

EFECTO DEL BIOCONTROL FÁGICO SOBRE CEPAS DE *Escherichia coli* PRODUCTORAS DE TOXINA SHIGA EN PRODUCTOS CÁRNICOS^o

DAVID TOMAT, VIRGINIA AQUILI, ANDREA QUIBERONI, CLAUDIA BALAGUÉ*

Área Bacteriología, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario. INLAIN (CONICET - Universidad Nacional del Litoral).

Resumen

En nuestra región resulta especialmente importante controlar la diseminación de enterobacterias patógenas productoras de enfermedades transmitidas por alimentos, tales como *Escherichia coli* productora de toxinas Shiga (STEC), entre otras. Las cepas de STEC son patógenos humanos emergentes que pueden causar diarrea, así como manifestaciones clínicas más severas incluyendo el Síndrome Urémico Hemolítico. En el presente trabajo proponemos a los bacteriófagos como herramienta de biocontrol de estas bacterias patógenas, presentes en alimentos cárnicos. Se obtuvieron 10 stocks de bacteriófagos a partir de materia fecal y se ensayó su efecto lítico sobre un panel de 103 diferentes cepas de enterobacterias patógenas y no patógenas. Entre ellos se seleccionó un fago (DT1) y se evaluó su efecto lítico utilizando como matriz carne contaminada con *E. coli* DH5 α . Se identificó que el stock fágico DT1 (6 cepas sensibles) presentó un rango de hospedador más específico que el stock fágico DT6 (15 cepas sensibles). Se evaluó la reducción de células viables (CV) en carne, obtenida con la exposición al fago a diferentes temperaturas. Obtuvimos una diferencia significativa en el porcentaje de CV a las temperaturas ensayadas, observando la mayor reducción dentro de las primeras horas del ensayo; asimismo dicha reducción se vio influenciada por la concentración de fago usada, siendo más efectiva la mayor utilizada. Los resultados obtenidos indican que los fagos ensayados pueden ser útiles en el biocontrol de *E. coli* en productos cárnicos a temperaturas de refrigeración y ambiente. Sin embargo, es necesario considerar y analizar la existencia de mutantes espontáneos fagorresistentes, naturalmente presentes en la población celular, que podrían estar seleccionándose y desarrollando durante los tiempos y temperaturas mayores ensayados durante las investigaciones.

Palabras clave: biocontrol, fagos, toxina Shiga, productos cárnicos

EFFECT OF PHAGE BIOCONTROL ON STRAINS OF SHIGA TOXIN-PRODUCING *Escherichia coli* IN MEAT PRODUCTS

Summary

It is especially important in our region to control the spread of pathogenic Enterobacteriaceae producing food-borne disease, such as Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains (STEC), among others. STEC are emerging human pathogens that can cause diarrhea, as well as severe clinical manifestations including hemolytic uremic syndrome (HUS). In this paper, we propose bacteriophages as a tool for the biocontrol of these pathogenic bacteria present in meat. We collected 10 stocks of bacteriophages from faeces and assayed their lithic effect on a panel of 103 different pathogenic Enterobacteriaceae. One phage (DT1) was selected and its lithic effect was determined using meat as a matrix contaminated with *E.*

^o Este trabajo recibió el premio de la Sociedad de Biología de Rosario, 2010.

* Correo electrónico: cbalague@fbioyf.unr.edu.ar

coli DH5 α . We identified that the phage stock DT1 (6 sensitive strains) presented a more specific host range than the phage stock DT6 (15 sensitive strains). We evaluated the reduction of viable cells (VC) of DH5 on meat after the exposure at different temperatures. We obtained a significant difference in the percentage of VC with the temperatures tested, observing further reduction within the first hours of the assay. This reduction was also influenced by the concentration of phage used; the biggest concentration was more effective. These results indicate that tested phages may be useful in the biocontrol of *E. coli* in refrigerated meat products and at room temperature. However, it is necessary to consider and analyze the existence of spontaneous phage-resistant mutants, naturally present in the bacterial cell population, that could be selected at different times when using the highest temperatures during our investigations.

