

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS  
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS  
CARRERA DE BIOQUÍMICA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES FÁRMACO BIOQUÍMICAS  
“DR. LUIS ENRIQUE TERRAZAS SILES”  
ÁREA DE BIOQUÍMICA MOLECULAR



“ESTUDIO DEL POTENCIAL DE BACTERIÓFAGOS LÍTICOS COMO  
HERRAMIENTAS DE CONTROL BIOLÓGICO DE *Campylobacter* spp. RESISTENTES  
A ANTIBIÓTICOS”

Tesis de grado presentada para la obtención del Grado de Licenciatura en Bioquímica

POR: YURAN ELÍAS CALANCHA PADRÓN

TUTORA: MARÍA TERESA ÁLVAREZ ALIAGA, *PhD*

LA PAZ – BOLIVIA  
2023

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS  
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS  
CARRERA DE BIOQUÍMICA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES FÁRMACO BIOQUÍMICAS  
“DR. LUIS ENRIQUE TERRAZAS SILES”  
ÁREA DE BIOQUÍMICA MOLECULAR

Tesis de grado:

“ESTUDIO DEL POTENCIAL DE BACTERIÓFAGOS LÍTICOS COMO  
HERRAMIENTAS DE CONTROL BIOLÓGICO DE *Campylobacter* spp. RESISTENTES  
A ANTIBIÓTICOS”

Presentada por:

Yuran Elías Calancha Padrón

Para optar el grado académico de Licenciatura en Bioquímica

Nota numeral:

Nota literal:

Director de la carrera de Bioquímica:

Dra. Maribel Ximena M. Taborga

Turora:

María Teresa Álvarez Aliaga, *PhD*

Tribunal:

Aneth Vásquez Michel M.Sc.

Tribunal:

Sergio Quisbert Barrera M.Sc.

Tribunal:

Pablo A. Irahola Schmeisser M.Sc.

## Dedicatoria

Para mi familia, a mis hermanitas María Belén y Wiñay Mercedes, mi papá, Pablo Roberto Calancha Llanos, les quedo muy agradecido por estar a mi lado, y en especial a mi madre Ma Luisa Padrón Martínez, gracias por todo tu apoyo incondicional durante esta odisea. Los quiero mucho.

## Créditos y agradecimientos

Muchas gracias a todo el grupo de investigación del laboratorio de Biotecnología fúngica y de Bioquímica Molecular, a María Teresa Álvarez por su constante apoyo, comprensión y guía en ciencia durante todo este tiempo, a Dayana, Abigail, Lizeth, Marisel, Pamela, David, Daniel, Marcelo, Leonardo, Ariel, Cristel y a todos quienes han colaborado de alguna manera en esta investigación, ¡GRACIAS!, sin su valiosa ayuda esto habría sido imposible.

A la Agencia Sueca de Cooperación Internacional para el Desarrollo (ASDI) por el sustento financiero durante la realización de esta investigación.

## ÍNDICE

I.	Planteamiento del problema	1
A.	Justificación	3
	Objetivo general	5
	Objetivos específicos	5
II.	Diseño teórico	6
A.	Marco referencial	6
1.	Antecedentes generales sobre el problema en estudio.	6
B.	Marco teórico	7
1.	Resistencia de <i>Campylobacter</i> a antibióticos	9
a.	Mecanismos de resistencia a antimicrobianos adquiridos por <i>Campylobacter</i>	10
b.	La vigilancia epidemiológica de <i>Campylobacter</i>	13
2.	Control biológico de <i>Campylobacter</i> spp. mediante bacteriófagos	15
a.	Grupos de bacteriófagos de <i>Campylobacter</i>	18
b.	Retos y perspectivas del control biológico de <i>Campylobacter</i> en alimentos	19
i.	Mecanismos de defensa de <i>Campylobacter</i> frente a bacteriófagos	19
ii.	Especificidad y eficacia de los bacteriófagos de <i>Campylobacter</i>	21
c.	Derivados de bacteriófagos como herramientas de biocontrol	23
A.	Marco conceptual	25
III.	Formulación de la hipótesis de investigación	26
	Hipótesis nula ( $H_0$ )	26
	Hipótesis alterna ( $H_i$ )	26
IV.	Operacionalización de las variables en estudio	27
A.	Población en estudio	28
B.	Descripción del ámbito de estudio	28
C.	Tipo de investigación	28
D.	Materiales, métodos, técnicas y procedimiento a ser empleados	29
1.	Asilamiento de bacterias del género <i>Campylobacter</i>	29
1.1.	Determinación del perfil de sensibilidad y resistencia antimicrobiana de cepas de <i>Campylobacter</i>	31
2.	Aislamiento de bacteriófagos contra <i>Campylobacter</i>	31

2.1. Spot test	32
2.2. Ensayo de doble capa	32
2.3. Propagación de una sola UFP	33
3. Caracterización parcial de los bacteriófagos	33
3.1. Determinación de la MDI (multiplicidad de infección)	33
3.2. Determinación de la estabilidad de los bacteriófagos	33
3.3. Rango de hospedero	34
3.4. Curva de un solo paso	34
3.5. Evaluación de la capacidad lítica de los de bacteriófagos de <i>Campylobacter</i>	34
A. Procesamiento de los datos	35
B. Procedimientos administrativos	37
1. Presupuesto	37
C. Aspectos bioéticos	37
V. Resultados y Discusión	38
A. Aislamiento de <i>Campylobacter</i> spp.	38
B. Sensibilidad fenotípica de resistencia antimicrobiana de <i>Campylobacter</i> spp.	41
C. Aislamiento y propagación de bacteriófagos	46
D. Determinación de la MDI (multiplicidad de infección)	47
E. Estabilidad de los bacteriófagos en distintos rangos de temperatura y pH	47
F. Rango de hospedero	48
G. Curva de un solo paso	50
H. Control en medio líquido	50
VI. Conclusiones	54
VII. Bibliografía	56
ANEXOS	66

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Aplicación de los bacteriófagos en distintos sitios de la producción de alimentos y en casos de riesgo extremo como durante infecciones por bacterias MRD, XDR y PDR. ....	17
Figura 2. Esquema metodológico empelado en el aislamiento de Campylobacter, bacteriófagos de Campylobacter y la determinación del perfil de sensibilidad y resistencia. ....	29
Figura 3. (A) Campylobacter (colonias rojas) en el medio cromogénico CHROMagar Campylobacter®, (B) colonias de Campylobacter en agar sangre 5% (v/v), (C) Colonias de Campylobacter (color rosa) - control de calidad del medio cromogénico CHROMagar Campylobacter®. ....	39
Figura 4. Unidades formadoras de colonias de Campylobacter por gramo entre los distintos tipos de muestras. ....	40
Figura 5. A. Mapa de calor del perfil de sensibilidad y resistencia de Campylobacter: blanco significa sensible y rojo significa resistente; se tienen a los antibióticos en grupos de acuerdo a la clasificación del tipo de antibiótico (A penicilinas, B tetraciclinas, C macrólidos, D anfenicoles, E quinolonas y F sulfonamidas). B. Proporción de bacterias XDR, MDR y resistentes aisladas por lugar de toma de muestra. C. Proporción de bacterias XDR, MDR y resistentes aisladas por tipo de muestra.....	42
Figura 6. Flujo de contaminación por bacterias transmitidas a través de los alimentos. Se resume la problemática de la falta de vigilancia de Campylobacter en muestras alimenticias, sitios de producción y crianza de los animales y el contacto con aves de vida libre y el consumidor final que llega a infectarse con este patógeno. Los sitios donde se tiene el símbolo de observación son aquellos donde se amerita realizar una vigilancia de los principales patógenos transmitidos por alimentos.....	45
Figura 7. Unidades formadoras de placas de 5 bacteriófagos, 16J-B1 (A), 16-F5 (B), GC1-C3 (C), 16J-H2 (D), GC1-K11 (E). Zonas de lisis por la aplicación de fagos concentrados (F).....	46

Figura 8. A. Proporción de bacterias que fueron ( $f > 1$ ) y no fueron ( $f = 0$ ) infectadas a distintas MOI. B. Distribución de Poisson, $f = 0$ representa la fracción de bacterias no infectadas, $f = 1$ representa la fracción de bacterias infectadas por un bacteriófago, $f > 1$ representa la cantidad de bacterias infectadas por más de un bacteriófago, y $f > 1 / f = 0$ representa el número de bacterias que absorbieron un bacteriófago del total de bacterias infectadas.....	47
Figura 9. Estabilidad de los bacteriófagos en distintos rangos de pH (izquierda) y temperatura (derecha). Se graficaron los rangos de recuperación (UFP/mL) de los bacteriófagos respecto al título (UFP/mL) de inóculo en cada experimento. ....	48
Figura 10. Curva de un solo paso del bacteriófagos 16J-F5, el tamaño de explosión se determina con la relación de la media de los títulos bajos y la media de los títulos altos, el periodo de incubación se determinó con el último punto antes de un incremento de títulos. ....	50
Figura 11. Control de Campylobacter en medio líquido a distintas MDI de bacteriófagos. ....	51
Figura 12. Áreas bajo la curva de la cinética de crecimiento a partir de la figura 11. ....	52
Figura 13. Determinación de diferencias en el recuento de UFC/g entre los distintos tipos de muestras, se aprecian los datos atípicos de los recuentos en las muestras de aves de corral. ....	69
Figura 14. Mapa de calor del perfil de sensibilidad: verde, sensible; amarillo, intermedio; rojo, resistente. ....	70
Figura 15. Antibiograma de una cepa de Campylobacter, se logra apreciar que esta cepa en específico tiene resistencia a Sulfametoxazol-trimetoprim, ácido nalidíxico, y ciprofloxacina.....	71

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales mecanismos y genes de Resistencia identificados en <i>Campylobacter</i> .....	11
Tabla 2. Operacionalización de las variables en estudio.....	27
Tabla 3. Tipo de investigación de acuerdo a diversos criterios.....	30
Tabla 4. Procesamiento de los datos según la matriz operacional.....	37
Tabla 5. Rango de hospederos de los fagos aislados.....	50
Tabla 6. Datos de aislamiento de cepas de <i>Campylobacter</i> .....	71
Tabla 7. Datos de aislamiento de los bacteriófagos.....	75

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Datos de aislamiento de las cepas de <i>Campylobacter</i> .....	71
Anexo 2. Análisis de no varianza (ANOVA) de CFU/g de los grupos de tipos de muestras.....	72
Anexo 3. Mapa de calor de la resistencia antimicrobiana de las cepas de <i>Campylobacter</i> aisladas.....	74
Anexo 4. Datos de aislamiento de bacteriófagos de <i>Campylobacter</i> .....	75
Anexo 5. Datos de títulos de bacteriófagos en distintas condiciones de pH y temperatura.....	76
Anexo 6. Determinación de la actividad de los bacteriófagos de <i>Campylobacter</i> frente a las cepas bacterianas en medio líquido.....	92

## Resumen

El inapropiado y excesivo uso de antibióticos ha aumentado la diseminación de los mecanismos de resistencia a antibióticos en bacterias patógenas. La producción avícola industrial es partícipe en la aparición de cepas resistentes a antibióticos de especies de *Campylobacter* spp y otras bacterias como consecuencia los consumidores resultan afectados con infecciones de bacterias multidrogorresistentes y extremadamente resistentes (MDR y XDR respectivamente). Los estudios de aislamiento y caracterización de bacteriófagos de *Campylobacter* refieren control sobre patógeno. El objetivo de esta investigación es estudiar bacteriófagos líticos en cuanto a su potencial uso como biocontroladores de cepas de *Campylobacter* resistente a antibióticos.

Se estableció el perfil de resistencia antimicrobiana de cepas de *Campylobacter* aisladas de heces de aves de corral y de vida libre, generando datos actuales sobre la resistencia de este patógeno. Existe una considerable cantidad de cepas resistentes a antibióticos de las cuales el 34,5% (19/55) son MDR, 41,8% (23/55) son XDR, el 87,3% (48/55) de las cepas son resistentes a fluoroquinolonas clasificándolas como cepas de prioridad elevada de investigación para la OMS.

Se aislaron 5 bacteriófagos con actividad lítica de cepas de *Campylobacter* a partir de muestras de heces de aves de corral y de vida libre, lodo de granjas y aguas superficiales, posteriormente se determinó la capacidad lítica de 4 bacteriófagos aislados para su uso como potenciales biocontroladores. Los 4 bacteriófagos aislados redujeron significativamente el crecimiento de *Campylobacter*, dado que se halló que reducen la carga bacteriana en ensayos *in-vitro*, lo que los convierte en potenciales biocontroladores de este patógeno.

Palabras clave: Bacteriófagos, resistencia antimicrobiana, *Campylobacter*, biocontrol.

## Abstract

The inappropriate and excessive use of antibiotics has increased the dissemination of antibiotic resistance mechanisms in pathogenic bacteria. Industrial poultry production is involved in the emergence of antibiotic resistant strains of *Campylobacter* spp. and other bacteria as a consequence consumers are affected with infections of multidrug resistant and extremely resistant bacteria (MDR and XDR respectively). Isolation and characterization studies of *Campylobacter* bacteriophages report control over pathogens. The objective of this research is to study lytic bacteriophages in terms of their potential use as biocontrollers of antibiotic resistant *Campylobacter* strains.

The antimicrobial resistance profile of *Campylobacter* strains isolated from poultry and free-living feces was established, generating current data on the resistance of this pathogen. There is a considerable number of antibiotic resistant strains of which 34.5% (19/55) are MDR, 41.8% (23/55) are XDR, 87.3% (48/55) of the strains are resistant to fluoroquinolones classifying them as strains of high research priority for WHO.

Five bacteriophages with lytic activity of *Campylobacter* strains were isolated from poultry and free-living fecal samples, farm sludge and surface water, then the lytic capacity of 4 isolated bacteriophages was determined for their use as potential biocontrollers. The 4 isolated bacteriophages significantly reduced the growth of *Campylobacter*, since they were found to reduce the bacterial load in in-vitro assays, which makes them potential biocontrollers of this pathogen.

Key words: Bacteriophages, antimicrobial resistance, *Campylobacter*, biocontrol.

## **I. Planteamiento del problema**

Ante la creciente resistencia a los antibióticos desarrollada por las bacterias, la medicina actual se está quedando sin la posibilidad de utilizar estos medicamentos debido al uso indiscriminado de los mismos desde la década de los 40. La resistencia a antibióticos no es un fenómeno nuevo, constituye uno de los procesos evolutivos de los microorganismos desde hace millones de años. Sin embargo, en las últimas décadas, debido al alto número de bacterias que han generado resistencia a antibióticos comerciales, este fenómeno ha sido considerado prioritario para la Organización Mundial de la Salud (OMS) que estima que para el año 2050, las infecciones bacterianas multidrogorresistentes (MDR) y extremadamente resistentes (XDR) serán una de las causas principales de muerte en el mundo (Yu et al., 2021).

A partir del siglo XX, prácticamente desde la producción industrial de antibióticos, se ha administrado los mismos a pacientes con infecciones, pero también se los ha empleado en la industria agropecuaria directamente a los animales productores de alimentos, tanto en el tratamiento como en el control y prevención de enfermedades infecciosas (Cota-Rubio et al., 2014). En este sentido, la administración de antibióticos en la industria avícola (ya sea en alimentos o mediante inyecciones) (Arenas & Melo, 2018) con la finalidad de la producción rápida de pollos de engorde, incide en la diseminación de bacterias resistentes en el medio ambiente con afectación directa a la salud humana y animal. No obstante, actualmente en varios países se está prohibiendo el uso de antibióticos para compensar carencias del bienestar animal, fomentar su crecimiento y rendimiento o con fines profilácticos (EFSA, 2016).

Las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETAs) causan 550 millones de casos de infecciones anuales, entre ellos 220 millones de niños menores de 5 años según la página web oficial de la OMS<sup>1</sup>. La campilobacteriosis es una de las ETAs responsable principal y más frecuente de gastroenteritis en el mundo(Thomas et al., 2020), siendo la zoonosis

---

<sup>1</sup> <https://www.who.int/es/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>

de origen alimentario más notificada en la Unión Europea (UE) en 2020 (EFSA, 2011; Elmi et al., 2021). Se estima que por cada caso reportado de campilobacteriosis, 30 casos no han sido informados (Luangtongkum et al., 2009).

Debido a la tendencia creciente de resistencia de *Campylobacter jejuni* contra múltiples antibióticos en las últimas décadas, la OMS ha catalogado dentro de la categoría de prioridad elevada a cepas de esta especie resistentes a fluoroquinolonas, formando parte de la “Lista OMS de patógenos prioritarios para la I+D de nuevos antibióticos”.

Aunque la OMS recomienda fuertemente a los sistemas de salud de cada país, establecer sistemas de vigilancia epidemiológica respecto a *Campylobacter* y otros agentes causales de ETAs, no se han adoptado estos sistemas de forma apropiada o son inexistentes en algunos casos en el hemisferio sur. En Latinoamérica son pocos los países que han avanzado en este sentido, tal es el caso de Brasil, Chile, Argentina, Ecuador y Uruguay. No obstante, en esta región se ha generado información científica relevante, principalmente relacionada a la descripción de perfiles de resistencia antimicrobiana, así como también la descripción de diversidad genética en muestras ambientales.

En Bolivia existe el Sistema de Vigilancia Epidemiológica (SNIS-VE) y el Programa Nacional de Enfermedades Transmitidas por Alimentos, este último a través del Instituto Nacional de Laboratorios en Salud de Bolivia (INLASA) en los informes de la Red de Laboratorios Oficiales de Análisis de Alimentos (RELOAA), presenta información muy básica de reporte de algunas bacterias transmitidas por agua y alimentos, también informa de la resistencia antimicrobiana en muestras de alimentos procesados y no procesados de algunas enterobacterias (*Escherichia coli*, coliformes termotolerantes, *Salmonella* spp, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*). Sin embargo hasta la fecha, *Campylobacter* no está dentro de los reportes<sup>2</sup> en los boletines RELOAA, por lo que datos de prevalencia, diversidad genética, resistencia antimicrobiana fenotípica y de genes de resistencia son desconocidos.

---

<sup>2</sup> Página web del INLASA donde se encuentran los reportes de los boletines RELOAA  
<https://www.inlasa.gob.bo/boletines-reloaa/>

A nivel mundial las implicaciones del problema de la resistencia antimicrobiana demandan estudiar alternativas que permitan controlar la proliferación de microorganismos patógenos; entre estas se encuentran estrategias de control biológico tales como el uso de probióticos, péptidos antimicrobianos, bacteriocinas, bacteriófagos y sus derivados.

Desde 1920 las primeras investigaciones sobre los bacteriófagos mostraban que éstos podían ser utilizados contra bacterias patógenas al ser humano, sin embargo, el auge de los antibióticos solapó el estudio de los bacteriófagos porque la producción y aplicación de éstos era inviable frente a la facilidad de producción y aplicación de los fármacos. Con el número decreciente de antibióticos funcionales, los bacteriófagos son una solución potencial para evitar el uso de antibióticos en la industria, al aplicarse como herramientas alternativas de control biológico para prevenir infecciones transmitidas por los alimentos e incluso para el tratamiento mediante fagoterapias.

### **A. Justificación**

Ante los constantes cambios en el planeta que arriesgan la estabilidad de la vida humana y ambiental, la Organización de Naciones Unidas (ONU) planteó los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) que tienen entre sus metas proteger el planeta y mejorar la vida de las personas en todo el mundo. El avance de actividades de base biotecnológica, como el desarrollo de ciencia básica y aplicada con bacteriófagos puede aportar al logro del ODS N° 2 (acabar con el hambre, a través de la producción sostenible de alimentos), ODS N° 9 (industria e innovación), ODS N° 12 (producción y consumo responsable), al ODS N° 11 (ciudades y comunidades sostenibles) como también engloba el tratamiento de aguas de consumo humano y aguas superficiales; por lo tanto, ofrece alternativas para sostener también el ODS N° 6 (agua limpia y saneamiento para todos).

Teniendo en cuenta la visión global actual de “OneHealth”, que es un enfoque concebido para diseñar e implementar programas, políticas, leyes e investigaciones en los que múltiples sectores se comunican y colaboran para lograr mejores resultados en salud humana, animal, la agricultura y el medio ambiente. Las áreas de trabajo donde el enfoque

“OneHealth” es particularmente necesario son: seguridad alimentaria, control de las zoonosis y la lucha contra la resistencia a los antibióticos.

Tanto las consideraciones de los ODS como las de One health han sido contempladas en el marco del subprograma Biorefinería y Biotecnología Agroindustrial propuesto en la Nota Conceptual UMSA-Asdi 2021-2025 y que también es acorde al Plan Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación de Bolivia, enfatizando la necesidad de obtener productos de mayor valor agregado a partir de los residuos, así como la generación de bioinsumos, bioenergía y nuevas tecnologías que permitan una gestión agropecuaria sustentable y brinden herramientas para la protección del medio ambiente; de igual manera la aplicación de nuevas estrategias de control biológico de patógenos relacionados a alimentos mediante la aplicación de bacteriófagos y/o sus derivados. En este sentido, la presente investigación forma parte el subprograma UMSA-Asdi 2021-2025 “Control biológico con el uso de bacteriófagos de los principales patógenos bacterianos transmitidos a través de alimentos cuyo objetivo es controlar cepas de *Escherichia coli*, *Sallmonella* spp. y *Campylobacter* spp resistentes a antibióticos aisladas de granjas avícolas, aves de vida libre y aguas superficiales.

Las bacterias patógenas transmitidas por alimentos han cobrado relevancia debido a fenómenos de multidrogorresistencia. Las especies de *Campylobacter* son de fácil transmisión entre aves y son uno de los principales agentes infecciosos humanos que producen cuadros diarreicos. Debido a que no existen datos epidemiológicos sistematizados de infecciones por *Campylobacter* en Bolivia, no se conoce el perfil de resistencia antimicrobiana de cepas circulantes de este patógeno. Esta falencia, determina la necesidad de generar datos de al menos el perfil fenotípico de sensibilidad y resistencia de cepas de *Campylobacter*, pero a partir de los reservorios como aves de corral y de vida libre.

Trabajar para lograr la inocuidad de los alimentos es una tarea importante para el sector productor y comercializador del país ya que asegura la disponibilidad de alimentos inocuos para la población y además nos permite cumplir con los estándares exigentes del

comercio internacional, favoreciendo así el desarrollo de la exportación. Con la visión global de la inocuidad de los alimentos, el control de patógenos en toda la cadena alimentaria, la aplicación de bacteriófagos o sus derivados directamente en la agroindustria y alimentos debe ser considerada en nuestro país como un aporte innovador que pone a Bolivia a la altura de otras naciones desarrolladas que han aceptado su uso.

Los bacteriófagos son útiles en el control de bacterias patógenas resistentes antibióticos, los estudios de aislamiento y caracterización de su capacidad lítica frente a bacterias patógenas sirven para encontrar a fagos candidatos como potenciales controladores. Este trabajo se centró en la determinación del perfil de resistencia de cepas de *Campylobacter* aisladas a partir de heces de pollos de granjas avícolas y de aves de vida libre, luego en el aislamiento de los bacteriófagos de *Campylobacter* para evaluar su capacidad lítica. Es necesario determinar para cada bacteriófago la especificidad frente al patógeno, su estabilidad en distintas condiciones y si disminuyen significativamente la población de bacterias tras su aplicación, por lo que este estudio planteó la siguiente pregunta: ¿tienen los bacteriófagos líticos aislados para *Campylobacter* spp. potencial para el control biológico de cepas resistentes a antibióticos presentes en granjas avícolas?

## **B. Objetivos**

### **Objetivo general**

Estudiar bacteriófagos líticos en cuanto a su potencial uso como biocontroladores de cepas de *Campylobacter* resistente a antibióticos.

### **Objetivos específicos**

1. Establecer el perfil de resistencia antimicrobiana de cepas de *Campylobacter* aisladas de heces de aves de corral y de vida libre.
2. Aislar bacteriófagos con actividad lítica de cepas de *Campylobacter* a partir de muestras de heces de aves de corral y de vida libre, lodo de granjas y aguas superficiales.
3. Determinar la capacidad lítica de los bacteriófagos aislados para su uso como potenciales biocontroladores.

## **II. Diseño teórico**

### **A. Marco referencial**

#### **1. Antecedentes generales sobre el problema en estudio.**

El inapropiado y excesivo uso de antibióticos ha aumentado la diseminación de los mecanismos de resistencia en bacterias patógenas, lo que explica la situación actual de los medicamentos usados en el tratamiento de las infecciones (San Millan, 2018). La industria avícola se ha convertido en un perfecto “caldo de cultivo” para el desarrollo de bacterias resistentes a múltiples antibióticos, pues la dieta de los animales los incluye para evitar su mortalidad e incluso como promotores de crecimiento. Como consecuencia los consumidores resultan afectados con infecciones de bacterias MDR (Thomas et al., 2020). La producción avícola ha tenido que afrontar los problemas del aumento alarmante de la resistencia bacteriana como el creciente número de informes sobre la resistencia de *Campylobacter* a las fluoroquinolonas, tetraciclina, eritromicina y gentamicina (N. Chinivasagam et al., 2020b; Żbikowska et al., 2020).

El INLASA realiza controles microbiológicos en alimentos en los Boletines RELOAA, sin encontrarse reportes de *Campylobacter* por lo que no existe una base de datos referencial local, sino estudios de tesis realizados en la UMSA de los cuales solo el estudio de Condori (2022) es reciente y solo presenta datos descriptivos de la presencia de *Campylobacter* spp en carnes, pero no profundiza en el estudio del perfil de resistencia. Otros estudios sobre este patógeno se llevaron a cabo en la ciudad de La Paz, como el de Olaguibel (2009) que presenta el perfil de resistencia de *Campylobacter* spp en muestras clínicas (heces de pacientes con diarrea) y el estudio de Bautista (2009) que realizó la determinación de *Campylobacter* spp en muestras de heces de aves de vida libre de la Plaza Murillo, sin embargo, los dos últimos estudios son muy desactualizados, pero son la referencia de partida que proveen la única información existente de este patógeno a nivel nacional, siendo estudios de tesis que no corresponden a un sistema de vigilancia de *Campylobacter* (Bautista Mollo et al., 2009; Condori, 2022; Olaguibel, 2009)

A nivel mundial la tendencia al uso de alternativas terapéuticas para tratar las infecciones por bacterias MDR ha dado lugar a la aplicación de cócteles<sup>3</sup> de bacteriófagos, aprovechando la capacidad de estos virus de ser altamente específicos (Domínguez Navarrete, 2020). La mayoría de los productos a base de fagos están dirigidos contra los principales patógenos del grupo ESKAPE y bacterias transmitidas por alimentos, como: *Salmonella spp*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni* y *Clostridium perfringens*. Los estudios de aislamiento y caracterización de bacteriófagos de *Campylobacter* refieren control sobre patógeno (N. Chinivasagam et al., 2020b; Kordi & Khakipour, 2021; Nowaczek et al., 2019; Owens et al., 2013; Steffan et al., 2021). Actualmente el estudio de los bacteriófagos de *Campylobacter*, como el de otros fagos, sigue en constante avance, debido a que se requiere tener más información sobre la dinámica de control de poblaciones, fagoresistencia, diversidad microbiana y las limitaciones de los mismos bacteriófagos; desde hace más de 10 años se han realizado avances sobre la aplicación de bacteriófagos de *Campylobacter* en matrices alimenticias y en granjas de pollos (Atterbury et al., 2003; Fischer et al., 2013; Kittler et al., 2013; C. Loc Carrillo et al., 2005; C. M. Loc Carrillo et al., 2007; Richards et al., 2019), estos estudios generaron información sobre la cual se evidenció la capacidad de biocontrol de los fagos de *Campylobacter*.

## **B. Marco teórico**

Las enfermedades transmitidas por los alimentos son una de las principales causas de hospitalización a nivel mundial y tanto las bacterias MDR como las XDR son una de las principales causas de muerte en todo el mundo (Moye et al., 2018). La campilobacteriosis es una de las enfermedades transmitidas por alimentos más frecuentemente reportadas en humanos (Centro Europeo para la Prevención y el Control de las Enfermedades, 2013). *Campylobacter* es un bacilo gramnegativo curvado, microaerófilo, citocromo oxidasa positivo que exhibe motilidad en espiral y se transporta en el intestino de muchos animales salvajes y domésticos, en particular especies aviares, incluidas las aves de corral,

---

<sup>3</sup> Mezclas de bacteriófagos con el fin de ampliar el rango de bacterias a ser infectadas y posteriormente eliminadas.

*Campylobacter* se encuentran también presentes en aves de vida libre<sup>4</sup>, por ejemplo, las palomas y las gaviotas (Silva et al., 2011), la prevalencia de *Campylobacter* en pollos de engorde es generalmente alta y la transmisión de la bacteria de ave a ave ocurre rápidamente<sup>5</sup> (Lee & Newell, 2006). No existe una vacuna disponible contra *C. jejuni* debido a la diversidad serológica del patógeno y la corta vida útil de los pollos de engorde (Ushanov et al., 2020).

*Campylobacter* generalmente se trasmite a humanos a través de alimentos contaminados (como carne de pollo) y es responsable de la mayoría de los casos de diarrea (de etiología bacteriana) tanto en países desarrollados y en vía de desarrollo (Biswas et al., 2007; Kreling et al., 2020), también se sabe que los casos de síndrome de Guillan Barré<sup>6</sup> (GBS) están asociados con las infecciones por *Campylobacter*<sup>7</sup> y puede causar artritis reactiva y enfermedades de inflamación ósea (Zautner et al., 2014). Los niños menores de 5 años y los adultos jóvenes son los hospederos humanos más comunes de *Campylobacter jejuni* (Kreling et al., 2020).

La OMS indica que es necesario realizar sistemáticamente la vigilancia epidemiológica de *Campylobacter* (EFSA, 2019), dado que este patógeno ha ido adquiriendo varios genes de resistencia, y actualmente las cepas de *Campylobacter jejuni* resistentes al fluoroquinolonas encuentran dentro de la categoría de microorganismos de prioridad ELEVADA de estudio (WHO, 2017), más aún, existen varios estudios que muestran un perfil de resistencia elevado para múltiples antibióticos (Fabre et al., 2018; Ghimire et al.,

---

<sup>4</sup> Estos animales, si bien no tienen una alimentación como la de los pollos de engorde, entran en contacto con los desperdicios de alimentos, mismos que potencialmente tienen una carga de microorganismos, incrementando el riesgo de diseminación de bacterias patógenas resistentes.

<sup>5</sup> La alta variabilidad del gen codificante para la flagelina, es un factor clave que le proporciona facilidad de colonizar nuevos nichos (Guerry et al., 1991)

<sup>6</sup> Síndrome de GB Afección en la que el sistema inmunológico ataca los nervios, los síntomas comienzan como debilidad y hormigueo en los pies y las piernas que se extienden a la parte superior del cuerpo. También se puede producir parálisis.

<sup>7</sup> Debido a la gran diversidad de *Campylobacter*, los mecanismos patogénicos que provocan síntomas clínicos aún no están bien definidos (Silva et al., 2011).

2014; Luangtongkum et al., 2009; Mourkas et al., 2019; Ocejo et al., 2021; Quino et al., 2022) que reportan cepas de *Campylobacter* XDR.

Actualmente se emplean varias estrategias para prevenir infecciones por *Campylobacter* y otros patógenos en la industria pecuaria, entre estas se encuentran el uso de antibióticos, desinfectantes y detergentes (estrategias químicas) y desinfección de ambientes con luz UV (estrategia física) (Biswas et al., 2007). En la actualidad el uso de bacteriófagos es una estrategia empleada en el biocontrol de patógenos bacterianos, como en las fagoterapias<sup>8</sup>, que se ha convertido en un esperanzador método biológico para el manejo de las infecciones resistentes a los antibióticos (Burrowes, 2018; Puxty & Millard, 2023), los fagos pueden usarse también de manera profiláctica en la cadena de producción de alimentos para reducir la carga bacteriana patógena (Burrowes, 2018; Jäckel et al., 2019).

### **1. Resistencia de *Campylobacter* a antibióticos**

Las bacterias adquieren resistencia a los antibióticos a través de dos vías principales: la mutación cromosómica y la adquisición de elementos genéticos móviles como los plásmidos por transferencia horizontal de genes (San Millan, 2018). Los plásmidos son moléculas circulares de ADN que se replican independientemente del cromosoma y pueden transferirse horizontalmente<sup>9</sup> entre bacterias por conjugación. La transferencia horizontal de genes en la microbiota intestinal ocurre por diferentes mecanismos de los cuales la transducción y la conjugación son los principales (McInnes et al., 2020).

