

Trabajo Final Integrador. CESA, FCV, UNLP

“Efecto del aditivo alimentario cloruro de sodio sobre *Escherichia coli* verotoxigénico”



Trabajo Final Integrador

“Efecto del aditivo alimentario cloruro de sodio sobre *Escherichia coli* verotoxigénico”

Autora: Lic. Lucía Medico

Director: Dra. Alejandra Krüger

Codirector: M.V. MSC. Giselda Isabel Bigeon

Fecha: Febrero 2018

## RESUMEN

*Escherichia coli* verotoxigénico (VTEC) puede causar una serie de enfermedades en el ser humano, desde diarrea acuosa y colitis hemorrágica (CH), hasta síndrome urémico hemolítico (SUH). Las cepas VTEC tienen la capacidad de producir verotoxinas (VTs), las cuales están codificadas por genes *vtx* que se encuentran en profagos insertos en el cromosoma bacteriano. La producción de VTs está ligada al ciclo de replicación del fago y las condiciones que llevan a la inducción del fago también incrementan la liberación de verotoxinas.

La alta tasa de infecciones asociadas a VTEC en Argentina constituye un importante problema en Salud Pública y un serio desafío para la industria alimenticia. Este trabajo se realizó con el propósito de evaluar el efecto del aditivo cloruro de sodio sobre el crecimiento de 6 cepas VTEC aisladas de bovinos y alimentos, y sobre la inducción de fagos codificantes de verotoxinas. Para ello se realizaron cultivos con y sin el agregado de NaCl 2%. Se midió la densidad óptica a 600 nm y se realizaron curvas de crecimiento bacteriano. A las 3 horas posteriores al agregado del aditivo, se recolectaron los sobrenadantes para la determinación de producción de fagos por recuento de unidades formadoras de placa de lisis. Alícuotas de los sobrenadantes se conservaron a 4 °C para evaluar la estabilidad de los fagos detectados. Los ensayos mostraron disminución de crecimiento de las cepas VTEC por la adición del NaCl 2%. Sin embargo, los títulos de fagos portadores de *vtx* producidos en presencia de NaCl 2% no fueron significativamente diferentes de los producidos por los cultivos controles. En uno de los sobrenadantes se detectó presencia de fagos infectivos luego de 55 días de conservación a 4 °C.

Teniendo en consideración que los fagos pueden persistir en los alimentos, son necesarios más estudios que determinen el riesgo de producción de fagos *vtx* en alimentos durante los procesos de elaboración, manipulación y almacenamiento.

Palabras claves: *Escherichia coli*, fago, verotoxinas, cloruro de sodio.

## **ABSTRACT**

Verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) can cause severe human diseases, ranging from mild diarrhea to haemorrhagic colitis (HC) and haemolytic–uraemic syndrome (HUS). VTEC strains are able to produce verotoxins (VTs), which are carried by phages inserted into the bacterial chromosome. VT production is linked to phage replication, and conditions that cause prophage induction also increment VT release.

The high rate of infections associated with VTEC in Argentina is a matter of public health concern and a serious challenge to the food industry. The present study was performed to evaluate the effect of sodium chloride on VTEC isolated from cattle and food and on the production of verotoxin-encoding phages (vtx phages). To reach this objective 6 VTEC strains were cultivated with and without addition of NaCl 2% and spectrophotometrically (OD600) monitored. After 3 h incubation, supernatants of cultures were collected for phage quantification assay using the double-agar-layer method. Aliquots of supernatants were stored at 4 °C for evaluation of phage stability. The assays showed a decrease in the growth of VTEC cultures added with NaCl 2%. However, the titers of vtx phages produced by cultures incubated with NaCl 2% were not significantly different from those produced by the control cultures. Infective phages were still present after 55 days at 4 °C in one of the supernatants.

Taking into account that phages can persist in food products, it is necessary that more studies evaluate the risk of vtx phage production during the manufacturing, handling and storage processes.

Keywords: *Escherichia coli*, phage, verotoxins, sodium chloride.

## ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN</b>	1
Enfermedades Transmitidas por los Alimentos	1
<i>Escherichia coli</i>	1
<i>Escherichia coli</i> verotoxigénico (VTEC)	2
Factores de virulencia	3
Bacteriofagos portadores de <i>vtx</i>	4
Síndrome urémico hemolítico (SUH)	6
Reservorios y vías de transmisión	6
Aditivos	8
<b>HIPÓTESIS</b>	10
<b>OBJETIVOS</b>	11
Objetivo general	11
Objetivos específicos	11
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	12
Cepas VTEC	12
Cepa hospedadora	12
Solución <i>stock</i> de cloruro de sodio	13
Condiciones de crecimiento de las cepas VTEC	13
Curvas de crecimiento/lisis de cepas VTEC	13
Detección de producción de fagos infectivos por cepas VTEC	14
Detección de genes <i>vtx<sub>2</sub></i> , <i>eae</i> , <i>saa</i> y <i>uspA</i> por PCR	15
Detección de fagos infectivos por cepas VTEC en los filtrados guardados	16
Análisis estadístico	16

<b>RESULTADOS</b>	17
Curvas de crecimiento en presencia-ausencia de cloruro de sodio	17
Titulación de fagos por métodos de doble capa de agar	21
Identificación de $vtx_1$ y $vtx_2$ por PCR	23
Evaluación de la infectividad de los fagos conservados a 4 °C	24
<b>DISCUSIÓN</b>	25
<b>CONCLUSIONES</b>	27
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	28
<b>ANEXO</b>	37

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Cepas de VTEC utilizadas en los ensayos	12
<b>Tabla 2.</b> Tabla de diluciones realizadas de los cultivos VTEC para mediciones de DO <sub>600</sub>	14
<b>Tabla 3.</b> <i>Primers</i> utilizados para la detección de genes de virulencia por PCR-MULTIPLEX	15
<b>Tabla 4.</b> Termociclado de la reacción PCR-MULTIPLEX para la detección de factores de virulencia	16
<b>Tabla 5.</b> Títulos promedio de fagos en sobrenadantes de cultivos en presencia y en ausencia de cloruro de sodio	22

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema de los ciclos lítico y lisogénico	5
<b>Figura 2.</b> Curvas de crecimiento de la cepa FB80 con y sin el agregado de NaCl	18
<b>Figura 3.</b> Curvas de crecimiento de la cepa FB5 con y sin el agregado de NaCl	18
<b>Figura 4.</b> Curvas de crecimiento de la cepa T8-1 con y sin el agregado de NaCl	19
<b>Figura 5.</b> Curvas de crecimiento de la cepa 41M con y sin el agregado de NaCl	19
<b>Figura 6.</b> Curvas de crecimiento de la cepa AP97-3 con y sin el agregado de NaCl	20
<b>Figura 7.</b> Curvas de crecimiento de la cepa FB3 con y sin el agregado de NaCl	20
<b>Figura 8.</b> Densidad óptica de los cultivos VTEC a las 3 horas (H3) del agregado de NaCl 2%.	21
<b>Figura 9.</b> Placas de lisis obtenidas a partir del sobrenadante de la cepa de <i>E. coli</i> FB5 sobre un césped de <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ .	23
<b>Figura 10.</b> Foto de gel de agarosa evidenciando la amplificación de <i>vtx</i> <sub>2</sub> a partir de las placas de lisis	24

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR LOS ALIMENTOS

Las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA) son enfermedades causadas por patógenos, sustancias químicas o parásitos y afectan la salud de una persona o grupo de personas en forma aguda o crónica. Se dan por la ingestión de alimentos, productos alimenticios o agua contaminados. Las mismas se encuentran dispersas alrededor del mundo y toda persona está en riesgo de contraerlas (WHO, 2007; Tauxe y col., 2010)

Las ETA constituyen un problema de salud pública mundial que se agrava año tras año. Entre los factores responsables se destacan el crecimiento de la población, la pobreza, la urbanización en los países subdesarrollados, el comercio internacional de alimentos, nuevas formas de contagio, la aparición de nuevos agentes causantes de enfermedades transmitidas por alimentos o nuevas variantes de estas con mayor resistencia y patogenicidad como así también a la falta de educación masiva en la sociedad y en las industrias (Tozzi y col., 2001).

Se manifiestan con síntomas tales como diarreas, vómitos, cefaleas, fiebre, *shocks* sépticos, hepatitis, entre otras, afectando con mayor gravedad a la población inmunodeprimida, apatncianos y niños pequeños (Tozzi y col., 2001).

Entre las bacterias patógenas frecuentemente asociadas a ETA se encuentran: *Clostridium botulinum*, *Escherichia coli* verotoxigénico, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* y *V. vulnificus* (Scallan y col., 2011).

### 1.2 *ESCHERICHIA COLI*

*Escherichia coli* es una bacteria Gram negativa perteneciente al orden de las *Eubacteriales*, Familia *enterobacteriaceae*, Tribu *Escherichieae*, Género *Escherichia*, Especie *coli* (Bergey y col., 1992)

Habitualmente forma parte de la microflora del intestino del hombre y de los animales de sangre caliente, encontrándose normalmente en las heces. En los

“Efecto del aditivo alimentario cloruro de sodio sobre *Escherichia coli* verotoxigénico”

animales, desde las primeras horas después del nacimiento, cepas de *E. coli* habitan la parte más distal del íleon y todo el colon, representando el uno por ciento o menos de las bacterias presentes en el colon. Esta bacteria es la especie anaerobia facultativa más numerosa en el tracto gastrointestinal sano de los animales adultos (Scanlan, 1991).

También se puede hallar en el suelo, agua y otros lugares, aunque su procedencia parece ser siempre intestinal. Su presencia en los alimentos es índice de contaminación fecal (Scanlan, 1991).

Las cepas de *E. coli* se pueden caracterizar en base sus antígenos somáticos (O), flagelares (H) y capsulares (K) (Evans y col., 1979). Han sido identificados por lo menos un total de 174 antígenos O, 56 antígenos H, y 80 antígenos K. La mayoría de las cepas son comensales inofensivos, aunque algunas cepas son patógenas y provocan diferentes enfermedades (Doyle y col., 2000).