Key words: biocontrol, phages, Shiga toxin, meat products

ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN DE LA IMPORTANCIA DEL TEMA

Las cepas de *Escherichia coli* productoras de toxina Shiga (STEC) son patógenos humanos emergentes que pueden causar diarrea así como manifestaciones clínicas más severas incluyendo Enterocolitis Hemorrágica, Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) y Púrpura Trombocitopénica Trombótica.^{1,2} Las STEC son patógenos que producen varios factores de virulencia que contribuyen a su patogenicidad. El factor de virulencia principal es la toxina Shiga (Stx), una toxina tipo A-B que inhibe la síntesis proteica en las células blanco.³ Se piensa que las toxinas Shiga producidas por las STEC en el intestino entran a la circulación sistémica resultando en el daño de órganos distales. Varias observaciones sugieren que el riesgo de complicaciones serias en la infección por STEC, por ejemplo el SUH, esta relacionado con la presencia y la cantidad de toxina Shiga producida durante la infección.^{4,5}

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*, *E. coli enteropatógena* y STEC, entre otras. Todas ellas son importantes agentes etiológicos de gastroenteritis infantil en Argentina. Particularmente, STEC es un patógeno emergente y su diseminación es la principal responsable de que Argentina tenga la mayor tasa mundial de SUH. En la Argentina el SUH es endémico, con aproximadamente 400 a 500 casos nuevos informados anualmente por las Unidades Hospitalarias de Nefrología y más de 7.000 casos notificados desde 1965.^{6,7} Actualmente, la tasa anual de incidencia de SUH estimada es de 13,9 cada 100.000 niños menores de 5 años.⁸⁻¹⁰ Estudios epidemiológicos recientes muestran

que hay un aumento global y sostenido en el aislamiento de cepas STEC no-O:157 en humanos^{11,12} y animales,^{13,14} particularmente de los serogrupos O:26, O:103 y O:111.¹⁵

El potencial terapéutico de los bacteriófagos ha sido explorado desde que éstos fueron descubiertos por Félix d'Herelle. Los primeros ensayos de terapia fágica fueron con frecuencia exitosos, usualmente seguidos de una recuperación rápida y completa de infecciones bacterianas, potencialmente fatales, luego de la administración del bacteriófago. Subsecuentes resultados inconsistentes, debido principalmente al pobre entendimiento de la biología básica de los bacteriófagos, la falta de control de calidad y la ausencia de estudios apropiadamente controlados llevaron a la pérdida de credibilidad en el uso de bacteriófagos como agentes terapéuticos. Esto, junto con el descubrimiento de los antibióticos, llevó a una pérdida de interés en la terapia fágica en Occidente —una tendencia revertida en los últimos años— aunque fue usada rutinariamente en la ex-Unión Soviética.¹⁶

Los bacteriófagos están compuestos enteramente de proteínas y ácidos nucleicos, sus eventuales productos de descomposición consisten exclusivamente de aminoácidos y nucleótidos, por lo que no son xenobióticos, y, distinto a los antibióticos y agentes antisépticos, su introducción y distribución en un dado medio ambiente puede ser visto como un proceso natural.^{17,18}

Respecto de su potencial aplicación en el biocontrol de patógenos contaminantes de alimentos, debería considerarse que éstos son las unidades autorreplicantes más abundantes en nuestro medio ambiente y están presentes en números significativos en el agua y alimentos.¹⁹ En carnes frescas y otros productos cárnicos se pueden detectar, en algunos casos, más de 108 bacte-

riófagos viables por gramo,²⁰ por lo que es un hecho que son consumidos rutinariamente con nuestros alimentos en una gran cantidad. Además, la cavidad oral humana^{21,22} y la materia fecal²³ contienen bacteriófagos, los cuales son especialmente abundantes en el aparato gastrointestinal.²⁴ Asimismo, la especificidad de bacteriófagos virulentos por el antígeno O de las cepas de *Escherichia coli* puede ser una característica económicamente favorable para el control de éstas en el medio ambiente y permite aplicar o mezclar el bacteriófago directamente sobre o dentro de un producto lácteo o cárnico sin comprometer la calidad de éste, la salud o la viabilidad de la flora normal intestinal.

El potencial de los bacteriófagos para el control de patógenos contaminantes de alimentos se ve reflejado en estudios recientes involucrando a distintos patógenos como *Campylobacter jejuni*,²⁵ *Escherichia coli* O157:H7,²⁶ y *Listeria monocytogenes*^{27,28}, entre otros.