Algunas bacterias son insensibles de forma innata a ciertos antibióticos, ahora se sabe que la resistencia natural existía antes del uso de antibióticos comerciales, dado que por el fenómeno de control de poblaciones muchas bacterias fueron eliminadas, pero eventualmente algunas de estas se fueron adaptando generando resistencia natural a

---

<sup>8</sup> La terapia con fagos es todavía un enfoque terapéutico en estudio, un mayor desarrollo de las fagoterapias requiere la caracterización biológica de los bacteriófagos, como el estudio de su especificidad de hospedero, la diversidad del genoma y la adaptación a sus huéspedes bacterianos (Yazdi et al., 2020).

<sup>9</sup> El número de diferentes genes de resistencia adquirida por patógenos humanos es muy bajo en comparación con la gran variabilidad de genes de resistencia presentes en los ecosistemas (McInnes et al., 2020; San Millan, 2018).

ciertos antibióticos; al conjunto de genes responsables de esta resistencia intrínseca se le ha denominado "resistoma intrínseco", que representa al menos un 3% de un genoma bacteriano, codificando diferentes enzimas y proteínas estructurales que regulan los procesos básicos de la fisiología bacteriana por lo tanto encargados del metabolismo primario (Laws et al., 2019).

El fenómeno de la resistencia a los antibióticos se define como la capacidad de supervivencia de un microorganismo y/o su proliferación ante la actividad potencial de un agente antibiótico (Blair, Webber, et al., 2014). Se clasifica a las bacterias como susceptibles con buenas posibilidades de tratar una infección y resistentes con pobres posibilidad de tratar la infección (Andrews, 2001; Blair, Webber, et al., 2014; Nguyen et al., 2020).

#### **a. Mecanismos de resistencia a antimicrobianos adquiridos por *Campylobacter***

El género *Campylobacter* ha ido adquiriendo relevancia en el ámbito clínico e industrial<sup>10</sup> debido al aumento del número de antibióticos a los que es resistente, en particular a las fluoroquinolonas<sup>11</sup> y tetraciclinas que son los antibióticos recetados en el tratamiento de este patógeno (Di Giannatale et al., 2019; Quino et al., 2022).

Al ser *Campylobacter* una bacteria gram-negativa, su membrana externa actúa como una barrera natural para los antibióticos (Blair, Webber, et al., 2014; Laws et al., 2019; Martinez, 2014). Sin embargo, el género *Campylobacter* ha ido adquiriendo mecanismos de resistencia a múltiples antimicrobianos (Tabla 1), entre estos destacan las bombas de eflujo, que son proteínas que eyectan los antibióticos fuera de la bacteria y tienden a proporcionar resistencia a varios tipos de antibióticos debido a que no reconocen específicamente una molécula, sino varias (Blair, Richmond, et al., 2014; Blair, Webber, et al., 2014), las bombas de eflujo que se encuentran en plásmidos que pueden diseminarse

---

<sup>10</sup> El costo económico es alto debido a la pérdida de productividad ya que las aves de corral, son los principales reservorios de *Campylobacter*.

<sup>11</sup> Los signos de infección por *C. jejuni* son clínicamente indistinguibles de los causados por otros patógenos bacterianos, y tales enfermedades generalmente se tratan con fluoroquinolonas (Thomas et al., 2020).

requieren especial atención dado que se consideran como el mayor mecanismo de resistencia antimicrobiana (Blair, Webber, et al., 2014). Una bomba clínicamente relevante es CmeR (Lin et al., 2002), los datos de (Pumbwe & Piddock, 2002) indican que esta bomba a *Campylobacter* le atribuye resistencia a varios antibióticos.

**Tabla 1. Principales mecanismos y genes de Resistencia identificados en *Campylobacter***

<b>Gen</b>	<b>Mecanismo</b>	<b>Resistencia</b>	<b>Referencia</b>
<b>Operon cmeR</b>	Bomba de eflujo, CmeABC	Fluoroquinolonas, eritromicina, $\beta$ -lactámicos, rifampicina, tetraciclina, desoxicolato, cloranfenicol y gentamicina	(Pumbwe & Piddock, 2002)
<b>ermB</b>	Metilación del ribosoma	Macrólidos, eritromicina y azitromicina	(Anampa et al., 2020)
<b>gyrA</b>	Mutación de diana (DNA Girasa; C257T)	Fluoroquinolonas	(Han et al., 2012)
<b>tet(O)</b>	Inactivación del antibiótico	Tetraciclina	(Crespo et al., 2012)
<b>23S</b>	Mutación de la diana (Gen 23S; A2075G)	Eritromicina	(Vacher et al., 2005)
<b>aphA-3</b>	Inactivación del antibiótico	Kanamicina	(Liebert et al., 2004)
<b>aphA-7</b>	Inactivación del antibiótico	Kanamicina	(Tenover et al., 1992)
<b>ant(6)/aadE</b>	Inactivación del antibiótico	Estreptomicina	(Hormeño et al., 2018) (Pinto-Alphandary et al., 1990)
<b>ant(3)/aadA</b>	Inactivación del antibiótico	Estreptomicina y Espectinomicina	(Pinto-Alphandary et al., 1990)
<b>sat-4</b>	Inactivación del antibiótico	Estreptomicina	(Jacob et al., 1994)
<b>ant(9)/aad9</b>	Inactivación del antibiótico	Estreptomicina y espectinomicina	(Ocejo et al., 2021)
<b>aph-2</b>	Inactivación del antibiótico	Gentamicina	(Fabre et al., 2018)
<b>Aac</b>	Tanslocación	Kanamicina	(Quino et al., 2022)

El gen *ermB* (erythromycin ribosome methylase) está presente en bacterias del género *Campylobacter* y brinda resistencia antimicrobiana por medio de la codificación de la metilasa ribosomal para la subunidad 23S, el mecanismo genético emergente más importante de resistencia a macrólidos (Alfredson & Korolik, 2007; Florez-Cuadrado et al., 2016; Zhang et al., 2016).

En las bacterias Gram negativas, ADN girasa (enzyma *gyr*), una topoisomerasa de tipo II, es el objetivo principal de los antibióticos del tipo quinolonas. Una vez dentro de las células bacterianas, las fluoroquinolonas forman un complejo estable con las enzimas objetivo y atrapan las enzimas en el ADN, lo que provoca rupturas de doble cadena en el ADN y la muerte bacteriana (Willmott, 1994). Esta enzima consta de dos subunidades (subunidades A y B) que se combinan en un complejo para formar una enzima funcional. Las dos subunidades están codificadas por *gyrA* y *gyrB*, respectivamente. En *Campylobacter*, la resistencia a las fluoroquinolonas está mediada por mutaciones puntuales en la región determinante de resistencia a quinolonas (QRDR). Las cepas que tienen los genes *gyr* junto con la función de la bomba de eflujo de múltiples fármacos CmeABC (Bachoual et al., 2001) son cepas altamente relevantes para la salud humana (Bush et al., 2020; Han et al., 2012).

El gen *tet(O)* es el responsable de la resistencia a la tetraciclina en *Campylobacter*, se ha informado con mayor frecuencia en plásmidos que también suelen albergar determinantes de resistencia a la kanamicina (Crespo et al., 2012; Ocejo et al., 2021). Sin embargo, también hay evidencia de que *tet(O)* está alojado en el cromosoma debido a que un estudio canadiense he determinado que un 33 % de aislamientos de *C. jejuni* resistentes a la tetraciclina carecían de plásmidos (Guernier-Cambert et al., 2021).

En *C. jejuni* y *C. coli*, la resistencia a los macrólidos está mediada cromosómicamente y se asocia con una reducción en la afinidad de unión de los macrólidos a la subunidad ribosomal 23S. La secuenciación de la región codificante de peptidil transferasa de los genes 23S rRNA de *Campylobacter* spp. resistente a la eritromicina, permitió la identificación de mutaciones puntuales en los mismos sitios que en *H. pylori*, que

probablemente son responsables de la resistencia. *Campylobacter* spp. resistente a la romicina, permitió la identificación de mutaciones puntuales en los mismos sitios que en *H. pylori*, que probablemente son responsables de la resistencia. en el que un residuo de adenina se reemplaza por un residuo de guanina (Chen et al., 2019; Zautner et al., 2014).

La forma más común de resistencia a kanamicina y a los antibióticos estructuralmente relacionados implica la síntesis de 3-aminoglucósido fosfotransferasas. Tenover y colaboradores reportaron la presencia de un nuevo gen de resistencia a kanamicina conocido como gen *aphA-7* en un aislado de *C. jejuni* (Tenover et al., 1992), y posteriormente, se caracterizó a *aphA-7* como fosfotransferasa para kanamicina y se determinó que se encuentra en dos pequeños plásmidos (Kaakoush et al., 2015; Qin et al., 2012).

#### **b. La vigilancia epidemiológica de *Campylobacter***

La vigilancia epidemiológica de patógenos transmitidos por alimentos es importante para prevenir los casos de diarrea y reducir el nivel de contaminación al que pueden estar expuestos los consumidores, al mismo tiempo de educar a estos últimos para limitar el riesgo de infección (Di Giannatale et al., 2019; Huang et al., 2009). Si bien, existen metodologías normalizadas como la ISO 10272 para la detección y enumeración de *Campylobacter* en alimentos (Anampa et al., 2020), el aislamiento de *Campylobacter* y el análisis del perfil de sensibilidad a antibióticos, es un reto al tratarse de un microorganismo fastidioso (CLSI, 2015; Dudzic et al., 2016).

Múltiples estudios a nivel mundial, informan tasas de contaminación de alimentos con *C. jejuni* que oscilan entre el 20 % y el 80 %, determinando un incremento de los casos de intoxicación alimentaria asociada a este patógeno (Gomes et al., 2006; Goode et al., 2003). Según la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), *Campylobacter* continúa siendo el patógeno bacteriano gastrointestinal humano más comúnmente informado en la Unión Europea (EFSA, 2016; Elmi et al., 2021), sin embargo, son pocos los estudios

disponibles en América Latina sobre la prevalencia de *Campylobacter* (Quino et al., 2022).

En Bolivia existen contados estudios sobre *Campylobacter* y su resistencia antibiótica. El 2009 se determinó el perfil de resistencia antibiótica de *Campylobacter* spp. de tres hospitales y un laboratorio (Hospital Municipal Boliviano Holandés, Hospital Arco Iris, Clínica AMID y SELADIS), entre los datos más importantes de este estudio se demostró que un 77,2% de las cepas de *Campylobacter* spp. tenía resistencia a Clindamicina seguida de la Ciprofloxacina con 70,4%. Se evidenció que *Campylobacter* spp. no mostró resistencia a cuatro antibióticos: Nitrofurantoina, Gentamicina, Cloranfenicol y Amoxicilina /Clavulanico (Olaguibel, 2009). Otro estudio de la Facultad de Medicina de la Universidad Mayor de San Andrés, determinó la presencia de *Campylobacter* spp. en heces de palomas y gallinas (Bautista Mollo et al., 2009), sin embargo, este estudio no presenta datos de resistencia, pero establece la presencia de *Campylobacter* spp. tanto en aves de vida libre como de corral en la ciudad de La Paz.

Dado que el análisis de la presencia de *Campylobacter* es lento debido a la biología de este microorganismo (lento crecimiento) un enfoque de vigilancia molecular se ha utilizado como un método alternativo para determinar la presencia de especies de *Campylobacter* (Gomes et al., 2006; Huang et al., 2009), así como de otros patógenos transmitidos por alimentos de interés para la salud pública. Quino y colaboradores realizaron en Perú una detección de marcadores moleculares de virulencia y resistencia a los antimicrobianos para *Campylobacter*, también aplicaron el análisis Whole Genome Sequencing (WGS)<sup>12</sup> o secuenciación de genoma completo para determinar la diversidad genética, factores de virulencia y determinantes de resistencia antimicrobiana de poblaciones de *C. jejuni* y *C. coli* (Quino et al., 2022).

---

<sup>12</sup> La secuenciación del genoma completo es el proceso de determinar la totalidad, o casi la totalidad, de la secuencia de ADN del genoma de un organismo.

Con el análisis de secuenciación de genoma completo WGS el grupo de Quino determinaron los genes *cadF*, *racR*, *flaA* y *dnaJ* que están asociados con la adherencia, colonización y termotolerancia de esta bacteria, también los genes *ciaB* y *pIdA* que tienen un papel en la invasión y supervivencia dentro del huésped, o el factor de virulencia de distensión citotelial (CDT) que conduce a la apoptosis de las células inmunitarias y epiteliales del intestino (Quino et al., 2022; Silva et al., 2011). Este enfoque de detección y análisis brinda información más profunda sobre genes de resistencia y virulencia de las cepas locales de *Campylobacter* spp (Fabre et al., 2018; Ocejo et al., 2021).

## **2. Control biológico de *Campylobacter* spp. mediante bacteriófagos**

En 1913, Frederick Twort describió un agente que lisaba cepas de *E. coli*. Cuatro años después, en 1917, Félix d'Herelle confirmó la presencia de un virus contra el bacilo de la disentería, al que denominó bacteriófago. Ambos estudios fueron independientes y demostraron que existían entidades microscópicas que lisaban a bacterias. Hoy en día, es por demás conocida la existencia de los bacteriófagos (fagos) como entes biológicos abundantes y diversos en la biosfera (Ushanov et al., 2020).

Una alternativa actual y en constante desarrollo, en el esfuerzo de eliminar las bacterias grampositivas y gramnegativas resistentes a los antibióticos, es el uso de bacteriófagos (Huemer et al., 2020) que atacan específicamente a un determinado género, especie o subespecie de bacterias, controlando la población de estas últimas.

Los bacteriófagos al igual que otros virus constan de una cubierta llamada cápside que contiene a su material genético sea ADN o ARN. No obstante, algunos fagos poseen otras estructuras, como es el caso del fago T4 que tiene una cabeza que comprende tanto la cápside como el material genético, un cuello o tallo compuesto por varias estructuras proteicas que ayudan a unirse a la bacteria blanco y también colaboran en la inserción del material genético dentro de la bacteria (Burrowes, 2018; Kakasis & Panitsa, 2019).

De acuerdo al tipo de ciclo de vida, los fagos se clasifican en líticos (obligatoriamente antagónicos) y lisogénicos a veces también llamados temperados o profagos, estos en

muchos casos puede conferir una ventaja de adaptación a nuevos nichos o ante agentes estrasantes (Puxty & Millard, 2023); la diferencia básica radica en el comportamiento del virión dentro de la célula hospedadora (Kakasis & Panitsa, 2019; Paczesny & Bielec, 2020). Mientras los virus líticos se replican y destruyen las bacterias<sup>13</sup>, los temperados unen su genoma al cromosoma bacteriano, donde se instalan y replican a medida que lo hace la célula, garantizando de una forma distinta su supervivencia (Burrowes, 2018; Puxty & Millard, 2023). Estos fagos temperados suelen generar nuevas partículas virales cuando existe un factor extrínseco que provoca su replicación, por ejemplo, radiación UV, calor, entre otros factores (Yukgehnaish et al., 2022).

Los bacteriófagos pueden controlar las poblaciones bacterianas a través de la lisis, impulsar la evolución de los sistemas de inmunidad bacteriana a través de la infección, proporcionar un conducto para la transferencia horizontal de genes y alterar el metabolismo del huésped mediante el transporte de genes metabólicos auxiliares (Puxty & Millard, 2023).

La aplicación de los bacteriófagos en los alimentos a abierto un abanico de investigaciones sobre su efectividad; un punto a favor es que son inofensivos para los humanos y los animales y están omnipresentes en el medio ambiente y, han sido reconocidos como agentes antimicrobianos prometedores para ayudar a controlar patógenos bacterianos específicos en la producción de alimentos (Endersen & Coffey, 2020). Una de las tendencias actuales de uso de bacteriófagos es su aplicación en la comida de los animales de granja y en los alimentos (figura 1).

---

<sup>13</sup> En los ensayos dentro del laboratorio, las muestras bacterianas deben de estar en fase de crecimiento exponencial, puesto que en ese estado la maquinaria de replicación, transcripción y traducción están activas.

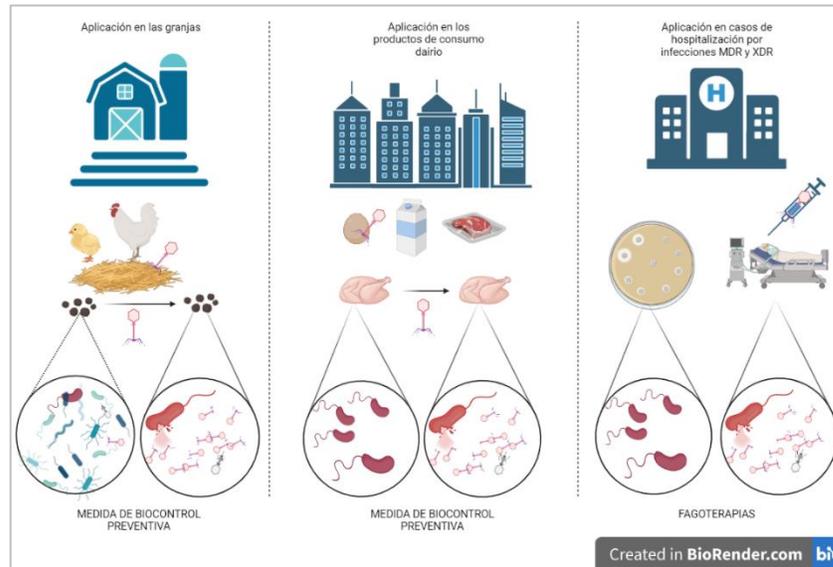


Figura 1. Aplicación de los bacteriófagos en distintos sitios de la producción de alimentos y en casos de riesgo extremo como durante infecciones por bacterias MRD, XDR y PDR (fuente: elaboración propia).

Para ser considerados excelentes candidatos como agentes de biocontrol en los alimentos, los fagos deben ser estrictamente líticos y posiblemente tener una amplia gama de huéspedes (Burrowes, 2018; Shende et al., 2017). La formulación de fagos, conocida como cóctel (mezcla de más de dos fagos que presentan actividad lítica frente a un mismo hospedero), debe lograr una alta reducción de la carga bacteriana y minimizar los efectos secundarios como ser la resistencia a bacteriófagos. Sin embargo, la virulencia de los fagos disminuye a medida que aumenta el rango de dianas bacterianas por lo que es importante conocer las interacciones específicas entre fagos y bacterias para desarrollar aplicaciones exitosas de fagos (Picozzi et al., 2021).

Los productos disponibles que contienen bacteriófagos aprobados para su uso en aplicaciones de seguridad alimentaria han ido en constante aumento; la mayoría de las investigaciones al respecto se basan en la caracterización de los bacteriófagos bajo condiciones variables de temperatura y pH, rango de hospedero y determinaciones de sus efectos sobre la carga bacteriana, ensayos con lo que se asegura la estabilidad de un fago en enfrentamiento a bacterias en una matriz compleja como los alimentos (Atterbury et

al., 2003; Connerton et al., 2011; Owens et al., 2013; Shende et al., 2017; Sørensen et al., 2017).

Uno de los primeros estudios de control biológico *in situ* de *Campylobacter* mediante el uso de bacteriófagos fue el realizado por Kittler y colaboradores, quienes aplicaron un coctel de fagos en el agua de consumo de aves de corral, disminuyendo de manera eficiente los recuentos de *Campylobacter* en pollos de engorde (Kittler et al., 2013). Este estudio determinó precedentes de la posibilidad de utilizar cocteles de bacteriófagos como una herramienta efectiva en el control biológico de patógenos alimentarios. Debido a algunas peculiaridades de los fagos de *Campylobacter* que dificultan su aislamiento y particularmente su análisis molecular, durante mucho tiempo el progreso en este campo de investigación fue bastante lento (Jäckel et al., 2019).

#### a. Grupos de bacteriófagos de *Campylobacter*

Existen tres grupos de bacteriófagos de *Campylobacter* clasificados según el tamaño de su genoma: grupo I ~320 kb, grupo II ~184 kb y grupo III ~138 kb (Jäckel et al., 2019; Steffan et al., 2021). Se han publicado varios estudios en los que se aplicaron con éxito fagos del grupo II o del grupo III; estos dos grupos de fagos son diferentes en cuanto a sus rangos de hospederos y receptores de células huésped (Furuta et al., 2017; Harada et al., 2018; Kandari, 2013).

Los fagos del grupo II y del grupo III tienen un tamaño de explosión bajo, un contenido de GC muy bajo de 26 a 27% y una insensibilidad a la escisión por muchas endonucleasas de restricción (Jäckel et al., 2019). En cócteles, los fagos del grupo II y III serían más eficaces en disminuir el número de bacterias resistentes a antibióticos (Hammerl et al., 2014). El rango restringido de hospederos de los fagos de *Campylobacter* hasta ahora permite apuntar específicamente a especies. La combinación de fagos previene el desarrollo de fago-resistencia que puede ocurrir como resultado de su aplicación, bacterias resistentes a los fagos muestran una capacidad de colonización reducida (Steffan et al., 2021).

b. Retos y perspectivas del control biológico de *Campylobacter* en alimentos

Las aplicaciones basadas en fagos contra *Campylobacter jejuni* podrían potencialmente usarse de manera similar a aquellas contra *Salmonella spp.* y *Listeria spp.*; sin embargo, hasta la fecha solo se han aprobado muy pocos productos de fagos de *Campylobacter* (Ushanov et al., 2020). Dado que los fagos de *Campylobacter* son depredadores naturales que potencialmente podrían controlar a *C. jejuni*, se tienen reportes sobre la aplicación de fagos de *Campylobacter* con fines terapéuticos (Connerton et al., 2011; Kandari, 2013; Ushanov et al., 2020).

En comparación con la mayoría de los otros fagos líticos, los fagos de *Campylobacter* exhiben algunas características que dificultan su aplicación (Jäckel et al., 2019) como ser: la cantidad de fagos que se genera por bacteria infectada (tamaño de explosión), el periodo de incubación y la misma fago resistencia.

Con la finalidad de disminuir la carga bacteriana de *Campylobacter*, usualmente se utiliza los detergentes y agentes desinfectantes y métodos físicos de control (Ushanov et al., 2020). Davis y sus colegas demostraron experimentalmente que *Campylobacter* sobrevive bien, tanto en la piel como en la carne de pollo a temperaturas refrigeradas (Davis & Conner, 2007) Por lo que la reducción del patógeno a bajas temperaturas solo puede lograrse mediante la aplicación en superficies inertes y biológicas de fagos en un número muy elevado<sup>14</sup> (Orquera et al., 2012).

i. Mecanismos de defensa de *Campylobacter* frente a bacteriófagos

A la fecha se han identificado distintos mecanismos de resistencia a los fagos en *C. jejuni*:

**a) Modificación del receptor que previene la adsorción de fagos.**

---

<sup>14</sup> La dosis infecciosa de *Campylobacter* es de 10<sup>4</sup> células bacterianas (Quino et al., 2022).

Las estructuras de polisacáridos capsulares (capsular polysaccharides CPS) de fase variable<sup>15</sup> pueden modular la infectividad de los fagos de *C. jejuni*; la variación de fase crea una población altamente dinámica y es esencial para la adaptación al nicho, en particular para las bacterias asociadas al hospedero (Huang et al., 2009). Los cambios en estas estructuras surgen también en respuesta a la exposición constante a los fagos en el intestino del pollo, lo que da como resultado una coevolución continua y dinámica entre el fago y el huésped (Ushanov et al., 2020). Debido a que esas estructuras superficiales también funcionan como receptores para los bacteriófagos, la variación de fase también puede afectar la infección y es considerada un mecanismo importante de resistencia a los fagos (Kreling et al., 2020; Sørensen et al., 2021).

#### **b) Diversidad de las cepas de *C. jejuni***

La extrema diversidad de cepas de *C. jejuni* es una de las causas del desarrollo de resistencia. Mediante el uso del análisis MLST<sup>16</sup> para caracterizar los aislamientos de *C. jejuni* en cuanto a la secuenciación de los genes que codifican a los receptores para bacteriófagos y comparando con las características de susceptibilidad a los fagos que presentan estas cepas de *C. jejuni*, se ha determinado que pese a contar con los mismos genes esta susceptibilidad es distinta, debido a mutaciones en estos genes (Kittler et al., 2013). Se han reportado también diferentes variantes genéticas de *Campylobacter* en diferentes parvadas de aves de vida libre (Ushanov et al., 2020), lo que a la larga lleva a la diseminación de cepas de *Campylobacter* con modificaciones en sus receptores insensibilizándolas a la infección por fagos.

#### **c) Resistencia debida a mutaciones espontáneas**

Se sabe que los aislados de *Campylobacter* resistentes a los fagos pueden surgir debido a la inversión cromosómica de los genes que codifican las proteínas receptoras de fagos,

---

<sup>15</sup> La variación de fase es un mecanismo común para crear heterogeneidad fenotípica de estructuras superficiales en bacterias importantes para la adaptación al nicho (Sørensen et al., 2021).

<sup>16</sup> La tipificación multilocus de secuencias es una técnica genética para la caracterización taxonómica de bacterias y microorganismos

silenciando su expresión y que además estas cepas resistentes muestran una menor capacidad para colonizar aves (C. M. Loc Carrillo et al., 2007). La incapacidad colonizante se debe a que los receptores de fagos ubicados a nivel flagelar en *Campylocater*, también están involucrados en los mecanismos de colonización de esta bacteria. De hecho, las subpoblaciones de *C. jejuni* susceptibles a los fagos pueden superar a las poblaciones resistentes a los fagos debido al aumento de la motilidad *in vitro* (Kittler et al., 2013).

#### **d) Degradación intracelular del ADN del bacteriófago**

Al ingresar el ADN foráneo a la célula bacteriana, se activan los sistemas RM (restriction/metilase) que constan principalmente de tres tipos de subunidades: subunidades de endonucleasa de restricción que facilitan la escisión del ADN, subunidades de especificidad para la detección de motivos de secuencia de ADN específicos, y subunidades de ADN metilasa (Ushanov et al., 2020). De esta manera, las subunidades de ADN metilasa modifican al material genético del hospedero (ADN metilado). Simultáneamente, las subunidades de reconocimiento de ADN foráneo se anclan al material genético del fago que es fragmentado por las subunidades de endonucleasas.

#### **e) Sistema CRISPR-Cas en *Campylobacter***

Esto da como resultado una infección abortiva y conduce a la muerte de las células infectadas, disminuyendo la propagación de los fagos. Por lo tanto, los sistemas CRISPR-Cas tipo I pueden servir como herramienta para reducir la infección por fagos y proteger de la infección a determinadas poblaciones bacterianas (Ushanov et al., 2020).

##### *ii. Especificidad y eficacia de los bacteriófagos de *Campylobacter**

Durante el aislamiento de un bacteriófago el hospedero empleado en los ensayos determina su especificidad, definiendo el rango de hospederos que los fagos van a tener (Jäckel et al., 2019), por ello en algunos estudios se emplea directamente una cepa problemática antes que alguna de referencia (Yazdi et al., 2020) para lograr tener una

mayor eficacia (capacidad del bacteriófago de eliminar a la bacteria o de reducirla en varios órdenes) durante sus aplicaciones.

*Campylobacter jejuni* NCTC12662 (PT14) se usa a menudo para el aislamiento de nuevos fagos y para los subsecuentes ensayos de caracterización y aplicación, debido a que esta cepa es susceptible a múltiples fagos (Jäckel et al., 2019). Por lo general las placas de lisis producidas por fagos de *Campylobacter* son típicamente pequeñas (~1 mm de diámetro) y ligeramente turbias. Luego, los fagos individuales deben recuperarse mediante tres aislamientos consecutivos de una sola placa (Jäckel et al., 2019; Sørensen et al., 2017), siendo este protocolo el estándar de aislamiento de fagos de *Campylobacter*. Una desventaja que surge al usar una sola cepa de *Campylobacter* para el aislamiento de nuevos fagos, como es el caso de *Campylobacter jejuni* NCTC12662, es que limita la especificidad de los fagos aislados, incidiendo en el rango de hospederos susceptibles.

La mayoría de los fagos del grupo III usan receptores de polisacáridos capsulares (CPS), mientras que los fagos del grupo II se dirigen principalmente a los receptores flagelares (Hammerl et al., 2014; Ushanov et al., 2020) las subpoblaciones muy diversas de *C. jejuni*, así como los procedimientos de aislamiento y enriquecimiento de fagos, influyen en la especificidad y eficacia de los fagos de *Campylobacter* (Ushanov et al., 2020). La aplicación sucesiva de fagos del grupo III y del grupo II reduce el número de *C. jejuni* en pollos de manera más eficiente (H. N. Chinivasagam et al., 2020).

Los fagos del grupo II y del grupo III difieren en cuanto a la especificidad de hospedero, además, la cinética de la infección puede ser diferente. Por esa razón, los cócteles de fagos deben contener miembros de ambos grupos para apuntar a *C. jejuni* y *C. coli*, optimizar la estrategia de aplicación y prevenir la resistencia a los fagos (Jäckel et al., 2019; Sørensen et al., 2017; Ushanov et al., 2020).

### c. Derivados de bacteriófagos como herramientas de biocontrol

Si bien los bacteriófagos son herramientas prometedoras en el control de poblaciones bacterianas, ya sean de relevancia clínica o agropecuaria<sup>17</sup>, se debe tener en claro que la mayoría de estos están en fase de estudio y se debe de tener bastante evidencia sobre su efectividad al elegirlos para aplicarlos, de hecho la expansión de las aplicaciones de fagos se ha visto obstaculizada en parte por los recientes fracasos de la terapia con fagos en los ensayos clínicos, la terapia con fagos, como el rápido desarrollo de resistencia y el largo y complicado camino hacia la aprobación como medicamento, son de menor preocupación en aplicaciones industriales y ambientales (Schwarz et al., 2022), pero no deben ser pasados por alto, al igual que otras tecnologías emergentes, el biocontrol basado en fagos para aplicaciones no tradicionales deben de considerarse cuidadosamente para mitigar posibles fallas y consecuencias no deseadas.

Ante este panorama se pueden aprovechar los mecanismos de lisis y reconocimiento de la bacteria hospedera que tienen los fagos. Sobre la lisis destacan las endolisinas (Abdelrahman et al., 2021; Heselpoth et al., 2021; Jamal et al., 2019), enzimas que lisan la pared bacteriana, lo que provoca que la bacteria explote debido la diferencia de presión osmótica entre el citoplasma y el medio externo (Burrowes, 2018). En el caso del reconocimiento se usan las proteínas de unión a los receptores que emplean los bacteriófagos para anclarse a la bacteria, con un enfoque dedicado al diagnóstico, donde se usan en el desarrollo de pruebas similares a las que emplean anticuerpos; en varios estudios estas pruebas han demostrado ser incluso más específicas en las determinaciones.

La exploración reciente de la resistencia antimicrobiana, la seguridad alimentaria, la inmunogenicidad debida a la aplicación de los bacteriófagos y la sinergia de las endolisinas con los antibióticos ha hecho avanzar aún más la investigación con estas

---

<sup>17</sup> Se tiene productos de fagos prometedores o probados actualmente en el mercado para agrícolas por la EPA103 como por ejemplo XylPhi-PD, fago se demostró que reduce la abundancia de el agente etiológico de la enfermedad de Pierce en las uvas (*Xylella fastidiosa*), actualmente se administra de forma profiláctica (Schwarz et al., 2022).

últimas (Abdelrahman et al., 2021). También se tiene evidencia de que las endolisinas muestran una actividad prometedora contra la formación de biopelículas.

La actividad lítica de las endolisinas se clasifica en diferentes tipos: (a) acetilmuramidasa, (b) transglicosilasa, (c) glucosaminidasa, (d) amidasa y (e) endopeptidasa. El conocimiento de que los lisados de fagos contienen actividad enzimática que podría causar *in vitro* la lisis de las bacterias fue documentada inicialmente por Frederick W. Twort durante su descubrimiento de los bacteriófagos (Burrowes, 2018). Twort definió más tarde un "virus transmisible" (bacteriófago) que solo actúa sobre bacterias vivas, mientras que una "lisina bacteriana" no transmisible secretada por el virus actuaría sobre bacterias muertas (Jamal et al., 2019).

La estructura de las endolisinas es un factor determinado por su origen. Sin embargo, la mayoría de las endolisinas para bacterias Gram-positivas tienen una configuración modular, mientras que las endolisinas que actúan sobre las bacterias Gram-negativas tienen una configuración globular simple (Abdelrahman et al., 2021). Las endolisinas modulares a menudo se caracterizan por la presencia de uno o dos dominios enzimáticamente activos (EAD) N-terminales (multidominio) unidos por una región conectora corta y flexible a un dominio de unión a la pared celular (CBD) C-terminal (Jamal et al., 2019; Zhou et al., 2020).