Actualmente las cepas de *E. coli* diarreagénicas se clasifican en 6 patotipos: *Escherichia coli* enteropatógeno (EPEC); *Escherichia coli* enterotoxigénico (ETEC); *Escherichia coli* verocitotoxigénico (VTEC); *Escherichia coli* enteroinvasivo (EIEC); *Escherichia coli* enteroagregativo (EAaggEC) y *Escherichia coli* de adherencia difusa (DAEC) (Scheutz y Strockbine, 2005; Bettelheim, 2007).

Particularmente, las cepas de *E. coli* productoras de verotoxinas (VTEC o STEC) son importantes patógenos asociados a problemas de salud pública en Argentina (Caletti, 2006).

### 1.3 VTEC

Con la denominación VTEC se conocen todas aquellas cepas de *Escherichia coli* capaces de producir alguno de los tipos existentes de una potente citotoxina conocida como verotoxina (VT), dada su capacidad de destruir *in vitro* las células Vero (Konowalchuk y col., 1977).

La infección con VTEC puede causar un amplio espectro de manifestaciones clínicas en seres humanos, desde infección asintomática, diarrea leve o moderada,

“Efecto del aditivo alimentario cloruro de sodio sobre *Escherichia coli* verotoxigénico”

colitis hemorrágica (CH) y síndrome urémico hemolítico (SUH) (Karmali, 1989; Proulx y col., 2001; Tarr y col., 2005).

Las primeras asociaciones de cepas VTEC a enfermedad en humano fueron a principio de los '80s. Riley y col., (1983) aislaron cepas *E. coli* O157:H7 de muestras de materia fecal de personas afectadas por un brote de enfermedad gastrointestinal asociado al consumo de carne mal cocida en EE.UU y Karmali y col., (1985) evidenciaron infección por VTEC en pacientes pediátricos con SUH en Canadá.

Si bien desde ese entonces la mayoría de estas infecciones se ha atribuido a las cepas de VTEC el serotipo O157:H7 cada vez se registran con mayor frecuencia casos de infección ocasionados por las cepas pertenecientes a serogrupos distintos del O157, como O26, O103, O111 y O145, entre otros, conocidas como VTEC no-O157 (Nielsen y col., 2006; Rivas y col., 2006)

#### 1.4 FACTORES DE VIRULENCIA

Los principales factores de virulencia de VTEC son las verotoxinas (VTs) (Karmali, 1989; Proulx y col., 2001; Tarr y col., 2005). Existen 2 tipos principales de VT, denominados VT1 y VT2, atendiendo a diferencias en su secuencia aminoacídica y en su reactividad inmunológica (Strockbine y col., 1986).

Aunque las toxinas VT1 y VT2 poseen similares mecanismos de acción, su toxicidad varía tanto *in vivo* como *in vitro*. En este sentido, se ha establecido que las cepas VTEC que producen sólo VT2 o VT1 y VT2 tienen una mayor probabilidad de causar el SUH que aquellos que sólo producen VT1 (Blanco y col., 2004; Johnson y col., 2006). Los genes que codifican estas toxinas (*vtx*) se encuentran en profagos insertos en el cromosoma bacteriano (Unkmeir y col., 2000; Schmidt, 2001).

Además de producir VT, muchas cepas VTEC son capaces de colonizar la mucosa intestinal mediante el desarrollo de una lesión característica conocida como lesión *attaching and effacing* o lesión A/E, que consiste en la adherencia íntima de la bacteria a la membrana de la célula epitelial, mediante una adhesina específica denominada intimina, y el posterior borrado o destrucción de las microvellosidades

(Nataro y Kaper, 1998; Doyle y col., 2000).

Muchas de las cepas VTEC asociadas a enfermedad suelen presentar grandes plásmidos. Estos megaplásmidos presentan variabilidad en tamaño y en la combinación de genes codificantes de factores de virulencia, entre ellos suele encontrarse el gen *ehxA*, codificante de una hemolisina enterohemorrágica (Schmidt y col., 1994) y también el gen *saa*, codificante de una adhesina autoaglutinante de VTEC (Paton y col., 2001).

### **1.5 BACTERIOFAGOS PORTADORES DE vtx**

Los fagos, como todos los virus, son parásitos absolutos y son reconocidos como los microorganismos más abundantes de todo el planeta y posiblemente los más diversificados (Hendrix, 2002; Serwer y col., 2007). Los fagos juegan un rol importante en el balance microbiano en distintos ecosistemas, pudiendo afectar el metabolismo e incluso provocar la muerte bacteriana. Por otro lado, algunos fagos pueden aportar factores de virulencia que pueden convertir a una cepa no patogénica en virulenta (Kutter y Sulakvelidze, 2004). En particular, los fagos que portan los genes codificantes de verotoxinas (vtx), también denominados fagos vtx, juegan un rol fundamental en la patogénesis de VTEC (Schmidt, 2001).

Los fagos portadores de vtx son temperados, es decir, generalmente siguen el ciclo lisogénico al infectar la célula hospedadora, y se integran al cromosoma bacteriano en forma de profagos. Ante una respuesta SOS bacteriana, se induce la vía lítica (transición del estado lisogénico a ciclo lítico) con la consecuente producción de partículas virales y la liberación de las mismas a través de lisis celular (Schmidt, 2001; Brüssow y col., 2004) (Figura 1). Los genes vtx están dentro de la región tardía de estos fagos (Kimmitt y col., 2000). Por lo tanto, las condiciones que llevan a la inducción del fago también incrementan la liberación de toxina (Schmidt, 2001).

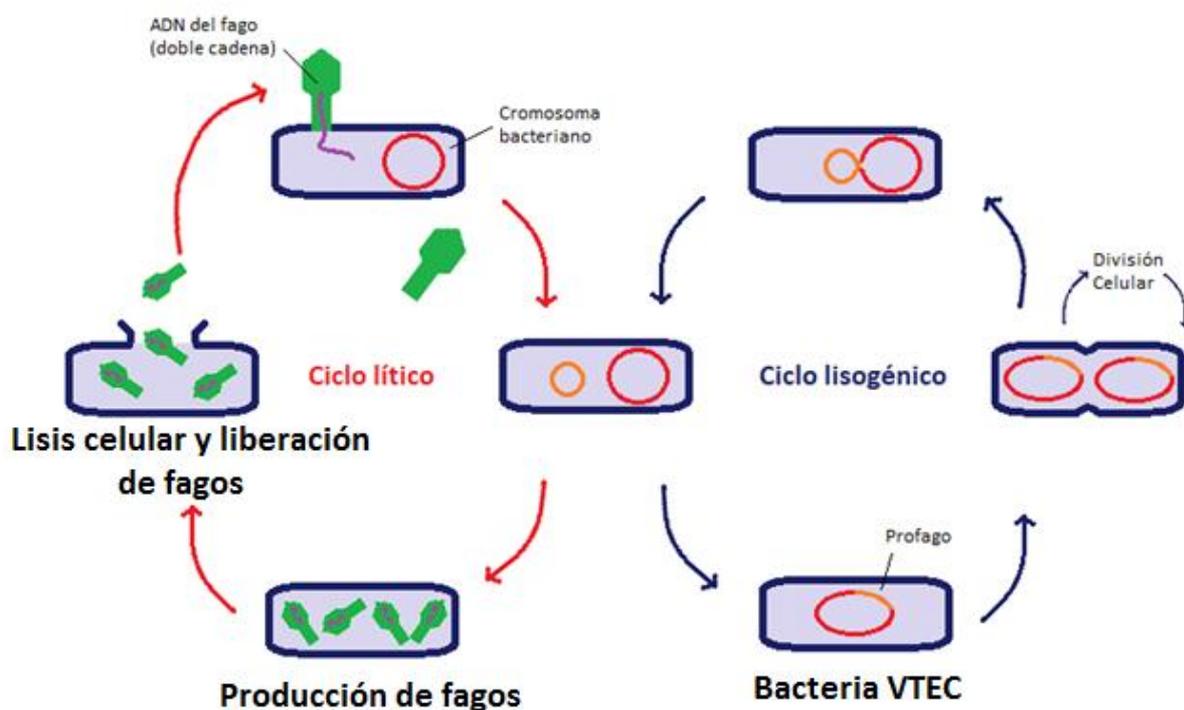
Una gran variedad de agentes pueden inducir la respuesta SOS (Little, 1984). Distintos investigadores han observado que estímulos como luz ultravioleta (UV), agua oxigenada (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y mitomicina C pueden inducir a los fagos portadores de vtx (Köhler y col., 2000; Schmidt, 2001).

“Efecto del aditivo alimentario cloruro de sodio sobre *Escherichia coli* verotoxigénico”

La transmisión por bacteriófagos es el principal vehículo en la propagación horizontal de los genes *vtx* en *E. coli* y contribuye significativamente a la emergencia de nuevos patotipos (Brett y col., 2003).

Se ha demostrado que los fagos en general son altamente resistentes a los procesos de inactivación (Baggi y col., 2001, Allué-Guardia y col., 2014) e incluso pueden tener una mayor persistencia en el ambiente que las bacterias que los portan (Martinez-Castillo y Muniesa, 2014). En particular, los fagos portadores de *vtx* demostraron mantener infectividad por periodos extendidos durante el proceso de producción de salchichas con alto contenido de NaCl (Rodé y col., 2011)

Figura 1. Esquema de los ciclos lítico y lisogénico



## 1.6 SUH

El síndrome urémico hemolítico es un desorden multisistémico caracterizado por presentar insuficiencia renal aguda, anemia hemolítica microangiopática y trombocitopenia (Karmali, 1989) que se presenta generalmente precedido por un episodio de diarrea con o sin sangre. Estos síntomas pueden acompañarse con fiebre, vómitos, dolor abdominal, y anuria u oliguria. Además, puede afectar sistema nervioso central, pulmones, páncreas y corazón, y llevar a la muerte debido a complicaciones neurológicas, intestinales, cardíacas o a infecciones intercurrentes (MS, 2017). Constituye importantes causas de insuficiencia renal aguda, de insuficiencia renal crónica y de trasplante renal en niños en la Argentina (Spizzirri y col., 1997).

