

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES
MAESTRIA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES FARMACOLÓGICAS
BIOQUÍMICAS



Establecimiento de una estrategia de control biológico de cepas ambientales de *Salmonella* spp. resistentes a antibióticos mediante la aplicación de bacteriófagos líticos.

Tesis de maestría presentado por:

Lic. Pamela Luque Cruz

LA PAZ-BOLIVIA

2023

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
MAESTRIA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES FARMACOLÓGICAS Y BIQUÍMICAS
MENCIÓN EN BIOTECNOLOGÍA



**Establecimiento de una estrategia de control biológico de
cepas ambientales de *Salmonella* spp. resistentes a antibióticos
mediante la aplicación de bacteriófagos líticos.**

Tesis de maestría presentado por:

Lic. Pamela Luque Cruz

Tutores: María Teresa Álvarez Aliaga Ph.D.

Carla Fabiana Crespo Melgar Ph.D.

LA PAZ-BOLIVIA

2023

Dedicatoria

A mi familia.

*“Y se dio cuenta de que nadie jamás está solo en el mar”
. Ernest Hemingway. El viejo y el mar*

Agradecimientos

A Dios, por iluminar mi camino.

A mi familia, por su apoyo incondicional.

*A mi tutora María teresa Álvarez, por su paciencia, guía, tiempo y permitirme
formar parte del proyecto de fagos.*

*A mi amiga y mentora Marisel Mamani, quien me metió a este mundo, gracias
por apoyarme en todas mis locuras, soportarme todos mis estados de ánimo y
simplemente por estar allí siempre.*

*A mis compañeros y amigos de laboratorio del Instituto de Investigaciones
Fármaco Bioquímicas, quienes me han apoyado de diferentes, pero igualmente valiosas
maneras.*

A todos ¡¡¡GRACIAS!!!

RESUMEN

La resistencia antimicrobiana debe ser contemplada dentro del contexto de "One health", por la interconexión entre salud humana, animal, agrícola y ambiental. En función a la visión global de la inocuidad de los alimentos, el control de patógenos en la cadena alimentaria (de la “granja a la mesa”), demanda contar con estrategias alternativas a los antimicrobianos como ser el uso de inmunomoduladores, probióticos, enzimas, vacunas, péptidos antimicrobianos, bacteriocinas y bacteriófagos y sus derivados, entre otros.

Mediante la presente investigación se estableció una estrategia de control biológico aplicando cocteles de bacteriófagos líticos sobre cepas ambientales de *Salmonella* spp. resistentes a antibióticos. En este contexto, se aislaron 10 cepas de *Salmonella*, 2 clasificadas como MDR en base al perfil de susceptibilidad antimicrobiana. Se estableció un banco de bacteriófagos líticos de *Salmonella* spp. conformado por 12 fagos aislados a partir de muestras ambientales y clasificados como fagos de amplia gama y muy amplia gama de hospederos en base a su espectro lítico. Dichos fagos son estables en un rango de pH de 3,5 a 9 y a temperaturas de hasta 60°C. Finalmente, se diseñaron cócteles compuestos por cinco fagos: ϕ C3/, ϕ C4/3, ϕ C2P, ϕ F4/1T y ϕ HCl2, los mismos presentaron periodos de latencia de 20 y 30 minutos y un tamaño de explosión de 27, 163, 147, 87 y 27 partículas virales/célula, respectivamente. La Eficacia fue determinada mediante la aplicación de los cocteles fágicos sobre cascaras de huevo y pechugas de pollo contaminadas con 8 log UFC/mL de *Salmonella* multirresistente, almacenadas a 25° C y 6° C, respectivamente. Observándose una disminución aproximada de 3 unidades log UFC/mL del recuento bacteriano viable cuando se emplea una dosis de 10^{12} UFP (MDI de 10000) en cascaras de huevo y una dosis de 10^{10} UFP (MDI de 100) en pechugas de pollo, con un tiempo de exposición de 16 y 2 horas, correspondientemente. De esta manera se hace factible el uso de cocteles fágicos para el control de cepas multirresistentes a antibióticos como una alternativa que coadyuve a la inocuidad alimentaria en nuestro país.

Palabras clave: Biocontrol, Bacteriófagos, *Salmonella*, coctel, eficacia, matrices alimentar

ABSTRACT

Antimicrobial resistance must be considered within the context of "One health", due to the interconnection between human, animal, agricultural and environmental health. Based on the global vision of food safety, the control of pathogens in the food chain (from "farm to table"), requires alternative strategies to antimicrobials such as the use of immunomodulators, probiotics, enzymes, vaccines, antimicrobial peptides, bacteriocins and bacteriophages and their derivatives, among others.

In the present study, a biological control strategy was established by applying cocktails of lytic bacteriophages on environmental antibiotic resistant strains of *Salmonella* spp. In this context, 10 *Salmonella* isolates were obtained, 2 classified as MDR based on the antimicrobial susceptibility profile. A bank of lytic bacteriophages of *Salmonella* spp. made up of 12 phages isolated from environmental samples and classified as wide range- and very wide host range-phages based on their lytic spectrum. These phages are stable in a pH range of 3.5 to 9 and at temperatures up to 60°C. Finally, cocktails composed of five phages were designed: ϕ C3/, ϕ C4/3, ϕ C2P, ϕ F4/1T and ϕ HCl2, they showed latency periods of 20 and 30 minutes and a burst size of 27, 163, 147, 87 and 27 viral particles/cell, respectively. Efficacy was determined by applying phage cocktails to eggshells and chicken breasts contaminated with 8 log CFU/mL of multidrug-resistant *Salmonella*, stored at 25°C and 6°C, respectively. A decrease of 3 log CFU/mL units in the viable bacterial count was observed when a dose of 10^{12} PFU (MOI of 10,000) was used in eggshells and a dose of 10^{10} PFU (MOI of 100) in chicken breasts, with an exposure time of 16 and 2 hours, correspondingly. In this way, the use of phage cocktails for the control of multidrug-resistant bacterial strains is feasible as an alternative that might contribute to food safety in our country.

Key words: Biocontrol, Bacteriophages, Salmonella, cocktail, Efficacy, food matrice

ÍNDICE DE CONTENIDO

CAPITULO 1. Introducción	1
CAPITULO 2. Problemática de infecciones producidas por <i>Salmonella</i> en granjas avícolas	5
2.1 <i>Salmonella: Descripción morfológica, fisiológica y taxonómica</i>	5
2.2 <i>Patogenicidad producida por Salmonella desde la perspectiva de One-health</i>	6
2.3 <i>Sanidad en granjas avícolas y alimentos</i>	8
2.4 <i>Salmonelosis en el sector avícola.....</i>	10
CAPITULO 3. Control biológico de cepas de <i>Salmonella</i> mediante bacteriófagos	12
3.1 <i>Control biológico</i>	12
3.2 <i>Bacteriófagos como herramientas de biocontrol de bacterias patógenas y/o resistentes a antibióticos</i>	13
3.2.1 <i>Morfología y composición de los fagos</i>	13
3.2.3 <i>Ciclo de vida</i>	15
3.3 <i>Terapia de fagos para el control de cepas patógenas en granjas avícolas y/o derivados</i>	19
3.3.1 <i>Terapia fágica.....</i>	21
3.3.2 <i>Biosanitización</i>	21
3.3.3 <i>Biocontrol</i>	21
3.3.4 <i>Bioconservación.....</i>	22
3.4 <i>Productos bio-basados con bacteriófagos</i>	22
4. <i>Factores a considerar en el control biológico mediado por fagos</i>	24
4.1 <i>Relación fago – bacteria. Multiplicidad de Infección y distribución de Poisson.</i>	24
4.2 <i>Rango de hospederos del fago</i>	25
4.3 <i>Estabilidad de los fagos</i>	26
4.4 <i>Tasa de adsorción de fagos</i>	26
4.5 <i>Período de latencia del fago y tamaño de la explosión.....</i>	27
4.6 <i>Determinación de la Eficacia de fagos</i>	29
CAPITULO 4.....	30
Antecedentes	30
Justificación	32
Objetivos	34

<i>Objetivo general</i>	34
<i>Objetivos específicos</i>	34
Formulación de la hipótesis	35
CAPITULO 5. Materiales y métodos	36
5.1 <i>Aislamiento e identificación de cepas de Salmonella spp.</i>	36
5.1.1 <i>Recolección y transporte de muestras</i> -----	36
5.1.2 <i>Aislamiento e identificación fisiológica de cepas de Salmonella spp.</i> --	37
5.1.3 <i>Determinación del perfil de resistencia antimicrobiana de cepas de Salmonella spp.</i> -----	38
5.2 <i>Establecimiento de un banco de bacteriófagos con actividad lítica sobre cepas de Salmonella spp.</i>	39
5.2.1 <i>Recolección y transporte de muestras</i> -----	39
5.2.2 <i>Aislamiento, purificación, titulación, amplificación y criopreservación de bacteriófagos.</i> -----	40
5.3 <i>Caracterización parcial de bacteriófagos líticos aislados</i>	42
5.3.1 <i>Relación bacteriófago:bacteria</i> -----	42
5.3.2 <i>Determinación del rango de hospederos – Prueba Puntual o Spot test</i>	43
5.3.3 <i>Estabilidad y viabilidad de los bacteriófagos a diferentes temperaturas y pH</i> -----	43
5.3.4 <i>Curva de un paso ó One-step growth curve</i> -----	44
5.3.5 <i>Adsorciones posteriores a la infección por fagos</i> -----	45
5.4 <i>Eficacia del coctel de fagos</i>	45
5.4.1 <i>Preparación de matrices alimentarias y coctel de fagos</i> -----	45
5.4.2 <i>Contaminación de matrices alimentarias con Salmonella spp. y aplicación de coctel de fagos</i> -----	46
5.4.3 <i>Determinación de la carga bacteriana en alimentos tratados con el coctel de fagos</i> -----	46
5.5 <i>Análisis estadístico</i>	48
CAPITULO 6. Resultados y discusión	49
6.1 <i>Aislamiento e identificación fisiológica de Salmonella spp.</i>	49
6.1.1 <i>Determinación del perfil de resistencia antimicrobiana de cepas de Salmonella spp</i> -----	52
6.2 <i>Establecimiento de un banco de bacteriófagos</i>	55
6.2.1 <i>Aislamiento, selección y titulación de bacteriófagos.</i> -----	55
6.3 <i>Caracterización de los bacteriófagos líticos aislados.</i>	57

6.3.1	Multiplicidad de infección-----	57
6.3.2	Distribución de Poisson-----	59
6.3.3	Rango de hospederos del fago-----	63
6.3.4	Estabilidad y viabilidad-----	65
6.3.5	Parámetros cinéticos de bacteriófagos -----	67
6.3.6	Adsorciones posteriores a la infección por fagos -----	69
6.3	<i>Eficacia del coctel de fagos en matrices alimentarias</i>	70
4.2	Eficacia del coctel de fagos en cascaras de huevo contaminadas con <i>Salmonella</i> -----	71
4.3	Eficacia del coctel de fagos en pechugas de pollo contaminadas con <i>Salmonella</i> -----	72
CAPITULO 7.	Conclusiones	78

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. La clasificación de las salmonelas según los estudios de hibridación de DNA-DNA (fuente: Achtman et al., 2012).....	6
Figura 2. Clasificación de bacteriófagos en función a morfología y tipo de material genético. Obtenido de Dion et al., 2020.....	14
Figura 3. Ciclo de vida de los bacteriófagos. a) Ciclo de vida lítico; b) ciclo de vida lisogénico; c) ciclo de vida pseudo-lisogénico; d) ciclo de vida crónico o portador y liberación a través de complejo proteico. Adaptado de Makky et al., 2021 ...	19
Figura 4. Aplicación de fagos en la industria avícola. (Tomado de Han et al., 2022)....	20
Figura 5. Ejemplos de productos de control biológico basado en fagos.	23
Figura 6. Curva de crecimiento de un paso de bacteriófagos (Giri et al., 2018).....	28
Figura 7. Geolocalización de los lugares de toma de muestras de heces de pollos y agua superficial.....	36
Figura 8. Colonias de <i>Salmonella</i> crecidas en CHROMagar™ <i>Salmonella</i> Plus A y B (color malva) y colonias de <i>Salmonella</i> crecidas en agar XLD C y D (color negro con halo traslucido). A) colonias provenientes de muestras de heces de pollos, B) colonias aisladas de agua de Rio Luribay. C) y D) colonias provenientes de muestras de heces de pollos.	49
Figura 9. Susceptibilidad antimicrobiana de cepas de <i>Salmonella</i> spp aisladas (N=10) Método de discriminación resistente (azul) – sensible (celeste): Puntos de corte de Kirby-Bauer según CLSI 32th. Edición).....	52
Figura 10. Morfología de las calvas de fagos aislados de muestras de heces de pollo ...	55
Figura 11. Distribución de Poisson frente a diferentes MDI.	60
Figura 12. Determinación de rango de hospederos de los diferentes bacteriófagos aislados, observándose como zonas de lisis sobre: A) cepa de <i>Salmonella</i> 16J y B) cepa de <i>Escherichia coli</i> D3.....	64
Figura 13. Curva de un paso de los bacteriófagos ϕ C2P, ϕ F4/1T, ϕ HC12, ϕ C3/1 y ϕ C4/3 usando hospedero particular la cepa de <i>Salmonella</i> spp. 16J.	68

Figura 14. Recuento bacteriano (log UFC/mL) en función del tiempo de acción (horas) y dosis del coctel de fagos (Log UFP/mL) sobre cascaras de huevo contaminadas con la cepa 16J de <i>Salmonella</i> multirresistente a antibióticos. El ensayo fue realizado a una temperatura de incubación de 25 °C.....	71
Figura 15. Superficie de respuesta en función del tiempo de acción (horas) y dosis del coctel de fagos (Log UFP/mL) sobre cascaras de huevo contaminadas con la cepa 16J de <i>Salmonella</i> multirresistente a antibióticos.	72
Figura 16. Recuento bacteriano (log UFC/mL) en función del tiempo de acción (horas) y dosis del coctel de fagos (Log UFP/mL) sobre pechugas de pollo contaminadas con la cepa 16J de <i>Salmonella</i> multirresistente a antibióticos. El ensayo fue realizado a una temperatura de incubación de 6 °C.	73
Figura 17. Superficie de respuesta en función del tiempo de acción (horas) y dosis del coctel de fagos (Log UFP/mL) sobre pechugas de pollo contaminadas con la cepa 16J de <i>Salmonella</i> multirresistente a antibióticos.	74

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Reacciones bioquímicas de <i>Salmonella</i> spp.....	38
Tabla 2. Diluciones de siembra para el recuento bacteriano en los pellets obtenidos de cada punto de muestreo posterior a la aplicación de fagos.....	47
Tabla 3. Denominación de la cepa de <i>Salmonella</i> aislada de acuerdo con el tipo de muestra y lugar de aislamiento.....	50
Tabla 4. Denominación del bacteriófago aislado, tipo de muestra y lugar de aislamiento	56
Tabla 5. Título de bacteriófagos (UFP/mL) de una calva única empleando como huésped las cepas Lu, 16J y S5 de <i>Salmonella</i>	57
Tabla 6. Multiplicidad de Infección de los fagos aislados frente a las cepas Lu, 16J y S5 de <i>Salmonella</i>	59
Tabla 7. Distribucion de Poisson de los fagos frente a las cepas Lu, 16J y S5 de <i>Salmonella</i>	62
Tabla 8. Rango de hospederos de los bacteriófagos aislados.....	63
Tabla 9. Estabilidad y viabilidad de los bacteriófagos a diferentes pH y temperaturas.....	66
Tabla 10 Parámetros cinéticos de los bacteriófagos ϕ C2P, ϕ F4/1T, ϕ HCl2, ϕ F3/1 y ϕ C4/3.....	69
Tabla 11. Fracción de bacterias que adsorben fagos después de ser infectadas.....	70

CAPITULO 1. Introducción

El uso y abuso sistemático de los antimicrobianos desencadenó la propagación de bacterias resistentes a los antibióticos, situación que actualmente se considera prioritaria para la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) y la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura (FAO). Este hecho se ve reforzado aún más por el planteamiento llevado a cabo por la OMS, que determina que los antibióticos administrados a los animales destinados a la producción de alimentos deben utilizarse únicamente para tratar enfermedades infecciosas y no para favorecer su crecimiento, como sucede hoy en día en muchas granjas en todo el mundo, así como en Bolivia. Es probable que una reducción del uso de antibióticos en la industria ganadera, al menos en un principio genere grandes pérdidas económicas por el cambio de modelo, así lo indican varios colegios veterinarios de América Latina donde se presentan anualmente 77 millones de casos de enfermedades infecciosas transmitidas por alimentos.

En las últimas décadas, se ha reportado el aislamiento e identificación de bacterias resistentes a antibióticos, resistentes al menos a 3 de las 13 categorías de antibióticos (MDR= multidrogo resistencia), susceptibles a solo 1 de las 13 categorías (XDR= extremadamente resistente) y los resistentes a todas las categorías antimicrobianas (PDR = pan drogo resistentes), como efecto directo del uso indiscriminado de los antibióticos en medicina humana y veterinaria, así como en la industria y la agricultura.

Un factor sustancial a considerar es que las bacterias MDR pueden ser transmitidas por zoonosis ó a través de la cadena alimentaria y el medio ambiente, de esta manera y, bajo el concepto de “One-Health”, es imperativo que los esfuerzos por controlar la diseminación de bacterias resistentes a antibióticos y/o los genes de resistencia antimicrobiana, estén dirigidos a la propuesta de métodos alternativos de control que no involucren una contaminación ambiental ni una afectación a la salud humana y animal.

Un problema de salud importante en Bolivia son las infecciones transmitidas por los alimentos y el agua, principalmente debido a las malas prácticas agrícolas, indebidos o ausentes procedimientos de saneamiento básico, malas prácticas de manipulación de alimentos y deficientes o ausentes tratamientos de aguas residuales. Entre las enfermedades infecciosas más comunes se encuentran aquellas producidas por *Salmonella* spp., *Escherichia coli* y *Campylobacter* spp.

La Red de Vigilancia de Contaminantes Microbianos (RELOAA -INLASA, Boletín del Ministerio de Salud 2017 - 2018) ha determinado datos de prevalencia relacionados con la contaminación microbiana en la cadena productiva de la carne de pollo, reportando una prevalencia de *E. coli* en un 3% de muestras fuera del Estándar de calidad microbiológica de alimentos, mostrando un perfil de resistencia antimicrobiana caracterizado por resistencia a nitrofurantoína y ácido nalidíxico en más del 65% de las cepas y resistencia a ampicilina y cefalosporinas en más del 70%. En el caso de *Salmonella* spp. en la cadena productiva de la carne de pollo existe un 19% de prevalencia y el perfil de resistencia antimicrobiana reporta más del 70% de las cepas resistentes a ampicilina, cefalosporinas, ciprofloxacina y ácido nalidíxico. Desafortunadamente, no existe una determinación de la incidencia, prevalencia o perfil de resistencia antimicrobiana de las cepas de *Campylobacter* spp.