Múltiples experimentos *in vivo* han demostrado que las endolisinas son efectivas contra una variedad de bacterias Gram-positivas (Heselpoth et al., 2021). Las endolisinas de fago a menudo muestran una fuerte actividad antibacteriana contra las bacterias Gram-positivas, pero una actividad comprometida contra las bacterias Gram-negativas debido a la presencia de una membrana externa protectora, sin embargo, en los últimos años, los enfoques de ingeniería molecular han aumentado la aplicabilidad de las endolisinas para combatir patógenos Gram-negativos (M. R. Clokie et al., 2018; Heselpoth et al., 2021; Jamal et al., 2019).

Una limitación de las endolisinas es la corta vida media *in vivo*, debido a la producción de la respuesta inflamatoria de las citoquinas y los anticuerpos neutralizantes contra ella,

pues provoca una respuesta inmunitaria cuando se utiliza de forma sistemática, por lo que debido a la respuesta inmunitaria pierde su actividad lítica enzimática in vivo (Abdelrahman et al., 2021). Se necesitan más ensayos para comprender la naturaleza inmunogénica de las endolisinas (Yukgehnaish et al., 2022).

### **A. Marco conceptual**

**Bacteriófago, fago:** virus que infectan exclusivamente a las bacterias.

**Concentración bactericida mínima (CBM):** mínima concentración de un antibiótico que, en un período de tiempo predeterminado, es capaz de inducir la muerte in vitro del 99.9% de una población bacteriana.

**Concentración inhibitoria mínima (CIM):** concentración más baja (en  $\mu\text{g/ml}$ ) de un antibiótico que inhibe el crecimiento de una determinada cepa bacteriana.

**Impedimento estérico:** propiedad de la estructura espacial de una molécula que impide o retarda la reacción con otra molécula debido al espacio que utiliza.

**Lisis:** deterioro de una célula debido a una lesión en su membrana plasmática.

**Lítico:** capacidad de causar lisis por medios químicos o físicos (como ondas sonoras de alta energía) o una infección por virus como un bacteriófagos.

**Lisogénico:** capacidad de los virus atenuados o profagos, de no destruir las células que infectan y su genoma pasa a incorporarse al ADN de la célula hospedadora o célula lisogénica.

**Multiplicidad de infección (MOI):** relación entre el número de partículas de virus y el número de células diana presentes en un espacio definido.

**Multidrogosresistencia:** capacidad de un microorganismo de ser resistente a varios antimicrobianos o tipos de antimicrobianos distintos.

**Resistencia:** capacidad de los microorganismos de no responder al tratamiento con los antibióticos creados para eliminarlos o inhibir su crecimiento.

Resistoma: conjunto de genes que se encargan de generar resistencia a los antibióticos.

Unidad formadora de colonia (UFC): una unidad de medida que se emplea para la cuantificación de microorganismos, es decir, para contabilizar el número de bacterias o células fúngicas viables en una muestra líquida o sólida.

Unidad formadora de placa (UFP): medida utilizada en virología para describir el número de partículas de virus capaces de formar placas en un ensayo.

### **III. Formulación de la hipótesis de investigación**

#### **Hipótesis nula ( $H_0$ )**

Los bacteriófagos aislados para *Campylobacter* spp. tienen el potencial para el control biológico de cepas resistentes a antibióticos.

#### **Hipótesis alterna ( $H_i$ )**

Ninguno de los bacteriófagos aislados para *Campylobacter* spp. tienen el potencial para el control biológico de cepas resistentes a antibióticos.

#### IV. Operacionalización de las variables en estudio

Tabla 2. Operacionalización de las variables en estudio									
Objetivos específicos	Variables	Definición conceptual	Definición operacional	Dimensiones	Indicadores	Tipo de variable			
Aislar bacteriófagos con actividad lítica de cepas de <i>Campylobacter</i> a partir de muestras de heces de aves de corral y de vida libre, lodo de granjas y aguas superficiales	Cantidad de bacteriófagos líticos.	Número de bacteriófagos que tienen el potencial lítico como biocontroladores.	Se evaluará cuáles de los bacteriófagos tiene las características de tamaño de los halos de lisis y claridad de las UFP.	Zonas de lisis en la placa Petri	Unidades formadoras de placas (UFP).	Cuantitativa continua			
				Cantidad UFC/ml	UFC/ml en el medio de cultivo, medida en DO a $\lambda_{600nm}$	Cuantitativa continua			
Determinar el potencial lítico de los bacteriófagos aislados	Crecimiento bacteriano en presencia de bacteriófagos	Proceso de multiplicación de múltiples partículas virales en el interior de la bacteria	Se realizará la curva del crecimiento bacteriano entre el tiempo transcurrido tras su inoculación	Tiempo	Minutos	Cuantitativa continua			
				Área bajo la curva	Área que se encuentra bajo la curva de crecimiento bacteriano en presencia de bacteriófagos	Se calculará el área bajo la curva del crecimiento bacteriano entre el tiempo transcurrido tras la inoculación de distintos bacteriófagos a distintas concentraciones.	Área	Área (DO a $\lambda_{600nm}$ /Tiempo)	Cuantitativa continua
				Cantidad de bacterias de <i>Campylobacter</i> en las muestras	Bacterias del género <i>Campylobacter</i> presentes en las muestras de heces, tierra, lodo y aguas superficiales.	Se calculará el número de unidades formadoras de colonia de <i>Campylobacter</i> por gramo o mililitro de muestra	Número de bacterias de <i>Campylobacter</i>	Unidades formadoras de colonias de color rojo en CHROMagar <i>Campylobacter</i> ®	Cuantitativa discreta
Establecer el perfil de resistencia antimicrobiana de cepas de <i>Campylobacter</i> aisladas de heces de aves de corral y de vida libre.	Cantidad de bacterias de <i>Campylobacter</i> en las muestras	Bacterias del género <i>Campylobacter</i> presentes en las muestras de heces, tierra, lodo y aguas superficiales.	Se calculará el número de unidades formadoras de colonia de <i>Campylobacter</i> por gramo o mililitro de muestra	Cantidad de muestra usada	Gramos o mililitros de muestra usada	Cuantitativa continua			
				Diluciones realizadas		Cuantitativa discreta			
				Color de las bacterias con la tinción gram	Bacilo Gram negativo con forma de S o alas de gaviota	Cualitativa nominal			
	Especies del género <i>Campylobacter</i>	Clasificación por tinción de Gram.	Se confirmará microscópicamente la morfología de las bacterias del género <i>Campylobacter</i>	Positivo en la prueba de oxidasa	Positivo: Color morado en tiras de prueba de oxidasa	Cualitativa nominal			
					Negativo: sin desarrollo de color morado en tiras de prueba de oxidasa	Cualitativa nominal			
					Gama hemólisis en agar sangre	Cualitativa nominal			
					Crecimiento y desarrollo bajo condiciones específicas de <i>Campylobacter</i>	Crecimiento en agar BHI en condiciones aerobias	Cualitativa nominal		
	Resistencia de <i>Campylobacter</i> a antibióticos	Identificación del género <i>Campylobacter</i>	Confirmación del género de la muestra bacteriana a través de sus características metabólicas	Crecimiento y desarrollo bajo condiciones específicas de <i>Campylobacter</i>	Crecimiento a 42°C	Cualitativa nominal			
					Tamaño del halo de inhibición	Diámetro del halo de inhibición en milímetros	Cuantitativa continua		
					Clasificación del halo según su diámetro	Sensible, intermedio y resistente de acuerdo a la guía M45 de la guía M45 de la CLSI	Cualitativa ordinal		

### **A. Población en estudio**

Bacteriófagos líticos aislados de muestras de heces y agua de las granjas de pollos de traspatio (comercio minorista).

Bacterias del género *Campylobacter* resistentes a antibióticos, aisladas de muestras de heces y agua de las granjas de pollos de traspatio (comercio minorista) y heces de aves de vida libre.

### **B. Descripción del ámbito de estudio**

Esta investigación se desarrolla en el ámbito de las ciencias biológicas, dentro de las áreas de microbiología, biotecnología y biología molecular. El desarrollo de la investigación se realizó en los laboratorios de Biotecnología Microbiana y Bioquímica Molecular del Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas (IIFB), Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas (FCFB), Universidad Mayor de San Andrés (UMSA).

Las muestras de heces se recolectaron de 2 lugares: de granjas criollas (heces de pollos) y de la Plaza Murillo (heces de aves de vida libre). Las muestras de aguas superficiales (aguas superficiales y aguas de excretas municipales) se recolectaron del Río La Paz de la ciudad de La Paz.

### **C. Tipo de investigación**

El presente trabajo se considera como una investigación aplicada, de alcance observacional y de carácter transversal.

---

Tabla 3. Tipo de investigación de acuerdo a diversos criterios

---

De acuerdo a:

---

Diseño o alcance	Descriptiva observacional
------------------	---------------------------

---

Propósito	Aplicada
-----------	----------

---

Tiempo de investigación	Transversal
-------------------------	-------------

---

## D. Materiales, métodos, técnicas y procedimiento a ser empleados

La figura 2 explica el proceso en general que se ha seguido durante el proceso del aislamiento de bacteriófagos como cepas de *Campylobacter*, por fines explicativos los detalles protocolares de esta metodología se explican en los siguientes apartados.

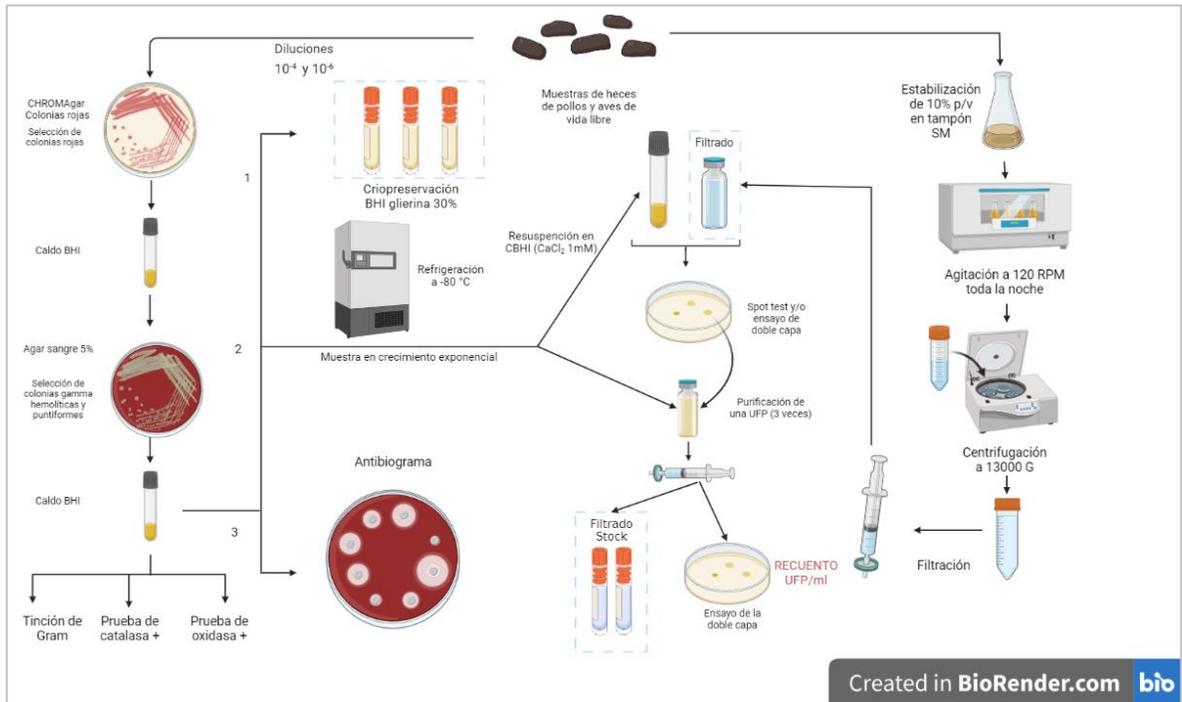


Figura 2. Esquema metodológico empleado en el aislamiento de *Campylobacter*, bacteriófagos de *Campylobacter* y la determinación del perfil de sensibilidad y resistencia (fuente: elaboración propia).

### 1. Aislamiento de bacterias del género *Campylobacter*

El material para el estudio consiste en cepas de *Campylobacter* spp. heces de pollos de granjas criollas, heces de aves de vida libre y aguas superficiales, bajo el siguiente protocolo.

1. El material sólido y semisólido fue diluido en solución fisiológica a una concentración de 10 % (p/v).
2. Diluir en NaCl 0,9 % (p/v) hasta alcanzar de dilución en los órdenes de  $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-8}$ .

3. Filtrar 1000  $\mu\text{L}$  de estas diluciones sobre membranas de nitrocelulosa con poros de 0,22  $\mu\text{m}$ .
4. Colocar las membranas sobre placas de Petri de 50 mm x 50 mm con CHROMagar Campylobacter <sup>®</sup>.
5. Incubar en atmósfera microaerofílica durante 48 horas a 42°C; para la generación de la atmósfera anóxica usar una vela.
6. Realizar el recuento de las colonias rojas.
7. Repicar con una aguja bacteriológica e inocular en caldo BHI.
8. Incubar en atmósfera microaerofílica durante 48 horas a 42°C; para la generación de la atmósfera usar una vela.
9. Tomar muestra del vial del paso 8 con un asa bacteriológica y realizar un cultivo por estría sobre placas de Petri con CHROMagar Campylobacter <sup>®</sup> (con 0,3 % (p/v) de agar adicional).
10. Replicar a las colonias axénicas, en caldo BHI.
11. Incubar en atmósfera microaerofílica durante 48 horas a 42°C; para la generación de la atmósfera usar una vela.
12. Tomar muestra del vial del paso 11 con un asa bacteriológica y realizar un cultivo por estría sobre placas de Petri con Agar sangre (con 5 % (v/v) de sangre).
13. Incubar en atmósfera microaerofílica durante 48 horas a 42°C; para la generación de la atmósfera usar una vela.
14. Resuspender los aislados bacterianos del paso 13 en 1 mL de solución de  $\text{MgSO}_4$  [10 mM]
15. Tomar 375  $\mu\text{L}$  y mezclar en tubos de criopreservación que tengan previamente 1125  $\mu\text{L}$  de solución BHI:glicerol (2:1, v:v) para tener una contracción final de glicerol de 25% (v/v).
16. Congelar en pasos graduales de 4°C, -20°C y -80°C, con cambios de temperatura en periodos de 1 hora.

### 1.1. Determinación del perfil de sensibilidad y resistencia antimicrobiana de cepas de *Campylobacter*

El perfil de sensibilidad antimicrobiana de *Campylobacter* spp se evaluó frente a nueve antibióticos diferentes: Ampicilina, Ampicilina/Ácido clavulánico, Cefepime, Sulfametoxazol/Trimetroprima, Ciprofloxacina, Ácido nalidíxico, Eritromicina, Tetraciclina y Cloranfenicol; bajo la técnica de Kirby Bauer, se siguieron las recomendaciones de la guía CLSI-M45<sup>18</sup> para *Campylobacter*, teniendo como controles a *E. coli* ATCC 25922 y a *S. aureus* ATCC 25923. Se deja en incubación toda la noche una muestra bacteriana en agar sangre (5% v/v de sangre ovina) en condiciones microaerófilas y a 42 °C, se suspenden las colonias en 2mL de 0,9% de NaCl hasta una escala de 0,5 estándares de McFarland, se siembra con ayuda de un hisopo estéril sobre la superficie de un Mueller Hinton Agar (MHA) enriquecido con sangre ovina al 5% (v/v) para obtener un crecimiento en césped o por siembra masiva de bacterias en la superficie de agar. Se colocan discos antimicrobianos espaciados sobre la superficie de la placa de MHA. Las placas se incuban en condiciones microaerófilas a 42 °C durante 24 horas. Tras la incubación el diámetro de la zona de inhibición fue registrado usando un vernier, dato usado para clasificar a la cepa como sensible (S), intermedio (I) y resistente (R) para los antibióticos usados.

### 2. Aislamiento de bacteriófagos contra *Campylobacter*

Se siguió el protocolo descrito por (Sørensen et al., 2017) con ligeras modificaciones. Se disuelven 2 gramos de la muestra en 10 mL de buffer SM, se deja toda la noche en agitación constante sobre un agitador a 120 rpm y 4 °C, tras ello se vierte el sobrenadante en un tubo de centrifugación y se centrifuga a 13000 g por 10 minutos a 4 °C, 5 mL del sobrenadante se filtran con una membrana de nitrocelulosa de 0,22 µm de poro y se guardan a 4 °C para su uso posterior. Para la propagación<sup>19</sup> de bacteriófagos, se mezcla en un tubo de ensayo de 4,5 mL de cultivo fresco y 500 µL de filtrado, se mezclaron con

---

<sup>18</sup> Guía CLSI - M45 3ra edición, Métodos para la dilución y prueba de la susceptibilidad antimicrobiana de aislados infrecuentes o bacterias fastidiosas (traducción al español).

<sup>19</sup> Experimento para aumentar su número para que sean detectables en el ensayo de doble capa.

ayuda de vórtex y se incubaron a 42 °C bajo condiciones microaerofílicas; tras su incubación se aplicó el procedimiento de filtración previamente descrito. La presencia de bacteriófagos en el filtrado se determinó mediante la técnica de “spot test”.

### 2.1. Spot test

Se deja en incubación toda la noche una muestra bacteriana en agar sangre (5% v/v de sangre) en condiciones microaerofílicas y a 42 °C, se suspenden las colonias en 2 mL de 10 mM de MgSO<sub>4</sub> hasta 3,0 en la escala de McFarland, 1 mL de la suspensión se inocula en 9 mL de CBHI (Infusion cerebro corazón suplementado con CaCl<sub>2</sub> 1 mM) y se deja en incubación por 3 horas en condiciones microaerofílicas. Se inoculan 400 µL a un tubo de tapa rosca con 5 mL de agar bando NZCYM (0,5 % de agar) a 45°C, se homogeniza la mezcla y se vierte sobre una caja de Petri con 20 mL de agar NZCYM (1,2 % de agar) a temperatura ambiente, se deja solidificar por 10 minutos en la cabina. Tras ello, 10 µL (por 5 a 6 veces por caja) del filtrado se colocan sobre el agar blando y se deja secar este inóculo por 10 minutos, luego se incuba en condiciones microaerofílicas a 42 °C por 18 a 24 horas, transcurrido el tiempo se observan las UFP (unidades formadoras de placa). Luego se realiza la propagación de una sola UFP y se realiza la técnica de spot test 3 veces para aislar al bacteriófago. Para la titulación de bacteriófagos se realizó el ensayo de doble capa.

### 2.2. Ensayo de doble capa

En la prueba de la doble capa se mezclan en un tubo 200 µL bacteria en fase de crecimiento exponencial (procedimiento previamente descrito) en CBHI y 200 µL del filtrado, esta mezcla se incubará a 42°C por 10 minutos para asegurar la unión de las partículas virales a la bacteria, posteriormente se añade la mezcla a 5 mL de agar blando NZCYM (0,5 % p/v de agar) a 45°C, todo se mezcla con la ayuda de un vórtex y se vierte a una placa con agar NZCYM, se deja agarizar y se incuba bajo condiciones microaerofílicas a 42°C por 24 a 36 horas. Luego se cuentan las UFP en cada placa y se calcula el título.

### 2.3. Propagación de una sola UFP

Las UFP se colectaron mediante punción en la zona de lisis se mezclaron con 200  $\mu\text{L}$  de buffer SM y se realizó el ensayo de doble capa (bajo el procedimiento descrito anteriormente), la selección de una sola UFP se realizó por triplicado. Tras la tercera propagación se concentran los bacteriófagos bajo el protocolo descrito por (Assis et al., 2017), donde el último filtrado de cada muestra se tituló por duplicado realizando diluciones de  $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-8}$  y  $10^{-10}$  del filtrado con buffer SM, para promediar las UFP en el filtrado, que finalmente es almacenado a 4 °C.

## 3. Caracterización parcial de los bacteriófagos

### 3.1. Determinación de la MDI<sup>20</sup> (multiplicidad de infección)

Se realizó el cálculo de MDI (relación UFC/UFP), con el que se obtuvieron datos de afinidad del bacteriófago a su diana, las MDI que se evaluaron son 0,001; 0,01; 0,1; 1 y 10 mediante el análisis de Poisson para determinar la probabilidad de infección. Se realizó el ensayo de doble capa (descrito anteriormente, ajustando el título de bacteriófagos para cada MDI y se calculó la cantidad de UFC infectadas por los bacteriófagos.

### 3.2. Determinación de la estabilidad de los bacteriófagos

En el ensayo se ajustaron los bacteriófagos a  $10^5$  UFP/mL, para el caso de la determinación de la estabilidad respecto al pH, 100  $\mu\text{L}$  de esta muestra ajustada se mezclaron con 900  $\mu\text{L}$  de buffer PBS [100 mM] ajustados a distintos pH (3, 4, 5, 7, 8, 10 y 12), tras 60 minutos de exposición se colocaron 100  $\mu\text{L}$  de esta última muestra en buffer SM (100 mM) a pH 7,2. Esta última mezcla se empleó para determinar el número de bacteriófagos remanentes tras la exposición. En el caso de la temperatura se ajustaron los bacteriófagos a  $10^5$  UFP/mL, y se colocaron en un termoblok a distintas temperaturas (50, 60, 70 y 80 °C) para el caso de -20 °C se usó un congelador de refrigerador, para el caso de 4°C y 20

---

<sup>20</sup> Multiplicity of infection, por sus siglas en inglés.

°C se emplearon ambientes a dicha temperatura y para 37 °C se usó una estufa de incubación.

### 3.3. Rango de hospedero

El ensayo de rango de hospedero (Bacterial Host range) determina la cantidad de cepas bacterianas que son sensibles a un bacteriófago. Debido a que los receptores son diferentes entre bacterias, los bacteriófagos lisan solo las cepas a las que logran reconocer.

En el ensayo se mezclan en un tubo 200 µL de una suspensión de células bacterianas en fase exponencial de crecimiento y 4 mL de agar NZCYM blando (0,45 % p/v agar) a 45 °C, se mezcla con la ayuda de un vórtex y se vierte a una placa con agar NZCYM (1,2 % p/v), tras la solidificación del agar vertido, se siembran 5 µL de cada uno de los lisados de bacteriófagos de forma separada y equidistante, se deja absorber y se incuba bajo condiciones microaerófilas a 42 °C por 24 horas.

### 3.4. Curva de un solo paso

Para el ensayo de la determinación de la “Curva de un solo paso” (One step growth curve) se deja en incubación toda la noche una muestra bacteriana sembrada sobre agar sangre 5 % (v/v), en condiciones microaerófilas y a 42 °C, se suspendieron las colonias en 4 mL de 10 mM de MgSO<sub>4</sub> hasta un aproximado de 1,0 en la escala de McFarland, esta suspensión se alícuota en un matraz con 45 mL de CBHI (Infusión cerebro corazón suplementado con CaCl<sub>2</sub> 1 mM), se inoculan 1000 µL del lisado de fagos a una MOI final de 0,01 y se incuba a 42 °C en condiciones microaerófilas con agitación de 120 rpm. Alícuotas de 500 µL, se toman por triplicado cada 5 minutos y se centrifugan a 13000 g, 250 µL se emplean para realizar un ensayo de doble capa para determinar las UFP.

### 3.5. Evaluación de la capacidad lítica de los de bacteriófagos de *Campylobacter*

En placas de cultivo celular se evaluará la capacidad lítica de los bacteriófagos, colocando las cepas de *Campylobacter* junto con los bacteriófagos a distintas MOI (10; 1; 0,1; 0,01 y 0,001), la densidad óptica de cada placa fue medida en un espectrofotómetro (EPOCH) a  $\lambda_{600 \text{ nm}}$ . El cultivo bacteriano incubado durante la noche se ajustó a 3,0 de la escala de

McFarland en 1 mL de MgSO<sub>4</sub> a una concentración de 10 mM, que se inoculó en 5 mL de CBHI<sup>21</sup>, 250 µL de esta suspensión y 250 µL de bacteriófagos se colocaron en los pocillos de una microplaca de 24 pocillos, se incubaron en condiciones microaerofílicas a 42°C en un agitador y se midió cada hora la DO<sub>600nm</sub>. Como control negativo de crecimiento solo se empleó una mezcla de 250 µL de CBHI y 250 µL de buffer SM y como control positivo de crecimiento 250 µL de suspensión bacteriana y 250 µL de buffer SM.

### A. Procesamiento de los datos

Dada la tabla presentada en la matriz operacional, la recolección de los datos, su elaboración y análisis se presentan como continuación, recogiendo inicialmente los datos de los indicadores.

Tabla 4. Procesamiento de los datos según la matriz operacional

Experimento	Recolección de los datos	Elaboración de los datos	Análisis de los datos
<b>Aislamiento de bacteriófagos</b>	Registro de las UFP contadas en las cajas de Petri	Tabla con los resultados de UFP en los distintos tipos de muestra	Gráfica de barras de las UFP/ml o UFP/g de cada muestra Determinación de la probabilidad de infección con el análisis de Poisson
<b>Curva de un solo paso</b>	Registro de las UFP contadas en las cajas de Petri en cada ensayo de doble placa Registro del tiempo de plaqueo en el ensayo de doble capa en minutos	Tabla de correlación UFP contadas en las cajas de Petri en cada ensayo de doble placa (variable dependiente) y el y tiempo (variable independiente) Gráfica de la curva de crecimiento de un solo paso.	Cálculo de número de tiempo de latencia (periodo de incubación). Cálculo de explosión (nuevas partículas virales / bacteria lisada)
<b>Control en medio líquido</b>	Registro de DO (600 nm) Registro del tiempo de medición de la DO <sub>600</sub> en horas	Tabla de correlación entre la DO (variable dependiente) y el y tiempo (variable independiente).	Gráfica del crecimiento microbiano, en comparación con el control negativo.
<b>Análisis de área bajo la curva</b>	Generación del ABC para cada bacteriófago	Gráfica de barras de las ABC	Análisis de Dunnett de las ABC.
<b>Determinación de estabilidad de los bacteriófagos</b>	Registro de títulos de UFP en distintos rangos de temperatura y pH	Tabla con los resultados de títulos de UFP por rangos de temperatura y pH	Gráfica de barras del porcentaje de recuperación de bacteriófagos

<sup>21</sup> Caldo BHI (Infusión cerebro corazón) suplementado con CaCl<sub>2</sub> a una concentración final de 1 mM.

<b>Determinación de rango de hospedero</b>	Registro formación de al menos una UFP con distintos hospederos	Tabla de determinación de la formación de al menos una UFP con marcas positivas (sencibles a la infección con los fagos) y negativas (no sencibles a la infección con fagos).	Tabla de determinación de la formación de al menos una UFP con marcas positivas (+, casillas de color verde) y negativas (-, color rojo).
<b>Aislamiento de <i>Campylobacter</i></b>	Registro de las UFC contadas en las cajas de Petri Registro de los gramos o mililitros utilizados de la muestra Registro del factor de dilución Registro de las formas observadas (ej.: bacilo, Gram negativo, alas de gaviota) Registro del resultado (+/-) en la prueba de oxidasa Registro del tipo de hemólisis observada en cada placa para cada muestra Registro del desarrollo (positivo o negativo) agar BHI en condiciones aerobias Registro del desarrollo (positivo o negativo) a 42°C	Tabla con los resultados de UFC/ml o UFC/g de cada muestra  Tabla con el resultado de las pruebas de cada muestra	Gráfico de barras con los resultados de UFC/ml o UFC/g de cada muestra  Tabla confirmando o rechazando la pertenencia al género <i>Campylobacter</i>
<b>Determinación del perfil de sensibilidad y resistencia</b>	Registro de los milímetros de diámetro del halo de inhibición	Tabla de clasificación del tamaño de los halos con datos de clasificación de resistencia. El análisis de la condición de sensibilidad o resistencia será determinado en función de la guía CLSI.	Mapa de calor (sensible, intermedio o resistente) para cada antibiótico para cada muestra.  Grafica de barras del total acumulado de cepas resistentes por antibiótico

## **B. Procedimientos administrativos**

### **1. Presupuesto**

La investigación está englobada dentro del proyecto Control biológico con el uso de bacteriófagos de los principales patógenos transmitidos por alimentos, que cuenta con financiamiento directo del Programa de cooperación Asdi-UMSA 2021 - 2025.

## **C. Aspectos bioéticos**

No aplican, debido a que la investigación no abarca el tratamiento de ningún tipo en los animales de las granjas o lugares donde se realizó la toma de muestra.

## V. Resultados y Discusión

### A. Aislamiento de *Campylobacter* spp.

Dentro del género *Campylobacter*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* y *Campylobacter fetus* son las especies más frecuentemente aisladas causantes de enfermedades gastrointestinales (Prachantasena et al., 2016; Quino et al., 2022; Thomas et al., 2020). Estas especies han ido adquiriendo plásmidos y desarrollando cambios cromosomales que les posibilitan tener resistencia a varios antibióticos (EFSA, 2019; Firlieyanti et al., 2016; Ma et al., 2021). La vigilancia epidemiológica de *Campylobacter* es una de las prioridades en seguridad alimentaria, según recomendaciones de la OMS (EFSA, 2011; Fabre et al., 2018; OMS, 2022; Quino et al., 2022), sin embargo, la mayoría de estudios sobre resistencia de *Campylobacter* se llevan a cabo en la UE y EEUU.

En este estudio se aislaron un total de 55 cepas de *Campylobacter* (Tabla anexos). No se obtuvieron aislados de aguas superficiales y la cantidad de aislados de lodo de granja y heces de aves de vida libre fueron menores a las de los aislados desde heces de pollos.

La figura 3, muestra las características de las colonias de *Campylobacter* en agar sangre y medio cromogénico. Los repiques efectuados en agar sangre (Figura 3B) aparte de determinar hemólisis<sup>22</sup> de las colonias inicialmente aisladas en CHROMagar *Campylobacter*® y la su morfología, fueron utilizados como material base para los procedimientos de criopreservación, estas muestras son base para responder los tres objetivos específicos.

---

<sup>22</sup> Las cepas *Campylobacter* han sido reportadas generalmente como bacterias que poseen lipopolisacáridos no hemolíticos, Arimi y sus colegas se demostraron que las cepas de *C. jejuni* y *C. coli* son hemolíticas en placas de agar sangre a 42 °C en virtud de su producción de hemolisina difusible. No suele detectarse hemólisis en las placas de agar sangre por *C. jejuni* y otras especies de *Campylobacter* termófilas crecidas a 37 °C, que podría significar que la temperatura no es adecuada para la producción de hemolisina, dado que el crecimiento es más rápido a 42 °C, la hemolisina se libera antes (Arimi et al., 1990; Grant et al., 1997).



Figura 3. (A) *Campylobacter* (colonias rojas) en el medio cromogénico CHROMagar Campylobacter®, (B) colonias de *Campylobacter* en agar sangre 5% (v/v), (C) Colonias de *Campylobacter* (color rosa) - control de calidad del medio cromogénico CHROMagar Campylobacter®<sup>23</sup>. Laboratorio de Bioquímica Molecular – IIFB/FCFB.

Concomitante al aislamiento descrito, se determinó el número de unidades formadoras de colonias por gramo de muestra (UFC/g) en el medio cromogénico, como se describió en el segmento de metodología. En se obtuvieron medias de  $3,75 \cdot 10^2$ ;  $11,2 \cdot 10^2$  y 96 UFC/g en las muestras de heces de aves de corral, de las heces de vida libre y de lodos de granja, respectivamente.

En las muestras de heces de pollos los recuentos de las UFC/g se registraron valores altos 5 casos, probablemente debido a una sobrepoblación de *Campylobacter* en los pollos (figura 4), sin embargo, en varios estudios se tienen reportes de  $10^8$  UFC por gramo de heces y por encima de esta cantidad cuando se trata del ciego de los pollos (Nowaczek et

<sup>23</sup> Dadas las recomendaciones del proveedor del medio cromogénico CHROMagar Campylobacter® el procedimiento de control de calidad de este medio emplea a *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Enterococcus faecalis*, independientemente se realizó la prueba con *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Para tal ensayo se inoculó 20 µL de muestras reactivadas de criopreservación a -80 °C de *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y de los aislados de *Campylobacter*, en 5 mL de caldo nutritivo (en agar sangre y posteriormente resuspendidas en BHI en el caso exclusivo de *Campylobacter*) tras 24 horas de incubación 10 µL de cada muestra se inocularon puntualmente sobre una placa de CHROMagar Campylobacter®. No se evidenció crecimiento de estas tres cepas de referencia, estableciendo la validez del medio para el aislamiento específico de cepas de *Campylobacter*, todas las cepas de *Campylobacter* probadas en el control de calidad desarrollaron colonias de color rojo (C1 a C21 en caso de la imagen).

al., 2019), entre tanto las muestras de heces de aves de vida libre y lodo de granja tuvieron valores más bajos.