OBJETIVOS

Los objetivos del presente trabajo están vinculados con el aislamiento de fagos con capacidad lítica específica sobre cepas de *E. coli*, determinar su rango de hospedador y analizar su influencia sobre cepas de *E. coli* en alimentos cárnicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

• **Aislamiento de bacteriófagos:** La cepa que se utilizó para aislar bacteriófagos desde materia fecal fue *E. coli* DH5 α por ser una buena receptora de diferentes tipos de fagos. Esta cepa se creció hasta una densidad óptica (DO = 1) en medio Hershey + 5 mM de MgSO₄. Se agregó una porción de materia fecal y se incubó 12 h a 37°C; luego se agregó 0,5 ml de cloroformo, se centrifugó a 15.000 x g durante 10 min. y se filtró el sobrenadante con un filtro de 0,45 μ m.²⁹ Para observar la obtención de bacteriófagos se utilizó la técnica de doble capa de agar; ésta consiste en mezclar una alícuota de 10 μ l y otra de 100 μ l de los filtrados con 100 μ l de la cepa receptora, a una DO = 1, agregar 3 ml de *soft* agar (Hershey + 5 mM MgSO₄), mezclar y colocar sobre placas con agar endurecido, incubando a 37°C.

• **Preparación de stocks de bacteriófagos:** Utilizamos la técnica de doble capa de agar con una cantidad de bacteriófagos tal que, luego de incubar, las placas de lisis se toquen unas con otras. Se agregó 5 ml de medio Hershey + 5 mM de MgSO₄ y se incubó a 4°C varias horas agitando intermitentemente. Se recogió el líquido, se agregó 0,1 ml de cloroformo y se centrifugó a

4.000 x g durante 10 minutos. Se tomó el sobrenadante y se colocó una gota de cloroformo para guardar los stocks a 4°C.³⁰

• **Caracterización de los bacteriófagos:** Se realizaron microscopías electrónicas de transmisión en los laboratorios del INTA de Castelar, y se testeó la presencia de genes de patogenicidad de *E. coli* diarreogénica mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando como controles las cepas descriptas a continuación.

• **Especificidad de los bacteriófagos:** Se determinó el rango de hospedador mediante la técnica de doble capa de agar en *E. coli*: 86 cepas indígenas y 6 cepas de la *American Type Culture Collection*. Como controles positivos de patogenicidad se utilizaron *E. coli* O157:H7 ATCC43890 y 933J obtenidas del ANLIS (Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud, Instituto "Carlos Malbrán"), las que poseen el gen *stx1*; ATCC43889 y ATCC43895, las que expresan los genes *stx2* y ambos *stx1* y *stx2*, respectivamente, y el gen de unión y fijación (*eaeA*). La cepa ATCC43895 posee el gen de la enterohemolisina portado en un plásmido de 60 Mda y el fago *stx2*, 933W. *E. coli* enterotoxigénica ATCC35401, que expresa las toxinas termolábiles y termoestables LTI y STI, y *E. coli* uropatógena T149, que expresa fimbria P y α -hemolisina también fueron usadas como controles positivos. *E. coli* HB101 y ATCC98222 se usaron como controles negativos de patogenicidad. Al panel de prueba se agregaron cepas de *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Proteus mirabilis*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhi y *Salmonella* Typhimurium. Se ensayó la sensibilidad a cada bacteriófago colocando 10 μ l de la suspensión fágica sobre la capa superior de agar inoculada. Las placas fueron examinadas para determinar la presencia de zonas claras de lisis o placas.³¹

• **Experimentos con carne:** Los bacteriófagos se aplicaron a los alimentos en presencia de la cepa receptora DH5 a tres temperaturas (5, 24 y 37°C); a baja (<100 células huésped/cm²) o alta (10⁴ células huésped/cm²) concentración celular; y a alta (10⁴) o baja (10) multiplicidad óptima de infección (MOI) de los fagos. La carne utilizada se adquirió en un comercio minorista cortada y empacada. En el laboratorio se cortó asépticamente en trozos de 2 cm³, y colocó en placas de Petri preequilibrados al pH y a la temperatura deseada. Se crecieron inóculos bacterianos en medio Hershey + 5mM de MgSO₄ 12 h a 37°C. Para las muestras experimentales se pipetearon 20 μ l de la cepa huésped (a baja o alta concentración) sobre la superficie

de la carne y se permitió su unión por 10 min. a temperatura ambiente, seguido de 20 μ l de cada bacteriófago (a baja o alta MOI). Se usó el mismo volumen de diluyente para los controles en lugar de la suspensión fágica. A cada tiempo de muestreo, las piezas de carne se transfirieron a una bolsa estéril, se agregó 5 ml de *buffer* SM (0,05 M TRIS, 0,1 M NaCl, 0,008 M $MgSO_4$, 0,01 % gelatina, pH 7,5), y la muestra se procesó en un *stomacher* por 2 min. Se tomó una muestra de 0,1 ml, se realizó una dilución seriada en *buffer* SM y se plaqueó 0,1 ml en el medio apropiado para el recuento de células viables. Se testearon controles sin inocular para evaluar la presencia de bacteriófagos y patógenos contaminantes. Se contabilizaron las placas de lisis (UFP/ml) utilizando la técnica de doble capa de agar.^{32,33}