Por otro lado, existen reportes de salmonelosis aviar en Bolivia, una enfermedad infecciosa altamente contagiosa en animales de granja, que provoca importantes pérdidas económicas por su alta tasa de mortalidad, disminución en la producción de huevos, baja incubación de huevos, así como aumento de gastos en tratamientos veterinarios. Esto se debe a infecciones debidas a *Salmonella Gallinarum* (tifoidea aviar) y *Salmonella Pullorum* (pullorosis) y a la falta de control y saneamiento básico en las granjas avícolas pequeñas.

Uno de los "nuevos" enfoques prometedores que se destaca cada vez más, entre otros, es la terapia con fagos o bacteriófagos (virus que infectan bacterias) que, desde su aislamiento y caracterización inicial, no es de extrañar que su uso estuviera dirigido a la

terapia en personas, sin embargo, la aparición de los primeros antimicrobianos de amplio espectro supuso el final de la terapia con fagos.

Los bacteriófagos tienen una serie de ventajas sobre otras alternativas: (i) alta eficacia para matar bacterias, (ii) efectos secundarios mínimos o nulos, (iii) sin efectos alérgicos, (iv) la producción es rápida y económica, y (v) son específicos del hospedero y, por lo tanto, no afectan a la microbiota intestinal ni a otras bacterias saprofitas del entorno ambiental.

Diferentes estudios científicos han demostrado que el uso de bacteriófagos es efectivo para llevar a cabo la prevención y tratamiento de patógenos bacterianos en animales. En el caso concreto de las aves de corral se han obtenido buenos resultados al reducir la infección de *Salmonella*, *E. coli* y *Campylobacter*. Hasta ahora, el uso de la terapia con fagos para controlar *Salmonella entérica* en aves podía reducir, pero no eliminar por completo la colonización bacteriana (Oechslin, F., 2018).

Hoy ya se comercializan productos a base de una mezcla de bacteriófagos para uso veterinario, como PLSV-1™ que es efectivo para *Salmonella* y INT-401™ para *Clostridium perfringens*, ambos aprobados para uso en aves, Listshield™ (aprobado como GRAS en USA) para el tratamiento de *Listeria monocytogenes*, para aplicación directa en pescados y mariscos, frutas y verduras procesadas y frescas, y productos lácteos, incluidos productos como el queso, y SalmoFresh™ eficaz contra *Salmonella entérica*, aprobado para su uso en aves, pescados, mariscos y productos frescos y procesados frutas y vegetales. En los últimos años, los estudios de la aplicación de bacteriófagos se están ampliando al análisis potencial del uso de moléculas bioactivas producidas por bacteriófagos como las bacteriocinas codificadas por bacteriófagos de cola (PBTLB) o tailocinas y proteínas codificadas por fagos. Algunas de estas proteínas se clasifican como depolimerasas (hidrolasas, liasas), lisinas asociadas a viriones, holinas y endolisinas.

Actualmente como un enfoque de intervención para el control biológico de patógenos alimentarios o bacterias resistentes a los antimicrobianos la aplicación de bacteriófagos ha sido bien recibida, por tal motivo se dará una visión orientada al control

biológico de *Salmonella* spp. resistente a antibióticos por bacteriófagos con actividad lítica. Todavía queda mucha investigación por hacer para asegurar que los bacteriófagos puedan volverse efectivos en el tratamiento de diferentes infecciones bacterianas, incluida la necesidad de que los bacteriófagos estén presentes en altas concentraciones y lo suficientemente estables para que puedan llegar al sitio de la infección en un estado activo.

El presente estudio estableció una estrategia de control biológico aplicando cocteles de bacteriófagos líticos sobre cepas ambientales de *Salmonella* spp. resistentes a antibióticos. Se caracterizó la cinética, estabilidad, viabilidad, espectro lítico de los bacteriófagos aislados y finalmente se evaluó la eficacia de los cocteles de bacteriófagos obtenidos sobre matrices de cascaras de huevo y pechugas de pollo, estableciendo una estrategia factible de biocontrol mediante el uso de cocteles fágicos sobre cepas multirresistentes a antibióticos.

CAPITULO 2. Problemática de infecciones producidas por *Salmonella* en granjas avícolas

2.1 *Salmonella*: Descripción morfológica, fisiológica y taxonómica

Salmonella spp. son bacilos rectos Gram negativos de tamaño variable, pertenecientes a las enterobacterias que no forman esporas. La mayor parte de las cepas son móviles como *Salmonella* Paratifoidea que suele estar peritricamente flagelada, sin embargo, *Salmonella* Gallinarum y *Salmonella* Pullorum son característicamente inmóviles (Guthrie, R., 2017)

La mayoría de las cepas de *Salmonella* son fermentadoras de lactosa, productoras de sulfito de hidrógeno, oxidasa negativa y catalasa positiva. Otras propiedades bioquímicas que permiten la identificación de *Salmonella* incluyen la capacidad de crecer en citrato como única fuente de carbono, descarboxilar la lisina e hidrolizar la urea. También son resistentes a determinadas sustancias químicas (p. ej., verde brillante, tetrionato de sodio, desoxicolato de sodio) que inhiben otras bacterias entéricas; estos compuestos son incluidos en medios para aislar cepas de *Salmonella* de muestras de heces (Brooks, 2011)

La clasificación de las cepas de *Salmonella* según los estudios de hibridación de DNA-DNA ha demostrado que hay siete grupos evolutivos (Figura 1). En la actualidad, el género *Salmonella* se divide en dos especies, cada una de las cuales contiene múltiples subespecies y serotipos. Las dos especies son:

- 1) *Salmonella entérica*: contiene cinco subespecies, de los cuales casi todas las infecciones de seres humanos son causadas por las cepas de la subespecie I, que se designa como *Salmonella entérica* subespecie *entérica*. Hay más de 2500 serotipos de salmonelas, incluidos más de 1400 en el grupo de hibridación de DNA I que pueden infectar al ser humano.
- 2) *Salmonella bongori* (antiguamente subespecie V).

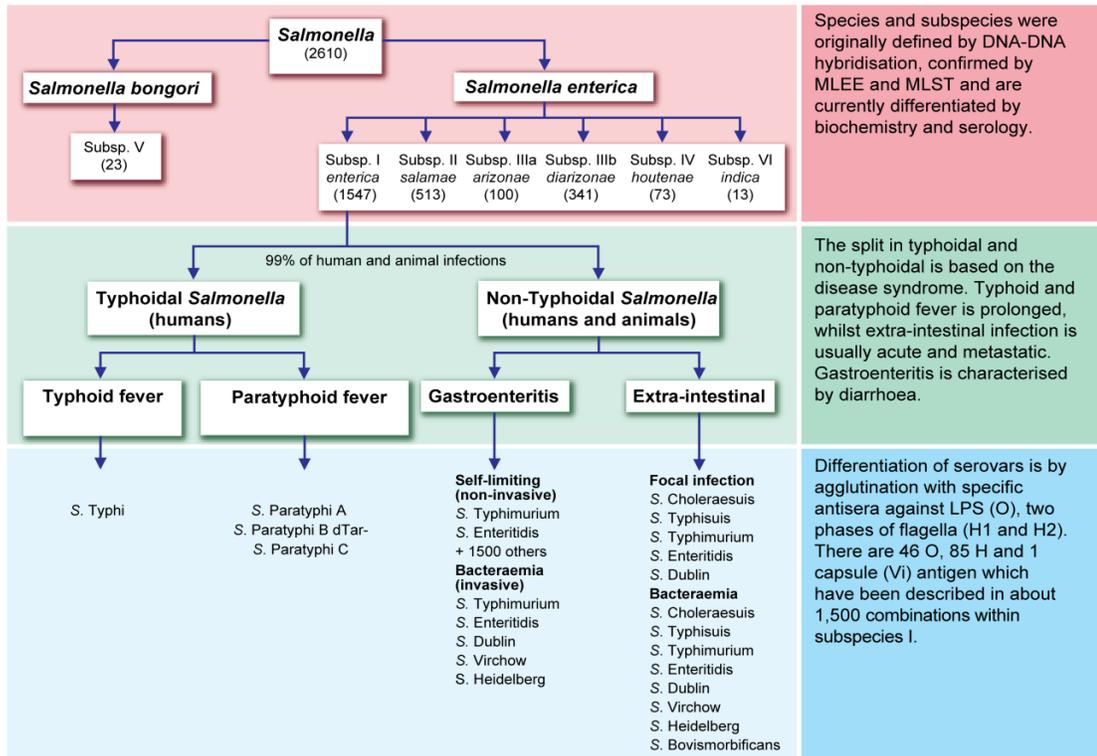


Figura 1. La clasificación de las salmonelas según los estudios de hibridación de DNA-DNA (fuente: Achtman et al., 2012)

2.2 Patogenicidad producida por *Salmonella* desde la perspectiva de One-health

Las cepas de *Salmonella* es uno de los 4 agentes causales de enfermedades diarreicas a nivel mundial, por lo general, la mayoría de los serotipos causan gastroenteritis en humanos que a menudo no presenta complicaciones y no necesita tratamiento, pero la enfermedad puede ser grave en los jóvenes, los ancianos y los pacientes con inmunidad debilitada. *Salmonella* Enteritidis y *Salmonella* Tiphymurium, son los serotipos transmitidos de animales a humanos considerados los más importantes en salud pública.

Salmonella es capaz de sobrevivir la acidez del estómago y la alta osmolaridad del intestino delgado, por lo cual induce su internalización por las células epiteliales intestinales del íleon y resiste la fagocitosis mediada por las células dendríticas y

macrófagos, logrando colonizar el tejido linfoide subyacente y los ganglios linfáticos mesentéricos (Cossart & Sansonetti, 2004; Dandekar et al, 2015). Los macrófagos se consideran las células blanco de la infección, ya que la bacteria se establece en un compartimiento ácido conocido como la vacuola que contiene a *Salmonella*, donde es capaz de evadir la actividad lítica de los componentes lisosomales, multiplicarse y propagarse en el tejido intestinal o en el resto del organismo de su hospedero cuando se establece una infección local o sistémica, respectivamente (Cossart & Sansonetti, 2004).

Un hábitat natural de especies de *Salmonella* son las aves de corral, las especies que ocasionan enfermedad en humanos normalmente no ocasionan problemas clínicos en las aves en general, sin embargo, 2 especies: *Salmonella Pullorum* y *Salmonella Gallinarum* pueden ocasionar pérdidas económicas cuantiosas en granjas. *Salmonella Pullorum* es el agente causal de la Pullorosis, que afecta a aves menores a 4 semanas de edad, se transmite por vía vertical (transovárica), este infecta los óvulos de pollos, así el embrión ya está infectado cuando eclosiona, este contamina la planta de incubación lo que lleva a la infección de otros pollos; también puede ser por vía directa o indirecta por el contacto con aves infectadas (respiratorias o heces) o alimentos, agua o arena contaminados, la transmisión entre granjas puede deberse a la mala bioseguridad (Aiello et al, 2016; McVey et al, 2013). Las aves que sobreviven pueden convertirse en portadores del patógeno en los macrófagos esplénicos y el aparato reproductor (ovarios). Por otro lado, *Salmonella Gallinarum* es causante de la Tifosis aviar, una enfermedad septicémica aguda o crónica de aves adultas, principalmente pollos, esta se transmite por huevo y produce lesiones en pollitos similares a los producidos por *Salmonella Pullorum*, sin embargo, esta presenta una tendencia mucho mayor a propagarse entre parvadas en crecimiento o maduras (Aiello et al, 2016; McVey et al, 2013).

La transmisión de cepas de *Salmonella* spp. proporciona un ejemplo convincente del paradigma One-Health que reconoce que la salud humana está estrechamente relacionada con la salud de los animales y el medio ambiente, esto se explica porque la mayoría de los casos de salmonelosis humana pueden transmitirse por vía fecal-oral, ya sea directa o indirectamente, a través de la cadena alimentaria, desde el alimento para

animales, la producción primaria y todo el camino hasta los hogares o los establecimientos e instituciones de servicio de alimentos. Sin embargo, las infecciones también se adquieren a través del contacto directo o indirecto con animales en hogares, clínicas veterinarias, jardines zoológicos, entornos agrícolas (Silva et al., 2014).

Se ha detectado *Salmonella* en varios lugares dentro de granjas y mataderos, y la contaminación a largo plazo de las granjas parece ser un fenómeno generalizado. Además, los insectos, aves, ratones y gusanos son considerados como vectores importantes para la rápida diseminación de *Salmonella* en el medio ambiente, pudiendo encontrarse también en verduras y plantas comestibles, pues estos pueden contener altas concentraciones de *Salmonella* debido a la contaminación fecal en tierras de cultivo por el riego, animales infectados o como resultado de la fertilización de tierras de cultivo con estiércol animal. Incluso se ha demostrado que los patógenos entéricos han adquirido mecanismos para ingresar a las plantas y reproducirse dentro, por lo cual no solo se encuentran en la superficie (Berger et al., 2010; Critzer & Doyle, 2010).

2.3 Sanidad en granjas avícolas y alimentos

La salmonelosis es particularmente costosa para los ganaderos, por lo cual el control se basa principalmente en la limpieza de nichos con ácidos fuertes o detergentes especializados de tipo pecuario, además se usan gran cantidad de agua, porque para remover la materia orgánica y biofilms formado por las bacterias se usa agua a presión, con el fin de eliminar todo residuo de contaminación (Lainez et al., 2008; Manual de buenas prácticas pecuarias en la producción de pollo de engorde., 2019).

Los ganaderos con frecuencia usan alimentos que han sido complementados con antibióticos para prevenir la salmonelosis y otras infecciones bacterianas en sus animales. (Brands, & Alcamo, 2005), justificando que, si un animal pierde mucho peso debido a la enfermedad, no habrá suficiente carne para vender con fines de lucro, además se considera que el costo del tratamiento de infecciones es alto.

En Bolivia el control de salmonelosis en granjas además de la limpieza se emplea vacunas método de prevención y control de *Salmonella*, está dirigido básicamente a tres

aspectos: a) prevenir o reducir la colonización intestinal; b) prevenir la infección sistémica y; c) reducir la excreción fecal, esta puede ser parcialmente efectiva en pollitos, pero no así en aves adultas. También se realizan controles serológicos y cultivos periódicamente mediante el Programa Nacional de Erradicación de la Salmonelosis y Sanidad Aviar (PRONESA),

Varios enfoques son utilizados para mejorar la seguridad de los alimentos, como ser: la pasteurización por calor se usa para reducir el número de bacterias en líquidos y productos lácteos. Sin embargo, la pasteurización no es adecuada para muchos alimentos frescos, ya que el proceso hace que los alimentos se cocinen. El procesamiento a alta presión (HPP), es otro método donde se expone los alimentos a alta presión para inactivar los microbios, utilizado en productos líquidos y platos precocinados, destinados a ser congelados; sin embargo, no puede emplearse en carnes y productos frescos, ya que puede afectar la apariencia (color) y/o el contenido nutricional de estos productos. La irradiación también es considerada un método para reducir la carga microbiana patógena en alimentos. Sin embargo, el método no es bien aceptado por los consumidores, además de que la irradiación puede afectar negativamente las cualidades organolépticas de los alimentos

En último lugar, los desinfectantes químicos, como el cloro y el ácido peracético, son empleados para reducir los contaminantes microbianos frutas y verduras frescas, así como productos alimenticios listos para comer. Si bien, en general, son efectivos, muchos de estos productos químicos son corrosivos y pueden dañar los equipos de procesamiento de alimentos y también pueden afectar negativamente al medio ambiente (es decir, no son amigables con el medio ambiente). Una desventaja común compartida por todas estas técnicas es que matan los microbios indiscriminadamente, tanto las bacterias patógenas como las potencialmente ventajosas del microbiota normal. (Moye et al. 2018) Además, incluso con la variedad de métodos disponibles, los brotes de origen alimentario todavía ocurren con relativa frecuencia.

2.4 Salmonelosis en el sector avícola

Las aves de corral son fuente de patógenos como *Salmonella*, *Clostridium perfringens* y *Campylobacter*. La presencia de salmonelosis aviar en granjas ocasiona pérdidas a los productores además de convertirlas en fuentes de contaminación y diseminación de cepas. Estudios realizados por Cordero & Guardia, 2021 sobre la incidencia de *Salmonella* spp (inmóvil), en aves de postura en el departamento de Cochabamba – Bolivia durante el periodo comprendido entre septiembre 2018 a septiembre 2019, confirmó casos positivos, equivalentes al 29%, siendo prevalente especialmente en muestras de heces, donde pese a las vacunas no se logra eliminar del todo.

Los serotipos de *Salmonella* con mayor prevalencia en granjas avícolas son: *Salmonella* Enteritidis y *Salmonella* Typhimurium, sin embargo, durante los últimos años se reportó la presencia también de *Salmonella* Heidelberg y *Salmonella* Infantis (Jassim & Limoges, 2017).

La capacidad de *Salmonella* de formar biofilms y permanecer por tiempos prolongados en nichos de aves de corral, es un peligro latente, pues desde que se descubrió que los antibióticos en dosis subterapéuticas administradas en alimentos promovía el crecimiento de aves de corral, cerdos y vacunos, la mayor producción de los antibióticos se ha destinado al consumo animal, donde aproximadamente el 90% es excretado en las heces (Massé et al., 2014), permitiendo que las bacterias presentes generen mecanismos resistencia a estos antibióticos, por tal motivo el ámbito internacional resaltan el papel potencial de los entornos de las granjas avícolas y ponedoras como reservorios de cepas MDR de *Salmonella*, además de su capacidad de estos de ser transmitidos a través de plásmidos a otras bacterias.

Las cepas de *S. entérica* han desarrollado resistencia a una variedad de antimicrobianos (Anexo 1). El cloranfenicol fue el primer antibiótico utilizado en el tratamiento de la fiebre tifoidea, sin embargo poco después se registraron las primeras cepas resistentes a este antibiótico por lo cual se sustituyó por sulfametoxazol-trimetoprim

y ampicilina o amoxicilina, no obstante, fue sustituido por las fluoroquinolonas, como la ciprofloxacina, y las cefalosporinas de espectro extendido, como la ceftriaxona, para el tratamiento de las infecciones por *Salmonella*, sin embargo, la resistencia a estos antimicrobianos ahora también es frecuente (Al Kraiem et al., 2019; Castro-Vargas et al., 2020).

