin infectar (cultivos sin fagos) así como tubos control sin células (conteniendo sólo fagos) para descartar la posibilidad de contaminación. El muestreo se realizó por duplicado en dos experimentos independientes. Adicionalmente se realizaron conteos de fagos libres y totales en una cepa no patógena (DH5 α) y en una patógena (STEC464 O157:H7) para evaluar la evolución a cada tiempo de muestreo.

Adicionalmente, se llevaron a cabo ensayos para estudiar el efecto combinado de los bacteriofagos sobre la lisis celular en medio líquido. Para esto se realizó una mezcla de los fagos (cóctel) en proporciones iguales. Se evaluó el cóctel DT1 + DT6 sobre las cepas DH5 α , EPEC920 y STEC464 O157:H7 y el cóctel DT5 + DT6 sobre la cepa STEC no-0157 ARG4827. Se utilizó la misma metodología (condiciones de cultivo, volúmenes, temperaturas, tiempos de muestreo y controles) que en los ensayos con fagos individuales descripta anteriormente.

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

Se utilizaron cubreobjetos de vidrio (CV) (18 mm x 18 mm) y fichas de acero inoxidable (AI) (25 mm x 15 mm) para representar dos materiales diferentes involucrados en el procesamiento de alimentos. Las matrices se limpiaron con etanol al 70% (v/v), posteriormente se autoclavaron, se colocaron en placas de Petri y se utilizaron inmediatamente o se almacenaron a temperatura ambiente hasta su uso. Cada cultivo bacteriano - EPEC920, STEC no-0157 (ARG4827) y STEC464 O157:H7- se inoculó (10 μ l) por separado, a dos concentraciones distintas, sobre las superficies sólidas evaluadas, a saber aproximadamente 10⁴ y 10⁶ UFC ml⁻¹ para CV y aproximadamente 10⁵ y 10⁷ UFC ml⁻¹ para AI, y se dejó secar durante 30 min a temperatura ambiente en flujo laminar (Gabinete de Bioseguridad Telstar Bio II A, Teslar, Inc., Buenos Aires, Argentina). Luego, se aplicaron alícuotas de 100 μ l del cóctel de fagos (DT1 + DT6



Detección bacteriana por amplificación isotérmica de ADN

ANSR para Salmonella spp y Listeria spp






Kits de diagnóstico rápido para la detección de microorganismos patógenos en alimentos.

- *Listeria sp. (AOAC-RI)
- *Salmonella sp (AOAC-RI)
- *E. coli O157:H7 (AOAC Official Method)
- Perlas Inmuno-magnéticas para E. coli O157

Kits Agri-Screen® y Veratox® para detección de: Aflotoxinas - Zearalenona - Toxina T-2 - Fumonisina - Ocratoxina - Vomitoxina (DON) - Histamina



PRODUCTOS QUIMICOS MAGIAR S.A.

Argentina: Productos Químicos Magiar S.A.
J.A. Cabrera 3288 CABA - Tel.: (54 11) 4963-1525
magiar@magiar.com.ar

Chile: Magiar Chilena S.A.
San Eugenio 1085 depto 184
Santiago - Tel. 2848-4650 - dcastillo@magiar.cl

Uruguay: Magiar Uruguay
Tel.: (59 82) 6983135 magiar@adinet.com.uy

para EPEC920 y STEC464 O157:H7; DT5 + DT6 para STEC no-O157 ARG4827) (aproximadamente 109 UFC ml⁻¹) o de caldo Hershey-Mg (control) en la parte superior de las superficies sólidas (CV y AI) inoculadas con la cepa correspondiente de *E. coli* evaluada. Se realizaron controles de secado, en donde se inoculó 10 µl de cultivos bacterianos sobre las superficies CV y AI sin adición de fagos o caldo Hershey-Mg para evaluar el porcentaje de recuperación celular. A continuación los CV y las AI se incubaron en el interior de las placas de Petri a 4 y 37°C durante 1, 3 y 24 h. Para las muestras ensayadas a 37°C por el período de tiempo más prolongado (24 h), las placas de Petri se incubaron en un baño termostático para evitar la evaporación completa del cóctel fágico o del caldo Hershey-Mg. Los tratamientos y los controles de CV y AI se colocaron en tubos de 50 ml de centrifuga con 1 ml de buffer fosfato salino (PBS) (pH 7,2), estos se homogeneizaron con vortex durante 2 min, se realizaron diluciones decimales en PBS, las cuales se sembraron en agar Hershey-Mg y se incubaron 24 h a 37°C. Luego de la incubación, se enumeraron las células viables (UFC ml⁻¹). La reducción en el número de células viables se calculó restando el número de UFC ml⁻¹ obtenido en las superficies tratadas (10 µl cepa bacteriana + 100 µl cóctel fágico) del número de UFC ml⁻¹ obtenido en superficies control (10 µl cepa bacteriana + 100 µl caldo Hershey-Mg). Se llevaron a cabo tres experimentos independientes y se ensayaron muestras por duplicado en cada tiempo de muestreo.