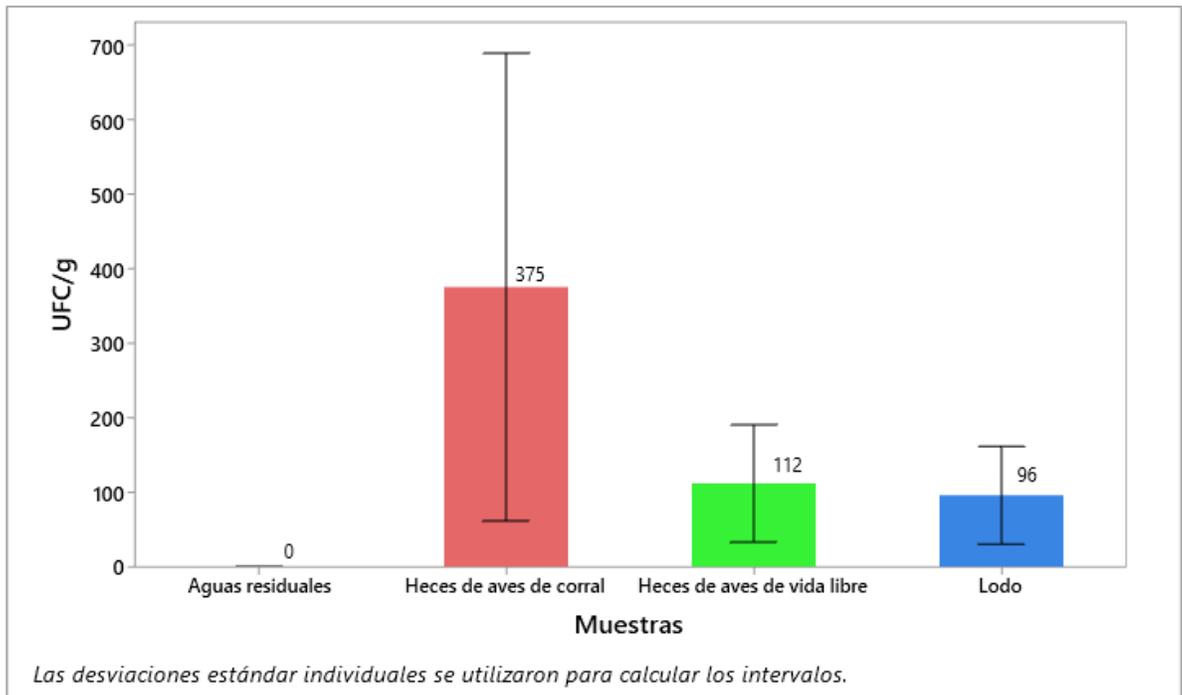


Figura 4. Unidades formadoras de colonias de *Campylobacter* por gramo entre los distintos tipos de muestras.

No se reporta datos de recuento en aguas superficiales debido a que no se detectó *Campylobacter* en estas muestras con esta metodología, lo cual no significa que estas estén exentas de contaminación por *Campylobacter*, más bien, esto puede significar que no se ha evidenciado a este patógeno por la dilución que ejerce el caudal de las aguas superficiales.

La mayoría de los estudios refieren la detección de *Campylobacter* en muestras de carne de pollo en supermercados y en granjas (H. N. Chinivasagam et al., 2020; N. Chinivasagam et al., 2020a; Furuta et al., 2017), no así en aguas superficiales, sin embargo, su detección por técnicas microbiológicas y/o moleculares generarían datos de vigilancia previamente no establecidos localmente.

Se debe tomar en cuenta que las especies de *Campylobacter* se encuentran también presentes en aves de vida libre como palomas y gaviotas, que si bien no tienen una alimentación como la de los pollos de engorde, entran en contacto con la aves de corral y con desechos humanos, como los municipales, aguas superficiales y residuales (Firlieyanti et al., 2016; Hammerl et al., 2014; C. M. Loc Carrillo et al., 2007). Las aves de vida libre tienen una carga de microorganismos patógenos para el ser humano, por lo que el contacto con materia de desecho en el que se sabe que existen genes de resistencia incrementa tanto el riesgo de diseminación de bacterias patógenas y la probabilidad de intercambio de material genético entre microorganismos (Hammerl et al., 2014; Qin et al., 2012).

Al respecto, Bautista y colaboradores (2009) realizaron un estudio de la Facultad de Medicina de la Univerisidad Mayor de San Andrés, en este determinaron la presencia de *Campylobacter* spp. en heces de palomas y gallinas, este estudio reportó por primera vez en Bolivia la presencia de especies de *Campylobacter* de relevancia clínica tanto en aves de vida libre como de corral en la ciudad de La Paz.

#### B. Sensibilidad fenotípica de resistencia antimicrobiana de *Campylobacter* spp.

Se realizó un ensayo de sensibilidad antimicrobiana por el método de difusión de discos, con las 55 cepas de *Campylobacter* aisladas. Los datos del mapa de calor del perfil de sensibilidad (Figura 5) muestra que una gran parte de las cepas aisladas presentan resistencia a ampicilina, ciprofloxacina, ácido nalidíxico y a sulfametoxazol/trimetoprim.

De acuerdo a la OMS, las cepas de *Campylobacter* resistentes a fluoroquinolonas, están clasificadas como de alta prioridad (Ma et al., 2021; WHO, 2017). En este estudio se determinó resistencia a fluoroquinolonas, tanto a ciprofloxacina como al ácido nalidíxico en un 63,3 % (35/55) y 76,4 % (42/55) de cepas, respectivamente, información que coincidiendo con otras investigaciones en las que se ha observado tendencias crecientes de resistencia a fluoroquinolonas de *Campylobacter jejuni* principalmente en muestras de carne y heces de pollos de engorde y otros animales de granjas (Dudzic et al., 2016; Hull et al., 2021; Lin et al., 2002; C. M. Loc Carrillo et al., 2007; Samarth & Kwon, 2020; Silva et al., 2011). Respecto a la resistencia a fluoroquinolonas, el estudio realizado el 2009 por

Olaguibel reporta 70 % de cepas de *Campylobacter spp.* resistentes a ciprofloxacina de un total de 44 cepas aisladas de muestras de heces de pacientes con síndrome diarreico. El 63,3 % de cepas resistentes a ciprofloxacina presentadas en este estudio representan un peligro directo para los productores y manipuladores de alimentos de alimentos están bajo el riesgo de transmisión de *Campylobacter* resistente a fluoroquinolonas entre otras bacterias patógenas, no estando exentos de contaminación los consumidores finales.

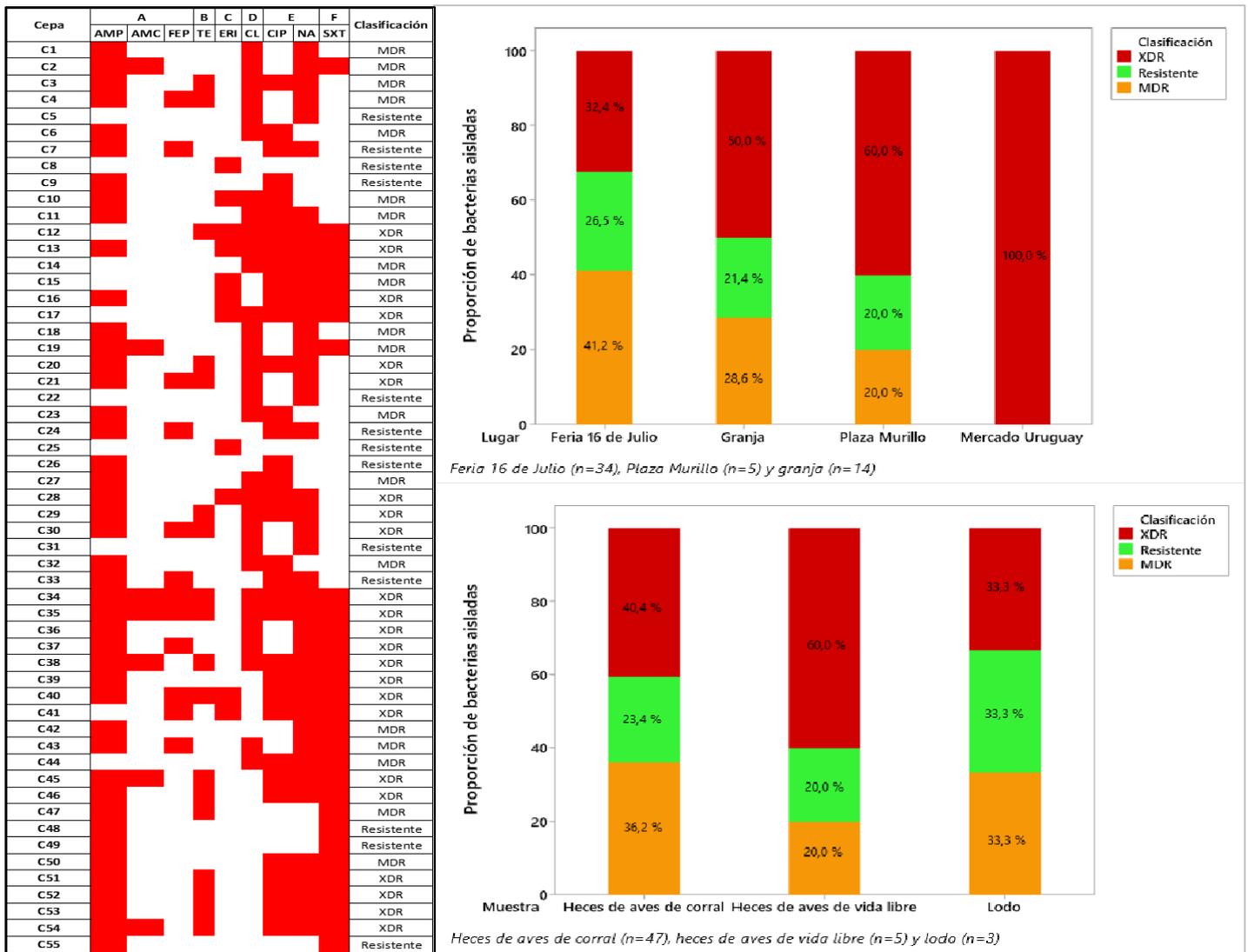


Figura 5. A. Mapa del perfil de sensibilidad y resistencia de *Campylobacter*: blanco significa sensible y rojo significa resistente; se tienen a los antibióticos en grupos de acuerdo a la clasificación del tipo de antibiótico (A: penicilinas, B: tetraciclinas, C: macrólidos, D: anfenicoles, E: quinolonas y F:

sulfonamidas). B. Proporción de bacterias XDR, MDR y resistentes aisladas por lugar de toma de muestra.  
C. Proporción de bacterias XDR, MDR y resistentes aisladas por tipo de muestra.

Se estableció la clasificación de la resistencia en MDR y XDR de acuerdo al criterio acordado por la Organización Panamericana de la Salud, en la que se considera MDR a una cepa que es resistente al menos a un agente antimicrobiano en tres o más categorías antimicrobianas y XDR a las cepas que son resistentes al menos a un agente en todas las categorías excepto en una o dos de ellas, es decir, los aislamientos bacterianos siguen siendo sensibles solo a una o dos categorías (Melano, 2017). Esta clasificación se observa el mapa del perfil de sensibilidad y resistencia de cada cepa. En esta gráfica se toma en cuenta la clasificación de intermedio como resistente debido a que no se tratan de cepas aisladas de muestras clínicas, en las que esta definición ayuda en la decisión clínica de incrementar la dosis del antibiótico a administrar, sino se trata de cepas ambientales sobre las que esta definición no es apropiada, puesto que la resistencia, aunque intermedia es un indicio potencial de la presencia de mecanismos de resistencia a antimicrobianos.

En la figura 5, se muestra la distribución de las cepas categorizadas como MDR y XDR de acuerdo al sitio de aislamiento (figura 5B) y al tipo de muestra (figura 5C). Este análisis revela que hay cepas MDR y XDR en heces tanto en pollos de granja, pollos comercializados en la “Feria 16 de Julio”, en el “Mercado Uruguay” y en aves de vida libre (palomas). Interesantemente, en proporción se tienen más cepas XDR en muestras de heces de palomas colectadas de La Plaza Murillo (60 %), que en granjas de traspatio (50 %) y que en la Feria 16 de Julio (32,4 %). En el caso específico del mercado Uruguay, las únicas dos cepas aisladas son XDR, sin embargo el dato más relevantes es que ninguna de las cepas aisladas resultó ser sensible a ninguno de los antibióticos ensayados, dado que todas las cepas resultaron ser resistentes al menos a un antibiótico (figura 5A).

Respecto al tipo de muestra se encontró que hay más cepas XDR en aves de vida libre (60 %) que en aves de corral y lodo de granjas (40,4 % y 33,3 %, respectivamente). Estos resultados indican que las cepas que se encuentran en aves de vida libre poseen

mecanismos de resistencia antimicrobianos y ameritan tener un sistema de vigilancia, aparte de unos especializado en el sector de producción de alimentos.

Dado el concepto de One Health, estas cepas de *Campylobacter* spp. probablemente se extendieron desde aves de corral y pasaron a las aves de vida libre como las palomas por consumo de alimentos contaminados con heces de pollos, o de otros animales, dado que este género bacteriano se encuentra diseminado en varios animales, entre los que figuran otros relacionados a actividades ganaderas como ovejas, cerdos y ganado bovino (Di Giannatale et al., 2019; Lopez-Chavarrias et al., 2021; Thomas et al., 2020). De igual manera, el perfil de resistencia de estas cepas puede ser el resultado de la exposición de residuos de alimentos contaminados con cepas de *Campylobacter* spp. en los vertederos y puntos de desecho de basura en la ciudad de La Paz, teniendo en cuenta que este género si bien no se desarrolla bajo ciertas condiciones características, puede permanecer en los alimentos por largos periodos de tiempo (Davis & Conner, 2007; Luangtongkum et al., 2009), esperando a que las condiciones mejoren. La carne es una fuente de proteínas y la producción de ganado y aves es fundamental para el sustento de las personas, el procesamiento centralizado y los sistemas más intensivos y a gran escala se han relacionado con la aparición de enfermedades zoonóticas (Thomas et al., 2020).

El seguimiento sistemático de la resistencia a los antimicrobianos en *Campylobacter* spp. y del uso de antimicrobianos es necesario en el desarrollo de estrategias adecuadas para controlar el uso indebido de antimicrobianos<sup>24</sup> (Di Giannatale et al., 2019). La vigilancia continua de *Campylobacter* y su perfil de sensibilidad y resistencia debe ser una de las tareas fundamentales de los entes encargados de esta clase de servicios.

En Bolivia no existe una base de datos referencial local sobre *Campylobacter*, sino estudios de tesis realizados en la Universidad Mayor de San Andrés, sin embargo, la mayoría de estos son muy desactualizados, pero son la única información existente de este

---

<sup>24</sup> La heterorresistencia (cambios metabólicos no incluyentes de mutaciones o HTG) puede representar el comienzo de una adquisición de resistencia clínicamente relevante (Martinez, 2014).

patógeno a nivel nacional. Olaguibel (2009) presentó el perfil de resistencia de *Campylobacter* spp en muestras clínicas (heces de pacientes con diarrea) y el estudio de Bautista y colaboradores (2009) determinó la presencia de *Campylobacter* en heces de aves de vida libre; únicamente el estudio de Condori (2022) es reciente pero solo presenta datos descriptivos de la presencia de *Campylobacter* spp en carnes, sin profundizar en el estudio del perfil de resistencia. En Bolivia se tiene la falencia de información actualizada de campylobacteriosis que es aún inexistente por la falta de un sistema de reporte de casos y de resistencia antimicrobiana al menos fenotípica de este patógeno, aún más desconocidos son los datos de *Campylobacter* en el sector agropecuario.

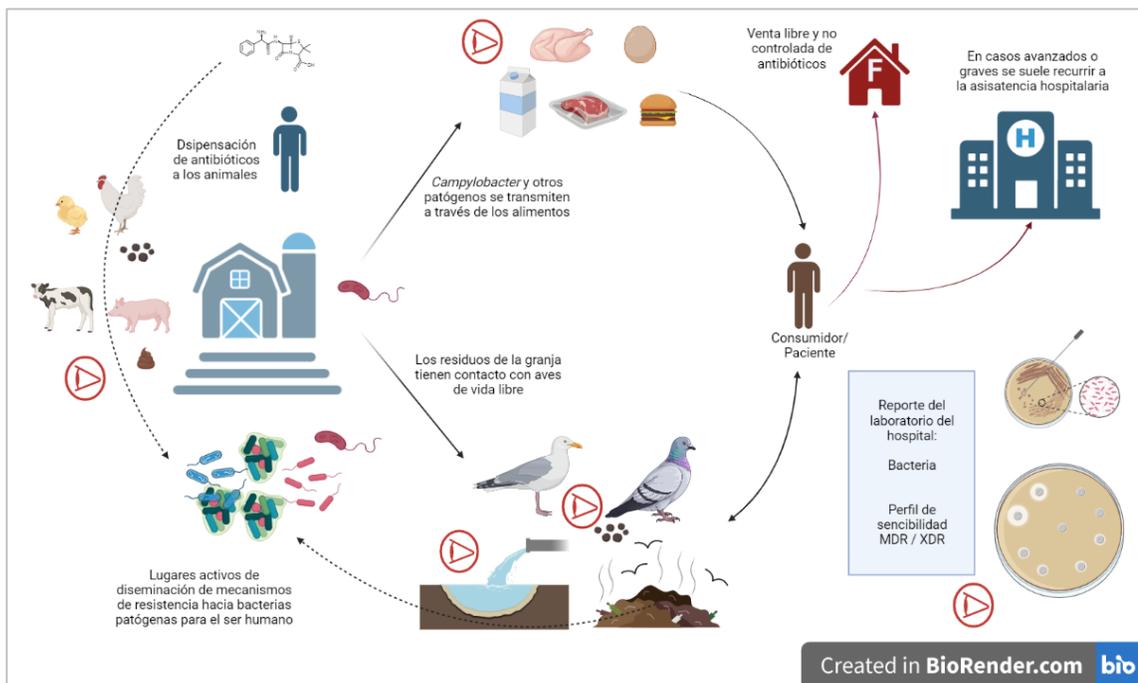


Figura 6. Flujo de contaminación por bacterias transmitidas a través de los alimentos. Se resume la problemática de la falta de vigilancia de *Campylobacter* en muestras alimenticias, sitios de producción y crianza de los animales y el contacto con aves de vida libre y el consumidor final que llega a infectarse con este patógeno. Los sitios donde se tiene el símbolo de observación son aquellos donde se amerita realizar una vigilancia de los principales patógenos transmitidos por alimentos.

La fácil diseminación de las bacterias transmitidas por alimentos requiere de la mejora continua de los sistemas de vigilancia para estos patógenos, estos sistemas deben considerar a los sitios de producción de los animales que son en los que se dispensan

antibióticos. Dada la problemática actual de la diseminación de bacterias patógenas, un sistema de vigilancia debería de tomar en cuenta a: las granjas o factorías, los sitios de venta de los productos (supermercados y sitios de venta minorista), aguas residuales, aguas superficiales, heces de aves de vida libre y contrastar estos datos con los generados por los hospitales respecto a la incidencia y resistencia de enfermedades transmitidas por alimentos, como se muestra en la figura 6.

### C. Aislamiento y propagación de bacteriófagos

Se aislaron 5 bacteriófagos cuyas morfologías de placa se observan en la figura 7, todos de muestras de heces de pollos. Se usó la cepa 2 de *Campylobacter* (C2) como cepa de propagación. Las suspensiones de bacteriófagos aislados se guardaron buffer SM a 4°C en para posteriores experimentos.

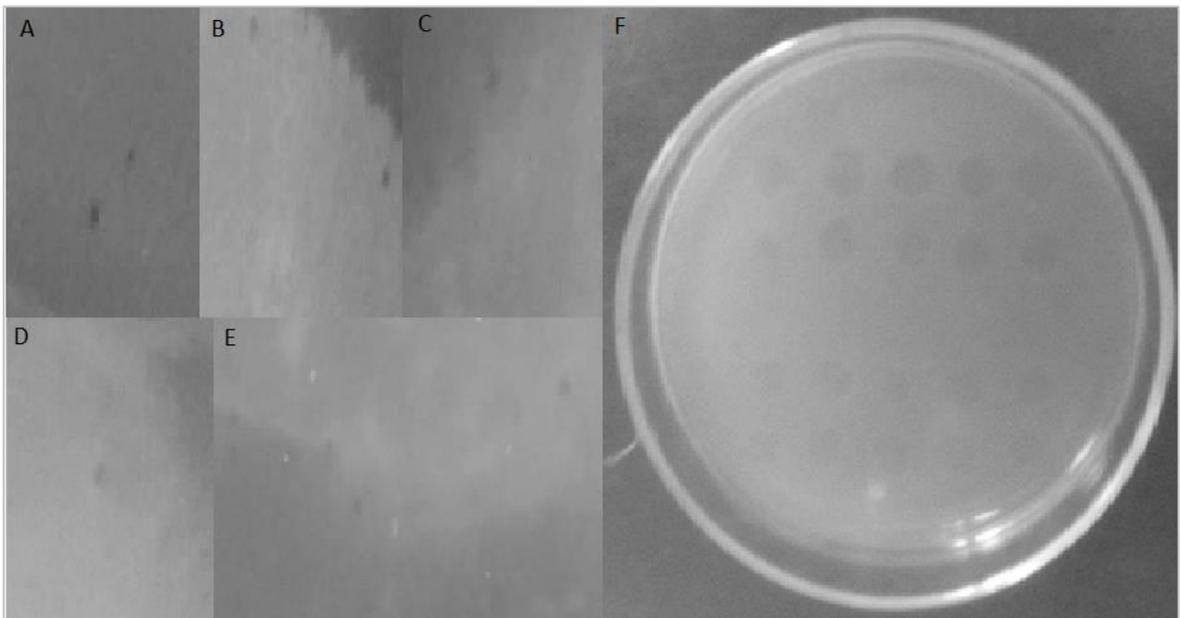


Figura 7. Unidades formadoras de placas de 5 bacteriófagos, 16J-B1 (A), 16-F5 (B), GC1-C3 (C), 16J-H2 (D), GC1-K11 (E). Zonas de lisis por la aplicación de fagos concentrados (F). Laboratorio de Bioquímica Molecular – IIFB/FCFB.

#### D. Determinación de la MDI<sup>25</sup> (multiplicidad de infección)

Se realizó el cálculo de MDI (relación UFC/UFP) mediante la distribución de Poisson. Las MDI que se evaluaron fueron 0,01; 0,1; 1 y 10. Para cada MDI se determinó la cantidad de bacterias no infectadas tras 5 minutos de exposición a los bacteriófagos y se calculó la cantidad de bacterias infectadas por quintuplicado, la proporción de bacterias supervivientes (que no fueron infectadas) se graficó respecto a la MDI de cada bacteriófago. Previamente se realizó el análisis de Poisson para calcular la probabilidad de infección. Los datos obtenidos concuerdan con la probabilidad teórica de infección y supervivencia (figura 8).

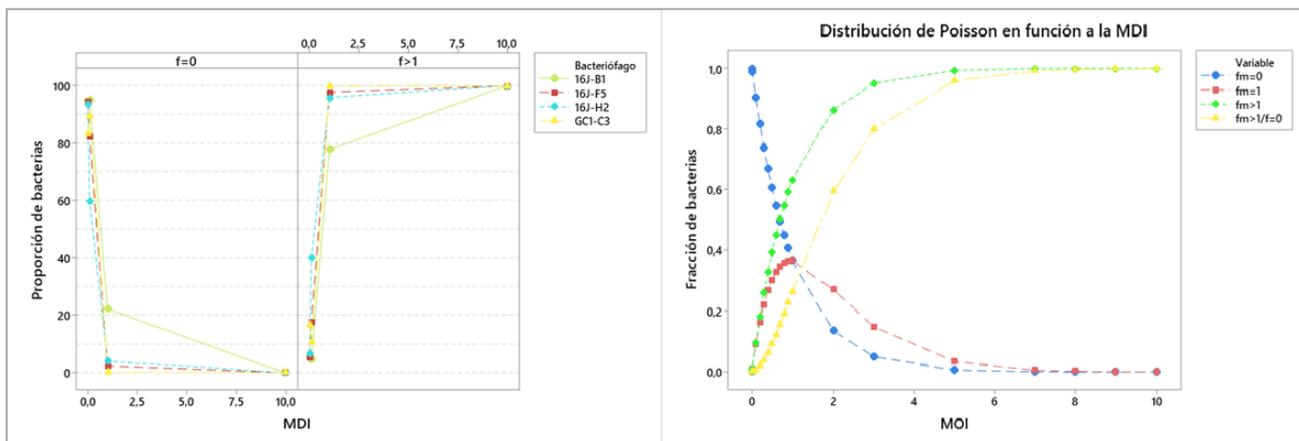


Figura 8. A. Proporción de bacterias que fueron ( $f>1$ ) y no fueron ( $f=0$ ) infectadas a distintas MOI. B. Distribución de Poisson,  $f=0$  representa la fracción de bacterias no infectadas,  $f=1$  representa la fracción de bacterias infectadas por un bacteriófagos,  $f>1$  representa la cantidad de bacterias infectadas por más de un bacteriófago, y  $f>1/f=0$  representa el número de bacterias que absorbieron un bacteriófago del total de bacterias infectadas.

#### E. Estabilidad de los bacteriófagos en distintos rangos de temperatura y pH

Los 4 bacteriófagos ensayados son estables tras periodos de incubación en un rango amplio tanto de temperatura como de pH, desde 4 a 50 °C, y de 3 a 10, respectivamente. Los títulos de bacteriófagos probablemente varían debido a la biología del virus, la cantidad de UFC/mL que se forman a partir de una célula infectada y el tiempo de incubación del virus. En la figura 9 se muestra la estabilidad de los bacteriófagos para

<sup>25</sup> Multiplicity of infection, por sus siglas en inglés.

poder ser aplicados en estos rangos. Como la gran mayoría de virus, los parámetros de estabilidad suelen ser semejantes a medida que cambia la variable, sin embargo, en los límites de su rango estable los títulos bajan de forma abrupta, o simplemente no se evidencian, como en los resultados descritos por (Steffan et al., 2021).

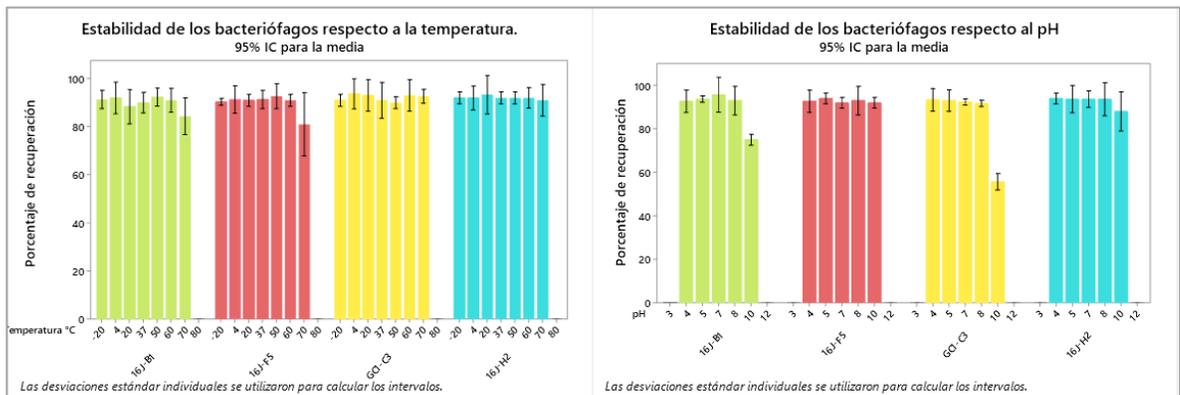


Figura 9. Estabilidad de los bacteriófagos en distintos rangos de pH (izquierda) y temperatura (derecha). Se graficaron los rangos de recuperación (UFP/mL) de los bacteriófagos respecto al título (UFP/mL) de inóculo en cada experimento.

#### F. Rango de hospedero

Se probó el rango de hospedero con las 55 cepas de *Campylobacter*, se observa que los bacteriófagos tienen especificidad sobre ciertas cepas de *Campylobacter* y que sobre la mayoría de las cepas, ningún bacteriófago tiene efecto lítico. También se probaron los bacteriófagos con cepas bacterianas de referencia, sin encontrar actividad lítica sobre estas, infiriendo una alta especificidad de los bacteriófagos incluso entre aislados del mismo género bacteriano (Tabla 5).

Respecto a la actividad lítica de los bacteriófagos para *Campylobacter*, la limitada cantidad de hospederos para estos fagos, se debe probablemente al hecho de que estos tienen distintos sitios de anclaje en la bacteria diana. Los bacteriófagos del grupo II y III tienen al flagelo y a polisacáridos capsulares como sitios de anclaje respectivamente (Jäckel et al., 2019; Ushanov et al., 2020), respecto al flagelo suelen existir modificaciones de ciertas proteínas por lo que, una nueva conformación puede conferir fago resistencia (Puxty & Millard, 2023), determinando que varias cepas bacterianas no sean sensibles a

los fagos aislados. El análisis de la susceptibilidad a bacteriófagos debe ser meticuloso (Jäckel et al., 2019; Steffan et al., 2021), debido a que el funcionamiento de estos virus *in vitro* puede no ser similar en casos de aplicación *in situ* (Furuta et al., 2017), teniendo como precedente que la fagorresistencia es uno de los principales retos de las aplicaciones de bacteriófagos.

Tabla 5. Rango de hospederos de los fagos aislados

Cepa	16J-B1	16J-F5	GC1-C3	16J-H2	GC1-K11	Cepa	16J-B1	16J-F5	GC1-C3	16J-H2	GC1-K11
C1	+	-	-	+	-	C31	-	-	-	-	-
C2	+	+	+	+	+	C32	-	-	-	-	-
C3	+	-	+	-	-	C33	-	-	-	-	-
C4	+	-	-	-	-	C34	-	-	-	-	-
C5	-	+	-	-	-	C35	-	-	-	-	+
C6	-	+	-	-	-	C36	-	-	-	-	-
C7	-	-	-	-	-	C37	-	-	-	-	-
C8	-	-	-	-	-	C38	-	-	-	-	-
C9	-	+	-	-	-	C39	-	-	-	-	-
C10	-	-	-	-	-	C40	-	-	-	-	-
C11	-	-	-	-	-	C41	-	-	-	-	-
C12	-	-	-	-	-	C42	-	-	-	-	-
C13	-	-	-	-	-	C43	-	-	-	-	-
C14	-	-	-	-	-	C44	-	-	-	-	-
C15	-	-	-	-	-	C45	-	+	-	-	-
C16	-	-	-	-	-	C46	-	-	-	-	-
C17	-	-	-	-	-	C47	-	-	-	-	-
C18	-	-	-	-	-	C48	-	-	-	-	-
C19	-	-	-	-	-	C49	-	-	-	-	-
C20	-	-	-	-	-	C50	-	-	-	-	-
C21	-	-	-	-	-	C51	-	-	-	-	-
C22	-	-	-	-	-	C52	-	-	-	-	-
C23	-	-	-	-	-	C53	-	-	-	-	-
C24	-	-	-	-	-	C54	-	-	-	-	-
C25	-	-	-	-	-	C55	-	-	-	-	-
C26	-	-	-	-	-	<i>E. coli</i> 25922	-	-	-	-	-
C27	-	-	-	-	-	<i>S. aureus</i> 22923	-	-	-	-	-
C28	-	+	-	-	-	<i>K. pneumoniae</i>	-	-	-	-	-
C29	-	-	-	-	-	<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	-	-
C30	-	-	-	-	-	<i>E. faecalis</i>	-	-	-	-	-

### G. Curva de un solo paso

En la determinación de la curva de un solo paso, se calculó un tamaño de explosión de 14,45 nuevas partículas virales por centro infeccioso para el bacteriófago 16J-F5, tras un tiempo de incubación de 75 minutos. Durante este periodo, los títulos de bacteriófagos permanecieron en una concentración baja respecto al recuento de UFP después de los 90 minutos durante el ensayo (figura 10).

### H. Control en medio líquido

Se probaron 4 bacteriófagos de los 5 iniciales, debido a que el fago GC1-K11 mostró tener zonas de lisis más turbias que el resto, en el ensayo de rango de hospedero, por lo que fue descartado para este análisis. Los fagos se probaron frente a la cepa de propagación (C2) en ensayo de cinética en el que se determinó la densidad óptica en una placa de cultivo de 24 pocillos, las lecturas fueron tomadas cada hora durante 25 horas, con subsecuentes incubaciones en condiciones microarero-fílicas entre lecturas (figura 11).