Debido a la baja efectividad de los antibióticos de primera elección para infecciones ocasionadas por *Salmonella* spp., se comenzó a emplear un antiguo antibiótico, la colistina, como una de las opciones terapéuticas de último recurso. La Organización Mundial de la Salud (OMS, 2011) reclasificó la colistina como un antibiótico de importancia crítica en entornos clínicos humanos. Tras su descubrimiento en 1947, la colistina se utilizó en medicina humana en Japón y Europa, pero en la década de 1970 se reconsideró su uso debido a su neurotoxicidad y nefrotoxicidad. No obstante, la colistina se ha utilizado ampliamente en medicina veterinaria para el tratamiento y la prevención de enfermedades infecciosas en países asiáticos, europeos y norteamericanos (Koch, 1970; Catry et al, 2015), donde pese a su uso restringido ya se reportaron cepas de *E. coli* y *Salmonella* resistentes a la colistina mediado por plásmidos. (Flavahan, 2017; Lima et al, 2019; Liu et al, 2016; Borowiak et al, 2017). Reportado también en Bolivia por el INLASA el 2019.

La aparición, evolución y propagación de microorganismos resistentes a los antibióticos a escala local están interconectados dentro del concepto de “One Health” con lo que constituye un factor de riesgo importante para la salud mundial. La persistencia y propagación de especies microbianas resistentes y la asociación de determinantes en la interfaz humano-animal-medio ambiente pueden alterar los genomas microbianos, lo que da como resultado superbacterias resistentes en varios nichos (Aslam et al, 2021, de Mezquita et al., 2021).

CAPITULO 3. Control biológico de cepas de *Salmonella* mediante bacteriófagos

3.1 Control biológico

El control biológico es el empleo de cualquier organismo vivo y/o sus subproductos para combatir cualquier enfermedad, patógeno o plaga específica a través de parasitismo, antibiosis, la competencia por los recursos o el espacio o mediante el desarrollo de inmunidad contra ellas (Pandit et al., 2022).

Las poblaciones de todos los organismos se reducen hasta cierto punto, por acciones naturales de sus depredadores, parásitos, antagonistas y enfermedades, este proceso se conoce como “control natural”, pero cuando se controlan plagas se denomina control biológico o biocontrol y los agentes que ejercen el control se denominan enemigos naturales, y difiere significativamente dependiendo de si las plagas son invertebrados, plantas o microorganismos (Hajek, 2004; Bellows & Van Driesche, 2012).

Actualmente se emplean diversos enfoques para el control biológico de plagas, basados en enemigos naturales, como ser la introducción de depredadores y parasitoides para el control de ácaros e insectos pestíferos como una alternativa a la dependencia de plaguicidas químicos. El segundo enfoque es el control de malezas (plantas que interfieren en el uso de agua, compiten por nutrientes con cultivos deseables e incluso pueden dañar al ganado). Uno de los biocontroladores que se han aplicado con éxito en Australia es la polilla *Cactoblastis cacttorum* para el control de *Opuntia* sp. El tercer enfoque el control biológico de microorganismos, especialmente de fitopatógenos donde uno de los biocontroladores por excelencia son los hongos del género *Trichoderma*, el cual induce un efecto antibiótico mediante la activación de diversos mecanismos de acción mediante producción de enzimas, micoparasitismo, competencia por espacio y nutrientes, además de estimular el crecimiento de la raíz, la altura y peso de la planta (Martínez-Padrón et al., 2017).

3.2 Bacteriófagos como herramientas de biocontrol de bacterias patógenas y/o resistentes a antibióticos

3.2.1 Morfología y composición de los fagos

Los bacteriófagos, también conocidos como fagos, son virus que infectan y se replican solo en células bacterianas. Son omnipresentes en el medio ambiente y son reconocidos como el agente biológico más abundante en la tierra (Vikram et al., 2021; Harper et al., 2021).

Los fagos que se encuentran con más frecuencia son los fagos con cola del orden *Caudovirales* con genomas de ADN de doble cadena, que representan más de 90% de los fagos aislados, el orden esta subcategorizado en 3 familias *Myoviridae*, *Podoviridae* y *Siphoviridae* (Harper et al., 2021), sin embargo, el 2018 se incluyó a las familias *Ackermannviridae* y *Herelleviridae* (Dion et al., 2020). Cada uno comparte una conformación de cápside similar que consiste en una cabeza poliédrica (compuestas por muchas copias de una o más proteínas) que encierra el genoma viral, pero difieren en las configuraciones relativas de sus colas (Maxwell & Davidson, 2013). De la misma manera, con base en la morfología, otras familias de fagos fueron clasificadas como *Inoviridae* (cápside filamentosa), *Microviridae*, *Tectiviridae*, *Corticoviridae*, *Leviviridae* y *Cystoviridae* (cápside poliédrica) y *Plasmaviridae* (cápside pleomórfica) (Elois et al., 2023).

Los fagos, según el tipo de ácido nucleico que contengan se les denominan fagos DNA y RNA. La mayoría de los fagos tienen el genoma dsDNA (doble cadena), pero también pueden tener genomas dsRNA, ssDNA (monocatenario) y ssRNA (Hatfull & Hendrix, 2011; Elois et al., 2023)

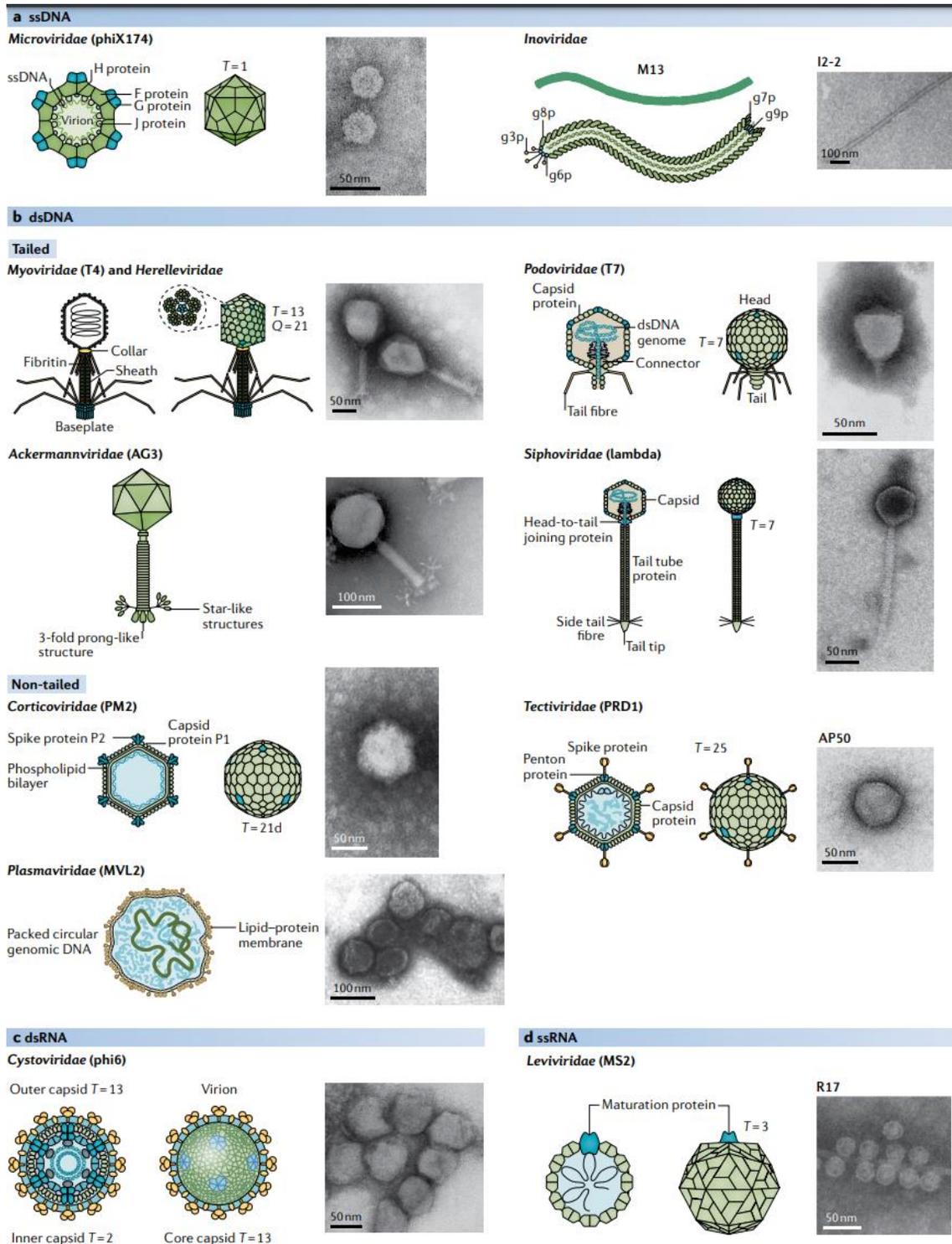


Figura 2. Clasificación de bacteriófagos en función a morfología y tipo de material genético. Obtenido de Dion et al., 2020

El sistema de clasificación de fagos por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) anteriormente se basaba principalmente en la evaluación las propiedades del fago, la composición molecular del genoma del virus (ss/ds, ADN o ARN), la estructura de la cápside del virus y si está envuelta o no, el rango de hospederos, patogenicidad y similitud de secuencia (Simmonds et al., 2017, Turner et al., 2021). Con el avance de tecnologías de secuenciación de próxima generación (NGS), actualmente se cuenta con una cantidad cada vez mayor de datos de secuencias genómicas y metagenómicas que incluyen genomas de fagos completos y fragmentos de genomas de fagos desconocidos hasta ahora (Chibani et al., 2019).

Los fagos específicos de *Salmonella* spp. hasta el momento han sido descritos dentro de las familias de fagos con cola *Myoviridae* o *Siphoviridae* (Atterbury et al., 2007). El primer bacteriófago de *Salmonella* descubierto fue el fago P22 de *Salmonella* Typhimurium, este es un fago de DNA de doble cadena de la familia *Podoviridae* fue aislado en 1952 por Zinder y Lederberg, otro ejemplo un fago similar a T7 con una cola corta no contráctil típica de la familia *Podoviridae* que infecta a *Salmonella* entérica serovar Gallinarum biovar Gallinarum ha sido reportado por Kwon et al., (2008).

3.2.3 Ciclo de vida

✓ Ciclo lítico

Una característica de los fagos virulentos es su capacidad para infectar y lisar bacterias, la especificidad de los fagos para bacterias particulares y la capacidad de los fagos para aumentar en número durante el proceso de infección hacen que los fagos sean excelentes agentes terapéuticos potenciales para combatir enfermedades bacterianas (Łobocka & Szybalski, 2012). Para ello los fagos pasan por diversas etapas que se describen a detalle a continuación:

Adsorción. - La infección de fagos comienza cuando estructuras como las fibras o los picos de cola, se unen a moléculas o capsulas específicas de la superficie de la bacteria

hospedera. En bacterias Gram negativas las proteínas, oligosacáridos y lipopolisacáridos (LPS) presentes en la membrana externa se puede utilizar durante la unión del fago (Sabour & Griffiths, 2010).

Inyección del DNA. - Después de la adsorción, el genoma del fago es inyectado para obtener acceso al metabolismo de transcripción/traducción de su huésped. Los fagos con cola llevan en la punta una enzima que degrada el peptidoglicano y la unión de la cola con la membrana bloquea la liberación prematura del material genómico de la cápside. Cuando DNA se introduce en el interior del huésped requiere energía metabólica basado en el ATP disponible o el potencial de membrana (Letellier et al, 2004). Una vez dentro del citoplasma los fagos poseen mecanismos para afrontar las exonucleasas y enzimas de restricción presentes, un sistema conocido es la circularización rápida de DNA mediante extremos cohesivos, repeticiones terminales o la protección de extremos mediante proteínas (Sabour & Griffiths, 2010).

Transcripción. - Después de la internalización del genoma del fago, la RNA polimerasa codificada por la cepa hospedera, reconoce promotores del genoma del fago, lo que lleva a la transcripción de genes tempranos de fagos (Sabour & Griffiths, 2010), los productos de estos genes tienen la función de proteger el genoma del fago y reestructurar el sistema hospedero a sus necesidades, pueden inactivar proteasas bacterianas, bloquear enzimas de restricción y terminar varias biosíntesis macromoleculares del huésped.

Replicación. - La mayoría de los fagos líticos codifican su propia maquinaria de replicación, antes de empaquetarse los genomas donde un conjunto de genes medios se transcribe, produciendo productos que sintetizan el nuevo DNA fágico, seguido de un conjunto de genes tardíos que codifican los componentes del fago, para algunos fagos, estas transiciones involucran la síntesis de nuevos factores sigma o proteínas de unión al DNA para reprogramar la RNA polimerasa del huésped; otros fagos codifican su propia RNA polimerasa. La degradación del DNA del huésped y la inhibición de la traducción de los RNAm del huésped son otros mecanismos que pueden contribuir a la

reprogramación de la célula para la síntesis de nuevos fagos (Kutter & Sulakvelidze, 2004).

Biosíntesis de proteínas estructurales. - El RNAm tardío dirige la síntesis de tres tipos diferentes de proteínas: proteínas estructurales como los componentes de la cabeza y cola; proteínas que participan en el ensamblaje del virión sin pasar a formar parte de su estructura ejemplo las proteínas de andamio que participan en el ensamblaje de las cápsides y son eliminadas una vez concluida su función y finalmente las proteínas responsables de la lisis celular y liberación de fagos (Hernández, 2017). El proceso de ensamblaje se puede dividir en tres grandes etapas para la mayoría de los fagos con cola. Primero, la cabeza del fago, en esta etapa llamada procapside o prohead, se ensambla alrededor de las proteínas de andamiaje. El complejo de poros, que forma el punto de unión de la cola, se encuentra en uno vértice de la procapside y la terminasa, que se acopla al complejo del poro, traslada el genoma del fago a la procápside, transformándola en una cápside madura. La translocación de ADN es impulsada por la hidrólisis de ATP y acoplada al procesamiento del genoma del fago concatemerizado (Łobocka & Szybalski, 2012).

Empaquetamiento de DNA. - El DNA se empaqueta en capas de proteínas icosaédricas preensambladas llamadas procápsidas, en la mayoría de los fagos, su ensamblaje implica interacciones complejas entre proteínas de andamiaje específicas y las principales proteínas estructurales de la cabeza, seguidas de la escisión proteolítica tanto del andamiaje como del extremo N de las principales proteínas de la cabeza. Antes o durante el envasado, la cabeza se expande y se vuelve más estable, con mayor capacidad interna (Kutter, E., & Sulakvelidze, A. 2004).

Lisis celular y liberación de viriones. - Durante la infección de fagos una “endolisina” soluble y activa se acumula en la célula hospedera, para acceder a la capa de péptidoglicano pero para ello primero actúa una proteína denominada “Holina” que forma una lesión permeabilizando la membrana para que pueda actuar la “endolisina” que

degradara la capa de peptidoglicano permitiendo la liberación de fagos maduros por presión osmótica (Young et al., 2000; Wang, 2006).

Muchos fagos han desarrollado diversos mecanismos para controlar el tiempo de lisis, uno de ellos emplea una proteína adicional, denominada “antiholina” que contrarresta formación de agujeros lo que permite la acumulación y luego la utilización abrupta de importantes niveles de holina (Wang et al., 2000).

✓ **Ciclo lisogénico**

De manera general en el ciclo lisogénico se caracteriza por la incorporación del ADN del fago en el genoma del huésped bacteriano, que puede sobrevivir como un plásmido, y los nuevos fagos resultantes tendrán una combinación de ADN del fago y el genoma del huésped

✓ **Ciclo pseudo-lisogénico y ciclo crónico**

Son ciclos de vida poco comunes, en el ciclo pseudo-lisogénico, se desarrolla cuando los nutrientes son limitados o falta huéspedes bacterianos, donde el material genético del fago permanece dentro de la célula huésped en una forma inactiva (Naureen et al., 2020). El ciclo crónico o estado de portador, en este ciclo de vida los fagos causan infecciones a largo plazo en huéspedes bacterianos, con progenie de fagos que brotan continuamente de la célula o se propagan asimétricamente a las células hijas, fue observado en fagos filamentosos (Cenens et al., 2013; Makky et al., 2021).

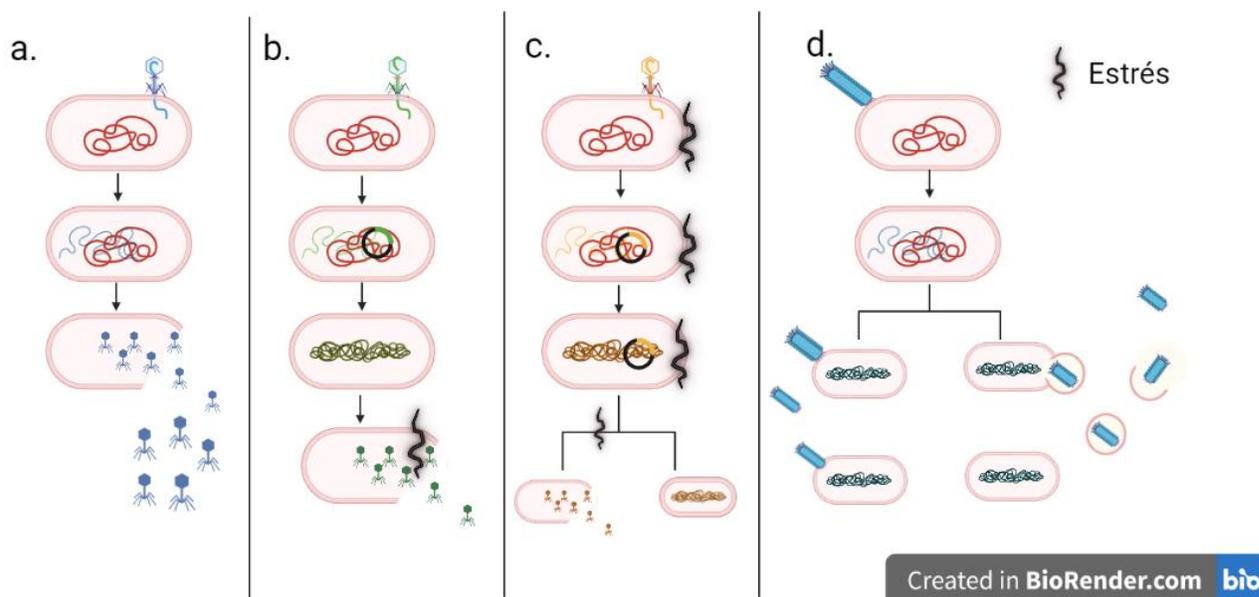


Figura 3. Ciclo de vida de los bacteriófagos. a) Ciclo de vida lítico; b) ciclo de vida lisogénico; c) ciclo de vida pseudo-lisogénico; d) ciclo de vida crónico o portador y liberación a través de complejo proteico. Adaptado de Makky et al., 2021

3.3 Terapia de fagos para el control de cepas patógenas en granjas avícolas y/o derivados

Las aves de corral son consideradas fuentes comunes de bacterias patógenas como: *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, y *Campylobacter* spp. donde la fuente de contaminación puede provenir de varias fuentes (Chai et al., 2016). El enfoque convencional en las granjas para la reducción de bacterias patógenas se basa en un incremento de la bioseguridad, una mejor higiene, cambios en el manejo y cuidado, mayor seguridad microbiana del alimento balanceado, que en parte contribuyen al control de los patógenos transmitidos por alimentos, sin embargo, muchas veces no es suficiente, por lo cual es necesario implementar nuevas herramientas que reduzcan el riesgo de patógenos, de modo que se pueda garantizar una mayor inocuidad alimentaria.