Análisis estadístico

Los valores de UFC ml⁻¹ se transformaron a logaritmo en base 10 para asegurar el cumplimiento de los supuestos requeridos por la técnica. Se realizó ANOVA a dos factores, y comparaciones múltiples, en caso de ser necesario, para comparar entre tratamientos. Se utilizó el método de Scheffé para determinar diferencias significativas ($p < 0,05$).

Resultados y discusión

Challenge con fagos individuales y con cóctel de fagos

Tanto con fagos individuales como con el cóctel (a saber DT1 + DT6 para *E. coli* EPEC920 y STEC464 O157:H7, y DT5 + DT6 para *E. coli* STEC no-O157 ARG4827) se obtuvieron reducciones significativas de células viables respecto de los controles sin fagos, para todas las cepas evaluadas. Cuando se ensayó la cepa *E. coli* DH5α se obtuvieron reducciones desde 2,04 a 5,55 log UFC ml⁻¹, siendo el cóctel el tratamiento con el que se obtuvo mayor reducción a 2 y 24 h (5,55 y 2,29 log UFC ml⁻¹, respectivamente), mientras que el DT1 fue más efectivo a tiempos intermedios (5,21 log UFC ml⁻¹ a 6 h). Para *E. coli* EPEC920, los fagos individuales fueron más efectivos en reducir la población bacteriana que la mezcla de ellos, obteniéndose las mayores reducciones para DT6 a

2 (5,51 log UFC ml⁻¹) y 6 h (5,23 log UFC ml⁻¹), mientras que a 24 h, la mayor reducción se obtuvo con DT1, a saber 1,16 log UFC ml⁻¹. La cepa *E. coli* STEC no-O157 ARG4827 fue la más sensible a la acción lítica, tanto de los fagos individuales como de los que formaban parte de un cóctel. Se obtuvieron valores máximos de reducción de hasta 6,38 log UFC ml⁻¹, sin embargo, a las 24 h de incubación también fue una de las menos afectadas (0,55 log UFC ml⁻¹). Al evaluar los valores de biocontrol para *E. coli* STEC464 O157:H7, se alcanzaron reducciones intermedias de 3,88 log UFC ml⁻¹ (2 h) con DT6, elevadas hasta 5,23 log UFC ml⁻¹ (6 h) y bajas de 1,99 log UFC ml⁻¹ (24 h), las dos últimas con el cóctel. Otros autores obtuvieron resultados comparables, con reducciones de 6,0 log UFC ml⁻¹ para la cepa *E. coli* O157:H7 a 37°C utilizando una MOI de 100 (O'Flynn y col., 2004).