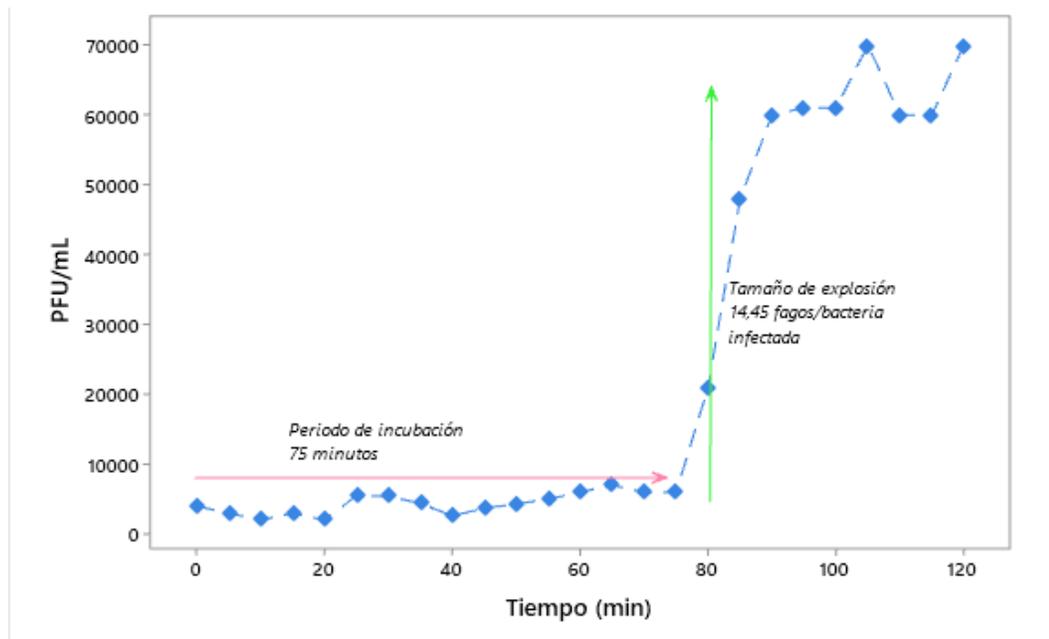


Figura 10. Curva de un solo paso del bacteriófagos 16J-F5, el tamaño de explosión se determina con la relación de la media de los títulos bajos y la media de los títulos altos, el periodo de incubación se determinó con el último punto antes de un incremento de títulos.

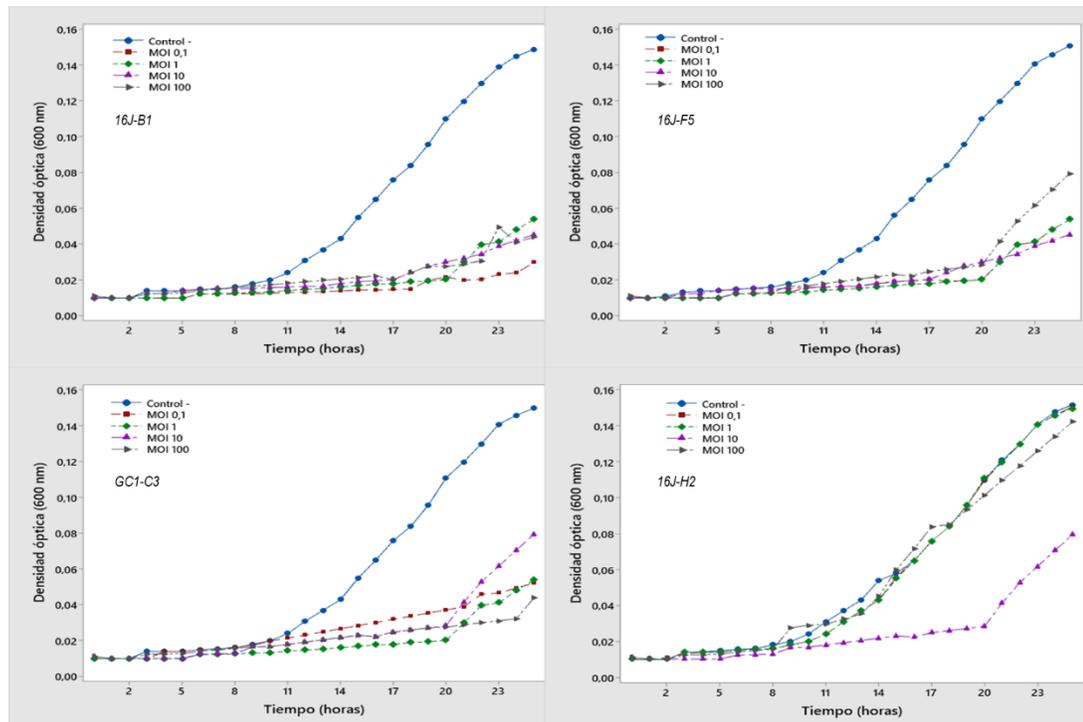


Figura 11. Control de *Campylobacter* en medio líquido a distintas MDI de bacteriófagos.

Los datos del rango de hospedero determinaron sobre cuales cepas bacterianas son funcionales los bacteriófagos, sin embargo, no son una medida cuantitativa para determinar cuan eficaces son los bacteriófagos. Las cinéticas de control (figura 10) muestran la dinámica de crecimiento y control de la bacteria en un ambiente controlado; sin embargo para analizar esta cinética de control se recurrió a calcular el área de bajo de la curva (ABC) de cada ensayo, para luego compararla con la de un control (ensayo sin bacteriófago).

Se realizó el análisis de Dunnett ( $\alpha=0,05$ ) para determinar si las ABC son significativamente diferentes respecto al control negativo. Se encontró que existen diferencias estadísticamente significativas entre los ensayos respecto a los controles a excepción de los experimentos con el  $\phi 4$  MDI 0,1 ( $p=0,999$ ) y  $\phi 4$  MDI 1 ( $p=0,993$ ), en ambos casos las AUC no son diferentes respecto al control. El resto de los ensayos sí tienen diferencias significativas, por lo que los bacteriófagos lograron reducir el desarrollo de *Campylobacter* (figura 12).

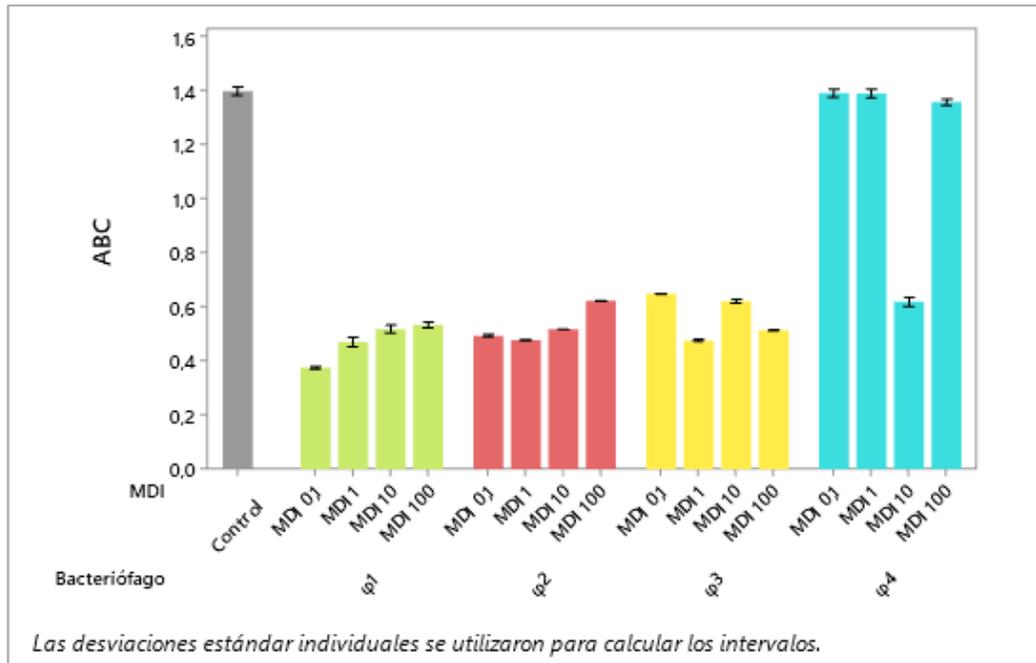


Figura 12. Áreas bajo la curva de la cinética de crecimiento a partir de la figura 11.

Steffan y colaboradores obtuvieron en su estudio cepas de *Campylobacter* spp. resistentes a bacteriófagos al final de cada experimento con cada combinación de fago y cepa bacteriana, esto explica el fenómeno de resistencia de la cepa C2<sup>26</sup> al fago 16J-H2 ensayado en la cinética de control en medio líquido (figura 4), cepa que no respondió ante ninguna combinación de MDI. En el control en medio líquido la disminución de la DO<sub>600</sub> es significativa respecto al control, sin embargo, al pasar las 20 horas de incubación el crecimiento aumenta a una tasa mayor, este es otro ejemplo de la fagoresistencia. Otros estudios presentan resultados similares con algunos bacteriófagos de *Campylobacter* y *E. coli* (Abdelrahman et al., 2022; Steffan et al., 2021).

Está claro que queda mucho trabajo por hacer para lograr una reducción significativa y constante de *C. jejuni* en las diferentes etapas de la producción de pollos de engorde (Liang et al., 2020; Orquera et al., 2012). Davis y sus colegas demostraron experimentalmente

<sup>26</sup> También se debe de considerar que los bacteriófagos de *Campylobacter* usan sitios poli G para generar diversidad genética y de esta forma evadir los mecanismos de fagoresistencia (Sørensen et al., 2017), por lo que en el ambiente pueden existir fagos para la cepa C2 y que por lo tanto puedan servir en su biocontrol.

que *Campylobacter* es viable tanto en la piel como en la carne de pollo a temperaturas refrigeradas (Davis & Conner, 2007), por lo que la reducción del patógeno a bajas temperaturas solo puede lograrse mediante un número muy alto de fagos que provocan la lisis desde el exterior (Orquera et al., 2012) considerando que la dosis infecciosa de *Campylobacter* es de  $10^4$  células bacterianas (Lopez-Chavarrias et al., 2021; Quino et al., 2022).

Para una actividad más amplia y una mayor potencia contra *C. jejuni*, es recomendable que las aplicaciones de polífagos (cócteles de fagos) dirigidas a este patógeno estén compuestas por fagos que posean proteínas de unión a flagelos y a grupos de carbohidratos en la membrana exterior (N. Chinivasagam et al., 2020a; Fischer et al., 2013; Hammerl et al., 2014; Łusiak-Szelachowska et al., 2020; Picozzi et al., 2021), realizar una terapia con fagos en las aves 1 o 2 días antes del sacrificio podría ayudar a evitar la resistencia a los bacteriófagos (Carvalho et al., 2010).

Lo más probable es que la eliminación exitosa de este patógeno se logre implementando estrictas medidas de bioseguridad combinadas con tratamientos con fagos y suplementos probióticos<sup>27</sup> (EFSA, 2011; Li et al., 2020; Ushanov et al., 2020), lo que hace que la investigación continua en todas las áreas sea necesaria y relevante. La caracterización y secuenciación de nuevos aislados de fagos de *C. jejuni* es muy necesaria para obtener más conocimientos sobre estos virus (M. Clokie & Kropinski, 2001; Jäckel et al., 2019).

---

<sup>27</sup> Por ejemplo, se tiene reportes de que la ingestión de un probiótico en combinación con un cóctel de fagos de *E. coli* disminuye las concentraciones de *Desulfovibrio* y aumenta la colonización de *Lactobacillus* en relación con el tratamiento únicamente con el probiótico o en combinación con antibióticos (Schwarz et al., 2022).

## **VI. Conclusiones**

Existe una considerable cantidad de cepas resistentes a antibióticos de las cuales el 34,5% (19/55) son MDR, 41,8% (23/55) son XDR, el 87,3% (48/55) de las cepas son resistentes a fluoroquinolonas clasificándolas como cepas de prioridad elevada de investigación para la OMS.

Se aislaron 5 bacteriófagos de los cuales 4 tienen potencial como biocontroladores de determinadas cepas de *Campylobacter* resistentes a antibióticos.

Estos 4 bacteriófagos redujeron significativamente el crecimiento de *Campylobacter* en el ensayo *in-vitro* de cinética, dado que se encontró que existen diferencias estadísticamente significativas de las ABC de las OD<sub>600</sub> entre los ensayos en medio líquido con bacteriófagos a MOI 0,1 hasta MOI 10 respecto a los controles.

## **Recomendaciones**

Se requiere tener un sistema de vigilancia epidemiológica regional y nacional que provea de información base para posteriores estudios con fines de investigación y cuidado de la salud pública. Esta vigilancia debe tomar en cuenta el concepto de One Health, que implica incluir salud humana, animal y ambiental, lo que significa tratar muestras no solo de alimentos, sino de excretas de animales de granja, muestras hospitalarias, de aguas superficiales y ambientales.

El Programa Nacional de Enfermedades Transmitidas por Alimentos es un área especializada del Ministerio de Salud y Deportes que informa Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETAs), pero no ofrece información sobre *Campylobacter*. Por otro lado, el Instituto Nacional de Laboratorios en Salud, de Bolivia (INLASA) en los reportes de la Red de Laboratorios Oficiales de Análisis de Alimentos (RELOAA) solo reporta *Escherichia coli*, coliformes termotolerantes, *Salmonella* spp, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* e informan de la resistencia antimicrobiana de cepas aisladas de muestras de alimentos. En ambos casos hasta la fecha no se observan reportes de determinaciones de *Campylobacter*.

La vigilancia de los genes de resistencia a antimicrobianos en estos tipos de muestras proveerá de datos epidemiológicos acerca de la diseminación de ciertos genes en el ambiente, por lo tanto, puede ayudar a tomar medidas preventivas respecto al uso incorrecto de antibióticos.

En el caso específico de *Campylobacter* la determinación de gen flagelar (*flaA*, *flaB* y *flaC*) y otros genes de factores de virulencia es de vital importancia para conocer a las cepas locales y por lo tanto poder disponer de una base de datos que permita usar bacteriófagos u otras herramientas de biocontrol de *Campylobacter*.

Es necesario investigar a mayor profundidad la biología de los campylófagos conocer sus límites para poder hacer un uso correcto de los bacteriófagos durante el control biológico de cepas de *Campylobacter* resistentes a antibióticos.

## VII. Bibliografía

- Abdelrahman, F., Easwaran, M., Daramola, O. I., Ragab, S., Lynch, S., Oduselu, T. J., Khan, F. M., Ayobami, A., Adnan, F., Torrents, E., Sanmukh, S., & El-Shibiny, A. (2021). Phage-encoded endolysins. *Antibiotics*, *10*(2), 1–31.  
<https://doi.org/10.3390/antibiotics10020124>
- Alfredson, D. A., & Korolik, V. (2007). Antibiotic resistance and resistance mechanisms in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *FEMS Microbiology Letters*, *277*(2), 123–132. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00935.x>
- Anampa, D., Benites, C., Lázaro, C., Espinoza, J., Angulo, P., Díaz, D., Manchego, A., & Rojas, M. (2020). Detección del gen ermB asociado a la resistencia a macrólidos en cepas de *Campylobacter* aisladas de pollos comercializados en Lima, Perú. *Revista Panamericana de Salud Pública*, *44*, 1.  
<https://doi.org/10.26633/rpsp.2020.60>
- Andrews, J. M. (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *48*(SUPPL. 1), 5–16.  
[https://doi.org/10.1093/jac/48.suppl\\_1.5](https://doi.org/10.1093/jac/48.suppl_1.5)
- Arenas, N. E., & Melo, V. M. (2018). Producción pecuaria y emergencia de antibiótico resistencia en Colombia: Revisión sistemática. In *Infectio* (Vol. 22, Issue 2).  
<https://doi.org/10.22354/in.v22i2.717>
- Arimi, S. M., Park, R. W. A., & Fricker, C. R. (1990). Study of haemolytic activity of some *Campylobacter* spp. on blood agar plates. *Journal of Applied Bacteriology*, *69*(3), 384–389. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1990.tb01528.x>
- Assis, A. S. F., Otenio, M. H., Drumond, B. P., Fumian, T. M., Miagostovich, M. P., & da Rosa e Silva, M. L. (2017). Optimization of the skimmed-milk flocculation method for recovery of adenovirus from sludge. *Science of the Total Environment*, *583*, 163–168. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.01.045>
- Atterbury, R. J., Connerton, P. L., Dodd, C. E. R., Rees, C. E. D., & Connerton, I. F. (2003). Isolation and characterization of *Campylobacter* bacteriophages from retail poultry. *Applied and Environmental Microbiology*, *69*(8), 4511–4518.  
<https://doi.org/10.1128/AEM.69.8.4511-4518.2003>
- Bachoual, R., Ouabdesselam, S., Mory, F., Lascols, C., Soussy, C. J., & Tankovic, J. (2001). Single or double mutational alterations of gyrA associated with fluoroquinolone resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Microbial Drug Resistance*, *7*(3), 257–261.  
<https://doi.org/10.1089/10766290152652800>
- Bautista Mollo, G. W., Barra Clavijo, R., Aruquipa Castro, R. M., Acarapi Villanueva, G. A., Aroja Santos, M., & Balboa Silva, P. (2009). Pesquisa de *Campylobacter* spp. en heces de Palomas y Gallinas. *SCientífica*, *7*(1), 26–28.  
<http://www.revistasbolivianas.ciencia.bo/pdf/rsscem/v7n1/v7n1a07.pdf>
- Biswas, D., Fernando, U. M., Reiman, C. D., Willson, P. J., Townsend, H. G. G., Potter, A. A., & Allan, B. J. (2007). Correlation between in vitro secretion of virulence-

- associated proteins of *Campylobacter jejuni* and colonization of chickens. *Current Microbiology*, 54(3), 207–212. <https://doi.org/10.1007/s00284-006-0295-z>
- Blair, J. M. A., Richmond, G. E., & Piddock, L. J. V. (2014). Multidrug efflux pumps in Gram-negative bacteria and their role in antibiotic resistance. *Future Microbiology*, 9(10), 1165–1177. <https://doi.org/10.2217/FMB.14.66>
- Blair, J. M. A., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O., & Piddock, L. J. V. (2014). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Publishing Group*, 13(1), 42–51. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3380>
- Burrowes, B. H. (2018). *Stephen T. Abedon, Benjamin H. Burrowes, Malcolm L. McConville, David R. Harper - Bacteriophages\_ Biology, Technology, Therapy- Springer (2018).pdf*.
- Bush, N. G., Diez-Santos, I., Abbott, L. R., & Maxwell, A. (2020). Quinolones: Mechanism, lethality and their contributions to antibiotic resistance. *Molecules*, 25(23). <https://doi.org/10.3390/molecules25235662>
- Carvalho, C. M., Gannon, B. W., Halfhide, D. E., Santos, S. B., Hayes, C. M., Roe, J. M., & Azeredo, J. (2010). The in vivo efficacy of two administration routes of a phage cocktail to reduce numbers of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* in chickens. *BMC Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-232>
- Centro Europeo para la Prevención y el Control de las Enfermedades. (2013). *Informe De Vigilancia. 7*. <https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/media/es/publications/Publications/Annual-Epidemiological-Report-2012.pdf>
- Chen, Y., Batra, H., Dong, J., Chen, C., Rao, V. B., & Tao, P. (2019). Genetic engineering of bacteriophages against infectious diseases. *Frontiers in Microbiology*, 10(MAY), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00954>
- Chinivasagam, H. N., Estella, W., Maddock, L., Mayer, D. G., Weyand, C., Connerton, P. L., & Connerton, I. F. (2020). Bacteriophages to Control *Campylobacter* in Commercially Farmed Broiler Chickens, in Australia. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00632>
- Chinivasagam, N., Estella, W., Cockerill, S., Maddock, L., Mayer, D., Billington, C., Premaratne, A., Liang, L., Connerton, P., & Connerton, I. (2020a). A Biocontrol Option to Control a Foodborne Pathogen; Using *Campylobacter* Bacteriophages to Control *Campylobacter* in Poultry. *Proceedings*, 36(1), 162. <https://doi.org/10.3390/proceedings2019036162>
- Chinivasagam, N., Estella, W., Cockerill, S., Maddock, L., Mayer, D., Billington, C., Premaratne, A., Liang, L., Connerton, P., & Connerton, I. (2020b). A Biocontrol Option to Control a Foodborne Pathogen; Using *Campylobacter* Bacteriophages to Control *Campylobacter* in Poultry. *Proceedings*, 36(1), 162. <https://doi.org/10.3390/proceedings2019036162>
- Clokie, M., & Kropinski, A. M. (2001). Bacteriophages: Methods and Protocols. Volume 2. In *Springer Protocols* (Vol. 531, Issue 1). <http://books.google.com/books?id=Ku2wPAAACAAJ>
- Clokie, M. R., Kropinski, A. M., & Lavigne, R. (2018). Bacteriophages, Methods and Protocols Volume III. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1681).

- <http://www.springer.com/series/7651>
- CLSI. (2015). Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria. In *Guidelines CLSI* (3rd Editio, Vol. 35, Issue 17). CLSI.
- Condori, M. (2022). Evaluación de la presencia de *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* y *Salmonella* spp en carne cruda de pollo, de expendio en la ciudad de La Paz. *Universidad Mayor de San Andrés*.
- Connerton, P. L., Timms, A. R., & Connerton, I. F. (2011). *Campylobacter* bacteriophages and bacteriophage therapy. *Journal of Applied Microbiology*, *111*(2), 255–265. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05012.x>
- Cota-Rubio, E., Hurtado-Ayala, L., Pérez-Morales, E., & Alcántara-Jurado, L. (2014). Resistencia a antibióticos de cepas bacterianas aisladas de animales destinados al consumo humano. *Revista Iberoamericana de Ciencias*, *1*(1), 75–85.
- Crespo, M. D., Olson, J. W., Altermann, E., Siletzky, R. M., & Kathariou, S. (2012). Chromosomal tet(O)-harboring regions in *Campylobacter coli* isolates from Turkeys and swine. *Applied and Environmental Microbiology*, *78*(23), 8488–8491. <https://doi.org/10.1128/AEM.02258-12>
- Davis, M. A., & Conner, D. E. (2007). Survival of *Campylobacter jejuni* on poultry skin and meat at varying temperatures. *Poultry Science*, *86*(4), 765–767. <https://doi.org/10.1093/ps/86.4.765>
- Di Giannatale, E., Calistri, P., Di Donato, G., Decastelli, L., Goffredo, E., Adriano, D., Mancini, M. E., Galleggiante, A., Neri, D., Antoci, S., Marfoglia, C., Marotta, F., Nuvoloni, R., & Migliorati, G. (2019). Thermotolerant *Campylobacter* spp. In chicken and bovine meat in Italy: Prevalence, level of contamination and molecular characterization of isolates. *PLoS ONE*, *14*(12), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0225957>
- Domínguez Navarrete, N. (2020). Bacteriófagos. *Revista de La Facultad de Medicina Humana*, *20*(1), 164–165. <https://doi.org/10.25176/rfmh.v20i1.2554>
- Dudzic, A., Urban-Chmiel, R., Stępień-Pyśniak, D., Dec, M., Puchalski, A., & Wernicki, A. (2016). Isolation, identification and antibiotic resistance of *Campylobacter* strains isolated from domestic and free-living pigeons. *British Poultry Science*, *57*(2), 172–178. <https://doi.org/10.1080/00071668.2016.1148262>
- EFSA. (2011). Scientific Opinion on *Campylobacter* in broiler meat production: control options and performance objectives and/or targets at different stages of the food chain. *EFSA Journal*, *9*(4). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.2105>
- EFSA. (2016). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. *EFSA Journal*, *14*(12). <https://doi.org/10.2903/J.EFSA.2016.4634>
- EFSA. (2019). The European Union One Health 2018 Zoonoses Report. *EFSA Journal*, *17*(12). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5926>
- Elmi, A., Nasher, F., Dorrell, N., Wren, B., & Gundogdu, O. (2021). Revisiting *Campylobacter jejuni* Virulence and Fitness Factors: Role in Sensing, Adapting, and Competing. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.607704>

- Endersen, L., & Coffey, A. (2020). The use of bacteriophages for food safety. *Current Opinion in Food Science*, *36*, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.10.006>
- Fabre, A., Oleastro, M., Nunes, A., Santos, A., Sifré, E., Ducournau, A., Bénéjat, L., Buissonnière, A., Floch, P., Mégraud, F., Dubois, V., & Lehours, P. (2018). Whole-genome sequence analysis of multidrug-resistant campylobacter isolates: A focus on aminoglycoside resistance determinants. *Journal of Clinical Microbiology*, *56*(9). <https://doi.org/10.1128/JCM.00390-18>
- Firleyanti, A. S., Connerton, P. L., & Connerton, I. F. (2016). Campylobacters and their bacteriophages from chicken liver: The prospect for phage biocontrol. *International Journal of Food Microbiology*, *237*, 121–127. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.08.026>
- Fischer, S., Kittler, S., Klein, G., & Glünder, G. (2013). Impact of a Single Phage and a Phage Cocktail Application in Broilers on Reduction of Campylobacter jejuni and Development of Resistance. *PLoS ONE*, *8*(10), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078543>
- Florez-Cuadrado, D., Ugarte-Ruiz, M., Quesada, A., Palomo, G., Domínguez, L., & Concepción Porrero, M. (2016). Description of an erm(B)-carrying Campylobacter coli isolate in Europe. *J Antimicrob Chemother*, *71*, 841–847. <https://doi.org/10.1093/jac/dkv383>
- Furuta, M., Nasu, T., Umeki, K., Minh, D. H., Honjoh, K. I., & Miyamoto, T. (2017). Characterization and application of lytic bacteriophages against campylobacter jejuni isolated from poultry in Japan. *Biocontrol Science*, *22*(4), 213–221. <https://doi.org/10.4265/bio.22.213>
- Ghimire, L., Singh, D. K., Basnet, H. B., Bhattarai, R. K., Dhakal, S., & Sharma, B. (2014). Prevalence, antibiogram and risk factors of thermophilic campylobacter spp. in dressed porcine carcass of Chitwan, Nepal. *BMC Microbiology*, *14*(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2180-14-85>
- Gomes, F. R., Curcio, B. R., Ladeira, S. R. L., Fernández, H., & Meireles, M. C. A. (2006). Campylobacter jejuni occurrence in chicken fecal samples from small properties in Pelotas, Southern of Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, *37*(3), 375–378. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822006000300032>
- Goode, D., Allen, V. M., & Barrow, P. A. (2003). Reduction of experimental Salmonella and Campylobacter contamination of chicken skin by application of lytic bacteriophages. *Applied and Environmental Microbiology*, *69*(8), 5032–5036. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.8.5032-5036.2003>
- Grant, K. A., Belandía, I. U., Dekker, N., Richardson, P. T., & Park, S. F. (1997). Molecular characterization of pldA, the structural gene for a phospholipase A from Campylobacter coli, and its contribution to cell-associated hemolysis. *Infection and Immunity*, *65*(4), 1172–1180. <https://doi.org/10.1128/iai.65.4.1172-1180.1997>
- Guernier-Cambert, V., Trachsel, J., Maki, J., Qi, J., Sylte, M. J., Hanafy, Z., Kathariou, S., & Looft, T. (2021). Natural Horizontal Gene Transfer of Antimicrobial Resistance Genes in Campylobacter spp. From Turkeys and Swine. *Frontiers in Microbiology*, *12*(September). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.732969>
- Guerry, P., Alm, R. A., Power, M. E., Logan, S. M., & Trust, T. J. (1991). Role of two

- flagellin genes in *Campylobacter* motility. *Journal of Bacteriology*, 173(15), 4757–4764. <https://doi.org/10.1128/jb.173.15.4757-4764.1991>
- Hammerl, J. A., Jäckel, C., Alter, T., Janzcyk, P., Stingl, K., Knüver, M. T., & Hertwig, S. (2014). Reduction of campylobacter jejuni in broiler chicken by successive application of group II and group III phages. *PLoS ONE*, 9(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114785>
- Han, J., Wang, Y., Sahin, O., Shen, Z., Guo, B., Shen, J., & Zhang, Q. (2012). A fluoroquinolone resistance associated mutation in gyrA Affects DNA supercoiling in *Campylobacter jejuni*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2, 21. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00021>
- Harada, L. K., Silva, E. C., Campos, W. F., Del Fiol, F. S., Vila, M., Dąbrowska, K., Krylov, V. N., & Balcão, V. M. (2018). Biotechnological applications of bacteriophages: State of the art. In *Microbiological Research* (Vols. 212–213, pp. 38–58). Elsevier GmbH. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.04.007>
- Heselpoth, R. D., Swift, S. M., Linden, S. B., Mitchell, M. S., & Nelson, D. C. (2021). Enzybiotics: Endolysins and Bacteriocins. In *Bacteriophages* (Issue January). [https://doi.org/10.1007/978-3-319-41986-2\\_34](https://doi.org/10.1007/978-3-319-41986-2_34)
- Hormeño, L., Ugarte-Ruiz, M., Palomo, G., Borge, C., Florez-Cuadrado, D., Vadillo, S., Píriz, S., Domínguez, L., Campos, M. J., & Quesada, A. (2018). Ant(6)-I genes encoding aminoglycoside O-nucleotidyltransferases are widely spread Among streptomycin resistant strains of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Frontiers in Microbiology*, 9(OCT). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02515>
- Huang, J. L., Xu, H. Y., Bao, G. Y., Zhou, X. H., Ji, D. J., Zhang, G., Liu, P. H., Jiang, F., Pan, Z. M., Liu, X. F., & Jiao, X. A. (2009). Epidemiological surveillance of *Campylobacter jejuni* in chicken, dairy cattle and diarrhoea patients. *Epidemiology and Infection*, 137(8), 1111–1120. <https://doi.org/10.1017/S0950268809002039>
- Huemer, M., Mairpady Shambat, S., Brugger, S. D., & Zinkernagel, A. S. (2020). Antibiotic resistance and persistence—Implications for human health and treatment perspectives. *EMBO Reports*, 21(12). <https://doi.org/10.15252/embr.202051034>
- Hull, D. M., Harrell, E., van Vliet, A. H. M., Correa, M., & Thakur, S. (2021). Antimicrobial resistance and interspecies gene transfer in *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* isolated from food animals, poultry processing, and retail meat in North Carolina, 2018–2019. *PLoS ONE*, 16(2 February). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0246571>
- Jäckel, C., Hammerl, J. A., & Hertwig, S. (2019). *Campylobacter* phage isolation and characterization: What we have learned so far. *Methods and Protocols*, 2(1), 1–11. <https://doi.org/10.3390/mps2010018>
- Jacob, J., Evers, S., Bischoff, K., Carlier, C., & Courvalin, P. (1994). Characterization of the sat4 gene encoding a streptothricin acetyltransferase in *Campylobacter coli* BE/G4. In *FEMS Microbiology Letters* (Vol. 120, Issues 1–2). <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1994.tb07000.x>
- Jamal, M., Bukhari, S. M. A. U. S., Andleeb, S., Ali, M., Raza, S., Nawaz, M. A., Hussain, T., Rahman, S. u., & Shah, S. S. A. (2019). Bacteriophages: an overview of the control strategies against multiple bacterial infections in different fields. In

- Journal of Basic Microbiology* (Vol. 59, Issue 2, pp. 123–133). Wiley-VCH Verlag. <https://doi.org/10.1002/jobm.201800412>
- Kaakoush, N. O., Castaño-Rodríguez, N., Mitchell, H. M., & Man, S. M. (2015). Global epidemiology of campylobacter infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(3), 687–720. <https://doi.org/10.1128/CMR.00006-15>
- Kakasis, A., & Panitsa, G. (2019). Bacteriophage therapy as an alternative treatment for human infections. A comprehensive review. In *International Journal of Antimicrobial Agents* (Vol. 53, Issue 1, pp. 16–21). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.09.004>
- Kandari, S. Al. (2013). *Characterization and comparison of Campylobacter Bacteriophages*. June, 297.
- Kittler, S., Fischer, S., Abdulmawjood, A., Glünder, G., & Kleina, G. (2013). Effect of bacteriophage application on *Campylobacter jejuni* loads in commercial broiler flocks. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(23), 7525–7533. <https://doi.org/10.1128/AEM.02703-13>
- Kordi, Y., & Khakipour, N. (2021). Evaluation of Three Isolation Experiments for *Campylobacter* Bacteriophages from Chicken Skin: A Comparative Study. *Asian Food Science Journal*, 20(11), 162–171. <https://doi.org/10.9734/afsj/2021/v20i1130385>
- Kreling, V., Falcone, F. H., Kehrenberg, C., & Hensel, A. (2020). *Campylobacter* sp.: Pathogenicity factors and prevention methods—new molecular targets for innovative antivirulence drugs? *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(24), 10409–10436. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10974-5>
- Laws, M., Shaaban, A., & Rahman, K. M. (2019). Antibiotic resistance breakers: current approaches and future directions. *FEMS Microbiology Reviews*, 014, 490–516. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuz014>
- Lee, M. D., & Newell, D. G. (2006). *Campylobacter* in poultry: Filling an ecological niche. *Avian Diseases*, 50(1), 1–9. <https://doi.org/10.1637/7474-111605R.1>
- Li, T., Teng, D., Mao, R., Hao, Y., Wang, X., & Wang, J. (2020). A critical review of antibiotic resistance in probiotic bacteria. In *Food Research International* (Vol. 136). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109571>
- Liang, L., Carrigy, N. B., Kariuki, S., Muturi, P., Onsare, R., Nagel, T., Vehring, R., Connerton, P. L., & Connerton, I. F. (2020). Development of a lyophilization process for *Campylobacter* bacteriophage storage and transport. *Microorganisms*, 8(2). <https://doi.org/10.3390/microorganisms8020282>
- Liebert, M. A., Kanamycin, P., Gibreel, A., Sköld, O. L. A., & Taylor, D. E. (2004). *Characterization of Plasmid-Mediated*. 10(2), 98–105.
- Lin, J., Overbye Michel, L., & Zhang, Q. (2002). CmeABC functions as a multidrug efflux system in *Campylobacter jejuni*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(7), 2124–2131. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.7.2124-2131.2002>
- Loc Carrillo, C., Atterbury, R. J., El-Shibiny, A., Connerton, P. L., Dillon, E., Scott, A., & Connerton, I. F. (2005). Bacteriophage therapy to reduce *Campylobacter jejuni* colonization of broiler chickens. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(11), 6554–6563. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.6554-6563.2005>