Debido a su capacidad de para matar bacterias, los bacteriófagos líticos son adecuados para la eliminación de cepas bacterianas patógenas, además su capacidad de aumentar en número durante el curso del tratamiento, alterar las biopelículas bacterianas

y presentar toxicidades inherentes bajas, se le ha otorgado varias aplicaciones potenciales. Dadas las ventajas de los bacteriófagos sobre los antibióticos y desinfectantes químicos, la explosión actual en la investigación sobre el uso de estos virus bactericidas en las industrias alimentaria y avícola ha resultado en el desarrollo de productos basados en fagos que ahora están disponibles comercialmente en los países desarrollados, por lo cual los productos a base de fagos que se emplean en: terapia fágica, como biosanitizantes, biopreservantes y el biocontrol en granjas y alimentos (Figura 3). Muchos estudios han informado de la eficacia de fagos específicos de la cepa hospedera para disminuir el recuento bacteriano en diferentes alimentos, como carne, huevos, piel de animales, verduras y alimentos procesados, también en la disminución de la colonización de bacterias patógenas en el tracto gastrointestinal de animales (Sulakvelidze, 2019; Ishaq et al., 2020; Colás-Medà et al., 2023).

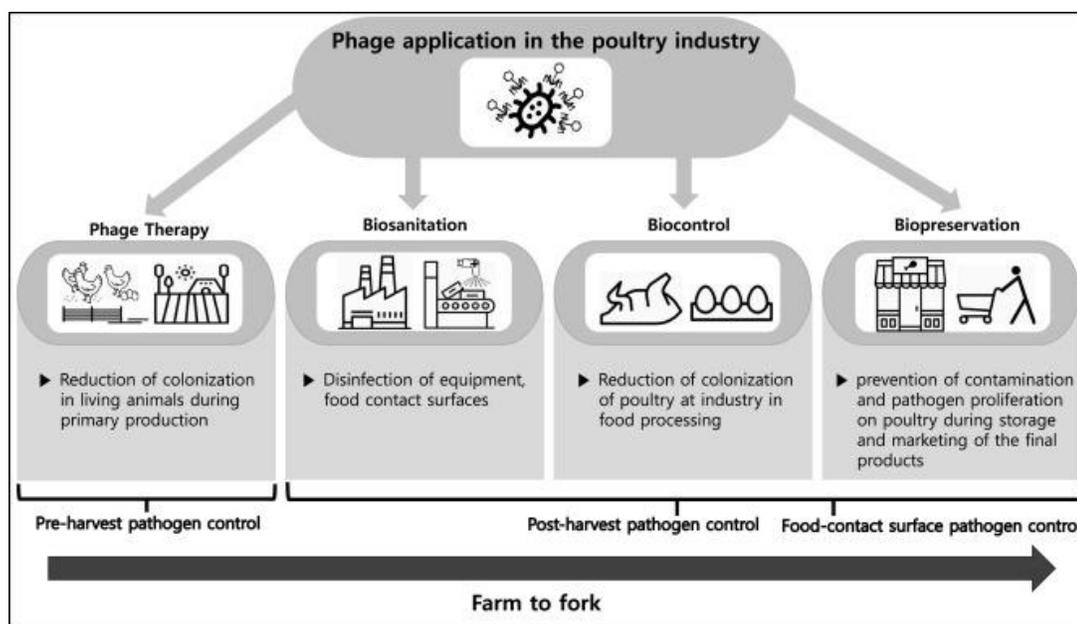


Figura 4. Aplicación de fagos en la industria avícola. (Tomado de Han et al., 2022)

3.3.1 Terapia fágica

Los bacteriófagos son adecuados para prevenir o reducir la colonización de bacterias patógenas y por ende enfermedades en el ganado (García, et al, 2008), donde se suministra fagos ya sea individuales o en coctel a los animales de granjas, las vías y métodos de aplicación fueron examinada por diversos autores y la aplicación de fagos a través de la alimentación por sonda oral o la ingesta de alimento mostraron una reducción de bacterias patógenas sin afectar la microbiota intestinal del huésped (Olson et al., 2022). Las investigaciones actuales están centradas en una mejor administración de fagos de manera que se evite la disminución del título de fagos debido a su desestabilización o inactivación por los extremos de pH gástrico.

3.3.2 Biosanitización

La biosanitización implica el uso de fagos para mejorar la seguridad de los alimentos mediante la descontaminación de varias superficies inanimadas en cocinas domésticas, instalaciones de procesamiento de alimentos, equipos y otros establecimientos de alimentos, de modo que sea menos probable que los alimentos que entran en contacto con esas superficies se contaminen con patógenos bacterianos transmitidos por los alimentos (Bhardwaj et al., 2015). Estudios reportaron que un coctel de fagos es también activo frente a la formación de biofilms, característico de bacterias patógenas como *Salmonella* spp. (Ge et al, 2022) convirtiéndolo en un alternativa ecológica y viable.

3.3.3 Biocontrol

Los brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos asociados con el consumo de alimentos crudos y procesados, incluso productos vegetarianos, enfatizan la necesidad de un agente antimicrobiano natural eficaz que pueda aplicarse directamente a los alimentos para eliminar los microorganismos patógenos. Los desinfectantes químicos utilizados a menudo no se pueden aplicar a todos los tipos de alimentos debido a cambios organolépticos, sabor, etc. (Bhardwaj et al., 2015), por ello se ha estudiado el uso de bacteriófagos en el control biológico de bacterias patógenas transmitidas por alimentos de manera que los alimentos sean más seguros. Reportes de la disminución en el recuento

bacteriano de cepas de *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e incluso *Campylobacter* en verduras, frutas y cárnicos demuestran la utilidad de estos.

Una alternativa a la comida seca para mascotas que está ganando cada vez más popularidad debido a valores nutricionales es la comida cruda, que consiste en carnes, como: pollo, pato o atún, combinadas con vegetales, como lechuga, arándanos y brócoli, que se venden y se sirven crudos; sin embargo, debido a que no están cocinados, existe una mayor posibilidad de que estén presentes patógenos transmitidos por los alimentos, que pueden transferirse a las mascotas, así como a los consumidores desprevenidos durante el proceso de alimentación, riesgo de infecciones que puede reducirse sustancialmente con la aplicación de fagos (Moye, et al 2018).

3.3.4 Bioconservación.

Los fagos también se emplean para extender la vida útil de los alimentos manufacturados perecederos como conservantes naturales (bioconservación). La aceptación de los bacteriófagos como un aditivo alimentario natural se basa en la presencia de altos niveles de bacteriófagos en el tracto digestivo de los seres humanos y en todo el entorno natural. Los productos deben ser aceptados por la FDA con la aprobación bajo las regulaciones 'generalmente reconocidas como seguras' (GRAS).

3.4 Productos bio-basados con bacteriófagos

El biocontrol mediado por fagos como una tecnología natural y ecológica para atacar solo bacterias patógenas y dejando libre el microbioma de los alimentos incrementando su el valor nutricional.

Actualmente se dispone en el mercado productos comerciales para ser aplicados durante la cadena alimentaria o productos listos para su consumo, la mayoría de estos productos contienen fagos naturales, aislados del medio ambiente y que no han sido modificados genéticamente. Aunque hay pruebas limitadas, el trabajo realizado por Moye et al. (2018) sugiere que los bacteriófagos no alteran las propiedades organolépticas de los alimentos.

Los productos de fagos actualmente aprobados por la FDA para ser aplicados en alimentos son: SalmoFresh™, PhageGuard S™, estos son cocteles de fagos, de ellos los 2 primeros cuentan con certificación GRAS (generalmente reconocido como seguro), por ello son empleados en la producción de productos cárnicos, avícolas y de huevo.

Otros productos en el mercado para ser aplicados como terapia de fagos y biosanitizantes, son:

- ✓ Bafasal® compuesto por 3 fagos: 3ent1, 8sent65 y 8sent1748, mezclados en igual concentración. Es empleado como aditivo para piensos aprobado por la normativa para uso en aves de corral para eliminar o prevenir la infección por *Salmonella* spp. en el tracto digestivo en aves de corral. Además, se puede añadir al agua potable.
- ✓ Biotector® S coctel fágico que se puede aplicar en alimentos para animales para controlar *Salmonella* Gallinarum, *Salmonella* Pullorum en aves de corral
- ✓ BacWash™, un coctel de fagos empleado para la desinfección y eliminación de *Salmonella* spp. de superficies



Figura 5. Ejemplos de productos de control biológico basado en fagos.

4. Factores a considerar en el control biológico mediado por fagos

Las estrategias de control biológico basado en fagos se dividen en 2 tipos: pasiva o inundativo y activo. En el pasivo la estrategia se basa en introducir un título de fagos suficiente que asegure que todas las células blanco adsorban al menos un fago en un tiempo corto, de esta manera se logra el control biológico sin la ayuda de replicación de fagos. En el biocontrol activo, un título mínimo de fagos se agrega al sistema y el control se basa en la capacidad del fago para infectar, replicarse dentro la célula hospedera y lizarla para liberar la progenie, de esta manera controlar la población bacteriana (Sabour & Griffiths, 2010).

De acuerdo con la cinética de destrucción de bacterias mediada por fagos, es necesario conocer la interacción entre los fagos y bacterias lo cual es determinado mediante la Multiplicidad de infección y la distribución de Poisson además de parámetros cinéticos como: la tasa de adsorción, el período de latencia del fago, el tamaño de la explosión y la tasa de crecimiento bacteriano.

4.1 Relación fago – bacteria. Multiplicidad de Infección y distribución de Poisson.

La Multiplicidad de Infección (MDI) por fagos, es definida como el número de partículas de fago añadidas por célula, que significa la proporción de fagos adheridos a bacterias y que posteriormente las infectan. Sin embargo, no todos los fagos que se adsorben logran infectar exitosamente a las bacterias debido a la expresión de mecanismos de resistencia anti-fagos. Por ello el concepto de MDI se traduce a multiplicidad de adsorción es decir “adsorción múltiple” que están en función a la densidad de la población bacteriana, cuando las densidades bacterianas son altas hay una mayor probabilidad de que todos los fagos agregados sean adsorbidos por una bacteria (Abedon, 2016). La MDI se calcula con la siguiente formula:

$$MDI = \frac{UFP/mL}{UFC/mL}$$

Donde UFP/mL es título de los bacteriófagos reflejada en las placas o calvas, y UFC/mL es la concentración de bacterias al momento de la infección.

La MDI siempre es mayor a la multiplicidad de adsorción de fagos (MOA) o MDI actual que considera el tiempo en el que las adsorciones suceden, por lo tanto, la multiplicidad en términos de adsorción será dependiente del tiempo en términos matemáticos se expresa con la siguiente ecuación:

$$MDI_{actual} = MDA = P(1 - e^{-kNt})/N$$

Dónde: P = densidad de fagos libres

k = 2.5x10⁻⁹ mL/min

t = intervalo de tiempo donde se produce la adsorción

N = densidad bacteriana

Si se agregan fagos a las bacterias en un sistema bien mezclado con una MDI de 1 y se permite que la adsorción continúe hasta completarse, los fagos se adsorberán aleatoriamente a las células susceptibles, lo que dará como resultado que algunas células absorban un solo fago, algunas células absorban múltiples fagos y algunas células no adsorban fagos. La probabilidad de que una bacteria adsorba un número “n” de fagos cuando se somete a una determinada MDI está determinada por una distribución de Poisson.

La distribución de Poisson para fines matemático nos permite calcular la adsorción de fagos “post” o adsorciones múltiples después de la infección por fagos.

$$adsorciones\ secundarias = 1 - e^{-PkL}$$

Donde, I corresponde a la fracción de fagos que se espera sean adsorbido por fagos, k es la constante de adsorción (min/mL) y L es el periodo de latencia del fago, considerando que la concentración de bacterias sea constante.

4.2 Rango de hospederos del fago

La especificidad de los fagos para una especie o cepa hospedadora puede considerarse una ventaja como una desventaja. En el caso del control de patógenos

transmitidos por alimentos, los fagos presentan una opción viable, ya que la diversidad de patógenos que requieren control se limita a relativamente pocas especies bacterianas, contrario a un antimicrobiano basado en fagos diseñado para su uso en medicina humana, donde los fagos están dirigidos a una gama relativamente estrecha de bacterias patógenas para humanos (Sabour & Griffiths, 2010).

4.3 Estabilidad de los fagos

Si tenemos buena actividad lítica *in vitro*, muchas veces esta actividad no se refleja en la práctica, pues cuando los fagos se agregan a matrices alimentarias u otros entornos a tratar sufren variaciones en su estabilidad, debido a las propiedades intrínsecas y extrínsecas de la matriz. Uno de ellos es la viabilidad de fagos, cuando estos se almacenan en un medio “ideal” los fagos tienen vidas medias que se pueden mantener constante entre días a meses.

Un factor intrínseco aplicado a los alimentos es la temperatura, que podría manifestarse en forma de algún tipo de tratamiento térmico de conservación o como almacenamiento prolongado a temperatura ambiente o refrigerada, o como congelación (Sabour & Griffiths, 2010). Los fagos son generalmente más estables a temperaturas bajas (por ejemplo, refrigeración) que a temperatura ambiente. Los efectos de la congelación en los fagos dependen tanto del fago como del medio en el que se congelan los fagos.

La sensibilidad de los fagos a los extremos de pH es otro factor para considerar en el control biológico de fagos ya sea activa o pasiva, los fagos tienden a ser estables en un rango de pH neutro, que oscila entre pH 5 y 8 (Sabour & Griffiths, 2010). Si bien en los últimos años se han reportado fagos tolerantes a un amplio rango de pH, estos no se comportan de igual manera sobre matrices alimentarias, sin embargo, no está claro si esta inactivación podría atribuirse completamente al pH o a algún otro factor propio de la matriz o una combinación de todos los factores presentes.

4.4 Tasa de adsorción de fagos

La constante de tasa de adsorción de fagos (k) juega un papel importante en el tipo de estrategia de biocontrol que se empleara, una velocidad de adsorción rápida es casi

siempre más eficaz en una estrategia de control biológico pasivo, en la que se desea una infección y lisis celular rápidas, contrario a un control biológico activo. Sin embargo, hay ciertos factores que determinaran la velocidad y tasas de adsorción de fagos a bacterias, como ser: viscosidad del medio, concentración de iones divalentes como calcio y magnesio, el número de moléculas receptoras expresada en la superficie bacteriana (Sabour & Griffiths, 2010).

La velocidad a la que los fagos se adsorben a su cepa hospedadora está determinada por la cinética de segundo orden, como se describe mediante la relación:

$$\frac{d_p}{d_t} = k * P * B$$

Donde k es la constante de tasa de adsorción de fagos en ml/min, P es la concentración de fagos y B es la concentración bacteriana.

Aunque este proceso puede expresarse en términos de cinética de segundo orden, en la mayoría de las condiciones el comportamiento es de pseudo primer orden: durante el proceso de adsorción, los fagos libres se eliminan del sistema por adsorción a una bacteria hospedadora, pero la bacteria permanece libre en el sistema para adsorber fagos adicionales. Esta relación también puede expresarse como:

$$k = \frac{\ln(P_o/P_t)}{Bxt}$$

Donde Po es la concentración inicial de fago libre y Pt es la concentración de fago libre en el tiempo t. Una conclusión que se puede extraer de esta expresión es que la concentración de bacterias susceptibles, B, y la constante de velocidad de adsorción, k, influirán fuertemente en la velocidad a la que los fagos libres pueden ubicarse y adsorberse en sus cepas hospedadoras.

4.5 Período de latencia del fago y tamaño de la explosión

Los parámetros de periodo de latencia y tamaño de explosión nos permiten determinar el tiempo en que el fago puede sintetizarse dentro la célula hospedera, pues

tiempos cortos se traducen generalmente en lisis bacteriana y liberación de fagos, sin embargo, tiempos largos conducen a la formación de profagos o internalización de material genético.

Estos parámetros se pueden determinar mediante las curvas de crecimiento de “un paso” o curvas “one step growth”, es una de las técnicas clásicas utilizada en la caracterización de nuevos bacteriófagos y se realiza para conocer el crecimiento poblacional de un fago y evaluar la eficiencia de su infección (Figura 5).

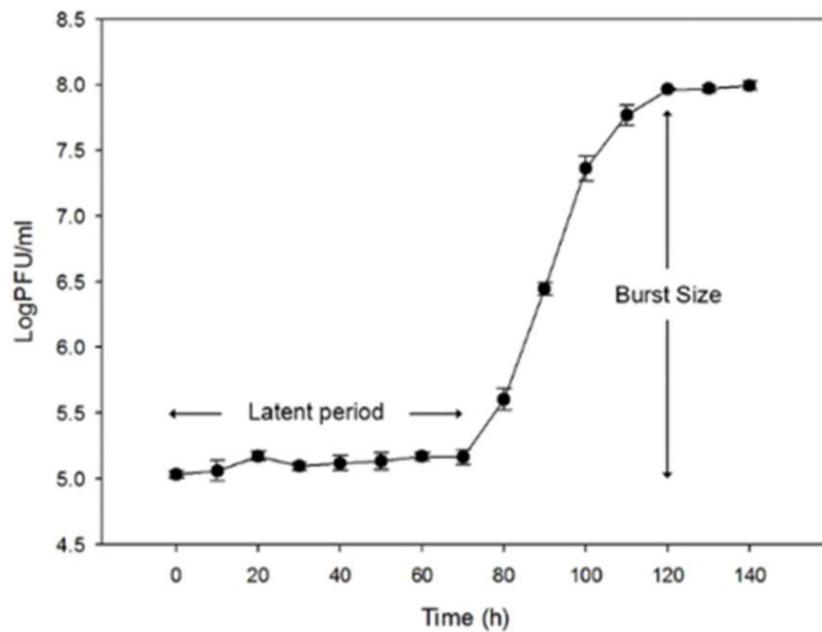


Figura 6. Curva de crecimiento de un paso de bacteriófagos (Giri et al., 2018).

Donde los datos del periodo de latencia el título de fagos se mantiene constante. Hasta que se presenta un incremento abrupto del título de fagos. Este se calcula con la siguiente formula:

$$\text{Tamaño de explosión} = \frac{\text{UFP/mL en el periodo meseta}}{\text{UFP/mL en el periodo latente}}$$

4.6 Determinación de la Eficacia de fagos

La Eficacia de tratamiento con fagos para la reducción o eliminación bacteriana susceptible, se determina con la diferencia en el recuento bacteriano viable inicial (sin tratamiento) y el recuento bacteriano viable después de la aplicación de fagos a un tiempo determinado. En la superficie de eficacia para el tratamiento con fagos, el tiempo optimo contacto es independiente de la dosis.

CAPITULO 4.