El SUH se presenta principalmente en niños menores de 5 años. Si bien todos los grupos de edad pueden resultar afectados por VTEC, los bebés y los niños de corta edad padecen muy frecuentemente la enfermedad grave (Kovacs y col., 1990). Actualmente, nuestro país presenta un alto registro de SUH, con alrededor de 500 casos nuevos declarados anualmente y una incidencia cercana a 17/100000 niños menores de 5 años de edad (Rivas y col., 2010).

En la mayoría de los casos de infección por VTEC la diarrea es autolimitada, pero se estima que aproximadamente un 5-10% de los pacientes infectados evolucionan a SUH (Rivas y col., 2011).

Generalmente, los enfermos eliminan rápidamente *E. coli* O157:H7 de su tracto gastrointestinal, con lo cual, antes de que aparezca el SUH, dos terceras partes de los enfermos ya no tienen el microorganismo en sus deposiciones (Doyle y col., 2000).

## 1.7 RESERVORIO Y VÍAS DE TRANSMISIÓN

Está claramente determinado que los rumiantes domésticos constituyen el principal reservorio de VTEC, dado que diversos estudios han puesto de manifiesto que principalmente el ganado bovino, también ovino y caprino, albergan cepas VTEC en su microbiota intestinal de forma generalmente asintomática. Muchas de las cepas aisladas de estos animales pertenecen a los mismos serotipos que las cepas

“Efecto del aditivo alimentario cloruro de sodio sobre *Escherichia coli* verotoxigénico”

causantes de infecciones en los seres humanos (Blanco y col., 2004; Rey y col., 2003).

Si no se realizan buenas prácticas de faena, el contenido intestinal del bovino puede pasar a la superficie de las reses, y así contaminar la carne. El desollado es la etapa más crítica para la contaminación de las canales con VTEC (Rivas y col., 2007; Bell, 1997; Cummins y col., 2008)

La principal vía de transmisión de VTEC son los alimentos contaminados, como por ejemplo, carne molida, productos cárnicos crudos o insuficientemente cocidos, hamburguesas, embutidos fermentados, morcilla, leche no pasteurizada ni hervida, yogur, quesos, mayonesa, papas, lechuga, brotes de soja, alfalfa y rábano, jugos de manzana no pasteurizados, y agua, entre otros (Kaper y col., 2004; Caprioli y col., 2005; Rivas y col., 2003). En particular, la carne cruda o poco cocinada y la leche cruda son los alimentos más frecuentemente asociados a la infección con *E. coli* O157:H7 (Cuno, 2000).

Otra forma de contagio de las infecciones por VTEC se produce por la transmisión de persona a persona y el contacto directo con animales portadores o sus heces (Nataro y Kaper, 1998; Armstrong y col., 1996). También se han sugerido otras vías de contagio menos frecuentes, como la transmisión por vía aérea (Varma y col., 2003), y se han documentado asimismo infecciones nosocomiales e infecciones adquiridas en el laboratorio (Orden y col; 2008)

La cocción incompleta de los alimentos cárnicos contaminados no permite la destrucción total de VTEC, aumentando el riesgo del desarrollo de enfermedades graves en el hombre (Rivas y col., 2006). La hamburguesa y la carne picada son uno de los productos de mayor riesgo debido a que, durante el picado, la bacteria pasa de la superficie de la carne al interior del producto, donde es más difícil que se alcance la temperatura necesaria para eliminarla durante la cocción (Ministerio de Salud, 2011).

Según el Código Alimentario Argentino (CAA), se entiende por *Hamburgués* o bife a la hamburguesa, al producto elaborado con carne picada con el agregado de sal, glutamato de sodio y ácido ascórbico. Su contenido de grasa no puede exceder del 20%, definición a la que el producto debe ajustarse además de cumplir con cualquier otro requisito establecido para el grupo general al que pertenece (C.A.A. –

Cap. VI – Art. 330). En Argentina, Parma y col., 2000 detectaron cepas VTEC en el 29% de muestras de hamburguesas y en el 25% de muestras de carne picada.

## 1.8 ADITIVOS

Los alimentos cárnicos, como otros alimentos, suelen contener aditivos en su composición. Los aditivos son sustancias que carecen de valor nutritivo y son agregados intencionalmente, sin el propósito de nutrir, con el objeto de modificar las características físicas, químicas, biológicas o sensoriales, durante el proceso de elaboración y/o envasado y/o acondicionado, almacenado, transporte o manipulación de un alimento (Cubero y col., 2002; C.A.A., Cap. XVIII).

Además, son utilizados para mantener o mejorar su inocuidad, su frescura, su sabor, su textura o su aspecto. Algunos de ellos se llevan empleando desde hace siglos para conservar alimentos (OMS, 2017).

El cloruro de sodio, conocido como sal de mesa o sal común, fue uno de los primeros antimicrobianos empleados para la conservación de alimentos y es un aditivo ampliamente utilizado en la industria cárnica. Es un ingrediente comúnmente usado en carnes procesadas para mejorar el sabor, solubilizar proteínas miofibrilares, y como agente antimicrobiano (Smit y col., 2009, 2005). Comúnmente se incorpora cloruro de sodio al 2-3% p/v en la formulación de productos cárnicos (Harris y col., 2012). Según el C.A.A., las hamburguesas pueden contener cloruro de sodio en su composición, con un máximo 850 mg de sodio/100 g de producto (C.A.A, Cap. VI).

Desde el punto de vista de la seguridad alimentaria es importante conocer si los aditivos que se emplean en la elaboración de productos cárnicos tienen algún efecto sobre cepas patógenas que pueden estar presentes como contaminantes. Considerando que los productos cárnicos pueden estar contaminados con VTEC, los aditivos agregados a la carne podrían interactuar con las bacterias, afectando su crecimiento e incluso induciendo una respuesta SOS y la producción de fagos codificantes de verotoxinas.

Resulta entonces de suma importancia determinar el efecto del cloruro de sodio sobre el crecimiento de cepas VTEC frecuentemente presentes en los productos

“Efecto del aditivo alimentario cloruro de sodio sobre *Escherichia coli* verotoxigénico”

cárnicos, la producción de verotoxinas y de los fagos que las codifican. Sin embargo, sólo se han realizado pocos estudios que evalúan el efecto de cloruro de sodio sobre VTEC y están restringidos a cepas O157:H7 (Hajmeer y col., 2006; Harris y col, 2012).

## **2. HIPÓTESIS**

El cloruro de sodio al 2% p/v afecta el crecimiento de cepas VTEC autóctonas, y la producción de fagos codificantes de verotoxinas.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 General**

1. Estudiar el efecto del aditivo cloruro de sodio al 2% p/v sobre el crecimiento de *Escherichia coli* verotoxigénico y la inducción de fagos codificantes de verotoxinas.

#### **3.2 Específicos**

1. Evaluar el efecto del cloruro de sodio al 2% p/v sobre el crecimiento de cepas VTEC en medio líquido (Caldo Luria Bertani).
2. Analizar la inducción del ciclo lítico de fagos presentes en cepas VTEC en respuesta al cloruro de sodio.
3. Determinar el nivel de producción de fagos infectivos.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Cepas VTEC

A partir de la colección del laboratorio de Inmunoquímica y Biotecnología (FCV-UNCPBA), se seleccionaron 6 cepas *Escherichia coli* verotoxigénico (VTEC) aisladas de bovinos y carne picada pertenecientes a serogrupo O157 y no-O157. Las mismas se encontraban también caracterizadas respecto a la presencia-ausencia de distintos genes de virulencia (Tabla 1). Las cepas *E. coli* se encontraban almacenadas a  $-70^{\circ}\text{C}$  en caldo Luria Bertani (LB) con 20% de glicerol.

**Tabla 1.** Cepas de VTEC utilizadas en los ensayos.

<i>Cepa</i>	<i>Origen</i>	<i>serotipo</i>	<i>Genes de virulencia</i>			
<b><i>T 8-1</i></b>	ternero	O26:H11	<i>stx</i> <sub>2a</sub>	<i>eae</i> $\beta$	<i>ehxA</i>	-
<b><i>AP 97-3</i></b>	bovino adulto en pastoreo	O113:H21	<i>stx</i> <sub>2a</sub> + <i>stx</i> <sub>2c</sub>	-	<i>ehxA</i>	<i>saa</i>
<b><i>FB 5</i></b>	bovino en <i>feedlot</i>	O145:H-	<i>stx</i> <sub>2a</sub>	<i>eae</i> $\gamma$	<i>ehxA</i>	-
<b><i>FB 3</i></b>	bovino en <i>feedlot</i>	O157:H7	<i>stx</i> <sub>2a</sub> + <i>stx</i> <sub>2c</sub>	<i>eae</i> $\gamma$	<i>ehxA</i>	-
<b><i>FB 80</i></b>	bovino en <i>feedlot</i>	O157:H7	<i>stx</i> <sub>2a</sub> + <i>stx</i> <sub>2c</sub>	<i>eae</i> $\gamma$	<i>ehxA</i>	-
<b><i>41M</i></b>	carne picada	O178:H19	<i>stx</i> <sub>2a</sub>	-	<i>ehxA</i>	<i>saa</i>

### 4.2 Cepa hospedadora

Para la detección de fagos producidos por las cepas VTEC se utilizó como hospedadora la cepa *Escherichia coli* derivada de K-12: DH5 $\alpha$  (Muniesa y col., 2004).

#### **4.3 Solución *stock* de cloruro de sodio**

Se preparó una solución *stock* de cloruro de sodio al 20% p/v utilizando droga sólida de NaCl y favoreciendo la disolución con agitación y calor. Luego se filtró la solución utilizando filtros de 0,22  $\mu\text{m}$  y se almacenó a temperatura ambiente.

#### **4.4 Condiciones de crecimiento de las cepas VTEC**

En cada ensayo se tomaron “ansadas” de los cultivos *stock* de las cepas VTEC y se cultivaron en erlenmeyers con 5 ml de LB durante toda la noche (*overnight*) a 100 rpm, a 37°C.