• **Análisis estadístico:** A los datos obtenidos se les calculó la media y su correspondiente desviación estándar. Se testearon las diferencias entre las condiciones trabajadas y los controles mediante la *t* de Student. Las comparaciones fueron realizadas usando el test de análisis de *t* de Student no apareado. El análisis fue realizado en el GraphPad Prism 5.0 y el SigmaPlot 10.0. Los

valores de *p* menores a 0,05 fueron considerados estadísticamente significativos.

RESULTADOS

Aislamiento, viabilidad y características de los stocks de bacteriófagos: Se obtuvieron 10 *stocks* de bacteriófagos a partir de materia fecal de individuos sanos que fueron titulados y conservados a 4°C. Se obtuvieron títulos que variaron entre: $5,8 \times 10^5$ UFP/ml y $4,6 \times 10^7$ UFP/ml. Se evaluó la viabilidad de cada *stock* de bacteriófagos después de 2 meses de almacenamiento y se obtuvieron títulos similares a los cuantificados anteriormente, demostrando ser éste un buen método de almacenamiento para los *stocks* de bacteriófagos.

La microscopía electrónica permitió inferir que los bacteriófagos estudiados podrían, taxonómicamente, pertenecer al tipo T-pares de la familia *Myoviridae*. La Figura 1 muestra una de las micrografías electrónicas realizadas a los concentrados de fagos, observándose una cabeza característicamente elongada y una cola contráctil, rígida y relativamente ancha. La determinación por PCR de los factores de virulencia para cepas diarreogénicas, arrojó resultados negativos para los 10 *stocks*.

TABLA I. Rango de hospedador

Stock fágico	Cepas sensibles
DT1	18; 65; 67; 96; 101; 102
DT 2	27; 47; 70; 75; 79; 101; 102
DT 3	18; 27; 47; 49; 59; 61; 65; 66; 67; 68; 70; 75; 79; 100; 101; 102
DT 4	18; 27; 47; 59; 61; 65; 66; 67; 68; 70; 75; 79; 100; 101; 102
DT 5	27; 47; 70; 75; 79; 101; 102
DT 6	18; 27; 47; 59; 61; 65; 66; 67; 68; 70; 75; 79; 100; 101; 102
LM1	27; 47; 59; 65; 70; 75; 79; 96; 101; 102
LM 2	59; 65; 78; 79; 101; 102
LM 3	14; 27; 47; 59; 65; 70; 75; 79; 101; 102
LM 4	15; 47; 49; 54; 55; 59; 65; 70; 79; 100; 101; 102

E. coli O157:H7: 27, 47, 59, 61, 68 y 79; STEC no-O157: 59, 65 y 66; *E. coli* enteropatógena: 18, 67, 70, 75 y 78, *E. coli* aislada de materia fecal diarreaica: 49, 54, 55, 70, 96, 100, 101 y 102; *E. coli* uropatógena: 14 y 15.

TABLA II. Reducción logarítmica del número de células viables de *E. coli* luego de la aplicación del tratamiento fágico a productos cárnicos contaminados.

	T	MOI	[Bacteria]inicial	Reducción logarítmica en la [Bacteria]inicial respecto del control libre de fago		
				T1 : 3 h	T2 : 6 h	T3 : 24 h
DT1/ DH5 α	5°C	$4,8 \times 10^3$	$7,0 \times 10^3$	1,03	0,90	0,87
	5°C	$4,8 \times 10^2$	$7,0 \times 10^3$	0,28	NS	0,48
DT1/ DH5 α	24°C	$5,3 \times 10^1$	$6,4 \times 10^5$	0,77	0,50	NS
	24°C	5,3	$6,4 \times 10^5$	NS	0,39	NS
DT1/ DH5 α	37°C	$2,3 \times 10^2$	$1,5 \times 10^4$	0,35	1,3	NS
	37°C	0,2	$1,5 \times 10^4$	0,33	NS	NS
DT1/ DH5 α	37°C	$8,1 \times 10^2$	$4,2 \times 10^4$	2,16	1,65	NS
	37°C	$8,1 \times 10^2$	$4,2 \times 10^4$	1,52	0,95	NS

MOI: multiplicidad óptima de infección; NS: no significativo: Los valores medios de las muestras control y tratadas no presentaron una diferencia significativa utilizando el test de la t de student (p mayor o igual a 0,05).