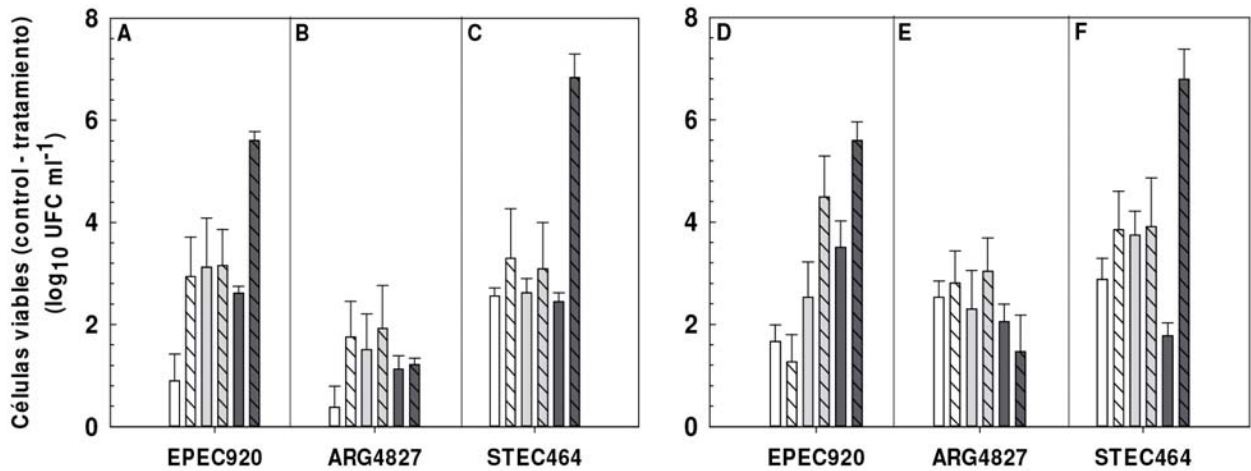
Para todos los sistemas se observó una mayor eficacia y actividad lítica a tiempos cortos de muestreo, mientras que en tiempos largos se observó un recrecimiento bacteriano, siendo 2,29 log UFC ml⁻¹, la máxima reducción alcanzada. Esto puede deberse a que el crecimiento bacteriano observado a 37°C puede promover la variabilidad fenotípica en la expresión del antígeno O pudiendo favorecer la supervivencia y crecimiento secundario de células bacterianas resistentes a la infección por fagos (Dodds y col., 1987).

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

Ensayos de descontaminación sobre cubreobjetos (glass coverslip)

Cuando se utilizaron cubreobjetos de vidrio como superficie sólida para los experimentos de biocontrol, el cóctel de fagos inactivó rápida (<1h) y completamente tanto a la cepa *E. coli* EPEC920 como a *E. coli* STEC464 O157:H7 a ambas temperaturas (4 y 37°C) y MOIs evaluadas, a saber 1,8x10⁴ y 1,8x10⁶ (EPEC920) y 1,2x10⁵ y 1,2x10⁷ (STEC464 O157:H7), obteniéndose una reducción de hasta 4 log UFC ml⁻¹. Sin embargo, a las 24 h se detectaron células viables cuando se utilizó el menor valor de MOI a 4°C. La cepa *E. coli* STEC no-O157 ARG4827 fue significativamente reducida en su número por el cóctel (DT5 + DT6) a las primeras horas del ensayo tanto a 4 como a 37°C. Estas reducciones se obtuvieron empleando MOIs de 2,2x10⁴ y 2,2x10⁶, y si bien en ningún caso se logró la eliminación completa de *E. coli*

Figura 1 - Diferencia en el número de células viables de *Escherichia coli* (UFC ml⁻¹) entre control y tratamiento (cóctel) a alta (10⁶) (A, B y C) y baja (10⁴) (D, E y F) MOI durante el biocontrol sobre superficies sólidas (cubreobjetos de vidrio). Los ensayos realizados a 4 y 37°C están representados por barras sin y con rayas, respectivamente. □= 1 h, ▨= 3 h y ■= 24 h



STEC no-0157 ARG4827, a 4°C el número de células viables se mantuvo constante hasta las 24 h mientras que a 37°C se obtuvieron reducciones de 1,46 log UFC ml⁻¹; en ambos casos el número de células viables fue siempre menor al control sin fagos (Figura 1). Abuladze y col. (2008) obtuvieron reducciones similares de hasta 4 log UFC ml⁻¹ en superficies sólidas utilizando sólo la mayor MOI evaluada (10⁵). Los controles a 4°C mostraron valores ligeramente menores al inóculo bacteriano inicial, mientras que a 37°C se evidenció un aumento de varios órdenes de magnitud en las UFC ml⁻¹ a las 24 h de incubación.