Al día siguiente, se tomaron alícuotas de 220  $\mu\text{l}$  de cada cultivo de cepa VTEC y se colocaron en respectivos erlenmeyers conteniendo 11 ml de LB. Estos cultivos se incubaron durante aproximadamente 45' a 180 rpm, a 37°C, hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm ( $\text{DO}_{600}$ ) de 0,2-0,3.

Una vez alcanzada la DO requerida, se dividieron los cultivos en dos partes iguales, y se le agregó a una de ellas solución de cloruro de sodio a una concentración final de 2% p/v y a la otra, el mismo volumen de agua destilada. Este momento se definió como hora 0 (H0).

Los erlenmeyers se incubaron a 180 rpm a 37°C durante 3 horas (denominadas H1, H2 y H3).

#### **4.5 Curvas de crecimiento/lisis de cepas VTEC**

Se siguió el crecimiento de los cultivos líquidos de VTEC a través de la medición de la  $\text{DO}_{600}$  a cada hora, realizando diferentes diluciones con LB cuando fue necesario (Tabla 2).

**Tabla 2.** Tabla de diluciones realizadas de los cultivos VTEC para medir DO<sub>600</sub>.

<b>Hora</b>	<b>Cultivo en LB</b>	<b>Cultivo en LB + 2% NaCl</b>
<b>0</b>	Puro	Puro
<b>1</b>	1/2	1/2
<b>2</b>	1/4	1/4
<b>3</b>	1/5	1/4

#### 4.6 Detección de producción de fagos infectivos por cepas VTEC

Para evaluar la producción de fagos con capacidad infectiva se utilizó el método de titulación en doble capa de agar (Köhler y col., 2000; Muniesa y col., 2004). Se utilizó la cepa hospedadora *E. coli* DH5 $\alpha$  cultivada hasta una DO<sub>600</sub> entre 0,6 – 0,8 (durante 2,5 horas aproximadamente).

En H3 se tomó 1 ml de cada cultivo de las cepas VTEC por duplicado, y se centrifugó a 4°C, a 12000 rpm durante 10'. Se filtraron los sobrenadantes utilizando filtros de 0,22  $\mu$ m baja adsorción proteica (MillexGV, Millipore). Una alícuota de cada filtrado se procesó en el día y otra alícuota se conservó en heladera para evaluar la estabilidad de los fagos en el tiempo.

Se realizaron diluciones 1/10 de cada filtrado en LB. Luego se colocaron 500  $\mu$ l del cultivo de la cepa hospedadora DH5 $\alpha$  con 100  $\mu$ l del filtrado de cultivo de cada cepa (o de las diluciones correspondientes) en tubos de 15 ml, y se incubó durante 30' a 120 rpm, a 37°C. Se agregó a cada tubo 3 ml de top agar suplementado con CaCl<sub>2</sub> (9 mM final) e inmediatamente se volcó sobre una placa de LB agar, que se incubó a 37°C 18 h aproximadamente. Se evaluó la presencia y el número de placas de lisis, y se determinó la concentración de ufp/ml.

#### 4.7 Detección de genes *vtx<sub>2</sub>*, *eae*, *saa* y *uspA* por PCR

Se utilizó una PCR específica para determinar si las placas de lisis observadas eran producidas por fagos *vtx<sub>2</sub>*. Para tal fin se levantaron con *tips* pequeñas muestras de agar conteniendo las placas de lisis a evaluar. Las muestras se colocaron en 100 µl de agua bidestilada y se emplearon 2,5 µl en un volumen final de 25 µl de reacción. Se realizó una reacción de PCR *multiplex* que incluyó *primers* para la detección de *vtx<sub>2</sub>* y también para los genes *uspA*, *eae* y *saa* (Paton y col., 1998; Chen y Griffiths, 1998) (Tabla 3).

**Tabla 3.** *Primers* utilizados para la detección de genes de virulencia por PCR-MULTIPLEX.

Gen	Primer secuencia 5´-3´	Tamaño del amplímero	Referencia
<b><i>vtx<sub>2</sub></i></b>	stx2F-GGCACTGTCTGAAACTGCTCC stx2R-TCGCCAGTTATCTGACATTCTG	255 pb	Paton y Paton, 1998
<b><i>eae</i></b>	eaeAF-GACCCGGCACAAGCATAAGC eaeAR-CCACCTGCAGCAACAAGAGG	384 pb	Paton y Paton, 1998
<b><i>saa</i></b>	saaDF-CGT GAT GAA CAG GCT ATT GC saaDR-ATG GAC ATG CCT GTG GCA AC	119 pb	Paton y Paton, 1998
<b><i>uspA</i></b>	Up-CCGATACGCTGCCAATCAGT Down-ACGCAGACCGTAGGCCAGAT	884 pb	Chen y Griffiths, 1998

El termociclado (Tabla 4) se realizó en un termociclador programable. Los productos de amplificación se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio y se visualizaron con luz UV, se utilizaron dos controles:

- Controles positivo: lisado de un cultivo de *E. coli* EDL933 (*vtx<sub>2</sub>*<sup>+</sup>, *eae*<sup>+</sup>, *uspA*<sup>+</sup>).
- Control negativo: agua bidestilada.

**Tabla 4.** Termociclado de la reacción PCR-MULTIPLEX para la detección de factores de virulencia.

CICLOS 1 a 9	CICLOS 10 a 15	CICLOS 16 a 24	CICLOS 25 a 35
95°C x 1´	95°C x 1´	95°C x 1´	95°C x 1´
65°C x 2´	65°C a 60°C (-1°C/ciclo) x 2´	60°C x 2´	60°C x 2´
72°C x 1,5´	72°C x 1,5´	72°C x 1,5´	72°C x 2,5´

#### 4.8 Detección de fagos infectivos por cepas VTEC en los filtrados guardados

Para evaluar la estabilidad de fagos conservados en heladera, se realizó un nuevo ensayo de titulación en doble capa a los 55-57 días.

#### 4.9 Análisis estadístico

Se utilizó el *test t* para datos apareados, a través del programa GraphPad Prism 7.03, para comparar los valores de DO<sub>600</sub> y los títulos de ufp/ml de los grupos tratado y control. Se consideraron diferencias significativas cuando  $p < 0,05$ .

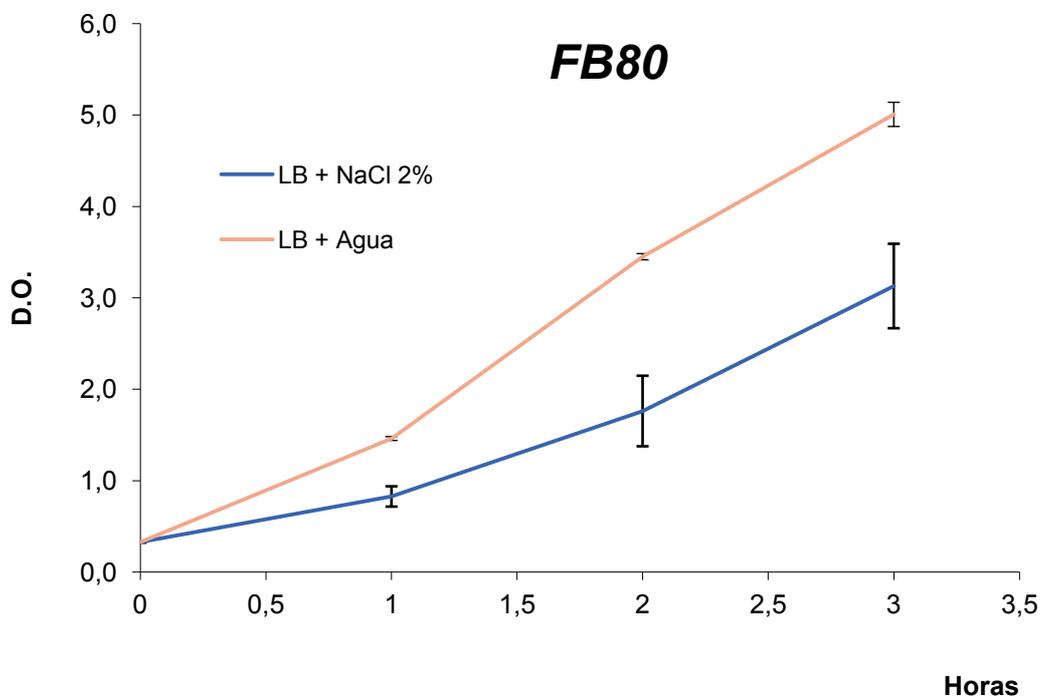
## **5. RESULTADOS**

### **5.1 Curvas de crecimiento en presencia-ausencia de cloruro de sodio**

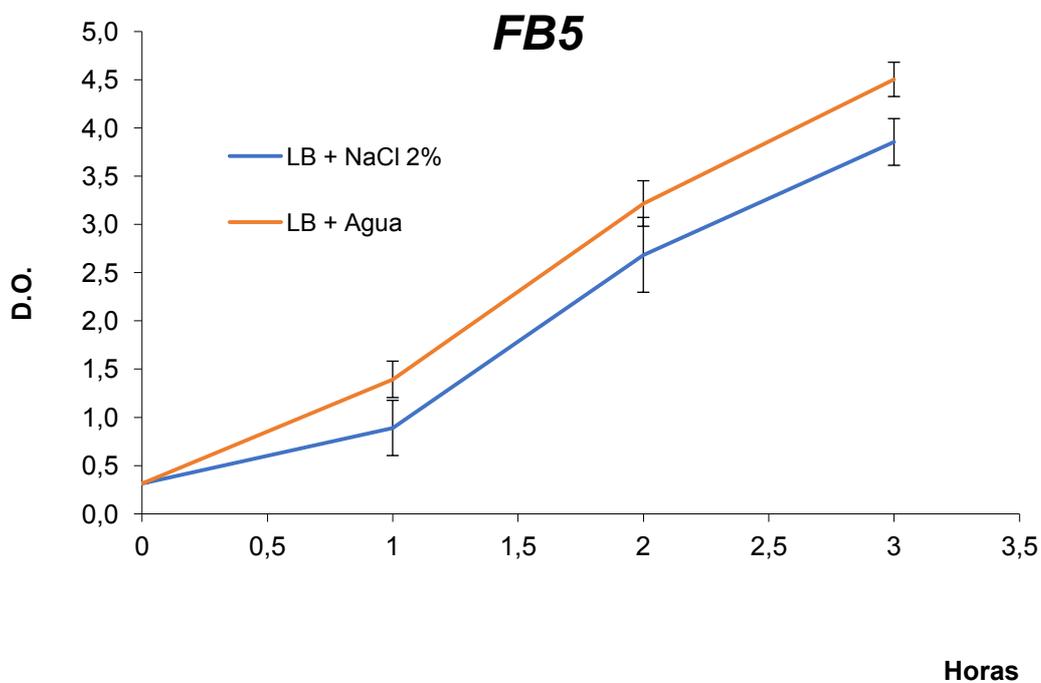
Se construyeron curvas de  $DO_{600}$  a lo largo del tiempo para cada cultivo VTEC incubado con y sin agregado de cloruro de sodio 2% (Figuras 2 a 7). En los gráficos se observa una menor velocidad de crecimiento en los cultivos con agregado de cloruro de sodio respecto a los cultivos controles. En H3 los cultivos controles llegaron a valores de  $DO_{600}$  promedio de 4,8 mientras que los tratados con cloruro de sodio mostraron valores de  $DO_{600}$  promedio de 3,6 (Figura 8). El análisis estadístico mostró diferencias significativas del grupo tratado vs. no tratado ( $p=0.012$ ).