- Loc Carrillo, C. M., Connerton, P. L., Pearson, T., & Connerton, I. F. (2007). Free-range layer chickens as a source of Campylobacter bacteriophage. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 92(3), 275–284. <https://doi.org/10.1007/s10482-007-9156-4>
- Lopez-Chavarrias, V., Ugarte-Ruiz, M., Barcena, C., Olarra, A., Garcia, M., Saez, J. L., de Frutos, C., Serrano, T., Perez, I., Moreno, M. A., Dominguez, L., & Alvarez, J. (2021). Monitoring of Antimicrobial Resistance to Aminoglycosides and Macrolides in Campylobacter coli and Campylobacter jejuni From Healthy Livestock in Spain (2002–2018). *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.689262>
- Luangtongkum, T., Jeon, B., Han, J., Plummer, P., Logue, C. M., & Zhang, Q. (2009). Antibiotic resistance in Campylobacter: Emergence, transmission and persistence. *Future Microbiology*, 4(2), 189–200. <https://doi.org/10.2217/17460913.4.2.189>
- Łusiak-Szelachowska, M., Weber-Dąbrowska, B., & Górski, A. (2020). Bacteriophages and Lysins in Biofilm Control. *Virologica Sinica*, 35(2), 125–133. <https://doi.org/10.1007/s12250-019-00192-3>
- Ma, L., Konkel, M. E., & Lu, X. (2021). Antimicrobial Resistance Gene Transfer from Campylobacter jejuni in Monoand Dual-Species Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 87(15), 1–17. <https://doi.org/10.1128/AEM.00659-21>
- Martinez, J. L. (2014). General principles of antibiotic resistance in bacteria. *Drug Discovery Today: Technologies*, 11(1), 33–39. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2014.02.001>
- McInnes, R. S., McCallum, G. E., Lamberte, L. E., & Schaik, W. Van. (2020). ScienceDirect Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in the human gut microbiome. *Current Opinion in Microbiology*, 53, 35–43. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2020.02.002>
- Melano, R. G. (2017). *Detección y notificación de patógenos multi-resistentes, con resistencia extrema o pan-resistentes*. 1–26. <https://www.paho.org/en/file/47264/download?token=9xbRTYW2>
- Mourkas, E., Florez-Cuadrado, D., Pascoe, B., Calland, J. K., Bayliss, S. C., Mageiros, L., Méric, G., Hitchings, M. D., Quesada, A., Porrero, C., Ugarte-Ruiz, M., Gutiérrez-Fernández, J., Domínguez, L., & Sheppard, S. K. (2019). Gene pool transmission of multidrug resistance among Campylobacter from livestock, sewage and human disease. *Environmental Microbiology*, 21(12), 4597–4613. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14760>
- Moye, Z. D., Woolston, J., & Sulakvelidze, A. (2018). Bacteriophage applications for food production and processing. *Viruses*, 10(4). <https://doi.org/10.3390/v10040205>
- Nguyen, B. A. T., Chen, Q. L., He, J. Z., & Hu, H. W. (2020). Microbial regulation of natural antibiotic resistance: Understanding the protist-bacteria interactions for evolution of soil resistome. In *Science of the Total Environment* (Vol. 705). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135882>
- Nowaczek, A., Urban-Chmiel, R., Dec, M., Puchalski, A., Stępień-Pyśniak, D., Marek, A., & Pyzik, E. (2019). Campylobacter spp. and bacteriophages from broiler chickens: Characterization of antibiotic susceptibility profiles and lytic

- bacteriophages. *MicrobiologyOpen*, 8(7). <https://doi.org/10.1002/mbo3.784>
- Ocejo, M., Oporto, B., Lavín, J. L., & Hurtado, A. (2021). Whole genome-based characterisation of antimicrobial resistance and genetic diversity in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from ruminants. *Scientific Reports*, 11(1), 8998. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-88318-0>
- Olaguibel, O. L. (2009). *MONITOREO DE LA RESISTENCIA ANTIMICROBIANA DE Campylobacter spp. EN CUATRO HOSPITALES DE LA CIUDAD DE LA PAZ – BOLIVIA 2005 -2006*. 1–97. <https://repositorio.umsa.bo/handle/123456789/1008/browse?value=CAMPYLOBACTER+SPP.&type=subject>
- OMS. (2022). *Enfermedades de transmisión alimentaria*.
- Orquera, S., Gözl, G., & Hertwig, S. (2012). Control of *Campylobacter* spp. and *Yersinia enterocolitica* by virulent bacteriophages. *Journal of Molecular and Genetic Medicine*, 06(01), 273–278. <https://doi.org/10.4172/1747-0862.1000049>
- Owens, J., Barton, M. D., & Heuzenroeder, M. W. (2013). The isolation and characterization of *Campylobacter jejuni* bacteriophages from free range and indoor poultry. *Veterinary Microbiology*, 162(1), 144–150. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.08.017>
- Paczesny, J., & Bielec, K. (2020). Application of bacteriophages in nanotechnology. *Nanomaterials*, 10(10), 1–25. <https://doi.org/10.3390/nano10101944>
- Picozzi, C., Garcia, P., & Vives, M. (2021). Editorial: Bacteriophages to Fight Food-Borne Pathogens/Phages Struggling for Food Safety. *Frontiers in Microbiology*, 12, 741387. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.741387>
- Pinto-Alphandary, H., Mabilat, C., & Courvalin, P. (1990). Emergence of aminoglycoside resistance genes *aadA* and *aadE* in the genus *Campylobacter*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 34(6), 1294–1296. <https://doi.org/10.1128/AAC.34.6.1294>
- Prachantasena, S., Charunontakorn, P., Muangnoicharoen, S., Hankla, L., Techawal, N., Chaveerach, P., Tuitemwong, P., Chokesajjawatee, N., Williams, N., Humphrey, T., & Luangtongkum, T. (2016). Distribution and genetic profiles of *campylobacter* in commercial broiler production from breeder to slaughter in Thailand. *PLoS ONE*, 11(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149585>
- Pumbwe, L., & Piddock, L. J. V. (2002). Identification and molecular characterisation of CmeB, a *Campylobacter jejuni* multidrug efflux pump . In *FEMS Microbiology Letters* (Vol. 206, Issue 2). <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2002.tb11007.x>
- Puxty, R. J., & Millard, A. D. (2023). Functional ecology of bacteriophages in the environment. In *Current Opinion in Microbiology* (Vol. 71). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2022.102245>
- Qin, S., Wang, Y., Zhang, Q., Chen, X., Shen, Z., Deng, F., Wu, C., & Shen, J. (2012). Identification of a novel genomic island conferring resistance to multiple aminoglycoside antibiotics in *Campylobacter coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(10), 5332–5339. <https://doi.org/10.1128/AAC.00809-12>
- Quino, W., Caro-Castro, J., Hurtado, V., Flores-León, D., Gonzalez-Escalona, N., & Gavilan, R. G. (2022). Genomic Analysis and Antimicrobial Resistance of

- Campylobacter jejuni and Campylobacter coli in Peru. *Frontiers in Microbiology*, 12(January), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.802404>
- Richards, P. J., Connerton, P. L., & Connerton, I. F. (2019). Phage biocontrol of Campylobacter jejuni in chickens does not produce collateral effects on the gut microbiota. *Frontiers in Microbiology*, 10(MAR), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00476>
- Samarth, D. P., & Kwon, Y. M. (2020). Horizontal genetic exchange of chromosomally encoded markers between Campylobacter jejuni cells. *PLoS ONE*, 15(10 October). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0241058>
- San Millan, A. (2018). Evolution of Plasmid-Mediated Antibiotic Resistance in the Clinical Context. In *Trends in Microbiology* (Vol. 26, Issue 12, pp. 978–985). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.06.007>
- Schwarz, C., Mathieu, J., Gomez, J. A. L., Yu, P., & Alvarez, P. J. J. (2022). *Renaissance for Phage-Based Bacterial Control*. <https://doi.org/10.1021/acs.est.1c06232>
- Shende, R. K., Hirpurkar, S. D., Sannat, C., Rawat, N., & Pandey, V. (2017). Isolation and characterization of bacteriophages with lytic activity against common bacterial pathogens. *Veterinary World*, 10(8), 973–978. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2017.973-978>
- Silva, J., Leite, D., Fernandes, M., Mena, C., Gibbs, P. A., & Teixeira, P. (2011). Campylobacter spp. As a foodborne pathogen: A review. *Frontiers in Microbiology*, 2(SEP), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00200>
- Sørensen, Gencay, Y. E., & Brøndsted, L. (2017). Methods for initial characterization of Campylobacter jejuni bacteriophages. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1512). [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6536-6\\_9](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6536-6_9)
- Sørensen, Vitt, A., Neve, H., Soverini, M., Ahern, S. J., Klumpp, J., & Brøndsted, L. (2021). Campylobacter phages use hypermutable polyG tracts to create phenotypic diversity and evade bacterial resistance. *Cell Reports*, 35(10), 109214. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109214>
- Steffan, S. M., Shakeri, G., Hammerl, J. A., Kehrenberg, C., Peh, E., Rohde, M., Jackel, C., Plotz, M., & Kittler, S. (2021). Isolation and Characterization of Group III Campylobacter jejuni-Specific Bacteriophages From Germany and Their Suitability for Use in Food Production. *Frontiers in Microbiology*, 12(December). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.761223>
- Tenover, F. C., Fennell, C. L., Lee, L., & LeBlanc, D. J. (1992). Characterization of two plasmids from Campylobacter jejuni isolates that carry the aphA-7 kanamycin resistance determinant. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 36(4), 712–716. <https://doi.org/10.1128/AAC.36.4.712>
- Thomas, K. M., de Glanville, W. A., Barker, G. C., Benschop, J., Buza, J. J., Cleaveland, S., Davis, M. A., French, N. P., Mmbaga, B. T., Prinsen, G., Swai, E. S., Zadoks, R. N., & Crump, J. A. (2020). Prevalence of Campylobacter and Salmonella in African food animals and meat: A systematic review and meta-analysis. *International Journal of Food Microbiology*, 315(August 2019), 108382. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108382>

- Ushanov, L., Lasareishvili, B., Janashia, I., & Zautner, A. E. (2020). Application of Campylobacter jejuni phages: Challenges and perspectives. *Animals*, *10*(2), 1–21. <https://doi.org/10.3390/ani10020279>
- Vacher, S., Menard, A., Bernard, E., Santos, A., & Megraud, F. (2005). Detection of mutations associated with macrolide resistance in thermophilic Campylobacter spp. by real-time PCR. *Microbial Drug Resistance*, *11*(1), 40–47. <https://doi.org/10.1089/mdr.2005.11.40>
- WHO. (2017). Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research. In *Nucl. Phys.* (Vol. 13, Issue 1).
- Willmott, et al. (1994). *The complex of DNA Gyrase and quinolone drugs with DNA forms a barrier to transcription by RNA polymerase* (pp. 351–363 (242)). *J. Mol. Bio.*
- Yazdi, M., Bouzari, M., Ghaemi, E. A., & Shahin, K. (2020). Isolation, Characterization and Genomic Analysis of a Novel Bacteriophage VB\_EcoS-Golestan Infecting Multidrug-Resistant Escherichia coli Isolated from Urinary Tract Infection. *Scientific Reports*, *10*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63048-x>
- Yu, H., Han, X., & Pérez, D. Q. (2021). Humanity faces disaster: Antimicrobial resistance. *Revista Habanera de Ciencias Medicas*, *20*(3), 1–9.
- Yukgehnash, K., Rajandas, H., Parimannan, S., Manickam, R., Marimuthu, K., Petersen, B., Clokie, M. R. J., Millard, A., & Sicheritz-Pontén, T. (2022). PhageLeads: Rapid Assessment of Phage Therapeutic Suitability Using an Ensemble Machine Learning Approach. *Viruses*, *14*(2). <https://doi.org/10.3390/v14020342>
- Zautner, A. E., Johann, C., Strubel, A., Busse, C., Tareen, A. M., Masanta, W. O., Lugert, R., Schmidt-Ott, R., & Groß, U. (2014). Seroprevalence of campylobacteriosis and relevant post-infectious sequelae. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, *33*(6), 1019–1027. <https://doi.org/10.1007/s10096-013-2040-4>
- Żbikowska, K., Michalczyk, M., & Dolka, B. (2020). The use of bacteriophages in the poultry industry. In *Animals* (Vol. 10, Issue 5). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ani10050872>
- Zhang, A., Song, L., Liang, H., Gu, Y., Zhang, C., Liu, X., Zhang, J., & Zhang, M. (2016). Molecular subtyping and erythromycin resistance of Campylobacter in China. *Journal of Applied Microbiology*, *121*(1), 287–293. <https://doi.org/10.1111/jam.13135>
- Zhou, B., Zhen, X., Zhou, H., Zhao, F., Fan, C., Perčulija, V., Tong, Y., Mi, Z., & Ouyang, S. (2020). Structural and functional insights into a novel two-component endolysin encoded by a single gene in Enterococcus faecalis phage. *PLoS Pathogens*, *16*(3), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008394>

# ANEXOS

Tabla 6. DATOS DE AISLAMIENTO DE CEPAS DE *CAMPYLOBACTER*

Datos muestrales							Análisis					Pruebas			
Lugar	Lugar específico	Tipo de muestra	Fecha	Código de muestra	Albado	Peso [g]	Factor de dilución	UFC	UFC/ml	UFC/g	Tinción Gram	Oxidasa	Hemólisis	CreCIM aerobio	CreCIM a 42°C
El Alto	16 de Julio	Heces de aves de corral	22/5/2021	161	C1	9	100	12	1200	133	G-	+	Y	-	+
El Alto	16 de Julio	Heces de aves de corral	22/5/2021	161	C2	10	100	6	600	60	G-	+	Y	-	+
El Alto	16 de Julio	Heces de aves de corral	22/5/2021	161	C3	10	100	5	500	50	G-	+	Y	-	+
El Alto	16 de Julio	Heces de aves de corral	22/5/2021	161	C4	3.1	100	7	700	226	G-	+	Y	-	+
El Alto	16 de Julio	Heces de aves de corral	23/5/2021	161	C5	7	100	9	900	129	G-	+	Y	-	+
El Alto	16 de Julio	Heces de aves de corral	24/5/2021	161	C6	10	100	23	2300	230	G-	+	Y	-	+
El Alto	16 de Julio	Heces de aves de corral	25/5/2021	161	C7	10	100	21	2100	210	G-	+	Y	-	+
El Alto	16 de Julio	Heces de aves de corral	26/5/2021	161	C8	8	100	2	200	25	G-	+	Y	-	+
El Alto	16 de Julio	Heces de aves de corral	27/5/2021	161	C9	10	100	5	500	50	G-	+	Y	-	+
El Alto	16 de Julio	Heces de aves de corral	28/5/2021	161	C10	8	100	9	900	113	G-	+	Y	-	+
El Alto	16 de Julio	Heces de aves de corral	29/5/2021	161	C11	10	100	7	700	70	G-	+	Y	-	+
El Alto	Granja criolla N°1	Heces de aves de corral	30/5/2021	GCT1	C12	9.5	100	4	400	42	G-	+	Y	-	+
El Alto	Granja criolla N°1	Heces de aves de corral	31/5/2021	GCT1	C13	10	100	1	100	114	G-	+	Y	-	+
El Alto	Granja criolla N°1	Heces de aves de corral	1/6/2021	GCT1	C14	7	100	8	800	114	G-	+	Y	-	+
El Alto	Granja criolla N°1	Heces de aves de corral	2/6/2021	GCT1	C15	10	100	16	1600	160	G-	+	Y	-	+
El Alto	Granja criolla N°1	Heces de aves de corral	5/4/2022	GCT1	C16	4.25	100	34	3400	80	G-	+	Y	-	+
El Alto	Granja criolla N°1	Heces de aves de corral	5/4/2022	GCT1	C17	1.66	100	6	600	361	G-	+	Y	-	+
El Alto	Granja criolla N°1	Heces de aves de corral	28/3/2022	GCT1	C18	2.72	10	31	310	114	G-	+	Y	-	+
La Paz	Plaza Murillo	Heces de aves de vida libre	7/4/2022	A1	C19	12.9	100	17	1700	132	G-	+	Y	-	+
La Paz	Plaza Murillo	Heces de aves de corral	7/4/2022	A2	C20	4.67	100	5	500	107	G-	+	Y	-	+
La Paz	Plaza Murillo	Heces de aves de corral	7/4/2022	A3	C21	9.56	100	9	900	94	G-	+	Y	-	+
La Paz	Plaza Murillo	Heces de aves de corral	7/4/2022	A3	C22	7.23	100	9	900	124	G-	+	Y	-	+
El Alto	Granja criolla N°1	Lodo	7/4/2022	E2	C23	6.89	100	5	500	73	G-	+	Y	-	+
El Alto	Granja criolla N°1	Heces de aves de corral	7/4/2022	E3	C24	2.38	100	9	900	378	G-	+	Y	-	+
El Alto	Granja criolla N°1	Heces de aves de corral	17/4/2022	E4	C25	1.9	400	9	3600	1895	G-	+	Y	-	+
El Alto	Granja criolla N°1	Heces de aves de corral	17/4/2022	E5	C26	1.81	400	7	2800	1547	G-	+	Y	-	+
El Alto	Granja criolla N°1	Heces de aves de corral	17/4/2022	E6	C27	4.2	400	9	3600	857	G-	+	Y	-	+
El Alto	Granja criolla N°1	Heces de aves de corral	17/4/2022	E7	C28	0.84	400	15	6000	7143	G-	+	Y	-	+
El Alto	Granja criolla N°1	Heces de aves de corral	22/8/2021	E8	C29	8.2	200	4	800	98	G-	+	Y	-	+
El Alto	Granja criolla N°1	Heces de aves de corral	22/8/2021	E9	C30	3.4	100	9	900	188	G-	+	Y	-	+
La Paz	Plaza Murillo	Heces de aves de vida libre	22/8/2021	E10	C31	3.4	100	7	700	206	G-	+	Y	-	+
El Alto	Granja criolla N°1	Heces de aves de corral	22/8/2021	E11	C32	5.04	100	6	600	119	G-	+	Y	-	+
El Alto	Granja criolla N°1	Heces de aves de corral	22/8/2021	E12	C33	8.96	100	4	400	45	G-	+	Y	-	+
El Alto	Granja criolla N°1	Heces de aves de corral	22/8/2021	E13	C34	4.2	400	5	2000	476	G-	+	Y	-	+
El Alto	Granja criolla N°1	Lodo	17/4/2022	E14	C35	10	100	9	900	90	G-	+	Y	-	+
El Alto	Granja criolla N°1	Heces de aves de corral	17/4/2022	E15	C36	10	100	12	1200	120	G-	+	Y	-	+
El Alto	Granja criolla N°1	Heces de aves de corral	12/4/2022	E16	C37	3.1	100	12	1200	387	G-	+	Y	-	+
La Paz	Plaza Murillo	Heces de aves de vida libre	12/4/2022	E17	C38	7	100	4	400	57	G-	+	Y	-	+
La Paz	Plaza Murillo	Heces de aves de vida libre	12/4/2022	E18	C39	8	100	9	900	113	G-	+	Y	-	+
La Paz	Plaza Murillo	Heces de aves de vida libre	12/4/2022	E19	C40	10	100	5	500	50	G-	+	Y	-	+
El Alto	Granja criolla N°1	Heces de aves de corral	15/4/2022	E20	C41	8	100	9	900	113	G-	+	Y	-	+
El Alto	Granja criolla N°1	Heces de aves de corral	15/4/2022	E21	C42	10	100	15	1500	150	G-	+	Y	-	+
El Alto	Granja criolla N°1	Heces de aves de corral	15/4/2022	E22	C43	9.5	100	4	400	42	G-	+	Y	-	+
El Alto	Granja criolla N°1	Heces de aves de corral	15/4/2022	E23	C44	1.66	100	9	900	542	G-	+	Y	-	+
El Alto	Granja criolla N°1	Heces de aves de corral	15/4/2022	E24	C45	2.72	10	7	70	26	G-	+	Y	-	+
El Alto	Granja criolla N°1	Heces de aves de corral	15/4/2022	E25	C46	1.29	100	6	600	47	G-	+	Y	-	+
El Alto	Granja criolla N°1	Heces de aves de corral	21/4/2022	E26	C47	1.66	100	4	400	241	G-	+	Y	-	+
El Alto	Granja criolla N°1	Heces de aves de corral	21/4/2022	E27	C48	2.72	10	5	50	157	G-	+	Y	-	+
El Alto	Granja criolla N°1	Heces de aves de corral	21/4/2022	E28	C49	9.56	100	15	1500	187	G-	+	Y	-	+
El Alto	Granja criolla N°1	Heces de aves de corral	21/4/2022	E29	C50	1.66	100	4	400	241	G-	+	Y	-	+
El Alto	Granja criolla N°1	Heces de aves de corral	21/4/2022	E30	C51	2.72	10	9	90	33	G-	+	Y	-	+
El Alto	Granja criolla N°1	Heces de aves de corral	21/4/2022	E31	C52	9.56	100	7	700	73	G-	+	Y	-	+
El Alto	Granja criolla N°1	Heces de aves de corral	25/4/2022	E32	C53	9.56	100	6	600	63	G-	+	Y	-	+
El Alto	Granja criolla N°1	Heces de aves de corral	25/4/2022	E33	C54	1.66	100	4	400	241	G-	+	Y	-	+
El Alto	Granja criolla N°1	Heces de aves de corral	25/4/2022	E34	C55	2.72	10	5	50	18	G-	+	Y	-	+

DETERMINACIÓN DE DIFERENCIAS EN EL RECUENTO DE UFC/g ENTRE LOS  
DISTINTOS TIPOS DE MUESTRAS

ANOVA de un solo factor: UFC/g vs. Muestras

Método

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna	No todas las medias son iguales
Nivel de significancia	$\alpha = 0,05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Muestras	4	Aguas superficiales; Heces de aves de corral; Heces de aves de vida libre; Lodo

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Muestras	3	608464	202821	0,20	0,896
Error	52	52697362	1013411		
Total	55	53305826			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
1006,68	1,14%	0,00%	*

Medias

Muestras	N	Media	Desv.Est	IC de 95%

Aguas superficiales	1	0,00000 0	*	(-2,02006E+03; 2020,057365)
Heces de aves de corral	4 7	375	1070	(81; 670)
Heces de aves de vida libre	5	111,5	63,4	(-791,9; 1014,9)
Lodo	3	95,7	26,4	(-1070,6; 1262,0)

Desv.Est. agrupada = 1006,68

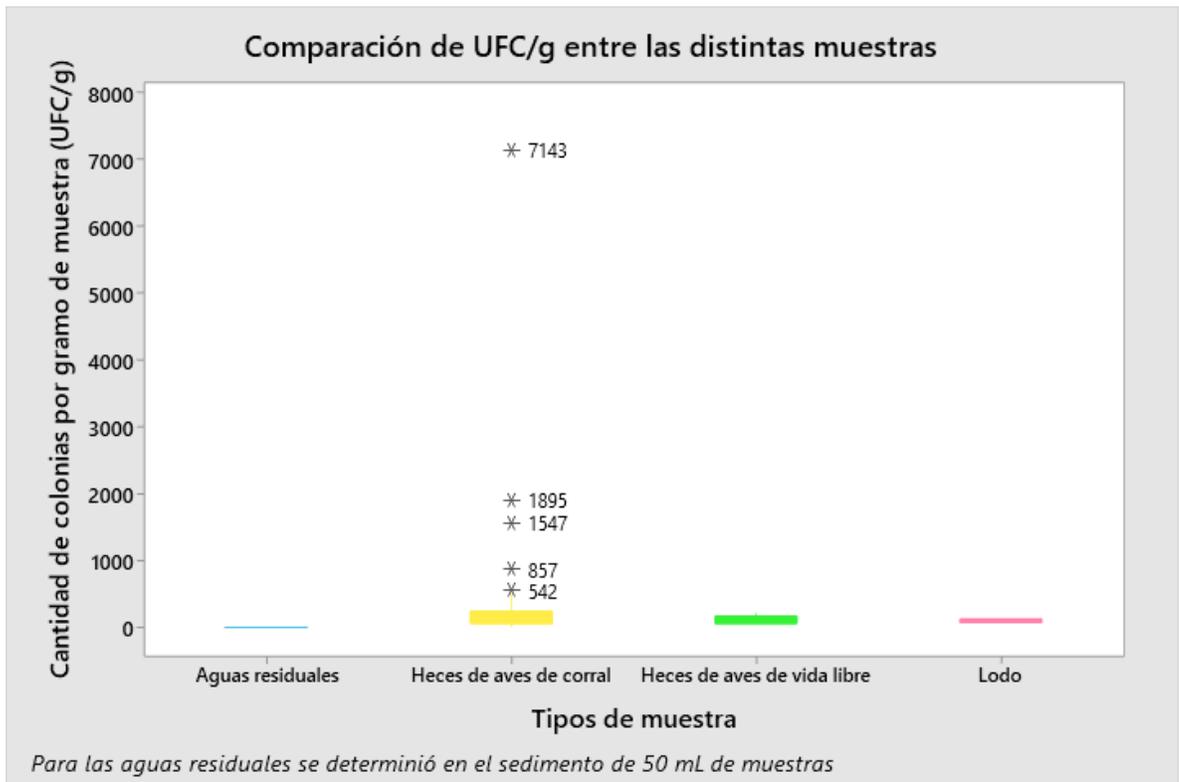


Figura 13. Determinación de diferencias en el recuento de UFC/g entre los distintos tipos de muestras, se aprecian los datos atípicos de los recuentos en las muestras de aves de corral.

## DETERMINACIONES DEL PERFIL DE RESISTENCIA.

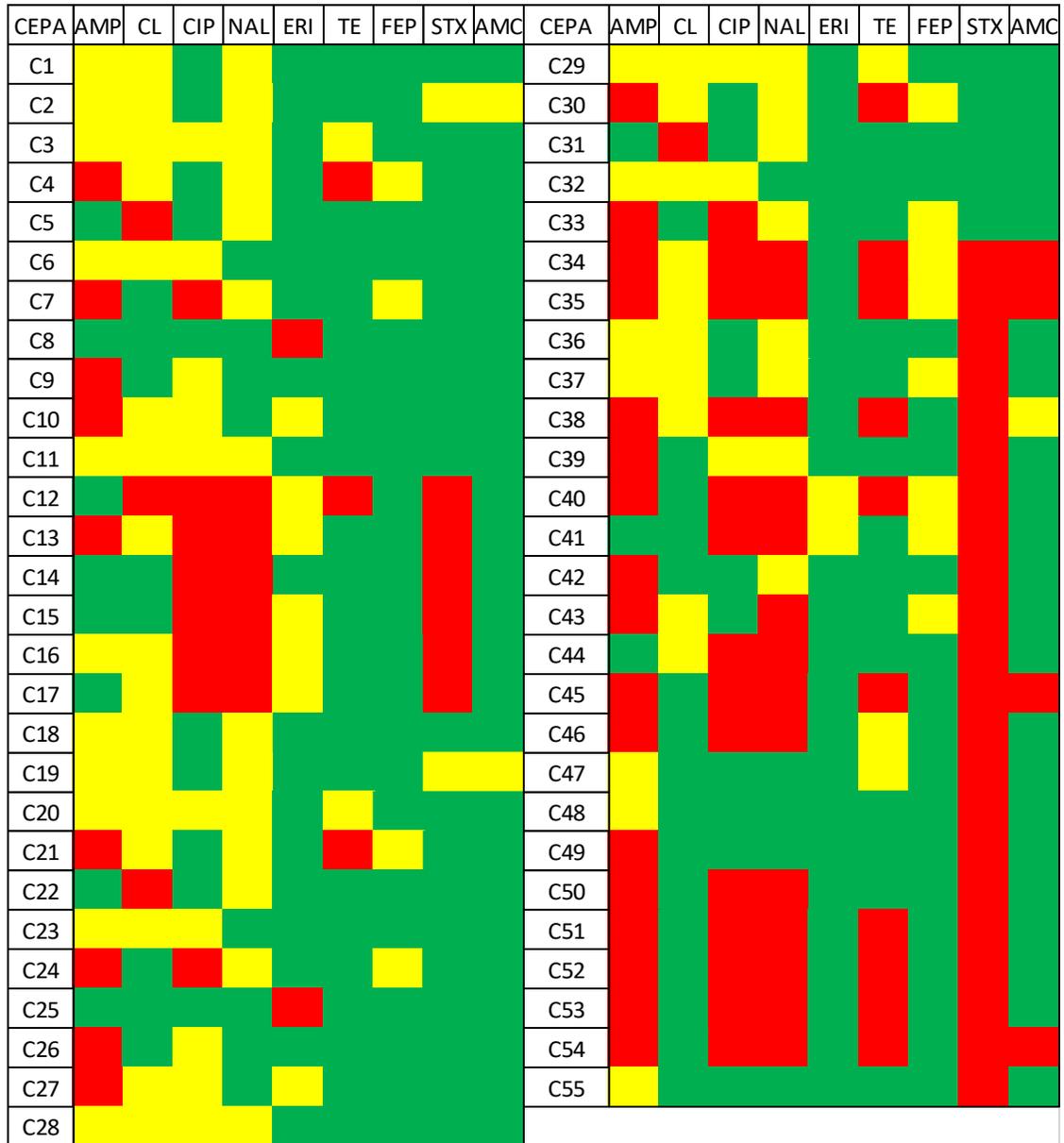


Figura 14. Mapa de calor del perfil de sensibilidad: verde, sensible; amarillo, intermedio; rojo, resistente.

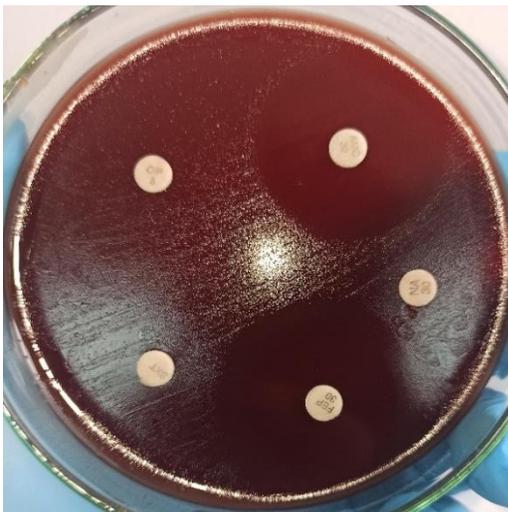


Figura 15. Antibiograma de una cepa de *Campylobacter*, se logra apreciar que esta cepa en específico tiene resistencia a Sulfametoxazol-trimetoprim, ácido nalidíxico, y ciprofloxacina.