Ensayos de descontaminación sobre acero inoxidable (stainless steel chips)

Al utilizar fichas de acero inoxidable como superficie sólida para el biocontrol de cepas de *E. coli*, el cóctel de fagos inactivó rápida (<3 h) y completamente a EPEC920 así como a STEC464 O157:H7 a 4 y 37°C tanto a baja como alta MOI, alcanzándose un biocontrol de hasta 5-6 log UFC ml⁻¹. Además, se obtuvo una inactivación completa de *E. coli* STEC no-0157 ARG4827 a 1 h (MOI = 1,7x10⁵) y 3 h (MOI = 1,7x10³) de incubación sólo cuando se realizaron los ensayos a 37°C (Figura 2). Viazis y col. (2010) obtuvieron valores de inactivación bacteriana en acero inoxidable de hasta 4,2 log UFC ml⁻¹ a 37°C (MOI=10), sin embargo, a bajas temperaturas (4°C) los valores de biocontrol sólo alcanzaron a 1,7 log UFC ml⁻¹ (MOI=100). En el caso de *E. coli* STEC464 O157:H7, si bien no se pudieron detectar células viables a las 3 h de incubación, a las 24 h se detectaron cuando se utilizó MOI baja (9,3x10³) a 37°C, lográndose una reducción en el número de células viables de sólo 1,25 log UFC ml⁻¹. Adicionalmente, se detectaron células de *E. coli* EPEC920 a 37°C a ambos valores de MOI empleados, a saber 1,8x10³ y 1,8x10⁵, a las 24 h de incubación, sin embargo, las reducciones permanecieron sig-

nificativas, observándose valores de hasta 5,37 log UFC ml⁻¹. Otros autores también han detectado células viables a tiempos de muestreo prolongados (O'Flynn y col., 2004) atribuyendo esto, en algunos casos, a mutantes insensibles o a una inadecuada distribución del tratamiento. En los ensayos a 4°C con *E. coli* STEC no-0157 ARG4827 se logró eliminar completamente el patógeno a la tercera hora de incubación utilizando MOI elevada, mientras que al emplear una MOI baja, la erradicación del patógeno se logró a las 24 h de incubación.

INGENIERIA PREGMA

Miguel García

EMPRESA ARGENTINA
EXPORTADORA DE
NUESTROS PRODUCTOS

Fabricadora de hielo en barra

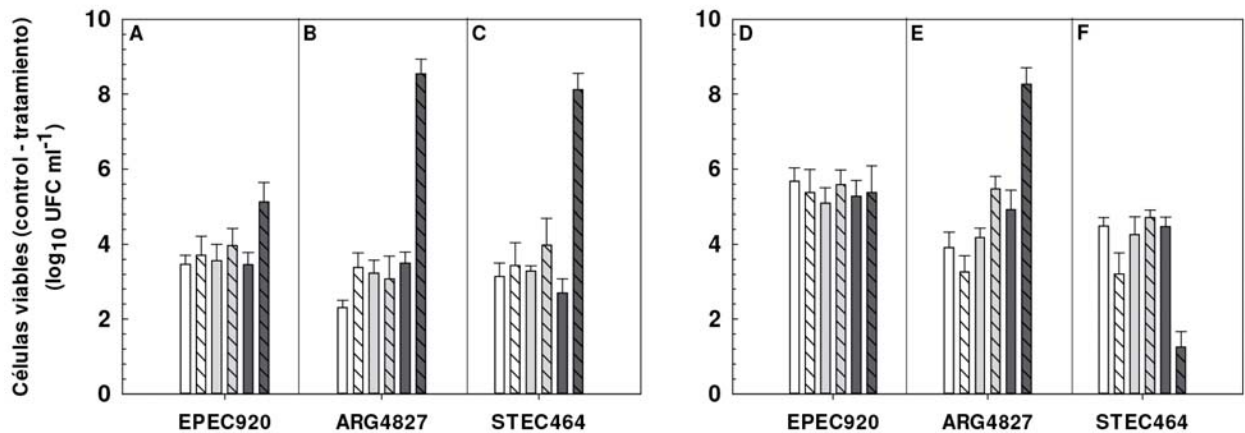
Fabricadora de hielo cilíndrico

Fabricadora de hielo en escama

Fabricadora de hielo cilíndrico - Hielo en barra - Hielo en Escamas - Conservadoras para hielo
- Cámaras frigoríficas - Paneles y equipamientos - Hidrocoolers por inmersión - Sistema de ósmosis inversa
- Procesado de espárragos - Lavadoras y llenadoras de bidones automáticas y semi-automáticas