En ninguno de las dos condiciones de crecimiento, se observaron curvas de crecimiento con patrón bacteriolítico

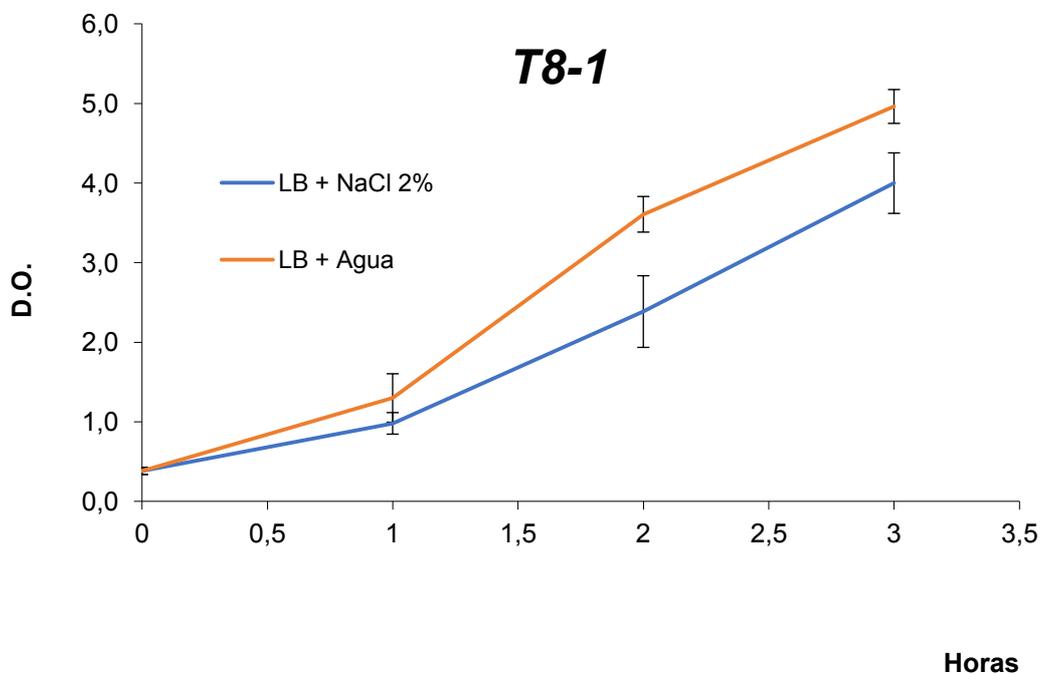
**Figura 2.** Curvas de crecimiento de la cepa FB80 con y sin el agregado de NaCl.



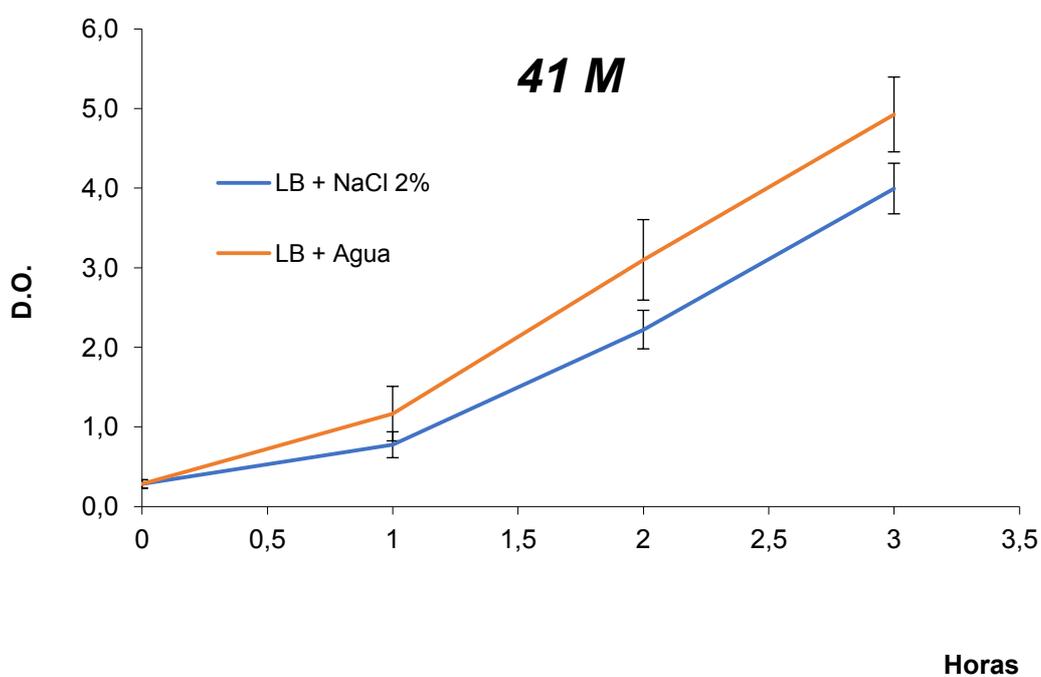
**Figura 3.** Curvas de crecimiento de la cepa FB5 con y sin el agregado de NaCl.



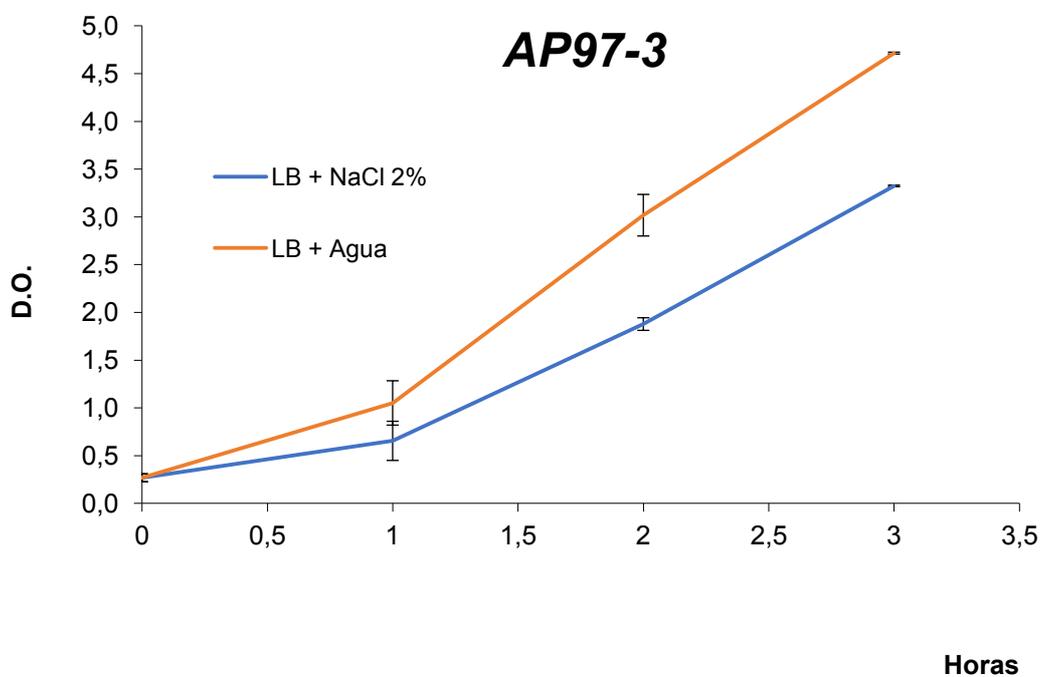
**Figura 4.** Curvas de crecimiento de la cepa T8-1 con y sin el agregado de NaCl



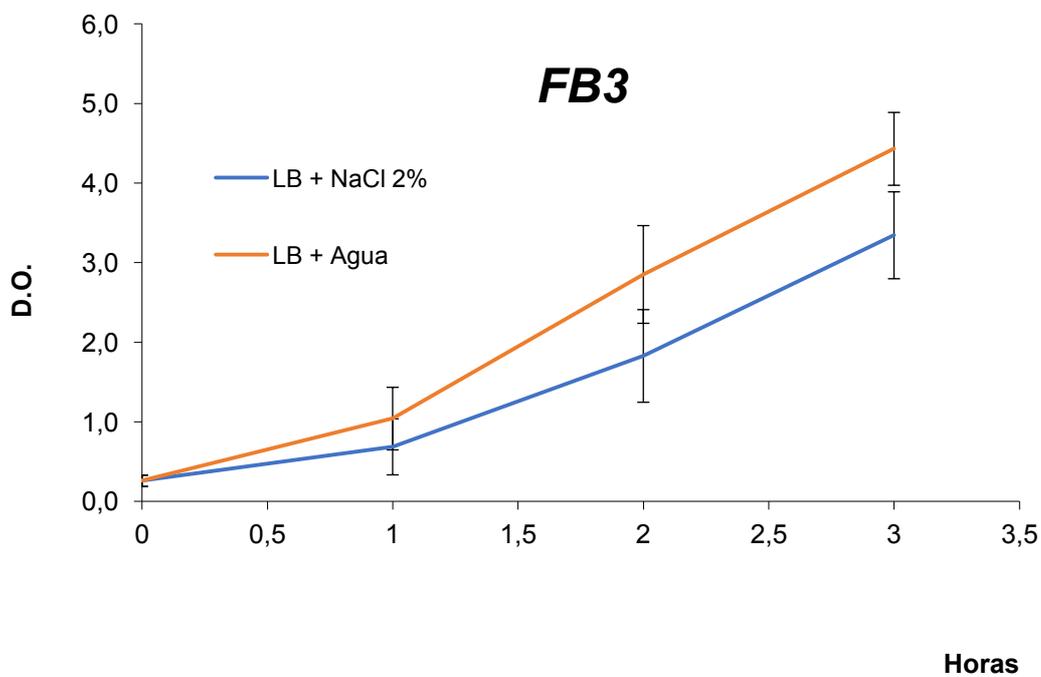
**Figura 5.** Curvas de crecimiento de la cepa 41M con y sin el agregado de NaCl.