#### DATOS AISLAMIENTO FAGOS

Datos muestrales					Código abreviado	Código del fago
Lugar	Lugar específico	Tipo de muestra	Fecha	Código de muestra		
El Alto	16 de Julio	Heces de aves de corral	22/7/2021	16J	<b>F1</b>	16J-B1
El Alto	16 de Julio	Heces de aves de corral	15/8/2021	16J	<b>F2</b>	16J-F5
El Alto	Granja criolla	Heces de aves de corral	12/3/2022	GC1	<b>F3</b>	GC1-C3
El Alto	16 de Julio	Heces de aves de corral	25/3/2022	16J	<b>F4</b>	16J-H2
El Alto	Granja criolla	Heces de aves de corral	3/5/2022	16J	<b>F5</b>	GC1-K11

TÍTULOS DE ESTABILIDAD DE LOS BACTERIÓFAGOS RESPECTO A TEMPERATURA

Temperatura °C	16J-B1	16J-F5	GC1-C3	16J-H2
-20	90	90	92	91
-20	91	91	91	92
-20	93	90	90	93
4	90	94	96	94
4	95	90	94	90
4	91	90	91	92
20	90	91	92	97
20	85	92	96	91
20	90	90	91	92
37	89	93	94	91
37	89	90	91	92
37	92	91	88	93
50	92	95	89	91
50	91	92	91	92
50	94	91	90	93
60	93	90	92	91
60	91	91	91	94
60	89	92	96	91
70	85	75	94	93
70	87	85	92	88
70	81	83	92	92
80	0	0	0	0
80	0	0	0	0

80	0	0	0	0
----	---	---	---	---

## ANOVA de un solo factor: 16J-B1 vs. Temperatura °C

### Método

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna	No todas las medias son iguales
Nivel de significancia	$\alpha = 0,05$

*Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.*

### Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Temperatura °C	8	-20; 4; 20; 37; 50; 60; 70; 80

### Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Temperatura °C	7	21358,7	3051,24	671,83	0,000
Error	16	72,7	4,54		
Total	23	21431,3			

### Resumen del modelo

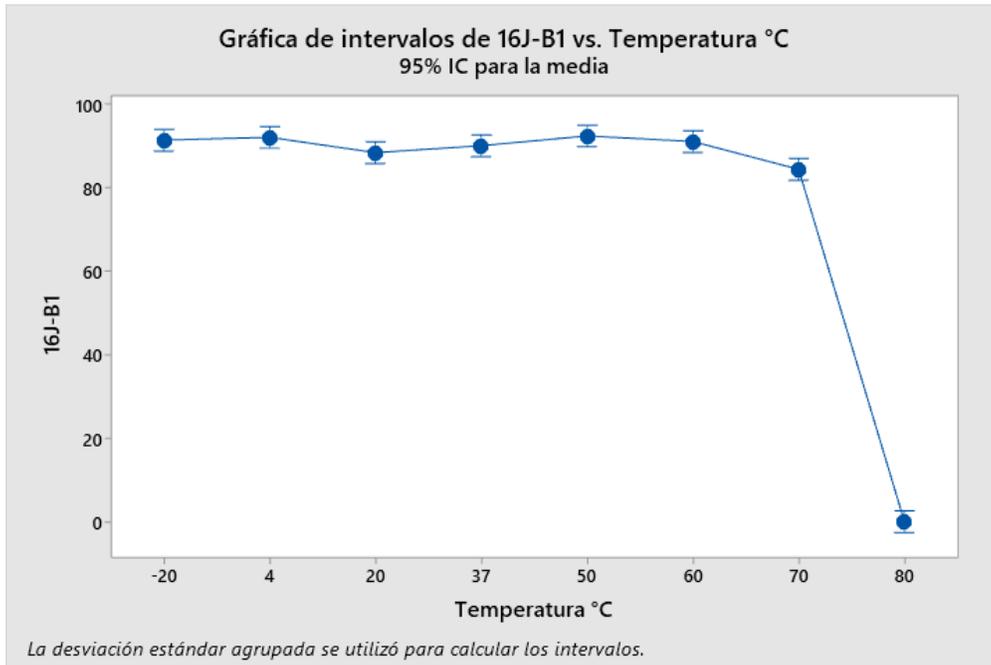
S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)

2,13112	99,66%	99,51%	99,24%
---------	--------	--------	--------

### Medias

Temperatura °C	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
-20	3	91,333	1,528	(88,725; 93,942)
4	3	92,00	2,65	(89,39; 94,61)
20	3	88,33	2,89	(85,72; 90,94)
37	3	90,00	1,73	(87,39; 92,61)
50	3	92,333	1,528	(89,725; 94,942)
60	3	91,00	2,00	(88,39; 93,61)
70	3	84,33	3,06	(81,72; 86,94)
80	3	0,000000	0,000000	(-2,608336; 2,608336)

*Desv.Est. agrupada = 2,13112*



### ANOVA de un solo factor: 16J-F5 vs. Temperatura °C

#### Método

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna	No todas las medias son iguales
Nivel de significancia	$\alpha = 0,05$

*Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.*

#### Información del factor

Factor	Niveles	Valores
<hr/>		

Temperatura 8 -20; 4; 20; 37;  
 °C 50; 60; 70; 80

### Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Temperatura °C	7	21453,2	3064,74	579,16	0,000
Error	16	84,7	5,29		
Total	23	21537,8			

### Resumen del modelo

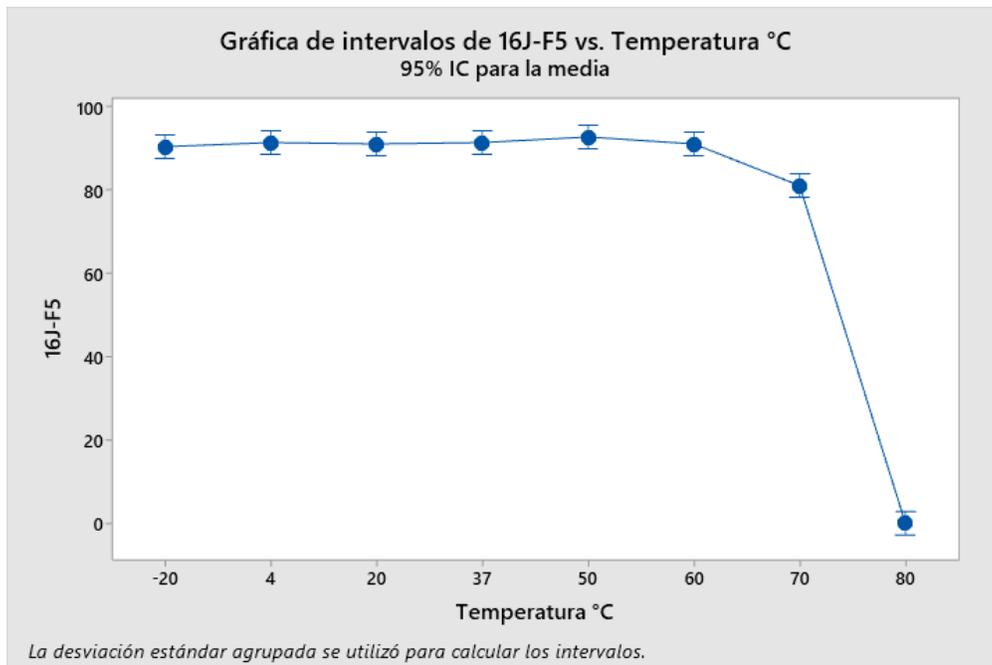
S	R- cuad.	R-cuad. (ajustado)	R- cuad. (pred)
2,30036	99,61%	99,43%	99,12%

### Medias

Temperatura °C	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
-20	3	90,333	0,577	(87,518; 93,149)
4	3	91,33	2,31	(88,52; 94,15)
20	3	91,000	1,000	(88,185; 93,815)
37	3	91,333	1,528	(88,518; 94,149)
50	3	92,67	2,08	(89,85; 95,48)

60	3	91,000	1,000	(88,185; 93,815)
70	3	81,00	5,29	(78,18; 83,82)
80	3	0,000000	0,000000	(-2,815478; 2,815478)

*Desv.Est. agrupada = 2,30036*



### ANOVA de un solo factor: GC1-C3 vs. Temperatura °C

#### Método

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna	No todas las medias son iguales

Nivel de significancia	$\alpha = 0,05$
------------------------	-----------------

*Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.*

### Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Temperatura °C	8	-20; 4; 20; 37; 50; 60; 70; 80

### Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Temperatura °C	7	22274,6	3182,09	779,29	0,000
Error	16	65,3	4,08		
Total	23	22340,0			

### Resumen del modelo

**R-**

**R- R-cuad. cuad.**

**S cuad. (ajustado) (pred)**

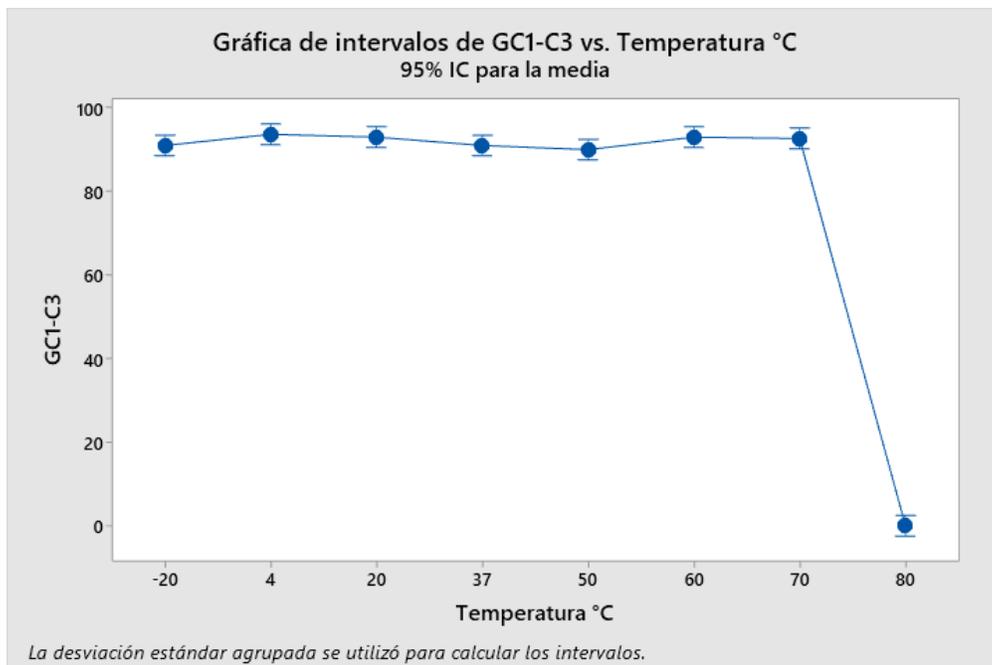
2,02073 99,71% 99,58% 99,34%

### Medias

Temperatura °C	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
-20	3	91,000	1,000	(88,527; 93,473)
4	3	93,67	2,52	(91,19; 96,14)

20	3	93,00	2,65	(90,53; 95,47)
37	3	91,00	3,00	(88,53; 93,47)
50	3	90,000	1,000	(87,527; 92,473)
60	3	93,00	2,65	(90,53; 95,47)
70	3	92,667	1,155	(90,193; 95,140)
80	3	0,000000	0,000000	(-2,473223; 2,473223)

*Desv.Est. agrupada = 2,02073*



**ANOVA de un solo factor: 16J-H2 vs. Temperatura °C**

**Método**

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna	No todas las medias son iguales
Nivel de significancia	$\alpha = 0,05$

*Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.*

### Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Temperatura °C	8	-20; 4; 20; 37; 50; 60; 70; 80

### Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Temperatura °C	7	22249,3	3178,47	930,28	0,000
Error	16	54,7	3,42		
Total	23	22304,0			

### Resumen del modelo

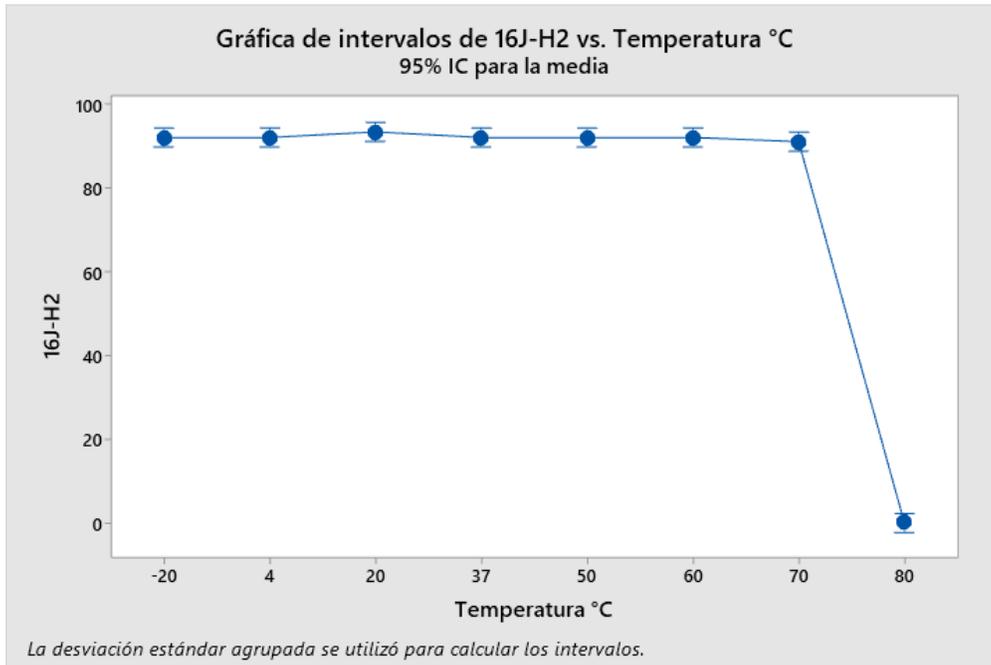
S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
1,84842	99,75%	99,65%	99,45%

### Medias

Temperatura °C	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%

-20	3	92,000	1,000	(89,738; 94,262)
4	3	92,00	2,00	(89,74; 94,26)
20	3	93,33	3,21	(91,07; 95,60)
37	3	92,000	1,000	(89,738; 94,262)
50	3	92,000	1,000	(89,738; 94,262)
60	3	92,00	1,73	(89,74; 94,26)
70	3	91,00	2,65	(88,74; 93,26)
80	3	0,000000	0,000000	(-2,262336; 2,262336)

*Desv.Est. agrupada = 1,84842*



### TÍTULOS DE ESTABILIDAD DE LOS BACTERIÓFAGOS RESPECTO A pH

pH	16J-B1	16J-F5	GC1-C3	16J-H2
3	0	0	0	0
3	0	0	0	0
3	0	0	0	0
4	91	92	91	94
4	92	91	95	95
4	95	95	94	93
5	94	93	95	96
5	93	94	93	94
5	94	95	91	91
7	92	93	93	92

7	97	92	92	94
7	98	91	92	95
8	96	91	92	93
8	92	92	92	91
8	91	96	91	97
10	74	91	54	91
10	75	92	56	89
10	76	93	57	84
12	0	0	0	0
12	0	0	0	0
12	0	0	0	0

### ANOVA de un solo factor: 16J-F5 vs. pH

#### Método

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna	No todas las medias son iguales
Nivel de significancia	$\alpha = 0,05$

*Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.*

#### Información del factor

Factor	Niveles	Valores
pH	7	3; 4; 5; 7; 8; 10; 12

#### Análisis de Varianza

<b>Fuente</b>	<b>GL</b>	<b>SC</b> <b>Ajust.</b>	<b>MC</b> <b>Ajust.</b>	<b>Valor</b> <b>F</b>	<b>Valor</b> <b>p</b>
pH	6	36863,1	6143,86	3000,49	0,000
Error	14	28,7	2,05		
Total	20	36891,8			

### Resumen del modelo

<b>S</b>	<b>R- cuad.</b>	<b>R-cuad. (ajustado)</b>	<b>R- cuad. (pred)</b>
1,43095	99,92%	99,89%	99,83%

### Medias

<b>pH</b>	<b>N</b>	<b>Media</b>	<b>Desv.Est.</b>	<b>IC de 95%</b>
3	3	0,000000	0,000000	(-1,771936; 1,771936)
4	3	92,67	2,08	(90,89; 94,44)
5	3	94,000	1,000	(92,228; 95,772)
7	3	92,000	1,000	(90,228; 93,772)
8	3	93,00	2,65	(91,23; 94,77)
10	3	92,000	1,000	(90,228; 93,772)
12	3	0,000000	0,000000	(-1,771936; 1,771936)

*Desv.Est. agrupada = 1,43095*

## ANOVA de un solo factor: GC1-C3 vs. pH

### Método

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna	No todas las medias son iguales
Nivel de significancia	$\alpha = 0,05$

*Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.*

### Información del factor

Factor	Niveles	Valores
pH	7	3; 4; 5; 7; 8; 10; 12

### Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
pH	6	34385,9	5730,98	3539,73	0,000
Error	14	22,7	1,62		
Total	20	34408,6			

### Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
1,27242	99,93%	99,91%	99,85%

### Medias

pH	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
----	---	-------	-----------	-----------

3	3	0,000000	0,000000	(-1,575627; 1,575627)
4	3	93,33	2,08	(91,76; 94,91)
5	3	93,00	2,00	(91,42; 94,58)
7	3	92,333	0,577	(90,758; 93,909)
8	3	91,667	0,577	(90,091; 93,242)
10	3	55,667	1,528	(54,091; 57,242)
12	3	0,000000	0,000000	(-1,575627; 1,575627)

*Desv.Est. agrupada = 1,27242*

## HOJA DE TRABAJO 1

### ANOVA de un solo factor: 16J-H2 vs. pH

#### Método

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna	No todas las medias son iguales
Nivel de significancia	$\alpha = 0,05$

*Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.*

### Información del factor

Factor	Niveles	Valores
pH	7	3; 4; 5; 7; 8; 10; 12

### Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
pH	6	36828,6	6138,10	1342,71	0,000
Error	14	64,0	4,57		
Total	20	36892,6			

### Resumen del modelo

S	R- cuad.	R-cuad. (ajustado)	R- cuad. (pred)
2,13809	99,83%	99,75%	99,61%

### Medias

pH	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
3	3	0,000000	0,000000	(-2,647582; 2,647582)
4	3	94,000	1,000	(91,352; 96,648)
5	3	93,67	2,52	(91,02; 96,31)
7	3	93,667	1,528	(91,019; 96,314)
8	3	93,67	3,06	(91,02; 96,31)

10	3	88,00	3,61	(85,35; 90,65)
12	3	0,000000	0,000000	(-2,647582; 2,647582)

*Desv.Est. agrupada = 2,13809*

### DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD EN MEDIO LÍQUIDO

Para cada experimento se presentan los datos con los blancos ajustados a 0 de OD 600

	16J-B1					
Tiempo (h)	DO600nm					
	Blanco	Control -	MOI 0,1	MOI 1	MOI 10	MOI 100
0		0,010	0,010	0,010	0,010	0,010
0		0,011	0,011	0,010	0,010	0,011
0		0,010	0,010	0,010	0,010	0,011
1		0,010	0,010	0,010	0,010	0,011
1		0,010	0,010	0,010	0,010	0,010
1		0,010	0,010	0,010	0,010	0,010
2		0,011	0,011	0,010	0,010	0,011
2		0,010	0,010	0,010	0,010	0,010
2		0,010	0,010	0,010	0,010	0,010
3		0,014	0,010	0,010	0,012	0,012
3		0,013	0,010	0,010	0,011	0,012
3		0,014	0,010	0,010	0,012	0,012
4		0,014	0,010	0,010	0,013	0,013
4		0,015	0,011	0,010	0,012	0,013
4		0,014	0,010	0,010	0,013	0,013
5		0,014	0,010	0,010	0,012	0,013
5		0,015	0,012	0,012	0,015	0,014

5		0,014	0,010	0,010	0,014	0,013
6		0,015	0,012	0,012	0,015	0,014
6		0,015	0,012	0,013	0,015	0,015
6		0,015	0,012	0,012	0,015	0,014
7		0,015	0,012	0,012	0,015	0,014
7		0,015	0,012	0,013	0,015	0,015
7		0,015	0,012	0,013	0,015	0,015
8		0,015	0,012	0,013	0,015	0,015
8		0,016	0,012	0,013	0,015	0,016
8		0,016	0,012	0,013	0,015	0,016
9		0,018	0,013	0,013	0,015	0,016
9		0,016	0,012	0,013	0,015	0,016
9		0,018	0,013	0,013	0,015	0,016
10		0,018	0,013	0,013	0,015	0,016
10		0,018	0,013	0,013	0,015	0,016
10		0,020	0,013	0,013	0,016	0,017
11		0,023	0,013	0,013	0,016	0,017
11		0,024	0,013	0,014	0,016	0,018
11		0,024	0,013	0,014	0,016	0,018
12		0,031	0,013	0,015	0,016	0,019
12		0,031	0,013	0,015	0,016	0,019
12		0,031	0,013	0,015	0,016	0,019
13		0,035	0,014	0,015	0,016	0,019
13		0,037	0,014	0,015	0,017	0,020
13		0,037	0,014	0,015	0,017	0,020
14		0,039	0,014	0,016	0,017	0,020
14		0,043	0,014	0,016	0,018	0,021
14		0,043	0,014	0,016	0,018	0,021

15		0,049	0,014	0,016	0,018	0,021
15		0,055	0,015	0,017	0,019	0,021
15		0,055	0,015	0,017	0,019	0,021
16		0,059	0,015	0,017	0,020	0,022
16		0,065	0,015	0,018	0,020	0,022
16		0,065	0,015	0,018	0,020	0,022
17		0,076	0,015	0,018	0,020	0,020
17		0,079	0,015	0,018	0,020	0,020
17		0,082	0,015	0,018	0,020	0,021
18		0,084	0,015	0,019	0,024	0,024
18		0,087	0,015	0,019	0,025	0,025
18		0,089	0,015	0,020	0,027	0,027
19		0,096	0,020	0,020	0,028	0,028
19		0,097	0,019	0,020	0,030	0,030
19		0,096	0,020	0,020	0,028	0,028
20		0,110	0,020	0,020	0,030	0,027
20		0,111	0,021	0,021	0,032	0,027
20		0,110	0,021	0,020	0,030	0,027
21		0,116	0,021	0,021	0,032	0,027
21		0,120	0,020	0,030	0,032	0,029
21		0,120	0,020	0,030	0,032	0,029
22		0,130	0,021	0,040	0,034	0,031
22		0,130	0,022	0,031	0,035	0,031
22		0,130	0,021	0,040	0,034	0,031
23		0,139	0,023	0,041	0,039	0,049
23		0,140	0,023	0,037	0,038	0,036
23		0,139	0,023	0,041	0,039	0,049
24		0,145	0,024	0,048	0,042	0,041

24		0,148	0,025	0,047	0,043	0,048
24		0,145	0,024	0,048	0,042	0,041
25		0,149	0,030	0,054	0,045	0,044
25		0,155	0,027	0,055	0,045	0,049
25		0,149	0,030	0,054	0,045	0,044

Fago:	16J-F5					
Tiempo (h)	DO600nm					
	Blanco	Control -	MOI 0,1	MOI 1	MOI 10	MOI 100
0		0,010	0,010	0,010	0,010	0,011
0		0,010	0,010	0,010	0,010	0,011
0		0,010	0,010	0,010	0,010	0,011
1		0,010	0,010	0,010	0,010	0,010
1		0,010	0,010	0,010	0,010	0,010
1		0,010	0,010	0,010	0,010	0,010
2		0,011	0,010	0,010	0,010	0,010
2		0,011	0,010	0,010	0,010	0,010
2		0,011	0,010	0,010	0,010	0,010
3		0,013	0,010	0,010	0,012	0,010
3		0,013	0,010	0,010	0,012	0,010
3		0,013	0,010	0,010	0,012	0,010
4		0,014	0,010	0,010	0,013	0,010
4		0,014	0,010	0,010	0,013	0,010
4		0,014	0,010	0,010	0,013	0,010
5		0,014	0,010	0,010	0,014	0,010
5		0,014	0,010	0,010	0,014	0,010

5		0,014	0,010	0,010	0,014	0,010
6		0,015	0,012	0,012	0,015	0,012
6		0,015	0,011	0,011	0,015	0,011
6		0,015	0,012	0,012	0,015	0,012
7		0,016	0,013	0,013	0,015	0,013
7		0,016	0,012	0,012	0,015	0,012
7		0,016	0,013	0,013	0,015	0,013
8		0,016	0,013	0,013	0,015	0,013
8		0,016	0,013	0,013	0,016	0,013
8		0,016	0,013	0,013	0,015	0,013
9		0,018	0,013	0,013	0,015	0,016
9		0,017	0,014	0,014	0,016	0,014
9		0,018	0,013	0,013	0,015	0,016
10		0,020	0,016	0,013	0,016	0,017
10		0,020	0,015	0,013	0,016	0,018
10		0,020	0,016	0,013	0,016	0,017
11		0,024	0,016	0,014	0,016	0,018
11		0,024	0,017	0,014	0,016	0,018
11		0,024	0,016	0,014	0,016	0,018
12		0,031	0,016	0,015	0,016	0,019
12		0,029	0,017	0,015	0,016	0,019
12		0,031	0,016	0,015	0,016	0,019
13		0,037	0,017	0,015	0,017	0,020
13		0,037	0,017	0,016	0,017	0,021
13		0,037	0,017	0,015	0,017	0,020
14		0,043	0,018	0,016	0,018	0,022
14		0,043	0,017	0,016	0,017	0,022
14		0,043	0,018	0,016	0,018	0,022

15		0,056	0,019	0,017	0,019	0,023
15		0,053	0,019	0,017	0,019	0,023
15		0,056	0,019	0,017	0,019	0,023
16		0,065	0,020	0,018	0,020	0,022
16		0,065	0,020	0,018	0,020	0,023
16		0,065	0,020	0,018	0,020	0,022
17		0,076	0,020	0,018	0,020	0,025
17		0,077	0,021	0,018	0,021	0,024
17		0,076	0,020	0,018	0,020	0,025
18		0,084	0,020	0,019	0,024	0,026
18		0,086	0,021	0,019	0,022	0,025
18		0,084	0,020	0,019	0,024	0,026
19		0,096	0,020	0,020	0,028	0,027
19		0,096	0,020	0,020	0,026	0,027
19		0,096	0,020	0,020	0,028	0,027
20		0,110	0,020	0,020	0,030	0,028
20		0,109	0,020	0,020	0,031	0,028
20		0,110	0,020	0,020	0,030	0,028
21		0,120	0,030	0,030	0,032	0,041
21		0,123	0,028	0,028	0,033	0,039
21		0,120	0,030	0,030	0,032	0,041
22		0,130	0,040	0,040	0,034	0,053
22		0,133	0,038	0,038	0,035	0,051
22		0,130	0,040	0,040	0,034	0,053
23		0,141	0,041	0,041	0,039	0,062
23		0,142	0,046	0,046	0,038	0,064
23		0,141	0,041	0,041	0,039	0,062
24		0,146	0,048	0,048	0,042	0,071

24		0,149	0,049	0,049	0,043	0,073
24		0,146	0,048	0,048	0,042	0,071
25		0,151	0,054	0,054	0,045	0,080
25		0,154	0,054	0,054	0,046	0,081
25		0,151	0,054	0,054	0,045	0,080

Fago:	GC1-C3					
Tiempo (h)	DO600nm					
	Blanco	Control -	MOI 0,1	MOI 1	MOI 10	MOI 100
0		0,010	0,010	0,010	0,011	0,011
0		0,010	0,010	0,010	0,011	0,011
0		0,010	0,010	0,010	0,011	0,011
1		0,010	0,010	0,010	0,010	0,010
1		0,010	0,010	0,010	0,010	0,010
1		0,010	0,010	0,010	0,010	0,010
2		0,010	0,010	0,010	0,010	0,010
2		0,010	0,010	0,010	0,010	0,010
2		0,010	0,010	0,010	0,010	0,010
3		0,014	0,010	0,010	0,010	0,012
3		0,013	0,010	0,010	0,010	0,011
3		0,014	0,010	0,010	0,010	0,012
4		0,014	0,014	0,010	0,010	0,013
4		0,015	0,012	0,010	0,010	0,013
4		0,014	0,014	0,010	0,010	0,013
5		0,014	0,014	0,010	0,010	0,013
5		0,014	0,015	0,010	0,010	0,013
5		0,014	0,014	0,010	0,010	0,013

6		0,015	0,015	0,012	0,012	0,014
6		0,014	0,015	0,011	0,011	0,013
6		0,015	0,015	0,012	0,012	0,014
7		0,016	0,015	0,013	0,013	0,015
7		0,015	0,016	0,013	0,013	0,015
7		0,016	0,015	0,013	0,013	0,015
8		0,016	0,016	0,013	0,013	0,016
8		0,016	0,016	0,013	0,013	0,016
8		0,016	0,016	0,013	0,013	0,016
9		0,018	0,017	0,013	0,016	0,016
9		0,017	0,017	0,013	0,015	0,017
9		0,018	0,017	0,013	0,016	0,016
10		0,020	0,020	0,013	0,017	0,017
10		0,020	0,020	0,014	0,018	0,017
10		0,020	0,020	0,013	0,017	0,017
11		0,024	0,021	0,014	0,018	0,018
11		0,023	0,021	0,014	0,019	0,018
11		0,024	0,021	0,014	0,018	0,018
12		0,031	0,023	0,015	0,019	0,019
12		0,028	0,024	0,015	0,019	0,019
12		0,031	0,023	0,015	0,019	0,019
13		0,037	0,025	0,015	0,020	0,020
13		0,038	0,025	0,015	0,021	0,021
13		0,037	0,025	0,015	0,020	0,020
14		0,043	0,027	0,016	0,022	0,022
14		0,044	0,027	0,016	0,022	0,022
14		0,043	0,027	0,016	0,022	0,022
15		0,055	0,029	0,017	0,023	0,023

15		0,053	0,029	0,017	0,023	0,023
15		0,055	0,029	0,017	0,023	0,023
16		0,065	0,030	0,018	0,022	0,022
16		0,065	0,030	0,018	0,023	0,023
16		0,065	0,030	0,018	0,022	0,022
17		0,076	0,032	0,018	0,025	0,025
17		0,078	0,032	0,018	0,024	0,024
17		0,076	0,032	0,018	0,025	0,025
18		0,084	0,034	0,019	0,026	0,026
18		0,087	0,034	0,019	0,025	0,025
18		0,084	0,034	0,019	0,026	0,026
19		0,096	0,036	0,020	0,027	0,027
19		0,096	0,036	0,020	0,027	0,027
19		0,096	0,036	0,020	0,027	0,027
20		0,111	0,037	0,020	0,028	0,027
20		0,107	0,037	0,020	0,028	0,028
20		0,111	0,037	0,020	0,028	0,027
21		0,120	0,039	0,030	0,041	0,029
21		0,123	0,039	0,026	0,036	0,029
21		0,120	0,039	0,030	0,041	0,029
22		0,130	0,046	0,040	0,053	0,030
22		0,133	0,044	0,037	0,050	0,030
22		0,130	0,046	0,040	0,053	0,030
23		0,141	0,047	0,041	0,062	0,031
23		0,143	0,046	0,040	0,056	0,031
23		0,141	0,047	0,041	0,062	0,031
24		0,146	0,050	0,048	0,071	0,032
24		0,146	0,051	0,051	0,077	0,033

24		0,146	0,050	0,048	0,071	0,032
25		0,150	0,052	0,054	0,080	0,044
25		0,151	0,053	0,056	0,083	0,042
25		0,150	0,052	0,054	0,080	0,044

Fago:	16J-H2					
Tiempo (h)	DO600nm					
	Blanco	Control -	MOI 0,1	MOI 1	MOI 10	MOI 100
0		0,010	0,010	0,010	0,011	0,011
0		0,010	0,010	0,010	0,011	0,011
0		0,010	0,010	0,010	0,011	0,011
1		0,010	0,010	0,010	0,010	0,010
1		0,010	0,010	0,010	0,010	0,010
1		0,010	0,010	0,010	0,010	0,010
2		0,010	0,011	0,010	0,010	0,010
2		0,010	0,011	0,010	0,010	0,010
2		0,010	0,011	0,010	0,010	0,010
3		0,014	0,013	0,014	0,010	0,012
3		0,012	0,012	0,012	0,010	0,011
3		0,014	0,013	0,014	0,010	0,012
4		0,014	0,014	0,014	0,010	0,013
4		0,014	0,014	0,014	0,010	0,013
4		0,014	0,014	0,014	0,010	0,013
5		0,015	0,014	0,014	0,010	0,013
5		0,015	0,014	0,014	0,010	0,013
5		0,015	0,014	0,014	0,010	0,013
6		0,016	0,015	0,015	0,012	0,014

6		0,016	0,015	0,015	0,011	0,014
6		0,016	0,015	0,015	0,012	0,014
7		0,016	0,016	0,016	0,013	0,015
7		0,016	0,016	0,015	0,013	0,015
7		0,016	0,016	0,016	0,013	0,015
8		0,018	0,016	0,016	0,013	0,016
8		0,018	0,016	0,016	0,013	0,016
8		0,018	0,016	0,016	0,013	0,016
9		0,020	0,018	0,018	0,016	0,027
9		0,020	0,017	0,017	0,015	0,022
9		0,020	0,018	0,018	0,016	0,027
10		0,024	0,020	0,020	0,017	0,029
10		0,024	0,020	0,020	0,018	0,032
10		0,024	0,020	0,020	0,017	0,029
11		0,031	0,024	0,024	0,018	0,029
11		0,031	0,025	0,024	0,018	0,031
11		0,031	0,025	0,024	0,018	0,029
12		0,037	0,031	0,031	0,019	0,032
12		0,037	0,030	0,030	0,019	0,031
12		0,037	0,031	0,031	0,019	0,032
13		0,043	0,037	0,037	0,020	0,035
13		0,044	0,038	0,038	0,021	0,035
13		0,043	0,037	0,037	0,020	0,035
14		0,054	0,044	0,043	0,022	0,045
14		0,052	0,043	0,043	0,022	0,039
14		0,054	0,043	0,043	0,022	0,045
15		0,058	0,056	0,055	0,023	0,060
15		0,060	0,053	0,053	0,023	0,054