La no detección de factores de patogenicidad indica la factibilidad de utilizar estos bacteriófagos como herramientas de biocontrol.

Especificidad de los bacteriófagos: Mediante la técnica de doble capa de agar se determinó el carácter lítico de los fagos (rango de hospedador) sobre 16 aislamientos de *E. coli* de origen alimentario, 8 de los cuales fueron STEC no-O157 y 2 O:157:H7, 17 aislamientos de *E. coli* uropatógenas, 35 aislamientos de *E. coli* patógenas de origen fecal, de los cuales 4 fueron STEC O157:H7 y 5 *E. coli* enteropatógenas, 18 cepas de *E. coli* de origen fecal no patógenas, 12 aislamientos de otras enterobacterias patógenas como *Shigella sp.*, *Salmonella sp.*, *Klebsiella pneumoniae*, y 5 aislamientos de cocos grampositivos.

Ninguna de las cepas no *E. coli* resultó sensible a alguno de los 10 bacteriófagos ensayados, demostrando la especificidad de los mismos por dicha especie. Asimismo, las *E. coli* no patógenas resultaron resistentes a la acción lítica de los fagos utilizados en este trabajo. Entre las *E. coli* patógenas resultaron sensibles 6 *E. coli* O157:H7, 3 STEC no-O157, 5 *E. coli* enteropatógenas, 8 *E. coli* aisladas de materia fecal diarreica y 2 *E. coli* uropatógenas (Tabla I).

Ensayos de biocontrol sobre productos cárnicos: En la cepa ensayada se observó una disminución significativa de células viables respecto del control libre de fagos. En la Tabla II puede observarse que a 5°C la reducción logarítmica es significativa a las 3, 6 y 24 h de

incubación. Por el contrario, cuando el ensayo se realizó a 24 y 37°C se observó reducción significativa a las 3 y 6 h de incubación, pero estos valores no se mantienen hasta las 24 h. En los ensayos pudo observarse un marcado descenso inicial en el número de células viables, dicha reducción se vio influenciada por la concentración de fago usada, siendo más efectiva la mayor MOI utilizada (Figura 2).

En todos los casos se observó un crecimiento bacteriano significativo luego de 24 h de incubación a 24 y 37°C, resultado que podría estar demostrando selección de variantes fagorresistentes en estas condiciones de ensayo.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Estudios anteriores han permitido aislar fagos específicos para lisar cepas de *E. coli* O157:H7.^{19,26,29,33,34} Durante el desarrollo del presente trabajo se han aislado 10 bacteriófagos activos contra cepas de *E. coli* enteropatógenas, O157:H7 y STEC no-O157. Este resultado resulta muy relevante, dada la epidemiología de nuestro país y la gran prevalencia de estas cepas como agentes etiológicos de diarreas y SUH en niños menores de 5 años. Algunos de estos fagos también demostraron capacidad de lisar 2 cepas uropatógenas, resultado que no parece sorprendente siendo el tracto gastrointestinal el origen de estas cepas en la inmensa mayoría de los casos.

El cepario trabajado como rango de hospedador

claramente demostró que todas las cepas O157:H7 fueron sensibles a algunos o varios bacteriófagos y la mayoría de las STEC no-O157 y *E. coli* enteropatógenas aisladas de materias fecales diarreicas o de alimentos. Contrariamente, ninguna cepa no patógena resultó afectada demostrando la factibilidad de utilizar estos fagos sin alterar la flora normal del tracto gastrointestinal.

Cuando se realizaron experimentos utilizando carne contaminada como matriz, los resultados de reducción de número de células bacterianas viables fueron variables, resultando significativos a 5°C hasta las 24 horas de incubación.

Los resultados obtenidos indican que los fagos examinados pueden ser útiles en el biocontrol de cepas de *E. coli* en productos cárnicos a temperaturas de refrigeración y ambiente. Sin embargo, es necesario considerar y analizar la existencia de mutantes espontáneos fagoresistentes, naturalmente presentes en la población celular, que podrían estar seleccionándose y desarrollando durante los tiempos y temperaturas mayores ensayados durante las investigaciones.