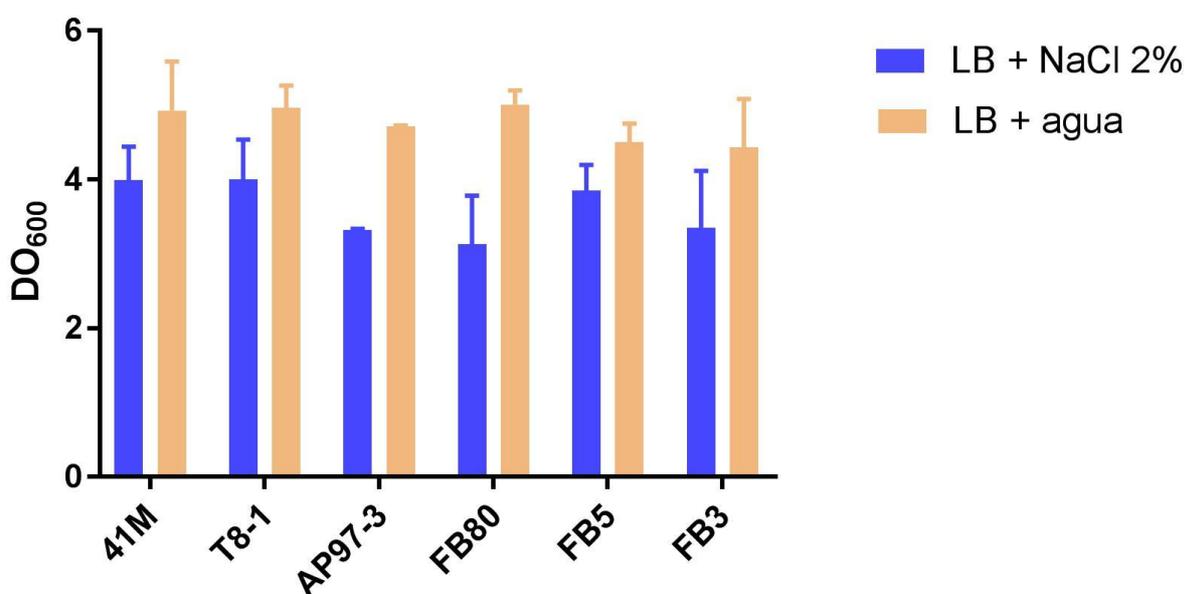
**Figura 6.** Curvas de crecimiento de la cepa AP97-3 con y sin el agregado de NaCl.



**Figura 7.** Curvas de crecimiento de la cepa FB3 con y sin el agregado de NaCl.



**Figura 8.** Densidad óptica de los cultivos VTEC a las 3 horas (H3) del agregado de NaCl 2%.



## 5.2 Titulación de fagos por método de doble capa de agar

Se detectaron placas de lisis a partir de los sobrenadantes de todos los cultivos, tanto tratados con el agregado de cloruro de sodio como los controles (Figura 9). Los títulos promedios de dos ensayos, determinados como unidades formadoras de placas (ufp)/ml, se muestran en la Tabla 5. En algunos casos el número de ufp obtenidas a partir del sobrenadante puro fue menor a 30, por lo que no se pudo determinar el título (se expresó como  $< 3 \cdot 10^2$  ufp/ml). El general se observó menor número de ufp a partir de los sobrenadantes de cultivos con cloruro de sodio que en los correspondientes controles, sin embargo la diferencia entre ufp/ml de tratados vs no tratados no fue estadísticamente significativo.

“Efecto del aditivo alimentario cloruro de sodio sobre *Escherichia coli* verotoxigénico”

**Tabla 5.** Títulos promedio de fagos en sobrenadantes de cultivos en presencia y en ausencia de cloruro de sodio.

CEPAS	Título (ufp/ml)*	
	LB + agua	LB + 2% NaCl
FB 80	$1,4 \times 10^2$	$< 3 \times 10^2$
41M	$< 3 \times 10^2$	$< 3 \times 10^2$
FB5	$3,04 \times 10^5$	$7,7 \times 10^4$
T8-1	$1,4 \times 10^3$	$1,06 \times 10^3$
FB3	$< 3 \times 10^2$	$< 3 \times 10^2$
AP97-3	$< 3 \times 10^2$	$< 3 \times 10^2$

\* Valor promedio de dos ensayos.

**Figura 9.** Placas de lisis obtenidas a partir del sobrenadante de la cepa de *E. coli* FB5 sobre un césped de *E. coli* DH5 $\alpha$ .



### 5.3 Identificación de *vtx*<sub>1</sub> y *vtx*<sub>2</sub> por PCR

Las placas de lisis analizadas fueron positivas para *vtx*<sub>2</sub> y negativas para *eae*, confirmando que las placas observadas correspondían a fagos portadores de *vtx* (Figura 10).

“Efecto del aditivo alimentario cloruro de sodio sobre *Escherichia coli* verotoxigénico”

**Figura 10.** Foto de gel de agarosa evidenciando la amplificación de *vtx<sub>2</sub>* a partir de placas de lisis.



Productos de PCR obtenidos a partir cepa control EDL933 (calle 1) y de zonas de placas de lisis de los sobrenadantes de los cultivos de T8-1 incubados sin y con agregado de NaCl (calles 2 a 5, y 6 a 10 respectivamente), FB 3 sin y con agregado de NaCl (calles 11 a 15, y 16 a 18, respectivamente).

#### 5.4 Evaluación de la infectividad de los fagos conservados a 4°C

Se observó una placa de lisis a partir del sobrenadante guardado de la cepa VTEC FB5 control. No se pudieron detectar fagos infectivos del resto de los sobrenadantes guardados.

## 6. DISCUSIÓN

*Escherichia coli* es el agente etiológico bacteriano más común en brotes asociados con productos cárnicos, especialmente carne de res molida (Rangel y col., 2005).

Dentro de los *E. coli* patógenos asociados con infecciones gastrointestinales en el hombre se encuentra *E. coli* verotoxigénico (VTEC) (Scheutz y Strockbine, 2005; Bettelheim, 2007), que puede generar un amplio espectro de características clínicas, y causar una grave enfermedades como es el síndrome urémico hemolítico (SUH) en humanos (Karmali y col., 1983).

En nuestro país el SUH adopta características de enfermedad endémica y se presenta con la mayor incidencia mundial de casos reportados (López y col., 1998; Rivas y col., 2010).

VTEC produce verotoxinas, las cuales son responsables de muchas de las características patológicas y de las complicaciones severas de la infección (O’Loughlin y Robins-Browne, 2001). Estas toxinas se encuentran codificadas en profagos insertos en el cromosoma bacteriano (Asadulghani y col., 2009; O’Brien y col., 1984). Los genes *vtx* están altamente expresados cuando se activa el ciclo lítico del fago (Johannes y Romer, 2010). Ante una respuesta SOS bacteriana, respuesta global generada ante agentes que dañan el ADN bacteriano o bloquean su replicación, se induce también el cambio del ciclo lisogénico al lítico de los bacteriófagos codificantes de *vtx* (Imamovic y Muniesa, 2012; Thi y col., 2011; Waldor y Friedman, 2005). De esta manera se produce la lisis bacteriana y la consecuente liberación de fagos y verotoxinas.

La sal es un ingrediente importante en las carnes procesadas, ya que mejora el sabor, solubiliza las proteínas miofibrilares y tiene propiedades antibacterianas, que puede causar estrés a *E. coli* e inducir la respuesta SOS.

Debido a que muchos estudios demuestran que los productos cárnicos pueden estar frecuentemente contaminados con VTEC, el presente estudio buscó evaluar los efectos del cloruro de sodio al 2% (concentración relevante para el procesamiento de hamburguesas), en el crecimiento bacteriano de VTEC y en la inducción de fagos portadores de *vtx*.

“Efecto del aditivo alimentario cloruro de sodio sobre *Escherichia coli* verotoxigénico”

Las curvas de  $DO_{600}$  mostraron una disminución en la velocidad de crecimiento en los cultivos de las cepas 6 VTEC analizadas debido al agregado de NaCl 2%. Estos resultados son coincidentes con los obtenidos previamente por Harris y col., (2012) en el estudio de dos cepas O157:H7, quienes observaron inhibición de crecimiento en los cultivos con el agregado de NaCl 2% respecto a cultivos sin agregado de NaCl.

Estudios previos demostraron que altas concentraciones de NaCl (~200 mM) pueden inducir bacteriofagos lambdoides que infectan *E. coli* (Łoś y col., 2009 y Shkilnyj y Koudelka, 2007). Sin embargo, Łoś y col., (2009) no observaron efecto inductor de NaCl 200 mM sobre fagos portadores de *vtx*.