15		0,058	0,056	0,055	0,023	0,060
16		0,065	0,065	0,065	0,022	0,072
16		0,065	0,066	0,065	0,023	0,072
16		0,065	0,065	0,065	0,022	0,072
17		0,076	0,076	0,076	0,025	0,084
17		0,074	0,076	0,076	0,024	0,085
17		0,076	0,076	0,076	0,025	0,084
18		0,084	0,084	0,084	0,026	0,085
18		0,086	0,087	0,087	0,026	0,090
18		0,084	0,084	0,084	0,026	0,085
19		0,096	0,096	0,096	0,027	0,093
19		0,095	0,095	0,096	0,028	0,095
19		0,096	0,096	0,096	0,027	0,093
20		0,110	0,110	0,111	0,028	0,102
20		0,110	0,110	0,111	0,028	0,101
20		0,110	0,110	0,111	0,028	0,102
21		0,121	0,120	0,120	0,041	0,110
21		0,124	0,123	0,124	0,036	0,111
21		0,121	0,120	0,120	0,041	0,110
22		0,130	0,130	0,130	0,053	0,118
22		0,134	0,133	0,133	0,045	0,118
22		0,130	0,130	0,130	0,053	0,118
23		0,141	0,141	0,141	0,062	0,126
23		0,142	0,141	0,141	0,061	0,126
23		0,141	0,141	0,141	0,062	0,126
24		0,148	0,146	0,146	0,071	0,134
24		0,151	0,150	0,150	0,073	0,135
24		0,148	0,146	0,146	0,071	0,134

25		0,152	0,151	0,150	0,080	0,142
25		0,158	0,157	0,156	0,082	0,143
25		0,152	0,151	0,150	0,080	0,142

ÁREAS BAJO LA CURVA CALCULADAS PARA CADA CINÉTICA DE CONTROL EN MEDIO LÍQUIDO

16J-B1	Control -	MOI 0,1	MOI 1	MOI 10	MOI 100
	0,01	0,01	0,01	0,01	0,0105
	0,0105	0,0105	0,01	0,01	0,0105
	0,01	0,01	0,01	0,01	0,0105
	0,0105	0,0105	0,01	0,01	0,011
	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
	0,0125	0,0105	0,01	0,01115	0,01165
	0,0115	0,01	0,01	0,0105	0,01115
	0,012	0,01	0,01	0,01115	0,01115
	0,014	0,01	0,01	0,0124	0,0124
	0,014	0,0105	0,01	0,0115	0,0124
	0,014	0,01	0,01	0,0124	0,0124
	0,014	0,01	0,01	0,01225	0,0125
	0,015	0,01155	0,01115	0,01325667	0,013225
	0,014	0,01	0,01	0,0133	0,0126
	0,0145	0,01105	0,01115	0,01325667	0,013225
	0,015	0,0121	0,0124	0,01494619	0,014365
	0,0145	0,01105	0,01115	0,01430667	0,013325

	0,015	0,0121	0,0123	0,01451333	0,01395
	0,015	0,0121	0,0125	0,01537905	0,01478
	0,015	0,0121	0,0124	0,01494619	0,014365
	0,015	0,0121	0,0124	0,01494619	0,014365
	0,0155	0,0122	0,0126	0,0151027	0,015195
	0,0155	0,0122	0,0126	0,0151027	0,015195
	0,0165	0,0123	0,0128	0,01538952	0,01561
	0,016	0,0123	0,0127	0,01482635	0,01561
	0,017	0,0124	0,0129	0,01511317	0,016025
	0,018	0,0125	0,0131	0,0154	0,01644
	0,017	0,0124	0,0129	0,01511317	0,016025
	0,019	0,0126	0,01323333	0,01555883	0,016855
	0,0205	0,01275	0,01323333	0,01555883	0,016855
	0,021	0,0128	0,01368556	0,01570448	0,01727
	0,022	0,0129	0,01381889	0,0158633	0,017685
	0,027	0,01318333	0,01409651	0,01600895	0,0181
	0,0275	0,01323333	0,01454873	0,0161546	0,018515
	0,0275	0,01323333	0,01454873	0,0161546	0,018515
	0,03275	0,01343333	0,01496516	0,01637308	0,0191375
	0,034	0,01351667	0,01511317	0,0164459	0,019345
	0,034	0,01351667	0,01511317	0,0164459	0,019345
	0,03658333	0,01363889	0,01535066	0,01656728	0,01969083
	0,04	0,01381667	0,01576492	0,01729578	0,020175
	0,04	0,01381667	0,01576492	0,01729578	0,020175
	0,04383333	0,01394286	0,01599489	0,01741022	0,02050107
	0,049	0,01423333	0,01656492	0,0185	0,021005
	0,049	0,01423333	0,01656492	0,0185	0,021005
	0,05402381	0,0143805	0,01687602	0,01887959	0,02140447

	0,06	0,01450667	0,01732587	0,01928275	0,021835
	0,06	0,01450667	0,01732587	0,01928275	0,021835
	0,06752381	0,01471805	0,01767981	0,01993351	0,02104155
	0,0719881	0,01461325	0,01789891	0,01988709	0,02134645
	0,07347619	0,01457832	0,01797194	0,01987162	0,02144808
	0,08	0,01491788	0,0185	0,02211981	0,02211981
	0,08282143	0,0149279	0,0187397	0,02273107	0,02284818
	0,08556548	0,01497785	0,01902621	0,02366342	0,02383908
	0,09	0,01752636	0,01928275	0,02588019	0,02588019
	0,09187103	0,01690323	0,01976653	0,02766881	0,02757122
	0,09258929	0,0176562	0,0196629	0,02745474	0,02739619
	0,103	0,02	0,01990257	0,02886899	0,0276118
	0,1040377	0,01983192	0,02055674	0,03113952	0,02852753
	0,103	0,0205	0,01990257	0,02886899	0,0276118
	0,11318878	0,0205	0,02045256	0,03085682	0,02746115
	0,1155	0,02047867	0,02545688	0,03219487	0,02803619
	0,115	0,02047867	0,02511981	0,03108624	0,02818476
	0,12318878	0,02077637	0,03021293	0,03307406	0,02904849
	0,12521323	0,02120793	0,03053239	0,03376659	0,02976576
	0,125	0,02025504	0,03488019	0,03330349	0,0297721
	0,1345	0,02189383	0,04053002	0,03670606	0,0400605
	0,13542859	0,0229524	0,03418419	0,03678554	0,03344572
	0,1345	0,02189383	0,04053002	0,03670606	0,0400605
	0,142	0,02370455	0,04480968	0,04050373	0,04534266
	0,14405844	0,02427388	0,0420179	0,04066022	0,04200965
	0,142	0,02370455	0,04480968	0,04050373	0,04534266
	0,147	0,0270871	0,0511446	0,04370874	0,04252066
	0,15130679	0,02581913	0,05086919	0,04409469	0,04822011

	0,147	0,0270871	0,0511446	0,04370874	0,04252066
Sum1	1,35509184	0,37350305	0,46478149	0,51175558	0,52841569
Sum2	1,3932253	0,37676497	0,4672756	0,52293604	0,5331658
Sum3	1,39163095	0,37368822	0,47846777	0,52058694	0,53715083

16J-F5					
	Control -	MOI 0,1	MOI 1	MOI 10	MOI 100
	0,01	0,01	0,01	0,01	0,0105
	0,01	0,01	0,01	0,01	0,0105
	0,01	0,01	0,01	0,01	0,0105
	0,0105	0,01	0,01	0,01	0,01
	0,01028571	0,01	0,01	0,01	0,00978571
	0,0105	0,01	0,01	0,01	0,01
	0,012	0,01	0,01	0,01115	0,01
	0,01178571	0,01	0,01	0,01115	0,00978571
	0,012	0,01	0,01	0,01115	0,01
	0,0135	0,01	0,01	0,0124	0,01
	0,01358571	0,01	0,01	0,01257	0,00998571
	0,0135	0,01	0,01	0,0124	0,01
	0,014	0,01	0,01	0,0133	0,01
	0,01430286	0,01	0,01	0,013384	0,00998286
	0,014	0,01	0,01	0,0133	0,01
	0,0145	0,01115	0,01115	0,01430667	0,01115
	0,01484384	0,01041818	0,01041818	0,01443362	0,0104133
	0,0145	0,01115	0,01115	0,01430667	0,01115
	0,01525	0,0124	0,0124	0,01494619	0,0124
	0,015431	0,01143007	0,01143007	0,01521024	0,01142725

	0,01525	0,0124	0,0124	0,01494619	0,0124
	0,01575	0,0126	0,0126	0,0151027	0,0126
	0,01582155	0,01255134	0,01255134	0,01571031	0,01255178
	0,01575	0,0126	0,0126	0,0151027	0,0126
	0,017	0,0129	0,0129	0,01511317	0,01457
	0,01647608	0,01334974	0,01334974	0,01602442	0,01377002
	0,017	0,0129	0,0129	0,01511317	0,01457
	0,019	0,01440883	0,01323333	0,01555883	0,01654
	0,01844209	0,01433243	0,01354877	0,01590353	0,01606092
	0,019	0,01440883	0,01323333	0,01555883	0,01654
	0,022	0,0158633	0,01381889	0,0158633	0,017271
	0,02197992	0,01595368	0,01384795	0,01588569	0,01779871
	0,022	0,0158633	0,01381889	0,0158633	0,017271
	0,0275	0,0161546	0,01454873	0,0161546	0,018533
	0,0262668	0,01710367	0,01446187	0,01615295	0,01850721
	0,0275	0,0161546	0,01454873	0,0161546	0,018533
	0,034	0,0164459	0,01511317	0,0164459	0,019795
	0,03266888	0,01711174	0,01510476	0,01641657	0,01980815
	0,034	0,0164459	0,01511317	0,0164459	0,019795
	0,04	0,01729578	0,01576492	0,01729578	0,021057
	0,03999776	0,01715486	0,01582453	0,01695138	0,02116698
	0,04	0,01729578	0,01576492	0,01729578	0,021057
	0,0495	0,0185	0,01656492	0,0185	0,022319
	0,04820258	0,01798751	0,01655238	0,01803205	0,02245261
	0,0495	0,0185	0,01656492	0,0185	0,022319
	0,0605	0,01928275	0,01732587	0,01928275	0,0226
	0,05912979	0,0191938	0,01736074	0,01935626	0,02328741
	0,0605	0,01928275	0,01732587	0,01928275	0,0226

	0,0705	0,01990257	0,01782587	0,01990257	0,02350958
	0,0710144	0,02020288	0,01804445	0,02029447	0,02370826
	0,0705	0,01990257	0,01782587	0,01990257	0,02350958
	0,08	0,01990257	0,0185	0,02211981	0,02535542
	0,08163088	0,02066151	0,01862447	0,02139718	0,02460603
	0,08	0,01990257	0,0185	0,02211981	0,02535542
	0,09	0,0195655	0,01928275	0,02588019	0,02652792
	0,09118515	0,02045674	0,01925679	0,02395646	0,02616241
	0,09	0,0195655	0,01928275	0,02588019	0,02652792
	0,103	0,01990257	0,01990257	0,02886899	0,02770042
	0,1026566	0,02001368	0,01997877	0,02820147	0,02774169
	0,103	0,01990257	0,01990257	0,02886899	0,02770042
	0,115	0,02511981	0,02511981	0,03108624	0,03479317
	0,116337	0,02405256	0,02435386	0,03170878	0,03380731
	0,115	0,02511981	0,02511981	0,03108624	0,03479317
	0,125	0,03488019	0,03488019	0,03330349	0,04700301
	0,12826457	0,03314401	0,03319961	0,03378131	0,04526499
	0,125	0,03488019	0,03488019	0,03330349	0,04700301
	0,1355	0,04053002	0,04053002	0,03670606	0,05717627
	0,13770641	0,04203733	0,04204245	0,03646525	0,05776212
	0,1355	0,04053002	0,04053002	0,03670606	0,05717627
	0,1435	0,04480968	0,04480968	0,04050373	0,06611611
	0,14556135	0,04727976	0,04727764	0,0404651	0,06854971
	0,1435	0,04480968	0,04480968	0,04050373	0,06611611
	0,1485	0,0511446	0,0511446	0,04370874	0,07505594
	0,15128984	0,05122931	0,05122693	0,04448732	0,07698483
	0,1485	0,0511446	0,0511446	0,04370874	0,07505594

Sum1	1,386	0,49275867	0,47741534	0,51749972	0,62257284
Sum2	1,39486649	0,49567048	0,4784553	0,51793835	0,62187169
Sum3	1,386	0,49275867	0,47741534	0,51749972	0,62257284

GC1-C3	Control -	MOI 0,1	MOI 1	MOI 10	MOI 100
	0,01	0,01	0,01	0,0105	0,0105
	0,01	0,01	0,01	0,0105	0,0105
	0,01	0,01	0,01	0,0105	0,0105
	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
	0,01	0,01	0,01	0,00978571	0,00978571
	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
	0,012	0,01	0,01	0,01	0,01115
	0,01133333	0,01	0,01	0,00972857	0,01049524
	0,012	0,01	0,01	0,01	0,01115
	0,014	0,012	0,01	0,01	0,0124
	0,01385714	0,011	0,01	0,00993418	0,01220204
	0,014	0,012	0,01	0,01	0,0124
	0,014	0,014	0,01	0,01	0,0126
	0,01462857	0,0136	0,01	0,00998959	0,01291102
	0,014	0,014	0,01	0,01	0,0126
	0,0145	0,0145	0,01115	0,01115	0,013325
	0,01434558	0,0152	0,01065714	0,01065615	0,01315343
	0,0145	0,0145	0,01115	0,01115	0,013325
	0,01525	0,01516667	0,0124	0,0124	0,014365
	0,01496659	0,01536905	0,01212704	0,01212806	0,0140946
	0,01525	0,01516667	0,0124	0,0124	0,014365
	0,01575	0,01591071	0,0126	0,0126	0,015195

	0,0158174	0,01593461	0,01317354	0,01317387	0,01526155
	0,01575	0,01591071	0,0126	0,0126	0,015195
	0,017	0,01695437	0,0129	0,01457	0,016025
	0,016699	0,01675082	0,01336832	0,01403631	0,0161777
	0,017	0,01695437	0,0129	0,01457	0,016025
	0,019	0,01871032	0,01323333	0,01654	0,01654
	0,01872885	0,01848882	0,01342428	0,01620313	0,01675299
	0,019	0,01871032	0,01323333	0,01654	0,01654
	0,022	0,02074074	0,01381889	0,017271	0,017271
	0,02151548	0,02062071	0,01371132	0,01825141	0,01726828
	0,022	0,02074074	0,01381889	0,017271	0,017271
	0,0275	0,02235946	0,01454873	0,018533	0,018533
	0,02549285	0,02247706	0,01428287	0,01902014	0,01812111
	0,0275	0,02235946	0,01454873	0,018533	0,018533
	0,034	0,02411541	0,01511317	0,019795	0,019795
	0,03311862	0,02446043	0,01506843	0,01998991	0,0196188
	0,034	0,02411541	0,01511317	0,019795	0,019795
	0,04	0,02587136	0,01576492	0,021057	0,021057
	0,04086844	0,02611326	0,0157911	0,0212258	0,02119046
	0,04	0,02587136	0,01576492	0,021057	0,021057
	0,049	0,02762731	0,01656492	0,022319	0,022319
	0,04835466	0,02772341	0,01653323	0,02240249	0,02250336
	0,049	0,02762731	0,01656492	0,022319	0,022319
	0,06	0,02938327	0,01732587	0,0226	0,0226
	0,05910239	0,02955058	0,01738348	0,02322428	0,02331895
	0,06	0,02938327	0,01732587	0,0226	0,0226
	0,0705	0,03113922	0,01782587	0,02350958	0,02350958
	0,07151568	0,03144596	0,01801523	0,023804	0,02382837

	0,0705	0,03113922	0,01782587	0,02350958	0,02350958
	0,08	0,03289517	0,0185	0,02535542	0,02535542
	0,08241225	0,03319719	0,01857478	0,02479907	0,0247996
	0,08	0,03289517	0,0185	0,02535542	0,02535542
	0,09	0,03465112	0,01928275	0,02652792	0,02652792
	0,09133953	0,03478217	0,01923366	0,02634932	0,02634241
	0,09	0,03465112	0,01928275	0,02652792	0,02652792
	0,1035	0,03640708	0,01990257	0,02770042	0,02728869
	0,1015826	0,03642126	0,01992353	0,02784578	0,02767603
	0,1035	0,03640708	0,01990257	0,02770042	0,02728869
	0,1155	0,03816303	0,02511981	0,03479317	0,02818476
	0,11516611	0,03824034	0,02291454	0,03195032	0,02840292
	0,1155	0,03816303	0,02511981	0,03479317	0,02818476
	0,125	0,0425205	0,03488019	0,04700301	0,02945564
	0,12788379	0,04142946	0,03138743	0,04290691	0,02937891
	0,125	0,0425205	0,03488019	0,04700301	0,02945564
	0,1355	0,04635767	0,04053002	0,05717627	0,03055213
	0,13793958	0,04494036	0,03875122	0,05304491	0,03048906
	0,1355	0,04635767	0,04053002	0,05717627	0,03055213
	0,1435	0,04811362	0,04480968	0,06611611	0,03164643
	0,14466195	0,04850083	0,04580468	0,06663166	0,03180925
	0,1435	0,04811362	0,04480968	0,06611611	0,03164643
	0,148	0,05091019	0,0511446	0,07505594	0,03801634
	0,14881132	0,05193848	0,05380762	0,08007649	0,03733644
	0,148	0,05091019	0,0511446	0,07505594	0,03801634
Sum1	1,3855	0,64849722	0,47741534	0,62257284	0,5142119
Sum2	1,39014171	0,64818481	0,47393346	0,61765809	0,51341825

Sum3	1,3855	0,64849722	0,47741534	0,62257284	0,5142119
16J-H2					
	Control -	MOI 0,1	MOI 1	MOI 10	MOI 100
	0,01	0,01	0,01	0,0105	0,0105
	0,01	0,01	0,01	0,0105	0,0105
	0,01	0,01	0,01	0,0105	0,0105
	0,01	0,0105	0,01	0,01	0,01
	0,01	0,01028571	0,01	0,00978571	0,00978571
	0,01	0,0105	0,01	0,01	0,01
	0,012	0,012	0,012	0,01	0,01115
	0,01088889	0,01130952	0,01088889	0,00954563	0,01005675
	0,012	0,012	0,012	0,01	0,01115
	0,014	0,0135	0,014	0,01	0,0124
	0,01288889	0,01302381	0,01288889	0,00975992	0,01152103
	0,014	0,0135	0,014	0,01	0,0124
	0,0145	0,014	0,014	0,01	0,0126
	0,0145	0,014	0,014	0,01	0,0126
	0,0145	0,014	0,014	0,01	0,0126
	0,01525	0,0145	0,0145	0,01115	0,013325
	0,01549691	0,0145086	0,01446914	0,01056446	0,01323699
	0,01525	0,0145	0,0145	0,01115	0,013325
	0,01575	0,01525	0,01525	0,0124	0,014365
	0,01617661	0,01526099	0,01521056	0,0119157	0,01423171
	0,01575	0,01525	0,01525	0,0124	0,014365
	0,017	0,01575	0,01575	0,0126	0,015195
	0,01739323	0,01583413	0,01583048	0,01266708	0,01531824
	0,017	0,01575	0,01575	0,0126	0,015195
	0,019	0,017	0,017	0,01457	0,02153661

	0,01903547	0,01670677	0,01672457	0,01368428	0,01874282
	0,019	0,017	0,017	0,01457	0,02153661
	0,022	0,019	0,019	0,01654	0,02818476
	0,02178632	0,01875003	0,01876263	0,01624613	0,02685632
	0,022	0,019	0,019	0,01654	0,02818476
	0,0275	0,022	0,022	0,017271	0,02918992
	0,02755726	0,02262501	0,02215253	0,01785403	0,03138246
	0,0275	0,0225	0,022	0,017271	0,02918992
	0,034	0,0275	0,0275	0,018533	0,03090936
	0,03433879	0,02756071	0,02687167	0,01848591	0,03090044
	0,034	0,028	0,0275	0,018533	0,03090936
	0,04	0,034	0,034	0,019795	0,03378098
	0,04068053	0,03384357	0,03379677	0,01977894	0,03306726
	0,04	0,034	0,034	0,019795	0,03378098
	0,0485	0,0405	0,04	0,021057	0,04010839
	0,04772827	0,04035976	0,04055179	0,02106388	0,03702886
	0,0485	0,04	0,04	0,021057	0,04010839
	0,056	0,05	0,049	0,022319	0,0525
	0,05591599	0,04810652	0,04787051	0,02232601	0,04658444
	0,056	0,0495	0,049	0,022319	0,0525
	0,0615	0,0605	0,06	0,0226	0,06576107
	0,06247247	0,05931281	0,05883172	0,02310014	0,06309117
	0,0615	0,0605	0,06	0,0226	0,06576107
	0,0705	0,0705	0,0705	0,02350958	0,07771794
	0,06928985	0,07064558	0,07054185	0,02338209	0,07835914
	0,0705	0,0705	0,0705	0,02350958	0,07771794
	0,08	0,08	0,08	0,02535542	0,0845352
	0,08012765	0,08123487	0,08137526	0,02505663	0,08728394

	0,08	0,08	0,08	0,02535542	0,0845352
	0,09	0,09	0,09	0,02652792	0,08925214
	0,09085402	0,09109154	0,09115841	0,02704501	0,09244285
	0,09	0,09	0,09	0,02652792	0,08925214
	0,103	0,103	0,1035	0,02770042	0,09744313
	0,10264772	0,10265332	0,10303391	0,02799779	0,09815905
	0,103	0,103	0,1035	0,02770042	0,09744313
	0,1155	0,115	0,1155	0,03479317	0,10563411
	0,11673832	0,11642551	0,11714312	0,0319548	0,10597471
	0,1155	0,115	0,1155	0,03479317	0,10563411
	0,1255	0,125	0,125	0,04700301	0,1138251
	0,12858363	0,12797404	0,12858337	0,04034686	0,11413228
	0,1255	0,125	0,125	0,04700301	0,1138251
	0,1355	0,1355	0,1355	0,05717627	0,12201608
	0,13770037	0,13718639	0,13732333	0,05326866	0,12193783
	0,1355	0,1355	0,1355	0,05717627	0,12201608
	0,1445	0,1435	0,1435	0,06611611	0,13020707
	0,14631588	0,14579994	0,14558688	0,06699408	0,13048083
	0,1445	0,1435	0,1435	0,06611611	0,13020707
	0,15	0,1485	0,148	0,07505594	0,13839806
	0,15428658	0,15335122	0,15295379	0,07742046	0,13891351
	0,15	0,1485	0,148	0,07505594	0,13839806
Sum1	1,4315	1,387	1,3855	0,62257284	1,36053493
Sum2	1,44340367	1,39785037	1,39655005	0,61074422	1,35258834
Sum3	1,4315	1,387	1,3855	0,62257284	1,36053493

**ANOVA de un solo factor: ABC vs. Bacteriófago**

## Método

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna	No todas las medias son iguales
Nivel de significancia	$\alpha = 0,0000100000$

*Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.*

## Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Bacteriófago	17	Control; $\varphi 1$ MDI 0,1; $\varphi 1$ MDI 1; $\varphi 1$ MDI 10; $\varphi 1$ MDI 100; $\varphi 2$ MDI 0,1; $\varphi 2$ MDI 1; $\varphi 2$ MDI 10; $\varphi 2$ MDI 100; $\varphi 3$ MDI 0,1; $\varphi 3$ MDI 1; $\varphi 3$ MDI 10; $\varphi 3$ MDI 100; $\varphi 4$ MDI 0,1; $\varphi 4$ MDI 1; $\varphi 4$ MDI 10; $\varphi 4$ MDI 100

## Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Bacteriófago	16	10,3257	0,645354	3734,99	0,000
Error	43	0,0074	0,000173		
Total	59	10,3331			

## Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0,0131448	99,93%	99,90%	99,91%

## Medias

<b>Bacteriófago</b>	<b>N</b>	<b>Media</b>	<b>Desv.Est.</b>	<b>IC de 99,999%</b>
Control	12	1,39786	0,02501	(1,37888; 1,41685)
φ1 MDI 0,1	3	0,37465	0,00183	(0,33668; 0,41263)
φ1 MDI 1	3	0,47017	0,00729	(0,43220; 0,50815)
φ1 MDI 10	3	0,51843	0,00590	(0,48045; 0,55640)
φ1 MDI 100	3	0,53291	0,00437	(0,49494; 0,57088)
φ2 MDI 0,1	3	0,493729	0,001681	(0,455755; 0,531703)
φ2 MDI 1	3	0,477762	0,000600	(0,439788; 0,515736)
φ2 MDI 10	3	0,517646	0,000253	(0,479672; 0,555620)
φ2 MDI 100	3	0,622339	0,000405	(0,584365; 0,660313)
φ3 MDI 0,1	3	0,648393	0,000180	(0,610419; 0,686367)
φ3 MDI 1	3	0,47625	0,00201	(0,43828; 0,51423)
φ3 MDI 10	3	0,62093	0,00284	(0,58296; 0,65891)

φ3 MDI 100	3	0,513947	0,000458	(0,475973; 0,551921)
φ4 MDI 0,1	3	1,39062	0,00626	(1,35264; 1,42859)
φ4 MDI 1	3	1,38918	0,00638	(1,35121; 1,42716)
φ4 MDI 10	3	0,61863	0,00683	(0,58066; 0,65660)
φ4 MDI 100	3	1,35789	0,00459	(1,31991; 1,39586)

*Desv.Est. agrupada = 0,0131448*

### Comparaciones múltiples de Dunnett con un control

### Agrupar información utilizando el método de Dunnett y una confianza de 95%

Bacteriófago	N	Media	Agrupación
Control (control)	12	1,39786	A
φ4 MDI 0,1	3	1,39062	A
φ4 MDI 1	3	1,38918	A
φ4 MDI 100	3	1,35789	
φ3 MDI 0,1	3	0,648393	
φ2 MDI 100	3	0,622339	
φ3 MDI 10	3	0,62093	
φ4 MDI 10	3	0,61863	
φ1 MDI 100	3	0,53291	
φ1 MDI 10	3	0,51843	
φ2 MDI 10	3	0,517646	
φ3 MDI 100	3	0,513947	

φ2 MDI 0,1	3	0,493729	
φ2 MDI 1	3	0,477762	
φ3 MDI 1	3	0,47625	
φ1 MDI 1	3	0,47017	
φ1 MDI 0,1	3	0,37465	

*Las medias no etiquetadas con la letra A son significativamente diferentes de la media del*

*nivel de control.*

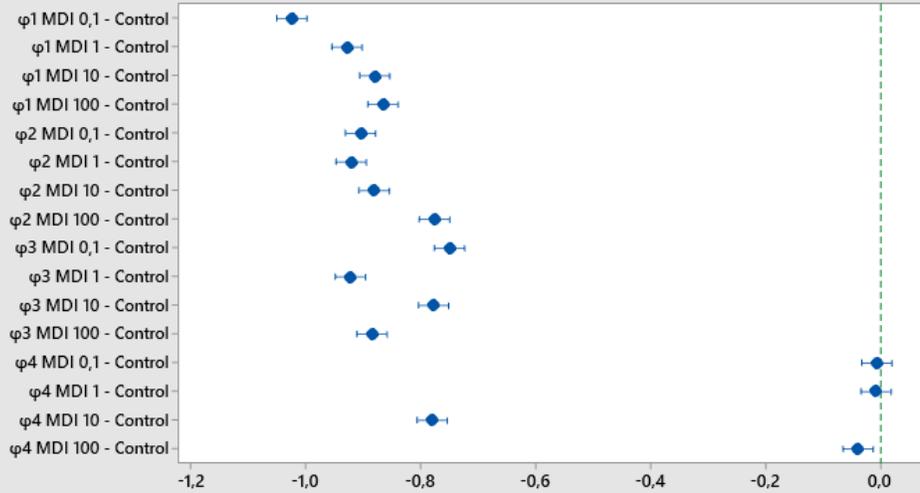
### Pruebas simultáneas de Dunnett para la media de nivel – Media de control

Diferencia de niveles	Diferencia de las medias	EE de diferencia	IC de 95%	Valor T	Valor p ajustado
φ1 MDI 0,1 - Control	-1,02321	0,00848	(-1,04943; -0,99699)	-120,59	0,000
φ1 MDI 1 - Control	-0,92769	0,00848	(-0,95391; -0,90147)	-109,33	0,000
φ1 MDI 10 - Control	-0,87944	0,00848	(-0,90566; -0,85322)	-103,65	0,000
φ1 MDI 100 - Control	-0,86495	0,00848	(-0,89117; -0,83873)	-101,94	0,000
φ2 MDI 0,1 - Control	-0,90413	0,00848	(-0,93035; -0,87792)	-106,56	0,000
φ2 MDI 1 - Control	-0,92010	0,00848	(-0,94632; -0,89388)	-108,44	0,000
φ2 MDI 10 - Control	-0,88022	0,00848	(-0,90644; -0,85400)	-103,74	0,000
φ2 MDI 100 - Control	-0,77552	0,00848	(-0,80174; -0,74931)	-91,40	0,000

φ3 MDI 0,1 - Control	-0,74947	0,00848	(-0,77569; -0,72325)	-88,33	0,000
φ3 MDI 1 - Control	-0,92161	0,00848	(-0,94783; -0,89539)	- 108,62	0,000
φ3 MDI 10 - Control	-0,77693	0,00848	(-0,80315; -0,75071)	-91,57	0,000
φ3 MDI 100 - Control	-0,88392	0,00848	(-0,91013; -0,85770)	- 104,17	0,000
φ4 MDI 0,1 - Control	-0,00725	0,00848	(-0,03346; 0,01897)	-0,85	0,999
φ4 MDI 1 - Control	-0,00868	0,00848	(-0,03490; 0,01754)	-1,02	0,993
φ4 MDI 10 - Control	-0,77923	0,00848	(-0,80545; -0,75302)	-91,84	0,000
φ4 MDI 100 - Control	-0,03998	0,00848	(-0,06620; -0,01376)	-4,71	0,000

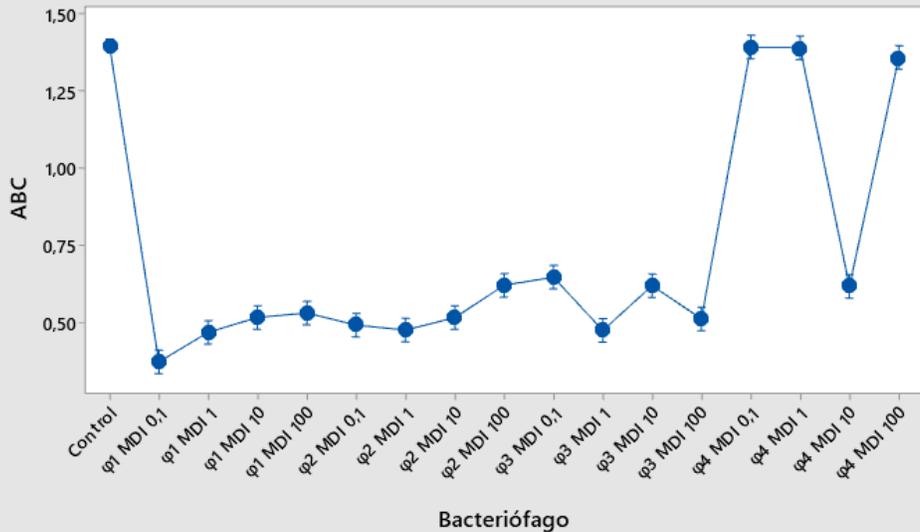
*Nivel de confianza individual = 99,65%*

**ICs simultáneos de 95% de Dunnett**  
 Media de nivel - Media de control para ABC



*Si un intervalo no contiene cero, las media correspondiente es significativamente diferente de la media de control.*

**Gráfica de intervalos de ABC vs. Bacteriófago**  
 99,999% IC para la media



*La desviación estándar agrupada se utilizó para calcular los intervalos.*

### Gráficas de residuos para ABC