(Recibido y aceptado: diciembre de 2010)

Figura 1. Micrografía electrónica de los bacteriófagos.

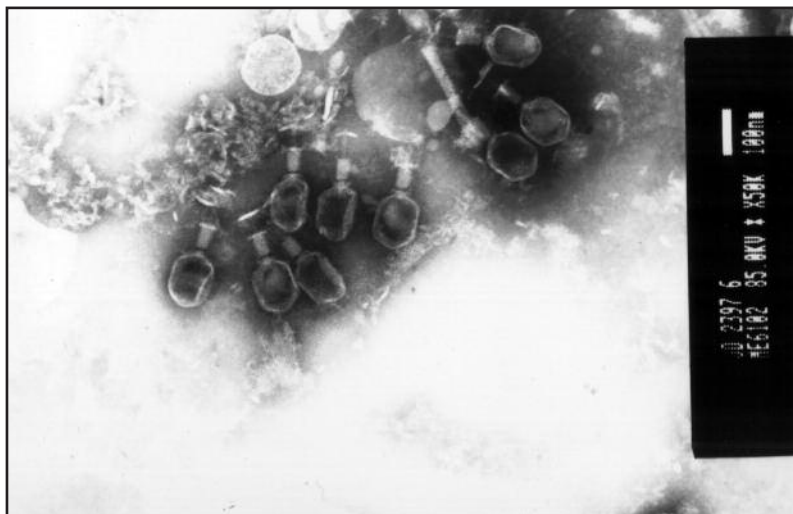
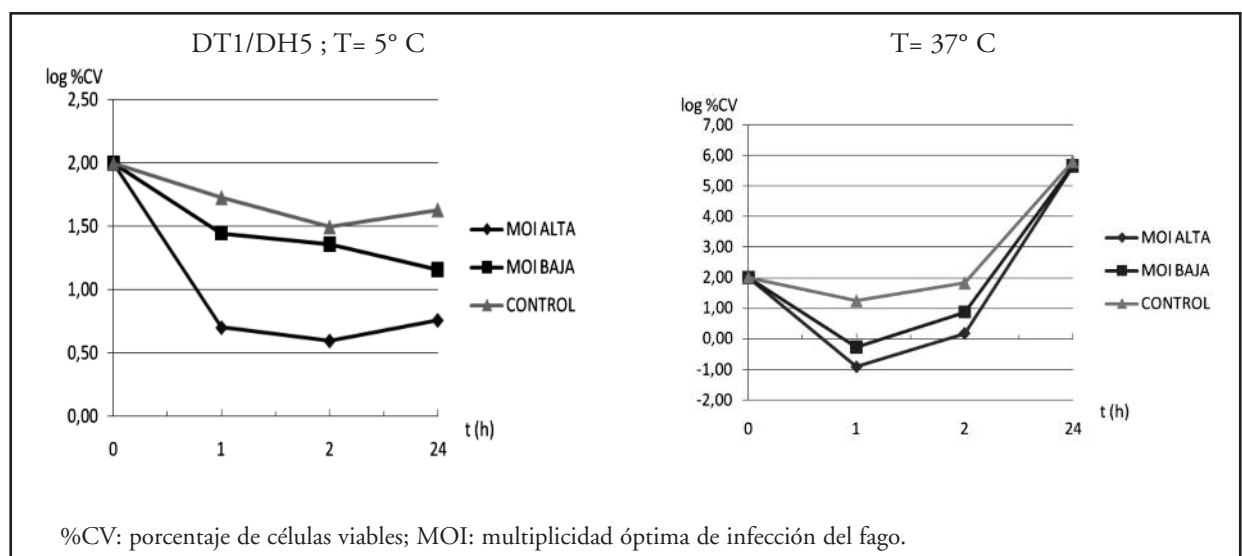


Figura 2. Reducción del número de células viables de *E. coli* en presencia del fago.