Antecedentes

Los bacteriófagos se descubrieron por primera vez a finales del siglo XIX. En 1896, Ernest Hankin, un examinador químico y bacteriólogo inglés, inactivó *Vibrio cholerae* utilizando filtrados de agua de los ríos Ganges y Yamuna en el norte de la India, esto fue repetido más tarde en 1898 por Nikolay Gamaleya, un médico y científico ruso, mientras trabajaba con *Bacillus subtilis*. En 1915, Federico Twort, un bacteriólogo inglés, sugirió que el agente causal era un “virus bacteriano” pero el primer informe de un posible efecto terapéutico de los fagos fue publicado hasta 1917 por un bacteriólogo, Felix d'Herelle, denominándolo “bacteriófago” por su capacidad aparente de “comer bacterias” (Chanishvili, N., 2012)

En un libro publicado en 1926 “*The bacteriophages and its Behavior*”; d'Herelle describió el uso de fagos para curar o prevenir diversas enfermedades de origen bacteriano. Aunque sus informes eran anecdóticos el uso de fagos comenzó a tomar importancia y ser investigado por diversas instituciones, e incluso llegaron a comercializarse algunas formulaciones para diversas enfermedades. No obstante, en la década de 1930 comenzaron a surgir reportes de preparaciones comerciales inactivas y muertes de pacientes tratados con fagos, finalmente una revisión en 1934 concluyó que no había pruebas de ningún efecto terapéutico. Más tarde con el descubrimiento de la penicilina los bacteriófagos fueron dejados de lado.

Los bacteriófagos se han convertido en una alternativa viable a la disminución en el uso de antibióticos para mitigar de alguna manera el riesgo de bacterias patógenas resistentes a antibióticos. Uno de los principales contribuyentes al desarrollo de cepas bacterianas resistentes es el uso continuo de antimicrobianos con fines agrícolas, específicamente en relación con los animales destinados a la producción de alimentos (Landers et al., 2012), entre ellos las granjas avícolas constituyen uno de los principales reservorios de cepas bacterianas resistentes a antibióticos, además si consideramos que el

90% del antibiótico consumido es excretado como desechos en las heces y orina constituyen una fuente de contaminación ambiental (Massé et al., 2014).

La investigación con cócteles de fagos comenzó a aumentar a principios del siglo XX debido a que las preparaciones de fagos individuales mostraban una reducida disminución de las bacterias patógenas, además de la capacidad de las bacterias de resistir a la infección mediada por fagos. Por ello diversos investigadores (Andreatti Filho et al., 2007; Borie et al., 2008; Wall et al., 2010; Hooton et al., 2011; Bai et al., 2019) empezaron a aplicar cocteles de fagos que a menudo se combinan múltiples tipos de fagos que poseen una diversidad de rangos de huéspedes (Garvey, 2022). De esta manera el uso de cócteles de fagos podría ayudar a superar las limitaciones asociadas con el uso de bacteriófagos monoespecíficos, como el desarrollo de resistencia a los fagos y el perfil limitado del rango de hospederos (Gordillo Altamirano & Barr, 2019). Los cócteles de fagos amplían la gama de hospederos y mejoran la eficacia del tratamiento, también pueden crear sinergias al dirigirse a diferentes receptores en superficies bacterianas.

A nivel nacional, el único estudio de fagos reportado fue por Sanz (2019) donde aisló 3 bacteriófagos, con capacidad infectiva frente a cepas multirresistentes de *Escherichia coli* de tres nichos ecológicos distintos, 1) del agua del río Choqueyapu (ϕ F), 2) de aguas de la laguna de Janko Khota de Milluni (ϕ D2) y 3) suelo de jardín particular (ϕ C1), los resultados que obtuvo en base a la Multiplicidad de infección (MDI) y la distribución de Poisson concluyó que los bacteriófagos D2 tuvieron mayor capacidad infectiva y actividad lítica, los C1 tuvieron capacidad infectiva y actividad lítica menor a la de los bacteriófagos D2 y en el caso del bacteriófago F su capacidad infectiva fue menor al igual que su actividad lítica.

Cabe resaltar que este es el primer trabajo de aislamiento de bacteriófagos nativos para el control de *Salmonella* spp. en matrices alimentarias. La aplicación de fagos como cocteles fue realizada en diversos estudios, no obstante, es el primero en nuestro país.

Justificación

Las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETAs) representan una carga económica alta asociados a la pérdida de productividad, las interrupciones en los mercados de alimentos y los impedimentos a las exportaciones de productos agroalimentarios debido a problemas de inocuidad de los alimentos (World Bank Group, 2021), afectando particularmente a los países sub desarrollados y en vías de desarrollo (Xu, 2021b), los principales patógenos bacterianos transmitidos por alimentos y el agua incluyen: *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* entérica, *Escherichia coli* (O157:H7), *Campylobacter jejuni* y *Vibrio* producen síntomas clínicos graves, llegando a ser mortal si la bacteria es resistente a antibióticos empleados para su tratamiento (Garvey, 2022; Lavilla et al, 2023).

En Bolivia, la producción de carne de origen avícola representa alrededor del 40 % de la producción de carne. El departamento de Santa Cruz es el mayor productor seguido de Cochabamba, según datos del Instituto Nacional de Estadística (INE). Los avicultores consolidados informan que son cinco enfermedades que generan mayor pérdida económica en las granjas, las que incluye: colibacilosis aviar, coriza infecciosa, la cólera aviar, la *Salmonella* y el Gumboro (Publiagro, 2022), que dificulta la comercialización y exportación del producto debido a que los requisitos de control nacional e internacional (Resolución N° 1153) de la Comunidad Andina de Naciones, indica que los productos de origen avícola deben estar libres de Pullorosis, tifosis aviar y Salmonelosis paratifoidea (*Salmonella enteritidis* y *Salmonella typhimurium*), de tal manera que los alimentos sean seguros.

En la actualidad se cuentan con alternativas ecológicas que incluyen el empleo de ácidos orgánicos, enzimas, probióticos – prebióticos y el biocontrol mediado por fagos que está cobrando un importante protagonismo como una alternativa efectiva dirigida a bacterias patógenas específicas que pueden afectar la salud de humanos, animales y plantas (Lavilla et al., 2023), debido a su abundancia, diversidad y distribución a nivel mundial. Los fagos son depredadores naturales considerados alternativas potenciales a los conservantes, productos químicos y antibióticos (Xu, 2021b). Por tal motivo, en la actualidad en países desarrollados donde la investigación está más desarrollada cuentan

ya con productos basados en fagos que pueden ser aplicados a lo largo de la cadena alimentaria.

Por tal motivo, el presente trabajo de investigación tiene la finalidad establecer una estrategia de control biológico de cepas ambientales de *Salmonella* spp. resistentes a antibióticos, mediante la aplicación de bacteriófagos líticos nativos aislados de muestras ambientales, posterior caracterización parcial, amplificación y aplicación de los bacteriófagos sobre matrices alimentarias, con el propósito de brindar una solución ecológica que pueda reducir o eliminar la carga infecciosa bacteriana, incrementar la viabilidad y sanidad animal, disminuir el riesgo de enfermedades transmitidas por alimentos y favorecer así el desarrollo productivo del sector avícola promoviendo el acceso de alimentos seguros y de calidad a la población consumidora final.

Objetivos

Objetivo general

Establecer una estrategia de control biológico de cepas ambientales de *Salmonella* spp. resistentes a antibióticos, mediante la aplicación de bacteriófagos líticos.

Objetivos específicos

- ✓ Determinar el perfil de sensibilidad y resistencia antibiótica de cepas de *Salmonella* spp. aisladas de muestras de cuerpos de agua superficial y heces de aves de corral (parrilleras y de postura) del departamento de La Paz, Bolivia.
- ✓ Establecer un banco de bacteriófagos aislados a partir de muestras de heces de aves de corral (parrilleras y de postura) con actividad lítica sobre cepas de *Salmonella* spp. previamente aisladas.
- ✓ Determinar una caracterización parcial de los bacteriófagos líticos aislados en función a la multiplicidad de infección, relación bacteriófago:bacteria, determinación del rango de hospederos, cinética de crecimiento y estabilidad.
- ✓ Determinar la eficacia de los bacteriófagos aislados en el control biológico de *Salmonella* spp. mediante la aplicación de un coctel fágico sobre matrices alimentarias contaminadas experimentalmente.

Formulación de la hipótesis

HIPOTESIS: Los bacteriófagos aislados de muestras de heces de aves de corral (parrilleras y de postura) y suelo de jardín, ejercen un control biológico sobre cepas ambientales de *Salmonella spp.* resistentes a antibióticos

HIPÓTESIS NULA: Los bacteriófagos aislados de muestras de heces de aves de corral (parrilleras y de postura) y suelo de jardín no ejercen un control biológico sobre cepas ambientales de *Salmonella spp.* resistentes a antibióticos

HIPÓTESIS ALTERNATIVA: Los bacteriófagos aislados de muestras de heces de aves de corral (parrilleras y de postura) y suelo de jardín ejercen un control biológico solo sobre cepas ambientales de *Salmonella spp.* sensibles a antibióticos

CAPITULO 5. Materiales y métodos

5.1 Aislamiento e identificación de cepas de *Salmonella* spp.

5.1.1 Recolección y transporte de muestras

Muestras de heces de aves de corral

Cuatro muestras de heces de aves de corral (parrilleras y de postura) se colectaron de la feria 16 de julio de la ciudad de El Alto – La Paz, donde son comercializadas; y dos muestras de heces de aves de corral (de postura) de granjas del municipio de Achocalla, La Paz. Todas las muestras fueron colectadas en frascos estériles y almacenadas a 4 °C hasta su uso.

Muestras de agua superficial

Un volumen de 100 mL de muestras de agua superficial se colectó en frascos estériles de vidrio, del río de Luribay en la provincia Loayza – La Paz, mismo que se halla circundante a granjas avícolas, del río La Paz que corre a lo largo del macrodistrito Sur del municipio de la Paz, y agua de la laguna de Achocalla de una orilla cercana a una granja avícola.

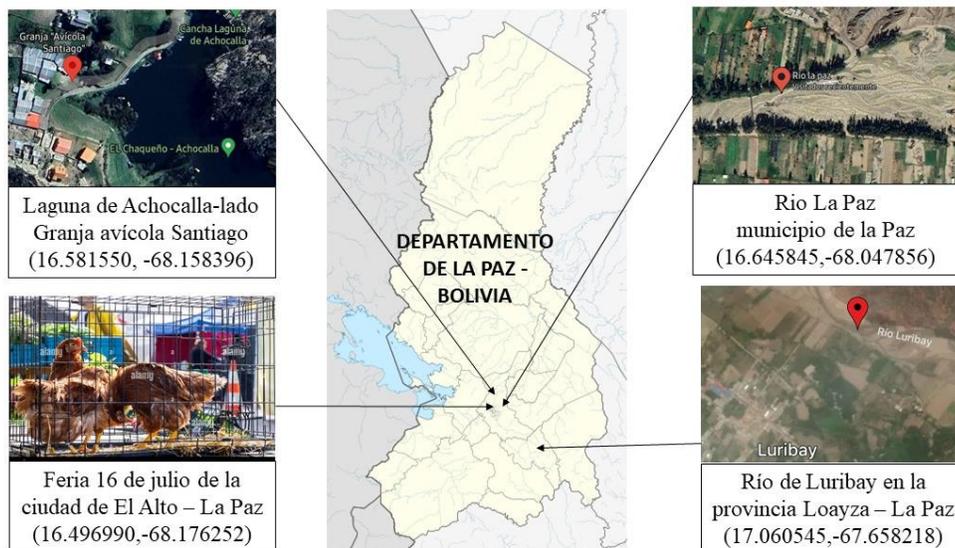


Figura 7. Geolocalización de los lugares de toma de muestras de heces de pollos y agua superficial.

Las muestras se trasladaron al laboratorio y se conservaron a 4 °C hasta su uso.

5.1.2 Aislamiento e identificación fisiológica de cepas de *Salmonella* spp.

El aislamiento de *Salmonella* spp. se realizó según Normas ISO 6579-2002 con algunas modificaciones. Se inoculó 1 g de muestra de heces ó 5 mL de agua en 10 mL de Agua peptonada tamponada (BPW) (peptona 10 g, NaCl 5 g, fosfato disódico 3,5 g, fosfato monopotásico 1,5 g, agua destilada 1 L) y se cultivó a 37 °C durante 18 horas. A partir del cultivo saturado obtenido, se inoculo 100 µL del BPW en 10 mL de caldo RambaQUICK Salmonella y se incubó a 41.5 °C por 7 horas. A partir de este segundo cultivo saturado, se tomó una asada del caldo RambaQUICK Salmonella y se sembró en la superficie del agar por estría agotamiento en placas de CHROMagar™ Salmonella Plus y agar de xilosa-lisina-desoxicolato (XLD agar) incubándose a 37 °C por 24 - 48 h. (Anexo 2)

Se seleccionaron las colonias típicas de *Salmonella* de color malva en CHROMagar™ Salmonella Plus y colonias negras con halo traslúcido en agar XLD y se cultivaron en agar nutritivo para ser confirmadas mediante pruebas bioquímicas y realización del perfil de resistencia antimicrobiana.

Para la identificación bioquímica, las colonias sospechosas fueron sembradas por punción y estría en agar hierro tres azúcares (TSI), agar lisina hierro (LIA), caldo urea, agar sulfuro de hidrogeno indol motilidad (SIM) y agar Citrato de Simmons. La prueba de oxidasa se realizó tomando una colonia con el asa bacteriológica a ser dispersada sobre una tira de papel Whatman N° 1 de 1 x 2 cm impregnada con el reactivo de Kovacs (diclorhidrato de tetrametil-p-fenilendiamina), donde una coloración rosa-morada se considera oxidasa positiva.

Las cepas identificadas como *Salmonella* spp. fueron almacenadas en caldo soya tripticasa (TSB) con glicerol al 30 % y preservadas a -80 °C.

Tabla 1. Reacciones bioquímicas de *Salmonella* spp.

PRUEBA O SUSTRATO	RESULTADO		reacciones en especies de <i>Salmonella</i>
	POSITIVO	NEGATIVO	
glucosa (TSI)	Fondo amarillo	Fondo rojo	(+)
lisina descarboxilasa (LIA)	Fondo violeta	Fondo amarillo	(+)
H ₂ S	Ennegrecimiento	no ennegrecimiento	(+)
Urea	color rosado	sin cambio de color	(-)
prueba de Indol	color rosado en la superficie	color amarillo en la superficie	(-)
Citrato de Simmons	Crecimiento, color azul	sin crecimiento ni cambio de color	V

(+) 90% o más positivos en 1 o 2 días; (-) 90% o más negativos en 1 o 2 días; (v) variable (*Salmonella* spp. móviles positivo, *Salmonella* spp. inmóviles negativo)

5.1.3 Determinación del perfil de resistencia antimicrobiana de cepas de *Salmonella* spp.

Una vez tipificadas las cepas aisladas fueron ensayadas mediante el método de Kirby-Bauer bajo las normas del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (NCLSI), para verificar la susceptibilidad a los siguientes antibióticos: Ampicilina (10 µg), Amoxicilina/ac clavulánico (20/10 µg), Cefalotina (30 µg), Ceftazidima (30 µg), Cefotaxima (30 µg), Ceftazidima (30 µg), Aztreonam (30 µg), Cefoxitina (30 µg), Ceftriaxon (30 µg), Fosfomicina (200 µg), Gentamicina (30 µg), Tobramicina (10 µg), Sulfametoxazol/ trimetoprim, Amikacina (30 µg), Ac. Nalidíxico (30 µg), Ciprofloxacina (5 µg), Oxitetraciclina (30 µg), Cloranfenicol (30 µg), Neomicina (30 µg) y Cloxacilina (200 µg). De igual manera, se añadió discos de estreptomina (10 µg) que, si bien no se emplean regularmente en el ensayo de antibiograma para *Salmonella*, este antibiótico se usa comúnmente como promotor del crecimiento en animales. Por esta razón, se introdujo

la estreptomicina como marcador de aislamientos resistentes que se mueven a lo largo de la cadena alimentaria (Mather et al, 2013).

El procedimiento del ensayo se detalla brevemente. Se sembraron las cepas aisladas de *Salmonella* spp. en agar nutritivo incubándose a 37 °C por 18-24 h, con la finalidad de obtener un cultivo saturado. A partir del saturado obtenido, se preparó una suspensión bacteriana en solución salina (0.9 % NaCl) ajustando la turbidez a la escala 0.5 de Mcfarland. A través de la sumersión de un hisopo estéril se inocularon por inundación las placas de agar Mueller-Hinton. Seguidamente, se colocaron uno a uno los discos de antibióticos previamente atemperados y las placas fueron incubadas a 37 °C por 16 a 18 horas.

Los puntos de corte de resistencia antibiótica fueron determinados con base las especificaciones reportadas por el NCLSI (2021). Como control de calidad, se utilizó la cepa *E. coli* ATCC 2592215. Las cepas que presentaron resistencia a tres o más antibióticos de grupos farmacológicos no relacionados se consideraron como resistentes a múltiples drogas (MDR, del inglés multi-drug resistance).

5.2 Establecimiento de un banco de bacteriófagos con actividad lítica sobre cepas de *Salmonella* spp.

5.2.1 Recolección y transporte de muestras

Las mismas cuatro muestras de heces de aves de corral colectadas para el aislamiento de *Salmonella* spp., fueron procesadas para el aislamiento de bacteriófagos. Por otro lado, cuatro muestras de suelo fueron colectadas del jardín del Hospital de Clínicas de la ciudad de La Paz, en época de lluvia. La colecta fue efectuada en frascos estériles y conservados a 4 °C hasta su uso.

5.2.2 Aislamiento, purificación, titulación, amplificación y criopreservación de bacteriófagos.

Aislamiento

Para aislar los fagos a partir de muestras de heces de aves de corral (parrilleras y de postura) y muestras de suelo de jardín, se siguió la metodología propuesta por Fang et al., 2019, con algunas modificaciones. Se re-suspendió 1 g muestras ya sea de heces ó suelos, en 10 mL de buffer SM (50 mM pH 7.5 Tris-HCl, 100 mM NaCl, 8 mM MgSO₄, gelatina al 0,01 % p/v) agitándose por inversión tres veces. Posteriormente los tubos conteniendo las re-suspensiones fueron centrifugados a 10 000 rpm. por 10 minutos. El sobrenadante fue filtrado a través de membranas de acetato de celulosa de 0.45 µm de poro. Para el proceso de enriquecimiento de fagos, el filtrado obtenido (2.5 mL) fué añadido a 2.5 mL de caldo TSB estéril suplementado con 5 mM CaCl₂ y 100 µL de cultivo de *Salmonella* spp. (DO~ 0.2 λ600nm) y éste fue incubado a 37 °C durante 24 h en agitación orbital a 120 rpm. Posteriormente, el cultivo mixto fué centrifugado a 8000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente y el sobrenadante fue filtrado a través de membranas de acetato de celulosa de 0.22 µm de poro, para eliminar las células bacterianas residuales.