Fábrica: Solis N°10343 (7600)
Mar del Plata - Bs. As. - Argentina
Tel./Fax: (54 0223) 4656777/4108823
migueltgarcia@pregma.com.ar - www.pregma.com.ar

Figura 2 - Diferencia en el número de células viables de *Escherichia coli* (UFC ml⁻¹) entre control y tratamiento (cóctel) a alta (10⁶) (A, B y C) y baja (10⁴) (D, E y F) MOI durante el biocontrol sobre superficies sólidas (acero inoxidable). Los ensayos realizados a 4 y 37°C están representados por barras sin y con rayas, respectivamente. □ = 1 h, ▨ = 3 h y ■ = 24 h



Conclusiones

En los ensayos de challenge in vitro y descontaminación sobre superficies sólidas realizados en el presente estudio se evidenció la eficacia de los bacteriofagos, tanto individualmente como formando parte de un cóctel, obteniéndose reducciones significativas en todos los sistemas evaluados. Por esto, podemos concluir que los fagos evaluados pueden constituir una herramienta útil de biocontrol frente a bacterias multirresistentes en las superficies sólidas de procesamiento de productos cárnicos encontradas en ambientes industriales. Actualmente estamos investigando la viabilidad fágica frente a las distintas condiciones que se pueden encontrar, tanto en la matriz cárnica (conservantes) como en el ambiente industrial (sanitizantes), para que los fagos puedan ser potencialmente incluidos en el futuro en sistemas de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (HACCP).

Bibliografía

DeWaal, C.; Tian, X. y Plunkett, D. (2009). (www.cspinet.org/new/pdf/outbreak_report_2009.pdf).

- Dodds, K. L.; Perry, M. B. y McDonald, I. J. (1987). Alterations in lipopolysaccharide produced by chemostat-grown *Escherichia coli* O157:H7 as a function of growth-limiting nutrient. *Canadian Journal of Microbiology*, 33:452-458.
- EFSA (European Food Safety Authority). (2010). The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2009. *EFSA Journal*, 9(3):2090, 1-378.
- Farrokh, C.; Jordan, K.; Auvray, F.; Glass, K.; Oppegaard, H.; Raynaud, S.; Thevenot, D. y Condron, R. (2012). Review of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and their significance in dairy production. *International Journal of Food Microbiology*. (En prensa).
- Kennedy, J. y Bitton, G. (1987). Bacteriophages in foods. In *Phage Ecology* ed. Goyal, S.M., Gerba, C.P. and Bitton, G. pp. 289-316. New York: John Wiley & Sons.
- Mead, P.; Slutsker, L.; Dietz, V.; McCaig, L.; Bresee, J.; Shapiro, C.; Griffin, P. y Tauxe, R. (1999). *Emerging Infectious Diseases*, 5:607-625.
- O'Flynn, G.; Ross, R. P.; Fitzgerald, G. F. y Coffey, A. (2004). Evaluation of a cocktail of three bacteriophages for biocontrol of *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(6): 3417-3424.
- Sulakvelidze, A. y Barrow, P. (2005). "Phage therapy in animals and agribusiness," in *Bacteriophages: Biology and Applications*, eds E. Kutter and A. Sulakvelidze (Boca Raton, FL: CRC Press), 335-380.
- Summers, W. C. (1999). *Félix d'Hérelle and the Origins of Molecular Biology*. New Haven, CT: Yale University Press.
- Viazis, S.; Akhtar, M.; Feirtag, J. y Diez-Gonzalez, F. (2010). Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 viability on hard surfaces by treatment with a bacteriophage mixture. *International Journal of Food Microbiology*, 145(1):37-42.



La solución instantánea a su problema de espacio frigorífico.

Con la última tecnología, todo para el almacenaje estático de mercadería perecedera.

CONTENEDORES DRY Y REFRIGERADOS. ALQUILER - VENTA



Leandro N. Alem 861 (1646) San Fernando Tel/Fax (5411) 4780.3551 / 4744.3270
info@cool-tainer.com.ar - www.cool-tainer.com.ar