REFERENCIAS

1. Griffin PM, Mead PS, Sivapalasingam S. *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohemorrhagic *Escherichia coli*. En: Infections of the gastrointestinal tract (MJ Blaser, PD Smith, JI Ravdin, et al., eds.), 2nd ed. Lippincott Williams & Wilkins; Philadelphia, 2002. Pp. 627-42.
2. Su C, Brandt LJ. *Escherichia coli* O157:H7 infection in humans. *Ann Intern Med* 123: 698-714, 1995.
3. Thorpe CM, Ritchie JM, Acheson DWK. *Enterohemorrhagic and other Shiga toxin-producing Escherichia coli*. En *Escherichia coli: virulence mechanisms of a versatile pathogen* (M Donnenberg, ed.). Academic Press; San Diego, 2002.
4. Ritchie JM, Wagner PL, Acheson DWK, Waldor MK. *Comparison of Shiga toxin production by hemolytic-uremic syndrome-associated and bovine-associated Shiga toxin-producing Escherichia coli isolates*. *Appl Environ Microbiol* 69: 1059-66, 2003.
5. Frankel G, Phillips AD, Rosenshine I, Dougan G, Kaper JB, Knutton S. *Enteropathogenic and enterohaemorrhagic Escherichia coli: more subversive elements*. *Mol Microbiol* 30: 911-21, 1998.
6. CNSAP (Comité de Nefrología de la Sociedad Argentina de Pediatría). *Incidencia del síndrome urémico hemolítico (SUH) en la República Argentina*. *Arch Arg Pediatr* 93: 409-11, 1995.
7. Roldán ML, Chinen I, Otero JL, y col. *Aislamiento, caracterización y subtipificación de cepas de Escherichia coli O157:H7 a partir de productos cárnicos y leche*. *Rev Arg Microbiol* 39: 113-9, 2007.
8. Rivas M, Miliwebsky ES, Chinen I, Deza N, Leotta GA. *Síndrome urémico hemolítico: asociación con la infección por Escherichia coli productor de toxina Shiga*. *Medicina (B Aires)* 66: 27-32, 2006.
9. Rivas M, Sosa-Estani S, Rangel J, y col. *Risk factors for sporadic Shiga toxin-producing Escherichia coli infections in children, Argentina*. *Emerg Infect Dis* 14: 763-71, 2008.
10. Ministerio de Salud y Ambiente, 2005 (www.msal.gov.ar).
11. Brooks JT, Sowers EG, Wells JG, y col. *Non-O157 Shiga toxin-producing Escherichia coli infections in the United States, 1983-2002*. *J Infect Dis* 192: 1422-9, 2005.
12. Tozzi AE, Caprioli A, Minelli F, y col. *Shiga toxin-producing Escherichia coli infections associated with hemolytic uremic syndrome, Italy, 1988-2000*. *Emerg Infect Dis* 9: 106-8, 2003.
13. Jenkins C, Pearce MC, Smith AW, y col. *Detection of Escherichia coli serogroups O26, O103, O111 and O145 from bovine faeces using immunomagnetic separation and PCR/DNA probe techniques*. *Lett Appl Microbiol* 37: 207-12, 2003.
14. Pearce MC, Jenkins C, Vali L, y col. *Temporal shedding patterns and virulence factors of Escherichia coli serogroups O26, O103, O111, O145, and O157 in a cohort of beef calves and their dams*. *Appl Environ Microbiol* 70: 1708-16, 2004.
15. Ogura Y, Ooka T, Whale A, y col. *TccP2 of O157:H7 and non-O157 Enterohemorrhagic Escherichia coli (EHEC): Challenging the dogma of EHEC-induced actin polymerization*. *Infect Immun* 75: 604-12, 2007.
16. Petty NK, Evans TJ, Fineran PC, Salmond GPC. *Biotechnological exploitation of bacteriophage research*. *Trends Biotechnol* 25: 7-15, 2007.
17. Carlton RM, Noordman WH, Biswas B, de Meester ED, Loessner MJ. *Bacteriophage P100 for control of Listeria monocytogenes in foods: genome sequence, bioinformatic analyses, oral toxicity study, and application*. *Regul Toxicol Pharmacol* 43: 301-12, 2005.
18. Clark JR, March JB. *Bacteriophages and biotechnology: vaccines, gene therapy and antibacterials*. *Trends Biotechnol* 24: 212-8, 2006.
19. Sulakvelidze A, Barrow P. *Phage therapy in animals and agribusiness*. En: *Bacteriophages: Biology and Applications* (E Kutter, A Sulakvelidze, eds.). CRC Press; Boca Raton, 2005. Pp. 335-80.
20. Kennedy JEJ, Bitton G. *Bacteriophages in foods*. En: *Phage Ecology* (SM Goyal, CP Gerba, G Bitton, eds.). John Wiley & Sons, New York, 1987. Pp. 289-16.
21. Bachrach G, Leizerovici-Zigmond M, Zlotkin A, Naor R, Steinberg D. *Bacteriophage isolation from human saliva*. *Lett Appl Microbiol* 36: 50-3, 2003.
22. Hitch G, Pratten J, Taylor PW. *Isolation of bacteriophages from the oral cavity*. *Lett Appl Microbiol* 39: 215-9, 2004.
23. Breitbart M, Hewson I, Felts B, y col. *Metagenomic analyses of an uncultured viral community from human feces*. *J Bacteriol* 185: 6220-3, 2003.
24. Furuse K. *Distribution of coliphages in the general environment general considerations*. En: *Phage Ecology* (SM Goyal, C Gerba, G Bitton, eds.). John Wiley & Sons; New York, 1987. Pp. 87-124.
25. Atterbury RJ, Connerton PL, Dodd CE, Rees CE, Connerton IF. *Application of host-specific bacteriophages to the surface of chicken skin leads to a reduc-*