Para determinar la presencia de bacteriófagos líticos se realizó la técnica de la doble capa agarizada, donde una muestra diluida de 100 µL del filtrado de fagos se mezcló con 200 µL de células de la cepa de *Salmonella* 16J (fase logarítmica media de crecimiento) y se incubó a 37 °C durante 15 min. Luego se agregaron 3 mL de agar soft (agar-agar 0.5% con 5 mM de CaCl₂) mantenido a 45°C y la mezcla se vertió sobre una placa de agar nutritivo Britania (5.0 g. pluripectona, 3.0 g. extracto de carne, 8.0 g cloruro de sodio y 15.0 g agar), después de 18-24 h de incubación a 37 °C se examinaron las zonas de lisis en la placa.

Purificación

El procedimiento de aislamiento de “placa única” fue realizado para purificar los fagos aislados. Se seleccionó una calva única que presentaba una zona clara y definida, la

cual fue re-suspendida en 1 mL de buffer SM. Se realizaron diluciones en serie de 10 y se ensayó la doble capa agarizada descrita anteriormente. Este procedimiento fue repetido 5 veces, hasta obtener un solo tipo de morfología de las calvas en la misma placa de agar.

Titulación

En función al último repique obtenido, se determinó el título de bacteriófagos a través del recuento del número de placas de lisis que produce una determinada dilución del filtrado, misma que se denomina "Unidad Formadora de Placa" (UFP) y el título se expresa como "UFP/mL".

$$\text{Título (UFP/ mL)} = \frac{\text{Nro.De placas de lisis} \times \text{fd}}{\text{volumen}}$$

Dónde: fd= factor de dilución

Amplificación

Después del aislamiento de fagos se llevó a cabo un proceso de amplificación para aumentar el título de fagos. Cien microlitros de un saturado de la cepa de *Salmonella* spp. seleccionada fue inoculada en matraces Erlenmeyer de 250 mL de capacidad conteniendo 100 mL de medio de amplificación (medio TBS con 10 mM CaCl₂ y 5 mM MgSO₄), se incubó a 37 °C por 6 horas hasta el inicio de la fase estacionaria. A partir de un cultivo de doble capa, se colectó una calva única con un tip truncado, y se inoculó el cultivo previamente descrito. Finalmente, el cultivo inoculado con la única calva de fagos se incubó a 37 °C por 4 horas en agitación orbital (120 rpm). El cultivo bacteriófago:bacteria resultante, fue centrifugado a 8000 rpm por 10 minutos. El sobrenadante obtenido fue filtrado a través de membranas de acetato de celulosa de 0.22 µm de poro y se almacenó a 4 °C. El título de los bacteriófagos fue determinado utilizando el método de agar de doble capa descrito previamente

Criopreservación

Los bacteriófagos purificados y de título conocido fueron almacenados en buffer SM con 30 % de glicerol a -80 °C mientras los fagos en uso para diferentes determinaciones se almacenaron a 4 °C (Dini, 2011).

5.3 Caracterización parcial de bacteriófagos líticos aislados

5.3.1 Relación bacteriófago:bacteria

Multiplicidad de infección

A partir de los títulos obtenidos, se determinó la Multiplicidad de Infección (MDI ó MDI por su sigla en inglés = Multiplicity of infection). Este parámetro determina la proporción entre el número de bacteriófagos y de bacterias hospedadoras en una infección, y se puede obtener aplicando la siguiente fórmula:

$$MDI = \frac{UFP/mL}{UFC/mL}$$

Donde UFP/mL es la concentración de los bacteriófagos reflejada en las playas de lisis, y UFC/mL es la concentración de bacterias al momento de la infección.

La concentración bacteriana fue determinada mediante la interpolación de los datos de densidad óptica (λ_{600nm}) y recuento de células viables de *Salmonella*. (Anexo 3)

Distribución de Poisson

Para asegurar una aproximación razonable de bacterias infectadas individualmente se empleó una distribución de Poisson, que constituye una función matemática que permite mostrar la infección de los bacteriófagos sobre las bacterias en cualquier MDI dada. En ese sentido, representa la probabilidad de que exista o no un porcentaje de bacterias que adsorben a los bacteriófagos. Para la determinación del modelo de Distribucion de Poisson se utilizó la función dpois y ppois en Rstudio, donde:

Dpois (x, # número de adsorciones que tuvieron las bacterias

lambda) # Multiplicidad de infección (MDI)

Para las diferentes probabilidades se utilizó las siguientes funciones:

- ✓ Proporción de bacterias que no están infectadas

$$f_{m=0} \quad \text{dpois} (0 , \text{MDI})$$

- ✓ Proporción de bacterias que adsorben o son infectadas por un solo fago

$$f_{m=1} \quad \text{dpois} (1 , \text{MDI})$$

- ✓ Proporción de bacterias que adsorben uno o más fagos

$$f_{m>1} \quad 1 - \text{ppois} (1 , \text{MDI})$$

- ✓ Del total de bacterias infectadas por al menos un fago, la proporción de bacterias infectadas por más de un fago se describe mediante:

$$f_{m>1}/f_{m>0} \quad 1 - \text{ppois} (1 , \text{MDI}) / 1 - \text{ppois} (0 , \text{MDI})$$

5.2 Determinación del rango de hospederos – Prueba Puntual o Spot test

Se examinó la variedad de hospederos para los fagos mediante una prueba puntual (Spot test – Anjay et al., 2021) con diferentes cepas que incluyen: *Salmonella* spp. aisladas, *Escherichia coli* D3, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*. Para la prueba puntual se mezclaron 200 μL del cultivo bacteriano en fase estacionaria con 3 mL de agar blando (0.5% + CaCl_2 5 mM) atemperado a 45 °C, y se vertió en placas de agar nutritivo. Las placas de agar se dejaron secar durante 10 min y posteriormente, 5 μL de cada fago fueron depositados mediante gotas sobre el césped bacteriano y se incubaron a 37 °C durante 18–24 h. Después de la incubación, se determinó si los fagos aislados mostraban actividad lítica sobre las cepas observando la formación de lisis en las áreas donde se depositaron las gotas fágicas.

5.3.3 Estabilidad y viabilidad de los bacteriófagos a diferentes temperaturas y pH

Los fagos también se sometieron a diferentes condiciones fisicoquímicas como ser viabilidad a diferentes pH, temperaturas y mantenimiento del título de bacteriófagos luego de la preservación a 4 °C.

Para determinar la estabilidad y viabilidad de los bacteriófagos en función a la temperatura, se utilizó el método empleado por Haq et al (2011) con algunas modificaciones. Se depositó 10 μL del fago concentrado en microtubos Eppendorf

estériles que contenía 1000 μL de buffer SM y se incubó en un termobloque a diferentes temperaturas (40, 50, 60, 70 y 80 $^{\circ}\text{C}$) por una hora. La viabilidad del fago se determinó mediante la Prueba Puntual o Spot Test.

La estabilidad a diferentes pH se realizó según el método empleado por Dini (2011) con algunas modificaciones. Se depositó 10 μL del fago concentrado en microtubos de Eppendorf estériles que contenían 1000 μL de solución salina (0.9% NaCl) ajustada a diferentes pH (2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11 y 12) con 1 M HCl o 1 M NaOH, e incubados a temperatura ambiente por 12 horas. La viabilidad del fago se determinó mediante la Prueba Puntual o Spot Test.

La estabilidad del título de bacteriófagos en el tiempo se realizó con los fagos almacenados a 4 $^{\circ}\text{C}$ por el lapso de un año, comparando los títulos obtenidos al inicio y al cabo de un año. Los títulos fueron determinados mediante el método de la doble capa agarizada.

5.3.4 Curva de un paso ó One-step growth curve

Se realizó un experimento para determinar la “Curva de crecimiento de un solo paso” (One-step growth curve) utilizando el método sugerido por Huang, et al. (2018) y Shang et al. (2021) con algunas modificaciones. Para este procedimiento solo se seleccionaron 5 fagos que presentaban MDI mayor a 1. Un mililitro de cultivo de *Salmonella* (10^8 UFC/mL) y 100 μL de suspensión de fago (10^6 UFP/mL) se mezclaron y se incubaron durante 20 min a 37 $^{\circ}\text{C}$. Después de la incubación, la mezcla se centrifugó a 8000 rpm durante 5 min. Se descartó el sobrenadante, y el sedimento fago-bacteria se resuspendió en 1 mL de caldo TSB para eliminar los fagos no adsorbidos. Luego de realizar 3 veces este lavado, el sedimento del último lavado se resuspendió en 1 ml de TSB y a partir de éste se inoculo 50 μL en 50 mL de TSB y se incubó a 37 $^{\circ}\text{C}$ durante 50 min. Se tomaron alícuotas de 1 mL cada 10 minutos y se centrifugaron a 8000 rpm por 5 minutos. Se tomaron 100 μL del sobrenadante obtenido en cada lapso y los mismos fueron usados para la determinación del título de fagos mediante el método de doble capa de agar.

5.3.5 Adsorciones posteriores a la infección por fagos

La tasa de adsorción de fagos no nos determina cuantas bacterias infectadas terminan adsorbiendo más de un fago, porque las bacterias infectadas no se distinguen en aquellas que han adsorbido un segundo fago y aquellas que no, por lo cual una segunda adsorción se da en un determinado tiempo.

La adsorción secundaria se determinó mediante la Distribución de Poisson empleada anteriormente, por la función:

$$1 - p_{\text{pois}}(\theta, k \cdot L \cdot I)$$

Donde:

k = constante de adsorción

L = periodo de latencia del fago

I = fracción de fagos que se espera sean adsorbido por fagos

5.4 Eficacia del coctel de fagos

5.4.1 Preparación de matrices alimentarias y coctel de fagos

Huevos y pechugas de pollo fueron adquiridos de un mercado local. Se procedió a la desinfección de las cascaras de huevo y las pechugas de pollo a través de la sumersión en etanol al 70%, posteriores enjuagues con agua destilada estéril, irradiación con luz UV y secado de ambos lados por 30 minutos dentro de una cabina de flujo laminar. Posteriormente, las pechugas de pollo desinfectadas fueron cortadas asépticamente en el laboratorio en piezas de 3 cm² usando una hoja de bisturí estéril.

Para determinar la eficacia del coctel fágico se tomaron 5 fagos que presentaron una alta MDI, a mencionar: ϕ C2P, ϕ F4/1T, ϕ HC11, ϕ C3/1 y ϕ C4/3. Se procedió a ajustar los títulos de cada fago a una concentración de 10¹⁹ UFP/mL. Posteriormente se preparó el coctel e fagos en proporciones de 1:1:1:1:1 determinando un título final de 2*10²⁰ UFP/mL. A partir de solución (coctel) de 2*10²⁰ UFP/mL se establecieron diluciones 1/10 en buffer SM hasta llegar a la concentración de 10¹⁴ UFP/mL para un volumen final de 100 mL. A partir de esta última solución se establecieron diluciones de 1/100 para obtener títulos de 10¹² UFP/mL (correspondiente a un MDI de 10000), de 10¹⁰ UFP/mL (MDI de

100), 10^8 UFP/mL (MDI de 1), de 10^6 UFP/mL (MDI de 0,01) y finalmente una solución de 10^4 UFP/mL (MDI de 0,0001).

5.4.3 Contaminación de matrices alimentarias con *Salmonella* spp. y aplicación de coctel de fagos

Se realizaron experimentos de eficacia del coctel fágico sobre cáscaras de huevo y pechugas de pollo contaminadas con la cepa 16J de *Salmonella* MDR, siguiendo la metodología descrita por Sritha & Bhat (2021) con algunas modificaciones. Se colocaron las cascaras de huevos y las secciones cuadradas de pechuga de pollo en el centro de placas Petri estériles, se procedió a contaminar la superficie esparciendo 150 μ L de una suspensión de *Salmonella* a una concentración de 10^8 UFC/mL y se dejó 30 minutos para que las bacterias puedan adherirse a la matriz alimentaria respectiva.

Para el tratamiento, se aplicó mediante aspersión el cóctel de fagos descrito a MDIs de 0.0001, 0.01, 1, 100 y 10000 en la superficie de las muestras de cascaras de huevo y pechugas de pollo y se incubaron a 25 °C y 6 °C, respectivamente. Como control de la concentración de la población bacteriana, cascaras de huevo y pechugas de pollo contaminadas con *Salmonella* a una concentración de 10^8 UFC/mL, fueron rociadas solamente con solución fisiológica, y como control del proceso de desinfección de las matrices alimentarias, las cascaras de huevo y pechugas de pollo desinfectadas fueron sometidas a recuento bacteriano en cada tiempo de muestreo. El control negativo contenía las matrices alimentarias estériles.

5.4.3 Determinación de la carga bacteriana en alimentos tratados con el coctel de fagos

Para determinar la carga bacteriana después del tratamiento descrito anteriormente, las cajas Petri empleadas se inundaron con 10 mL de solución fisiológica (NaCl 0.85%) y se dejó en agitación a 120 rpm por 20 minutos. Luego de este tiempo, se tomó una alícuota de la solución fisiológica que ha tomado contacto con las muestras de cascaras de huevo y pechugas de pollo. Este procedimiento fue repetido luego de la incubación a los tiempos de exposición con el coctel de bacteriófagos de 0, 2, 4, 8 y 16

horas. Con la finalidad de evitar sembrar el coctel de bacteriófagos aun presente, las alícuotas se centrifugaron a 8000 rpm por 5 minutos para la precipitación bacteriana y el sobrenadante que aún podría contener el coctel de fagos, fue descartado. El recuento bacteriano en los pellets obtenidos de los ensayos tanto de los grupos control como del experimental, fue establecido luego de la resuspensión total del pellet en 1 mL de solución fisiológica mediante agitación por vortex y la siembra posterior en cajas Petri con agar nutritivo de 100 uL de diluciones establecidas a partir de esta resuspensión (Tabla 2).

Tabla 2. Diluciones de siembra para el recuento bacteriano en los pellets obtenidos de cada punto de muestreo posterior a la aplicación de fagos.

MUESTRA	DILUCIONES DE SIEMBRA
Dosis de fagos de 10^8 , 10^{10} y 10^{12} UFP/mL	10^{-3}
Dosis de fagos de 10^4 y 10^8 UFP/mL	10^{-5}
Control de crecimiento bacteriano y tratamiento a tiempo 0	10^{-6}
Control de esterilidad	Siembra directa

La eficacia del tratamiento con el coctel de fagos se determinó mediante la siguiente formula:

$$Eficacia = 1 - \left(\log \frac{UFC}{ml} \text{ con tratamiento} / \log \frac{UFC}{ml} \text{ sin tratamiento} \right)$$

Donde "log UFC/mL" = recuento bacteriano contaminante de la matriz alimentaria. Cuanto mayor sea la superficie (cercano a 1), se considera que es más eficaz en la eliminación de la carga microbiana contaminante.

5.5 Análisis estadístico

Todos los procedimientos se realizaron por triplicado y los resultados se muestran como valores medios del logaritmo de UFC/muestra y las desviaciones estándar de la media se indican mediante barras de error. Rstudio v. 4.2.0 fue utilizado para el análisis de la distribución de Poisson con las funciones ppoiss y dpoiss.

La eficacia del coctel de fagos empleados se evaluó en STATISTICA V.8 el análisis factorial de los resultados se realizaron usando ANOVA de 2 variables para examinar las diferencias significativas ($p < 0,05$). De igual manera se establecieron superficies de respuesta para la estimación de la Eficacia.

CAPITULO 6. Resultados y discusión

6.1 Aislamiento e identificación fisiológica de *Salmonella* spp.

Colonias típicas de *Salmonella* de color malva y de color negro con halo traslucido (ojo de pez) fueron aisladas a partir de los medios selectivos CHROMagar™ *Salmonella* Plus y agar XLD, respectivamente (Figura 8).

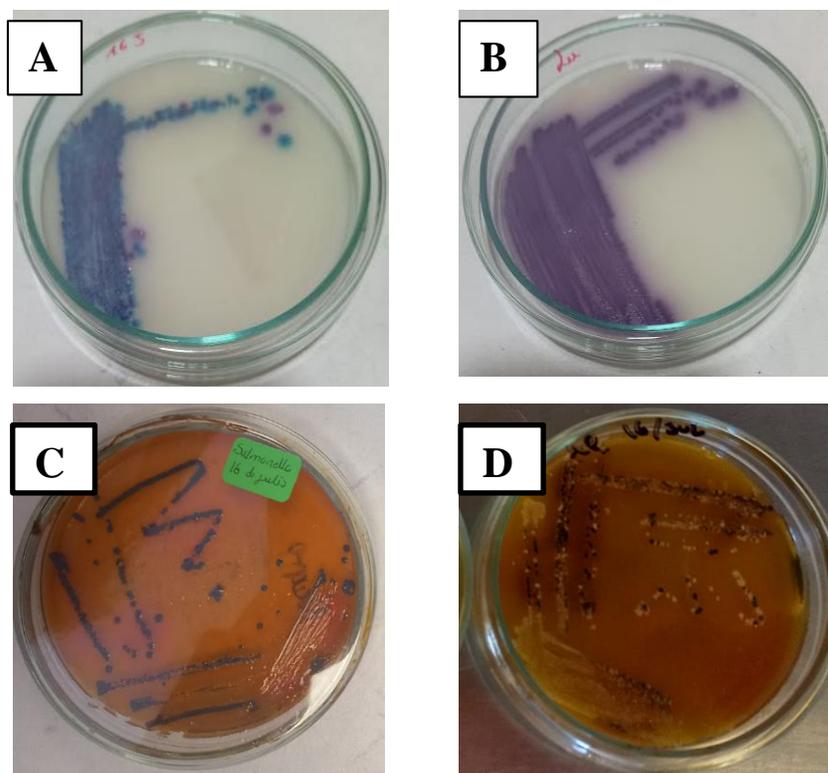


Figura 8. Colonias de *Salmonella* crecidas en CHROMagar™ *Salmonella* Plus A y B (color malva) y colonias de *Salmonella* crecidas en agar XLD C y D (color negro con halo traslucido). A) colonias provenientes de muestras de heces de pollos, B) colonias aisladas de agua de Rio Luribay. C) y D) colonias provenientes de muestras de heces de pollos.

Se aislaron 10 cepas de *Salmonella* de muestras de heces de pollo, de efluentes circundantes a una granja (Rio Luribay), del Rio La Paz y de la laguna de Achocalla, tal y como se detalla en la Tabla 3.