A partir de este primer análisis de resultados se podría sugerir que el NaCl 2% no induce la producción de fagos portadores de *vtx* ya que no se detectó diferencia significativa en los títulos obtenidos en los cultivos tratados con respecto a los controles. Y además, no se observó efecto bacteriolítico en las curvas de  $DO_{600}$  de cultivos suplementados con NaCl 2%, como se visualiza en las curvas de cultivos en presencia de inductores típicos de fagos *vtx*, como la mitomicina C (Imamovic y Muniesa; 2012). Sin embargo, no se puede dejar fuera del análisis la disminución de células bacterianas en los cultivos con NaCl, que pudiera haber influido en el menor recuento de placas de lisis. En el estudio de Harris y col., (2012) no encontraron una diferencia significativa el contenido de verotoxina en los cultivos con NaCl 2% respecto a los controles, pero determinaron una producción aumentada de verotoxinas en los cultivos con NaCl al relativizarla a la población bacteriana presente (expresada como log CFU/ml).

La presencia de fagos *vtx* en alimentos ha sido poco estudiada teniendo en cuenta que los fagos podrían persistir en condiciones en las que las bacterias son inactivadas y mantener en el ambiente un importante gen de virulencia como *vtx*. Rodé y col., (2011) mostraron una alta estabilidad de los fagos *vtx* en condiciones de procesamientos de los alimentos. En este estudio se pudo observar que al menos uno de los fagos *vtx* mantuvo su capacidad infectiva luego de 55 días de almacenamiento 4°C.

## 7. CONCLUSIONES

En presencia de NaCl 2% las cepas VTEC estudiadas mostraron una disminución de crecimiento y, si bien no se detectó un efector inductor fuerte, mantuvieron la producción de fagos portadores de *vtx*

En base a que la sal es un ingrediente muy usado en carnes procesadas, y en distintas cantidades, son necesarias futuras investigaciones que evalúen diferentes concentraciones de este aditivo sobre VTEC y fagos *vtx*.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Allué-Guardia A, Martínez-Castillo, A, Muniesa M. Persistence of infectious Shiga toxin-encoding bacteriophages after disinfection treatments. *Applied and environmental microbiology*. 2014; 80(7): 2142-2149.
2. Armstrong GL, Hollingsworth J, Morris JG. Emerging foodborne pathogens: *Escherichia coli* O157:H7 as a model of entry of a new pathogen into the food supply of the developed world. *Epidemiologic Reviews*. 1996; 18: 29-51.
3. Asadulghani M, Ogura Y, Ooka T, Itoh T, Sawaguchi A, Iguchi A, Nakayama K, Hayashi T. The defective prophage pool of *Escherichia coli* O157: prophage-prophage interactions potentiate horizontal transfer of virulence determinants. *PLoS Pathogens* 5, e1000408. 2009.
4. Baggi F, Demarta A, Peduzzi R. Persistence of viral pathogens and bacteriophages during sewage treatment: lack of correlation with indicator bacteria. *Research in Microbiology*. 2001; 152(8): 743-751.
5. Bell GR. Distribution and sources of microbial contamination on beef carcasses. *J Appl Microbiol*. 1997; 82: 292–300.
6. Bergey DH, Hort JG, Krieg, Sneath P. *Bergey's Manual Of Determinative Bacteriology*. 1992; 9: 559-571.
7. Bettelheim KA. The non-O157 Shiga-toxigenic (verocytotoxigenic) *Escherichia coli*; under-rated pathogens. *Clinical Microbiology Reviews*. 2007; 33: 67-87.
8. Blanco JE, Blanco M, Alonso MP, Mora A, Dahbi G, Coira MA. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from human patients: Prevalence in Lugo, Spain, from 1992 through 1999. *J Clin. Microbiol*. 2004; 42: 311-9.
9. Blanco M, Blanco JE, Mora A, Dahbi G, Alonso MP, Gonzalez EA. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from cattle in Spain and identification of a new intimin

“Efecto del aditivo alimentario cloruro de sodio sobre *Escherichia coli* verotoxigénico”

- variant gene (eae-x). J Clin. Microbiol. 2004; 42: 645–51.
10. Brett KN, Hornitzky MA, Bettelheim KA, Walker MJ, Djordjevic SP. Bovine Non-O157 Shiga Toxin 2- Containing *Escherichia coli* Isolates Commonly Possess stx2-EDL933 and/or stx2vhb Subtypes. Journal of Clinical Microbiology. 2003; 41: 7.
  11. Brussow H, Canchaya C, Hardt WD. Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 2004; 68: 560-602.
  12. Caletti MG. El Síndrome Urémico Hemolítico en la Argentina. Medicina (Buenos Aires). 2006; 66: 1.
  13. Caprioli A, Morabito S, Brugreb H, Oswald E. Enterohemorrhagic *Escherichia coli*: Emerging issues on virulence and modes of transmission. Veterinary Research. 2005; 36: 289-311.
  14. Chen J, Griffiths MW. PCR differentiation of *Escherichia coli* from other Gramnegative bacteria using primers derived from the nucleotide sequences flanking the gene encoding the universal stress protein. Letters in Applied Microbiology. 1998; 27: 369-371.
  15. Cubero N, Monferrer A, Villalta J. Aditivos Alimentarios. 2002; 94-101.
  16. Cummins E, Nally P, Butler F, Duffy G, O’Brien S. Development and validation of a probabilistic second-order exposure assessment model for *Escherichia coli* O157:H7 contamination of beef trimmings from Irish meat plants. Meat Sci. 2008; 79:139–54.
  17. Cuno YM. Estudio del Comportamiento de *Escherichia coli* O157:H7 en distintos tipos de zumos. Tesis doctoral. Facultad de Veterinaria, Universidad Autónoma de Barcelona. 2000.
  18. Doyle MP, Zhao T, Meng J, Zhao S, Beuchat LR, Montville TJ. Microbiología de los Alimentos. Fundamentos and Fronteras. Editorial Acribia SA. Zaragoza (España). 2000; 171-199.

“Efecto del aditivo alimentario cloruro de sodio sobre *Escherichia coli* verotoxigénico”

19. Evans DJ, Evans DG, Dupont HL. Hemagglutination patterns of enterotoxigenic and enteropathogenic *Escherichia coli* determined in human, bovine, chicken and guinea pig erythrocytes in the presence and absence of mannose. *Infect. Immun.* 1979; 23: 336-346.
20. Hajmeer M, Ceylanb E, Marsdenc JL, Fungc D y C. Impact of sodium chloride on *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus* analysed using transmission electron microscopy. *Food Microbiology.* 2006; 23: 446-452.
21. Harris SM, Yue WF, Olsen SA, Hu J, Means WJ, McCormick RJ, Du M, Zhu M. Salt at concentrations relevant to meat processing enhances Shiga toxin 2 production in *Escherichia coli* O157:H7. *International Journal of Food Microbiology.* 2012; 159:186-192.
22. Hendrix RW. Bacteriophages: Evolution of the majority. *Theoretical Population Biology.* 2002; 61: 471-480.
23. Imamovic L, Muniesa M. Characterizing RecA-Independent Induction of Shiga toxin2-Encoding Phages by EDTA Treatment. *PLoS ONE.* 2012; 7(2).
24. Johannes L, Romer W. Shiga toxins-from cell biology to biomedical applications. *Nature Reviews Microbiology.* 2010; 8: 105-116.
25. Johnson KE, Thorpe CM, Sears CL. The emerging clinical importance of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Clin. Infect. Dis.* 2006; 43:1587-95.
26. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature reviews. Microbiology.* 2004; 2: 123-140.
27. Karmali MA, Petric M, Lim C, Fleming PC, Arbus GS, Lior H. The association between idiopathic hemolytic syndrome and infection by verotoxin-producing *Escherichia coli*. *Journal Infectious Diseases.* 1985; 151: 775-782.
28. Karmali MA, Petric M, Steele BT, Lim C. Sporadic cases of haemolytic- uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. *The Lancet.* 1983; 321: 619-620.

“Efecto del aditivo alimentario cloruro de sodio sobre *Escherichia coli* verotoxigénico”

29. Karmali, M. Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. Clin. Microbiol. Rev. 1989; 2: 15-35.
30. Kimmitt PT, Harwood CR, Barer MR. Toxin gene expression by shiga toxin-producing *Escherichia coli*: the role of antibiotics and the bacterial SOS response. *Emerg Infect Dis*. 2000; 6: 458-465.
31. Köhler B, Karch H, Schmidt H. Antibacterials that are used as growth promoters in animal husbandry can affect the release of Shiga-toxin-2-converting bacteriophages and Shiga toxin 2 from *Escherichia coli* strains. Microbiology. 2000; 146: 1085-1090.
32. Konowalchuk J, Speirs JI, Stavric S. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. Infect Immun. 1977; 18: 775-9.
33. Kovacs MJ, Roddy J, Gregoire S, Cameron W, Eidus L, Drouin J. Thrombotic thrombocytopenic purpura following hemorrhagic colitis due to *Escherichia coli* O157:H7. American Journal of Medicine. 1990; 88: 177-179.
34. Kutter, E., & Sulakvelidze, A. (Eds.). (2004). \*Bacteriophages: biology and applications\*. CRC Press.
35. Ley 18284 – Código Alimentario Argentino. Capítulo VI. Artículo 330.
36. Ley 18284 – Código Alimentario Argentino. Capítulo XVIII.
37. Little JW. Auto-digestion of LexA and phage I repressors. Proc Natl Acad Sci USA 1984; 81: 1375-9.
38. López EL, Contrini MM, de Rosa MF. Epidemiology of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in South America. In: Kaper JB, O'Brien AD, editor. In *Escherichia coli* O157:H7 and other shiga toxin-producing E coli strains. Washington DC. American Society for Microbiology. 1998; pp. 30-37.
39. Łoś, J. M., Łoś, M., Węgrzyn, G., & Węgrzyn, A. Differential efficiency of induction of various lambdoid prophages responsible for production of Shiga toxins in response to different induction agents. Microbial pathogenesis.

“Efecto del aditivo alimentario cloruro de sodio sobre *Escherichia coli* verotoxigénico”

2009; 47(6): 289-298.