- tion in recovery of Campylobacter jejuni.* Appl Environ Microbiol 69: 6302-6, 2003.
26. O'Flynn G, Ross RP, Fitzgerald GF, Coffey A. *Evaluation of a cocktail of three bacteriophages for biocontrol of Escherichia coli O157:H7.* Appl Environ Microbiol 70: 3417-24, 2004.
 27. Dykes GA, Moorhead SM. *Combined antimicrobial effect of nisin and a listeriophage against Listeria monocytogenes in broth but not in buffer or on raw beef.* Int J Food Microbiol 73: 71-81, 2002.
 28. Leverentz B, Conway WS, Camp MJ, y col. *Biocontrol of Listeria monocytogenes on fresh-cut produce by treatment with lytic bacteriophages and a bacteriocin.* Appl Environ Microbiol 69: 4519-26, 2003.
 29. Kudva IT, Jelacic S, Tarr PI, Youderian P, Hovde CJ. *Biocontrol of Escherichia coli O157 with O157-specific bacteriophages.* Appl Environ Microbiol 65: 3767-73, 1999.
 30. Jamalludeen N, Jonson RP, Friendship R, Kropinski AM, Lingohr EJ, Gyles CL. *Isolation and characterization of nine bacteriophages that lyse O149 enterotoxigenic Escherichia coli.* Vet Microbiol 124: 47-57, 2007.
 31. Goodridge L, Gallaccio A, Griffiths M. *Morphological, host range, and genetic characterization of two coliphages.* Appl Environ Microbiol 69: 5364-71, 2003.
 32. Carey-Smith GV, Billington C, Hudson JA, Heinemann JA. *Isolation and characterization of bacteriophages infecting Salmonella spp.* FEMS Microbiol Lett 258: 182-6, 2006.
 33. Bigwood T, Hudson JA, Billington C, Carey-Smith GV, Heinemann JA. *Phage inactivation of foodborne pathogens on cooked and raw meat.* Food Microbiol 25: 400-6, 2008.
 34. Raya R, Varey P, Oot R, Dyen M, y col. *Isolation and characterization of a new T-Even bacteriophage, CEV1, and determination of its potential to reduce E. coli O157:H7 levels in sheep.* Appl Environ Microbiol 72: 6405-10, 2006.



UAI

Universidad Abierta Interamericana

Excelencia Académica Reconocida Nacional e Internacionalmente
Reconocida Internacionalmente por la acreditadora COAIE (Washington, USA)

SEDE ROSARIO

Sede Administrativa
Av. Pellegrini 1816 (2000) Rosario
Tel.: (0341) 4408010 - 4477220/21
uairosario@vaneduc.edu.ar



VANEDUC
1942 - 2010
68 AÑOS



INSCRIPCIÓN 2011

Medicina

- Acreditada por CONEAU . Res. 945/05 (Rosario)
- Acreditada por CONEAU . Res. 697/04 (Buenos Aires)

Lic. en Kinesiología y Fisiatría

Lic. en Producción de Bioimágenes

Instru. Quirúrgica Univ.

Lic. en Nutrición

HOSPITAL UNIVERSITARIO DE ALTA COMPLEJIDAD

Localización Lagos

Ov. Lagos 944 - Tel.: (0341) 4356510
uairosario@vaneduc.edu.ar - www.uai.edu.ar

Aprender es mucho más que estudiar