Tabla 3. Denominación de la cepa de *Salmonella* aislada de acuerdo con el tipo de muestra y lugar de aislamiento

<i>Salmonella</i> spp.	LUGAR DE AISLAMIENTO	TIPO DE MUESTRA
H	Mercado de Ciudad Satélite. Municipio El Alto – La Paz	Huevo
Lu	Rio Luribay. Provincia Loayza – La Paz	
RLP	Rio La Paz. Municipio de Mecapaca – La Paz	Aguas superficiales
RLP2		
S1	Laguna Achocalla. Municipio de Achocalla – La Paz	
S2		
16J	Feria 16 de Julio. Municipio El Alto – La Paz	
S3	Granjas domésticas. Municipio de Achocalla – La Paz	Heces de pollo
S4		
S5		

Un aspecto importante para resaltar es el aislamiento de *Salmonella* spp. en muestras de agua proveniente del río de Luribay, en el que se observó un desarrollo masivo de *Salmonella* en comparación con las muestras de heces de pollos, y muestras de aguas del Río La Paz y laguna de Achocalla, lo que nos indica la contaminación ambiental proveniente de granjas avícolas circundantes al río. Si bien se establecen controles periódicos realizados a las granjas registradas a nivel nacional mediante el Programa Nacional de Erradicación de la Salmonelosis y Sanidad Aviar (PRONESA), existen granjas clandestinas que no cumplen con las normas de higiene y control y muchas veces pasan desapercibidas por las autoridades. Estas granjas constituyen un peligro ambiental ya que muchas veces vierten sus desechos directamente a ríos o efluentes sin tratamiento previo lo que constituye una fuente de contaminación, por ello se puede detectar cepas de *Salmonella* spp. en dichos nichos ecológicos.

Se aisló también *Salmonella* de huevos, mostrando que esta bacteria puede transmitirse a través de la cadena alimentaria. Resultados similares fueron obtenidos por Montesdeoca y Villarruel (2021), quienes estudiaron la dinámica de la presencia de *Salmonella* en 240 huevos de gallina, que fueron adquiridos en el mercado local en Ecuador, determinando que 10 huevos de gallina (4.16%) resultaron positivos para *Salmonella*. Se encontró mayor prevalencia de *Salmonella* spp. en huevos del Sector B correspondiente a los distribuidores mayoristas del mercado. De igual manera Li et al (2020) estudiaron la prevalencia de *Salmonella* en huevos donde se recolectó un total de 33 288 huevos (5548 muestras agrupadas de 6 huevos) en China en 2016 y la prevalencia de *Salmonella* fue del 0,5 % (27/5548). El serotipo predominante fue *Salmonella* Enteritidis.

Estudios realizados por Velásquez et al (2018) en granjas avícolas en el sudeste Estados Unidos, muestran una prevalencia del 6% de *Salmonella* en granjas pese al cumplimiento de las recomendaciones sobre prácticas de manejo y bioseguridad. En el mencionado estudio se identificaron 6 serotipos diferentes: *Salmonella* Enteritidis (52%), *Salmonella* Berta (38%), *Salmonella* Mbandaka (7%), *Salmonella* Typhimurium (2%), *Salmonella* Kentucky (0,4%), y *Salmonella* Tennessee (0,4%).

En Ecuador, Mejía et al. (2020) obtuvieron resultados similares, donde *Salmonella* estuvo presente en 41,4 % de las muestras de canales de pollos y *Salmonella* Infantis representó el 98.2 % de los aislamientos. Rodríguez Hernández et al. (2021) muestrearon un total de 15 granjas en la región de Tolima, Colombia, de las cuales cuatro granjas resultaron positivas a *Salmonella* spp., con una prevalencia del 26,67% (4/15). Del total de muestras analizadas el 17,78 % resultó positivo para el aislamiento de *Salmonella* encontrándose con mayor frecuencia de las muestras de hisopado cloacal (79,17 %, n = 19), seguido de las muestras de hisopado de botas (16,67 %, n = 19), n = 4) y muestras de alimento de aves (4.16%, n= 1).

6.1.1 Determinación del perfil de resistencia antimicrobiana de cepas de *Salmonella* spp

Los resultados del perfil de resistencia antimicrobiana de los aislados de *Salmonella* se presentan en la figura 9. En una visión global encontramos que el 100 % de los aislamientos fueron resistentes a cloxacilina, 50 % a tobramicina, 40 % a gentamicina y ácido nalidíxico. El 20% de los aislados presentaron resistencia a betalactámicos y cefalosporinas y que incluyen: a ampicilina, amoxicilina ac. clavulánico, cefalotina, cefepima, cefotaxima, cefoxitina, aztreonam, fosfomicina, cotrimoxazol y cloranfenicol. Ninguno de los aislamientos presentó resistencia a ceftazidima, neomicina y estreptomina.

GRUPO	ANTIBIÓTICO	HUEVO		AGUA				HECES DE POLLOS				
		H	LU	RLP1	RLP2	S1	S2	16J	S3	S4	S5	
AMINOGLUCOSIDOS	Gentamicina (30 ug)											
	Tobramicina (10 ug)											
	Amikacina (30 ug)											
	Estreptomina (10 ug)											
	Neomicina (30 ug)											
ANFENICOLES	Cloranfenicol (30 ug)											
QUINOLONAS	Ac. Nalidixico (30 ug)											
	Ciprofloxacina (5 ug)											
SULFONAMIDAS	Sulfametoxazol/ trimetoprim											
TETRACICLINAS	Oxitetraciclina (30 ug)											
MISCELANEA	Fosfomicina (200 ug)											
PENICILINAS	Ampicilina(10 ug)											
	Cloxacilina (200 ug)											
CEFALOSPORINAS	Cefalotina (30 ug)											
	Ceftazidima (30 ug)											
	Cefotaxima (30 ug)											
	Cefepima (30 ug)											
	Cefoxitina (30 ug)											
INHIBIDORES DE B-LACTAMASAS	Ceftriaxon (30 ug)											
	Amoxicilina/ac clavulánico (20/10 ug)											
MONOBACTAMICOS	Aztreonam (30 ug)											

Figura 9. Susceptibilidad antimicrobiana de cepas de *Salmonella* spp aisladas (N=10) Método de discriminación resistente (azul) – sensible (celest): Puntos de corte de Kirby-Bauer según CLSI 32th. Edición)

El cien por ciento de las cepas de *Salmonella* aisladas presentó resistencia a uno o más de los antimicrobianos ensayados incluidos los aislados de muestras de agua superficiales. La resistencia más común fue a la cloxacilina, ac. nalidíxico y gentamicina, sin embargo, el 100 % de ellos presentaron resistencia intermedia a ciprofloxacina, esta quinolona considerada de primera elección en casos de infecciones gastrointestinales ocasionadas por bacterias Gram negativas.

La cepa **Lu** de *Salmonella* spp. aislada de muestras de agua provenientes del río Luribay y la cepa **16J** aislada de muestras de heces de pollo de la feria 16 de Julio, presentaron resistencia a diferentes grupos de antimicrobianos como ser: betalactámicos que incluyen cefalosporinas de tercera y cuarta generación, tetraciclinas, sulfonamidas, anfenicoles y una resistencia intermedia a quinolonas, siendo resistente a más de tres de los trece grupos de antibióticos, por tal motivo fueron consideradas cepas multirresistentes o MDR establecido por el consenso Iberoamericano que estandariza las definiciones de los diferentes niveles de resistencia a los antimicrobianos en bacterias de importancia en salud pública.

De acuerdo a lo reportado, existen granjas avícolas circundantes al río Luribay, lo que nos indica que hay una contaminación ambiental, que podría deberse en gran medida a la contaminación por agua proveniente de las granjas. Si bien la OMS prohibió el uso de antibióticos en animales como promotores de crecimiento, es sabido que los piensos para animales contienen bajas dosis de antibióticos (Landers et al., 2012), además con el incremento del precio del maíz en los últimos años los productores optan por usar alimentos balanceados para el desarrollo de las aves que les brinda la nutrición suficiente, y son empleados para minimizar el riesgo de contaminación no solo de *Salmonella* spp. sino también de otras bacterias patógenas, lo que minimiza pérdidas, no obstante, provoca una contaminación ambiental permitiendo que las bacterias puedan generar resistencia a los antimicrobianos.

En nuestros resultados, todas las cepas de *Salmonella* fueron sensibles a la estreptomicina. Este antibiótico fue ensayado como marcador de aislamientos resistentes

que se mueven a lo largo de la cadena alimentaria por ser usado comúnmente como promotor del crecimiento en animales, determinando que posiblemente este antibiótico no sea usado en la alimentación de los pollos.

Los resultados del presente estudio se compararon con los obtenidos por Sánchez *et al.* (2020), quienes evaluaron 31 aislamientos de *Salmonella* spp. en granjas avícolas de ponedoras del centro de Ecuador obtenidos el 2017, donde las cepas de *Salmonella* Infantis fueron del fenotipo MDR en el 94,4% de los aislamientos, las cepas de *Salmonella* Typhimurium tenían un fenotipo de resistencia antimicrobiana reducida y el 50 % mostró resistencia a al menos un antimicrobiano. Similares resultados reportaron Lapierre *et al.* (2020), quienes realizaron una caracterización fenotípica y genotípica de factores de virulencia y susceptibilidad antibiótica de cepas de *Salmonella* Infantis aisladas de carne de pollo disponible en supermercados, proporcionando pruebas de la diseminación de *Salmonella* Infantis virulenta y multirresistente.

Zhang, *et al.* (2021) caracterizaron a *Salmonella* Indiana transmitida por pollos, este fue resistente a 10 clases de antimicrobianos, incluidas las penicilinas, los agentes combinados de β -lactámicos, las cefemas, los aminoglucósidos, los antagonistas de la vía del folato, las fosfomicinas, los macrólidos, los fenicoles, las quinolonas y las tetraciclinas, por lo que se consideró un aislado XDR (extremadamente resistentes a los fármacos). Una característica destacada de su genoma es la identificación de 28 islas genómicas (GI) que codifican proteínas para fagos, secreción de tipo IV, reparación de ADN y formación de biopelículas, así como 5 islas de patogenicidad (SPI) de *Salmonella*, incluidas C63PI, SPI-2, SPI-3, SPI-4 y SPI-5, además describieron una variedad de 27 genes de resistencia a los antimicrobianos (ARG) adquiridos en el plásmido de tipo IncHI2-IncHI2A.

6.2 Establecimiento de un banco de bacteriófagos

6.2.1 Aislamiento, selección y titulación de bacteriófagos.

Se aislaron un total de 12 fagos de muestras de heces de pollos y suelos de jardín utilizando la cepa 16J de *Salmonella* como hospedero. Todos los fagos aislados presentaron diferencias claras en el tamaño de la placa y la turbidez, identificándose 3 tipos: 1) fagos que presentaban calvas de apariencia clara y con borde definido, considerados fagos líticos, 2) fagos que presentaban calvas con centros claros con un halo turbio, que, podrían corresponder a fagos resistentes o profagos y finalmente, 3) fagos que mostraban calvas turbias u opacas correspondientes a fagos lisogénicos ya que no logran lisar por completo a las bacterias que infectan (Figura 10).

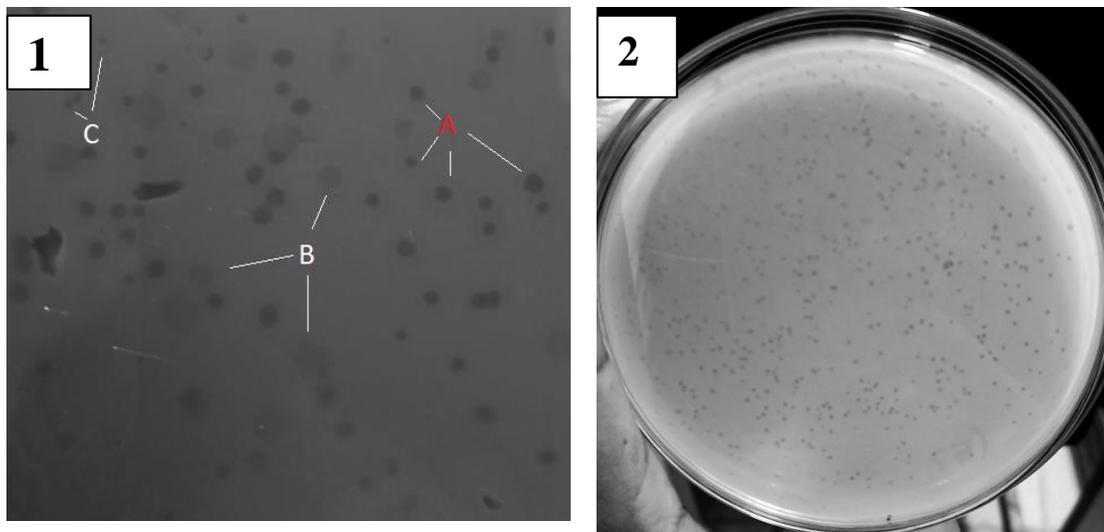


Figura 10. Morfología de las calvas de fagos aislados de muestras de heces de pollo

1. Presencia de calvas en un aislamiento primario. A) calvas claras con borde definido (líticas). B) calvas turbias (lisogénicas). C) calvas claras con borde opaco (Pseudo lisogénicas)
2. Presencia de calvas pequeñas claras con borde definido pertenecientes al fago F4/1T después de múltiples repiques.

Debido a la capacidad específica para lisar bacterias, solo se seleccionaron fagos líticos y los fagos lisogénicos que incorporan su material genético al genoma bacteriano quedaron descartados debido a que, pueden actuar como vehículos para la transmisión

horizontal de genes entre bacterias, animales o humanos a través de la cadena alimentaria (ŻBikowska, 2020; De Souza, et al, 2021).

Del total de fagos aislados, 5 provenían de las mismas muestras de heces de pollos de la feria 16 de Julio utilizadas para el aislamiento de *Salmonella* spp. y 7 provenientes de muestras de suelo de jardín del Hospital de Clínicas (Tabla 4). Estos resultados se correlacionan con otros estudios que reportan que los fagos específicos de *Salmonella* spp. se pueden aislar a partir de muestras de ambientes de granjas avícolas, heces de animales, mataderos y aguas residuales (Andreatti Filho *et al.*, 2007; Atterbury *et al.*, 2007).

Tabla 4. Denominación del bacteriófago aislado, tipo de muestra y lugar de aislamiento

FAGO	LUGAR DE AISLAMIENTO	TIPO DE MUESTRA
φF3/2 φF1/1P φF4/1T φF1/3 φF3/1	Feria 16 de Julio. Municipio El Alto – La Paz	Heces de pollo
ΦHC11 φHC12 φC2P φC2G φC3/1 φC4/2 φC4/3	Hospital de Clínicas Municipio de La Paz, La Paz	Suelo de jardín

El procedimiento de titulación de bacteriófagos fue realizado utilizando como hospederas a las cepas de *Salmonella* 16J, Lu y S5 aisladas en el presente estudio, debido a que las mismas provienen de diferentes muestras y además presentan diferente perfil de resistencia antimicrobiana como se describió previamente.

La tabla 5 muestra el título de cada bacteriófago purificado a partir de una calva única, empleando como hospedero la cepa de *Salmonella* 16J, Lu y S5. Los títulos para la cepa 16J estuvieron entre 10^9 a 10^{13} UFP/mL,

Tabla 5. Título de bacteriófagos (UFP/mL) de una calva única empleando como huésped las cepas Lu, 16J y S5 de *Salmonella*

FAGO	Cepas de <i>Salmonella</i>		
	16 J (MDR)	Lu (MDR)	S5 (sensible)
φF3/2	5,0E ⁺¹⁰	6,90E ⁺⁰⁹	1,27E ⁺¹⁰
φF3/1	4,2E ⁺⁰⁹	6,18E ⁺¹⁰	4,20E ⁺⁰⁸
φHC11	1,5E ⁺¹²	2,81E ⁺¹¹	1,50E ⁺¹¹
φF1/1P	6,2E ⁺⁰⁹	3,88E ⁺⁰⁸	6,20E ⁺⁰⁸
φF1/3	4,7E ⁺¹²	8,22E ⁺¹⁰	4,70E ⁺¹⁰
φHC12	5,0E ⁺¹¹	4,39E ⁺¹¹	5,00E ⁺¹¹
φC2P	6,8E ⁺¹³	8,09E ⁺¹²	1,90E ⁺¹²
φC2G	2,8E ⁺¹²	1,58E ⁺¹²	2,80E ⁺¹⁰
φC3/1	4,5E ⁺¹¹	6,43E ⁺¹¹	4,50E ⁺¹¹
φF4/1T	4,7E ⁺¹²	2,88E ⁺¹¹	1,85E ⁺¹¹
φC4/2	2,1E ⁺¹²	4,20E ⁺⁰⁹	2,10E ⁺¹¹
φC4/3	6,2E ⁺¹³	1,22E ⁺¹²	1,20E ⁺¹²

Con la finalidad de tener un banco de fagos parcialmente caracterizado y tener un stock de fagos de título conocido para futuras determinaciones, se procedió a calcular el título de bacteriófagos posterior a la amplificación efectuada en caldo TBS con cofactores, empleando como hospedador a la cepa de *Salmonella* S5 que es sensible a la mayoría de los antibióticos ensayados. En los resultados se observó que el título de bacteriófagos se incrementó considerablemente hasta títulos de 10^{30} a 10^{40} UFP/mL (Anexo 4)

6.3 Caracterización de los bacteriófagos líticos aislados.

6.3.1 Multiplicidad de infección

La multiplicidad de infección es un factor determinante para considerar la aplicación de fagos como agentes de control biológico, considerando que el aumento de la relación

UFP/UFC determina la probabilidad de que las partículas de fagos infecten a la bacteria hospedera. Por esta razón, diversos estudios recomiendan aplicar una MDI alta *in vivo* que *in vitro*. Por ejemplo, el promedio más alto de MDI reportado fue de 115612.4 a ser aplicado como terapia fágica y de 434.5 en aplicaciones para el control biológico de *Salmonella* (Sekatawa et al, 2020).

En el presente estudio, se seleccionaron 3 cepas de *Salmonella* spp., que presentaban diferente perfil de susceptibilidad antimicrobiana: las cepas 16J y Lu consideradas MDR y la cepa S5 que era sensible a la mayoría de los antibióticos ensayados. Esta selección fue establecida con el fin de observar si los fagos infectaban de igual manera a cepas MDR o no.

Respecto a la MDI, los resultados determinaron que 10 de los 12 fagos estudiados presentaron una multiplicidad de infección mayor a uno, con excepción de los fagos ϕ F3/1 y ϕ F1/1P frente a la cepa **16J** de *Salmonella*. Datos bibliográficos indican que con una MDI mayor a 5 las probabilidades de infección y lisis bacteriana se incrementan. (Abedon, 2016, Goode et al, 2003). Si consideramos la definición de Multiplicidades de infección, tendríamos como ejemplo la absorción del bacteriófago ϕ C2P, donde una sola célula bacteriana de la cepa de *Salmonella* **Lu** absorbe 833 fagos en promedio, una sola célula bacteriana de la cepa de *Salmonella* **16J** absorbe cerca de 300 fagos y finalmente aproximadamente 700 fagos son absorbidos por la cepa de *Salmonella* **S5**.