40. Martínez-Castillo A., Muniesa M. Implications of free Shiga toxin-converting bacteriophages occurring outside bacteria for the evolution and the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2014; 4.
41. Ministerio de Salud de la Nación Argentina (MS). 2017. Boletín Integrado de Vigilancia. Dirección Nacional de Epidemiología y Análisis de la Situación de Salud. N° 379 – SE 39.
42. Ministerio de Salud de la provincia de Buenos Aires, Manual de manipulación de alimentos (2011).
43. Muniesa M, Blanco JE, De Simon M, Serra-Moreno R, Blanch AR, Jofre J. Diversity of stx2 converting bacteriophages induced from Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from cattle. *Microbiology*. 2004; 150: 2959-2971.
44. Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 1998; 11: 142-201.
45. Nielsen EM, Scheutz F, Torpdahl M. Continuous surveillance of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections by pulsed-field gel electrophoresis shows that most infections are sporadic. *Foodborne Pathog. Dis.* 2006; 3: 81–7.
46. O'Brien AD, Newland JW, Miller SF, Holmes RK, Smith HW, Formal SB. Shiga-like toxin-converting phages from *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis or infantile diarrhea. *Science*. 1984; 226: 694-696.
47. O'Loughlin EV, Robins-Browne RM. Effect of Shiga toxin and Shiga-like toxins on eukaryotic cells. *Microbes and Infection*. 2001; 3: 493-507.
48. Orden JA, Cortés C, Horcajo P, De la Fuente R, Blanco JE, Mora A. A longitudinal study of verotoxin-producing *Escherichia coli* in two dairy goat herds. *Vet Microbiol*. 2008; 132: 428-34.

“Efecto del aditivo alimentario cloruro de sodio sobre *Escherichia coli* verotoxigénico”

49. Organización Mundial de la Salud (OMS). Aditivos alimentarios. Revisión por internet: Diciembre 2017. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/food-additives/es/>
50. Parma AE, Sanz ME, Blanco JE, Blanco J, Viñas MR, Blanco M, Padola NL, Etcheverría AI. Virulence genotypes and serotypes of verotoxigenic *Escherichia coli* isolated from cattle and foods in Argentina. Importance in Public Health. *Europ J Epidemiol.* 2000; 16: 757-62.
51. Paton AW, Srimanote P, Woodrow MC, Paton JC. Characterization of saa, a novel autoagglutinating adhesin produced by locus of enterocyte effacement negative shiga toxigenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans. *Infection and Immunity.* 2001; 69: 6999-7009.
52. Paton JC, Paton AW. Pathogenesis and diagnosis of shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clinical Microbiology Reviews.* 1998; 11: 450-479.
53. Proulx, F., Seidman, E. G., & Karpman, D. Pathogenesis of Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome. *Pediatric Research.* 2001; 50(2): 163-171.
54. Rangel JM, Sparling PH, Crowe C, Griffin PM, Swerdlow DL. Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks, United States, 1982-2002. *Emerg Infect Dis.* 2005; 11: 603-9.
55. Rey J, Blanco JE, Blanco M, Mora A, Dahbi G, Alonso JM. Serotypes, phage types and virulence genes of Shiga-producing *Escherichia coli* isolated from sheep in Spain. *Vet Microbiol.* 2003; 94: 47-56.
56. Riley LW, Remis RS, Helgerson SD, McGee HB, Wells JG, Davis BR, Hebert RJ, Olcott ES, Johnson LM, Hargrett NT, Blake PA, Cohen ML. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *New England Journal of Medicine.* 1983; 308(12): 681-685.
57. Rivas M, Caletti MG, Chinen I, Re SM, Roldán CD, Chillemi G, Fiorilli G, Bertolotti A, Aguerre L, Sosa Estani S. Home-prepared hamburger and sporadic hemolytic uremic syndrome, Argentina. *Emerg Infect Dis.* 2003; 9: 1184-6.

“Efecto del aditivo alimentario cloruro de sodio sobre *Escherichia coli* verotoxigénico”

58. Rivas M, Chinen I, Miliwebsky E, Galli L, Repetto HA, Masana M. Epidemiology of Argentinean STEC. En: Bacterial Population Genetics: A Tribute to Thomas S. Whittam. Walk S, Feng P (Eds.). ASM Press. 2011; 109-132.
59. Rivas M, Miliwebsky E, Chinen I, Deza N. Manual de procedimientos diagnóstico y caracterización de *Escherichia coli* O157 productor de toxina shiga a partir de especímenes clínicos. Buenos Aires: Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas; 2007.
60. Rivas M, Miliwebsky E, Chinen I, Roldan CD, Balbi L, García B. Characterization and epidemiologic subtyping of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from hemolytic uremic syndrome and diarrhea cases in Argentina. Foodborne Pathog Dis. 2006; 3: 88-96.
61. Rivas M, Padola NL, Lucchesi PMA, Massana M. Diarrheagenic *Escherichia coli* in Argentina. Chapter 10. En: Alfredo G. Torres (Ed). Pathogenic *Escherichia coli* in Latin America. University of Texas USA. Bentham Science Publishers Ltd. 2010; 142-161.
62. Rode TM, Axelsson L, Granum PE, Heir E, Holck A, Trine ML. High stability of Stx2 phage in food and under food-processing conditions. Applied and environmental microbiology. 2011; 77(15): 5336-5341
63. Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, Tauxe RV, Widdowson M, Roy SL. Foodborne Illness Acquired in the United States-Major Pathogens. Emerg Infect Dis. 2011; 17(1): 7-15.
64. Scanlan M. Introducción a la Bacteriología Veterinaria. Editorial Acribia. Zaragoza. España. 1991.
65. Scheutz F, Strockbine NA. Family I. Enterobacteriaceae. En: Garrity GM (editor-in-chief). Brenner DJ, Krieg, NR, Staley JT. (Eds.). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2<sup>nd</sup> Edition. Vol. Two. Part B. Springer, New York, USA. 2005; pp 607-624.
66. Schmidt H, Karch H, Beutin L. The large-size plasmids of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 encode hemolysins which are presumably members of the

“Efecto del aditivo alimentario cloruro de sodio sobre *Escherichia coli* verotoxigénico”

- E. coli*  $\alpha$ -hemolysin family. Federación Europea de Sociedades de Microbiología. *Microbiology Letters*. 1994; 117: 189-96.
67. Schmidt H. Shiga-toxin-converting bacteriophages. *Research in Microbiology*. 2001; 152: 687-695.
68. Serwer P, Hayes SJ, Thomas JA, Hardies SC. Propagating the missing bacteriophages: a large bacteriophage in a new class. *Virology Journal*. 2007; 4: 21.
69. Shkilnyj P, Koudelka GB. Effect of Salt Shock on Stability of  $\lambda$ imm434 Lysogens. *Journal Of Bacteriology*. 2007; 23: 446–452
70. Smit BA, Engels WJ, Smit G. Branched chain aldehydes: production and breakdown pathways and relevance for flavour in foods. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2009; 81: 987–999.
71. Smit G, Smit BA, Engels WJ. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiology Review*. 2005; 29: 591-610.
72. Spizirri FD, Rahman RC, Bibiloni N, Ruscasso JD, Amoreo OR. Childhood hemolytic uremic syndrome in Argentina: long-term follow-up and prognostic features. *Pediatric Nephrology*. 1997; 11: 156-160.
73. Strockbine NA, Marques LR, Newland JW, Smith HW, Holmes RK, O'Brien AD. Two toxin-converting phages from *Escherichia coli* O157:H7 strain 933 encode antigenically distinct toxins with similar biologic activities. *Infect Immun*. 1986; 53: 135-40.
74. Tarr PI, Gordon CA, Chandler WL. Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome. *Lancet*. 2005; 365: 1073-86.
75. Tauxe RV, Doyle MP, Kuchenmüller T, Schlundt, J, Stein CE. Evolving public health approaches to the global challenge of foodborne infections. *International Journal of Food Microbiology*. 2010; 139: 16-28.

“Efecto del aditivo alimentario cloruro de sodio sobre *Escherichia coli* verotoxigénico”

76. Thi TD. Effect of recA inactivation on mutagenesis of *Escherichia coli* exposed to sublethal concentrations of antimicrobials. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2011; 66: 531–538.
77. Tozzi EA, Goriotti S, Caprioli A. Epidemiology of human infections by *Escherichia coli* O157 and other verocytotoxin-producing *E. coli*. En: Duffy G, Garvey P, McDowell DA. *Verocytotoxigenic E. coli*. Trumbull, CT: Food & Nutrition Press; 2001; Pp. 161–80.
78. Unkmeir, A., & Schmidt, H. Structural analysis of phage-borne stx genes and their flanking sequences in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and *Shigella dysenteriae* type 1 strains. *Infection and immunity*. 2000; 68(9): 4856-4864.
79. Varma JK, Greene KD, Reller ME, De Long SM, Trottier J, Nowicki SF. An outbreak of *Escherichia coli* O157 infection following exposure to a contaminated building. *JAMA*. 2003; 290: 2709-12
80. Waldor MK, Friedman DI. Phage regulatory circuits and virulence gene expression. *Current Opinion in Microbiology*. 2005; 8: 459-465.
81. World Health Organization, Switzerland (2007). Disponible en URL: <http://www.who.int/whr/2007/en/index.html>.

## **ANEXO**

### **Preparación de los medios:**

#### **Caldo LB (500 ml):**

- Tripteína bacteriológica: 5 g.
- Cloruro de Sodio: 2,5 g.
- Extracto de levadura: 2,5 g.

Se disolvieron en agua destilada y se llevó a volumen. Se esterilizó en autoclave.

#### **Top ágar:**

Se agregaron 0,225 g de ágar-ágar a 30 ml de caldo LB. Se esterilizó en autoclave.

#### **LB ágar para placas:**

Se agregaron 7,5 g de agar-agar a 500 ml de LB. Se esterilizó en autoclave. Se distribuyó sobre placas de Petri.

En los casos en los que se utilizó para la detección de placas de lisis se adicionó con ampicilina a una concentración final de 0,33  $\mu$ g /ml previo a la distribución en la placas de Petri.