La susceptibilidad a la infección y posterior lisis de las células bacterianas depende de que las mismas difieran en cuanto a las características y número de receptores de unión a nivel de membranas, a las condiciones del entorno celular como ser presencia y concentración de iones de Ca^{2+} y Mg^{2+} y a la densidad bacteriana al momento de la infección. (Moldovan et al, 2007; Abedon, 2022). Como se observa en la tabla 6, las multiplicidades de infección del fago ϕ F3/1 adsorbido por células bacterianas de las cepas de *Salmonella* **Lu**, **16J** y **S5** fueron de 25, 1.7 y 0.3, respectivamente, determinando que probablemente las características típicas de las membranas de estas cepas y los factores del entorno celular coadyuvarían a las diferencias en las MDI, siendo la cepa S5 la que

presenta menor susceptibilidad a la infección por el fago $\phi F3/1$, donde sólo 3 fagos son adsorbidos por 10 células bacterianas.

Todos los fagos ensayados presentaban actividad lítica frente a todas las cepas de *Salmonella* aisladas, sin embargo, la efectividad de lisis no es la misma, ya que fagos como $\phi F3/2$, $\phi HC11$, $\phi C2P$ y otros presentan una multiplicidad de infección alta que garantiza una mayor lisis y eliminación del patógeno.

Tabla 6. Multiplicidad de Infección de los fagos aislados frente a las cepas Lu, 16J y S5 de *Salmonella*.

FAGO	Aislados de <i>Salmonella</i>		
	Lu (MDR)	16J (MDR)	S5 (SENSIBLE)
$\phi F3/2$	50,0	11,9	53,3
$\phi F3/1$	25,0	0,3	1,7
$\phi HC11$	150,0	50,0	80,0
$\phi F1/1P$	3,0	0,2	4,8
$\phi F1/3$	50,0	6,3	28,6
$\phi HC12$	390,0	76,2	444,4
$\phi C2P$	833,3	300,0	700,0
$\phi C2G$	750,0	6,3	133,3
$\phi C3/1$	200,0	100,0	140,0
$\phi F4/1T$	58,3	250,0	95,0
$\phi C4/2$	20,0	52,4	100,0
$\phi C4/3$	416,7	261,9	625,0

MDR= multidrogo resistente

6.3.2 Distribución de Poisson

A menudo no es suficiente considerar solo el promedio de fagos adsorbidos por bacterias que es la información que nos brinda la MDI, por lo cual es necesario ser consciente de la probabilidad de que exista o no un porcentaje de bacterias que adsorban a los bacteriófagos que se halla sujeta a una distribución Poissonal. En este sentido se

estudia la relación entre el porcentaje de bacteriófagos adsorbidos por las bacterias y además el porcentaje de bacterias que fueron infectadas por los bacteriófagos.

Como se muestra en la figura 10, la variación en la distribución de fagos depende de la multiplicidad de infección. Una MDI mayor a 1 hace que la fracción de bacterias que adsorben a uno o más bacteriófagos se incremente y que la fracción de bacterias que no recibe ningún fago disminuya. Según el análisis estadístico de Poisson, se necesita una MDI mínima de 8 para garantizar que el 100% las bacterias reciban al menos un bacteriófago.

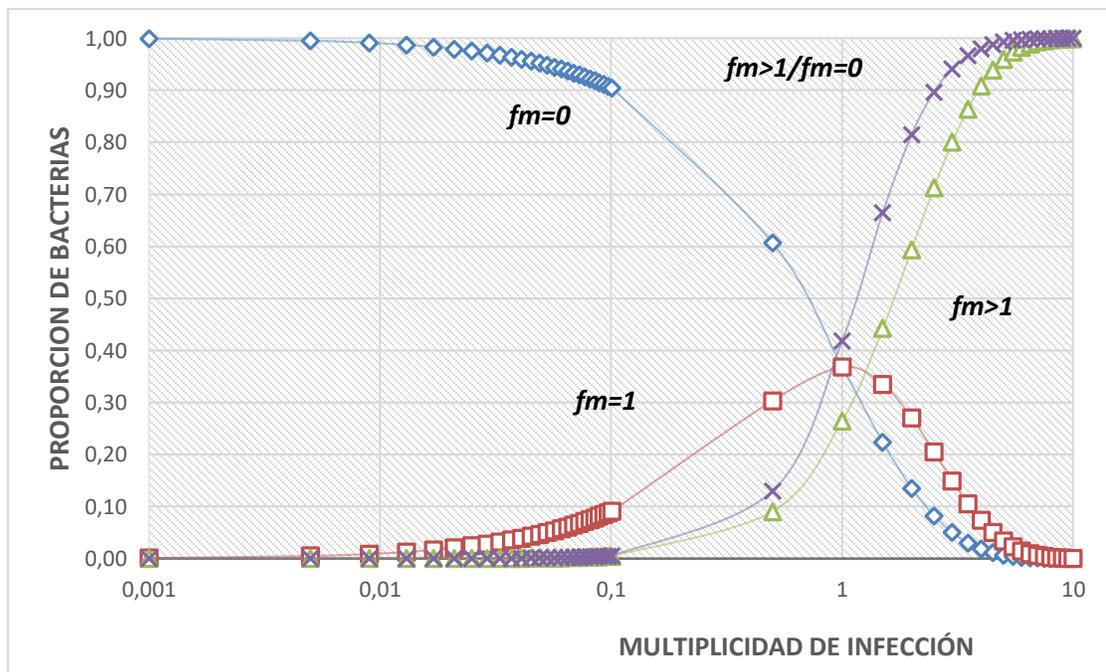


Figura 11. Distribución de Poisson frente a diferentes MDI.

Para rombos azules $fm=0$ fracción de bacterias que no han sido infectadas, cuadrados naranjas $fm=1$ fracción de bacterias que adsorbieron solo un fago, triángulos grises $fm>1$ fracción de bacterias que adsorbieron más de un fago, cruces amarillas $fm>1/fm$ fracción de bacterias que adsorbieron más de un fago del total de bacterias infectadas.

La tabla 7 detalla la distribución de Poisson de los fagos: FAGOS $\phi F3/2$, $\phi HC11$, $\phi HC12$, $\phi C2P$, $\phi C2G$, $\phi C3/1$, $\phi F4/1T$, $\phi C4/2$, $\phi C4/3$ y $\phi F1/3$ estos presentan una MDI > 8 frente a las 3 cepas de *Salmonella* ensayadas (Lu, 16J y S5), por lo cual presentan el mismo patrón de distribución determinado por el análisis de Poisson, indicando que el 100 % de

las bacterias adsorben múltiples bacteriófagos, asumiendo que el 100 % de los bacteriófagos aplicados son adsorbidos.

La distribución de Poisson para el fago ϕ F3/1 es diferente, donde el 100 % de las bacterias son infectadas por fagos frente a la cepa Lu de *Salmonella*, comparado con la cepa 16J de *Salmonella*, donde el 22 % de bacterias es infectado por solo un fago, el 4% de las bacterias adsorbe más de un fago y el 74% de las bacterias permanecen sin adsorber fagos, por lo tanto, el porcentaje de bacterias que fueron infectadas por los bacteriófagos es del 5%. Respecto a la cepa de *Salmonella* S5, donde el porcentaje de bacterias no infectadas se reduce a un 18%, el 31 % de las bacterias adsorbe un fago y el porcentaje de bacterias que adsorben más de 1 fago es de 51 % siendo mayor al porcentaje determinado para la cepa 16J y de igual manera, el porcentaje de bacterias que fueron infectadas por los bacteriófagos es del 74%.

En la adsorción del bacteriófago ϕ F1/1P por bacterias de la cepa Lu existe la probabilidad de que el 5% de las bacterias no adsorbieran ningún bacteriófago, el 15 % adsorbió al menos un bacteriófago y el 80% adsorbieron más de un bacteriófago respecto al total de bacterias que adsorbieron al menos un bacteriófago; el porcentaje de bacterias que fueron infectadas por los bacteriófagos es del 94 %. En la relación de la adsorción de los bacteriófagos ϕ F1/1P por la cepa 16J, el 82 % de las bacterias no han adsorbido a ningún bacteriófago, por consiguiente, el 16% de las bacterias adsorbieron al menos un bacteriófago, el 2 % de las bacterias adsorbieron a más de un bacteriófago, por último, el porcentaje de bacterias infectadas por bacteriófagos fue del 2%. En la relación de la adsorción del bacteriófago ϕ F1/1P por la cepa S5 existe la probabilidad de que el 1% de las bacterias no adsorbieran ningún bacteriófago, por lo tanto, el 4% podría haber adsorbido al menos un bacteriófago respecto al total de bacterias del cultivo y el 95% de las bacterias adsorbieron a más de un bacteriófago respecto al total de bacterias que adsorbieron al menos un bacteriófago, el 99% de las bacterias fueron infectadas por los bacteriófagos.

Tabla 7. Distribución de Poisson de los fagos frente a las cepas Lu, 16J y S5 de *Salmonella*.

HUÉSPED	F_m=0 (%)	F_m=1 (%)	F_m>1 (%)	<i>f_m</i>>1/<i>f_m</i>=0 (%)
FAGOS ϕ F3/2, ϕ HCl1, ϕ HCl2, ϕ C2P, ϕ C2G, ϕ C3/1, ϕ F4/1T, ϕ C4/2, ϕ C4/3 y				
ϕ F1/3				
Lu	0	0	100	100
16J	0	0	100	100
S5	0	0	100	100
FAGO ϕ F3/1				
Lu	0	0	100	100
16J	74	22	4	5
S5	18	31	51	74
FAGO ϕ F1/1P				
Lu	5	15	80	94
16J	82	16	2	2
S5	1	4	95	99

Como la distribución de Poisson se calcula en base a la multiplicidad de infección, también podemos determinarlo inversamente, es decir que podemos predecir la MDI basado en la fracción conocida de bacterias que permanecen viables después de exposición del fago pudiendo obtener resultados más certeros que durante la función de plaqueo en la doble capa de agar, siendo esencial para la aplicación de fagos como biocontrol mantener el título constante

La distribución de Poisson también nos ayuda a determinar en qué grado las bacterias infectadas por fagos experimentan adsorciones posteriores, juntamente con los datos de la cinética de fagos, podríamos predecir la fracción de bacterias infectadas que podrían adsorber fagos adicionales antes de la lisis. Esto es importante pues cuantas más

adsorciones secundarias exista, más fenómenos asociados a la adsorción secundaria de fagos ocurrirán dentro de un cultivo, como mayores tasas de inducción de ciclos lisogénicos por fagos o de inhibición de la lisis

6.3.3 Rango de hospederos del fago

Se usaron diecisiete cepas diferentes para evaluar el rango de hospederos para los fagos aislados en este estudio (Tabla 8). Entre las diferentes cepas de *Salmonella* spp aisladas (n=10), ninguna de ellas resulto ser resistente a la infección por fagos, incluyendo las cepas de *Salmonella* consideradas MDR. Basándose en el espectro lítico, 6 fagos se clasificaron como fagos de amplia gama de hospederos, 6 fagos se clasificaron como fagos de muy amplia gama de hospederos y ninguno de los fagos fue clasificado como fagos de rango estrecho de hospederos.

Tabla 8. Rango de hospederos de los bacteriófagos aislados

HUESPED	BACTERIÓFAGO											
	HCII	F3/1	C2P	C4/3	F4/IT	C2G	F1/IP	HC12	C3I	F1/3	F3/2	C4/2
<i>Salmonella</i> 16J	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Salmonella</i> Lu	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Salmonella</i> RLP1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Salmonella</i> RLP2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Salmonella</i> H	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Salmonella</i> S1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Salmonella</i> S2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Salmonella</i> S3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Salmonella</i> S4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Salmonella</i> S5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>E. coli</i> D3	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-
<i>E. coli</i> ATCC25922	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>E. faecalis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Los fagos que presentaban un rango de hospedador más amplio fueron los fagos aislados de muestras de heces de pollos, a nombrar: ϕ F3/2, ϕ F1/3 y ϕ F3/1, y los fagos aislados de muestras de suelo de jardines del Hospital de Clínicas ϕ HCl1, ϕ C2P y ϕ C2G. Estos 6 bacteriófagos pueden ser considerados como de muy amplia gama de hospederos debido a que además de presentar actividad lítica frente a las 10 cepas de *Salmonella* (Figura 12-A), presentaron también actividad lítica frente a la cepa de *Escherichia coli* D3 (Figura 12-B). Sin embargo, es importante resaltar que, los mismos no presentaron igual actividad lítica frente a la cepa *Escherichia coli* ATCC 25922, a excepción del fago ϕ HCl2.

Por otro lado, cuando se ensayaron *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis* (bacterias Gram positivas), no se observó actividad lítica frente a ninguna de las 2 cepas mencionadas.

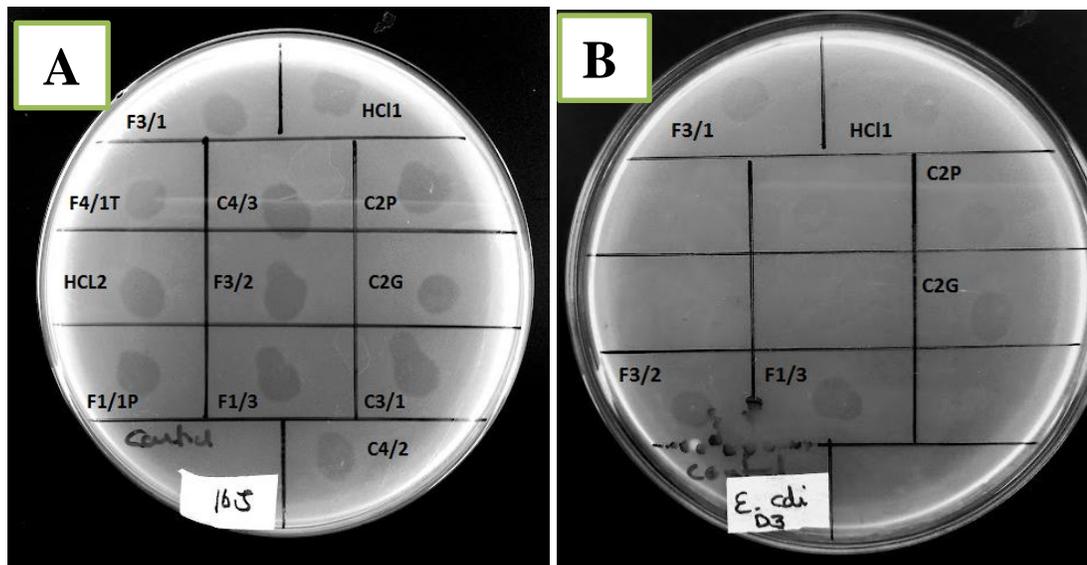


Figura 12. Determinación de rango de hospederos de los diferentes bacteriófagos aislados, observándose como zonas de lisis sobre: A) cepa de *Salmonella* 16J y B) cepa de *Escherichia coli* D3

Resultados similares fueron obtenidos por Anjay et al (2021) quienes obtuvieron 6 fagos clasificados como fagos de amplia gama de hospederos y 15 fagos de muy amplia gama de hospederos. Las serovariedades de *Salmonella* más susceptibles fueron Abortus equi, Dublin, Dusseldorf, Virginia, Gallinarum9S, Heidelberg, y Ayinde (lisadas por todos los fagos) mientras que, las serovariedades menos susceptibles fueron Derby, Artis II y Budapest (lisadas por sólo 1 o 2 fagos). Encontraron que todos los fagos eran líticos para las cepas no patógenas de *E. coli* ATCC8739, sin embargo, ninguno de los fagos mostró actividad lítica contra *Salmonella* Flexneri y *Yersinia enterocolitica*.

Otros autores reportaron fagos con un amplio rango de hospederos como Li et al. (2020) que trabajaron con el fago STP4-a, quienes analizaron el rango de hospederos, la terapia y la seguridad en la administración en pollos. Primeramente, los pollos fueron inoculados con 91 cepas de *Salmonella* de diferentes subespecies y serovariedades. Luego de la administración de fagos, observaron que el fago STP4-a podría inhibir 88 de las 91 cepas de *Salmonella* ensayadas y que, el tratamiento con fagos podía inhibir la colonización bacteriana en los pollos, además de concluir que el pretratamiento con fagos podía prevenir y eliminar por completo a *Salmonella*. Por lo tanto, el fago STP4-a constituía un agente antimicrobiano seguro con una gama de hospederos extremadamente amplia y podía usarse en la industria avícola.

Anteriormente Mahmoud et al. (2018) ya habían reportado 3 fagos (Salmacey1, Salmacey2 y Salmacey3), que infectan serotipos de *Salmonella* resistentes a múltiples antimicrobianos aislados de pollos de engorde en Egipto. Los resultados del ensayo de rango de hospederos revelaron que estos bacteriófagos eran polivalentes con capacidad de infectar cepas de: *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, serovariedades de *Salmonella*: *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Enteritidis y *Salmonella* Kentucky.

6.3.4 Estabilidad y viabilidad

La Estabilidad y viabilidad de los bacteriófagos aislados fue establecida a través de la variación en el título de bacteriófagos (mantenimiento o decaimiento) al ser almacenados a 4 °C por un el lapso de año. Los resultados demostraron que los títulos de

bacteriófagos disminuyen entre 2 y 3 órdenes logarítmicos después de 12 meses de almacenamiento, asimismo se observó un cambio en la morfología de las calvas, pues estas eran de menor tamaño comparado con la morfología inicial.

Los fagos demostraron ser estables a diferentes escalas de pH. Nueve de los doce fagos aislados fueron estables a pH de 3.5 a 10 y 3 fagos frente a un rango menor de pH (Tabla 9). Todos los fagos presentaban actividad lítica a temperaturas entre 0 a 60 °C.

Tabla 9. Estabilidad y viabilidad de los bacteriófagos a diferentes pH y temperaturas

FAGO	TITULO UFP/mL (ALMACENADO A 4 °C POR 1 AÑO)	pH	TEMPERATURA
φHCl2	6,2E ⁺⁰⁷ (- 2 log)	3.5-9.0	0-60 °C
φC3/1	2,0 E ⁺⁸ (- 3 log)	4.5-9.0	0-60 °C
φF3/2	3,0E ⁺⁸ (-2 log)	3.5 -10	0-60 °C
φF1/3	4,7E ⁺¹⁰ (-2 log)	3.5 -10	0-60 °C
φF3/1	5,0E ⁺⁸ (-3 log)	3.5 -10	0-60 °C
φC2P	8,1E ⁺¹¹ (-2 log)	3.5 -10	0-60 °C
φC2G	3.0E ⁺¹⁰ (-2 log	3.5 -10	0-60 °C
φF4/1T	1,7E ⁺⁹ (- 3 log)	3.5 -10	0-60 °C
φC4/2	1,1E ⁺¹⁰ (-2 log)	3.5 -10	0-60 °C
φC4/3	2,5E ⁺¹⁰ (-3 log)	3.5 -10	0-60 °C
ΦF1/1P	1,2 E ⁺⁹ (-3 log)	4.5 – 9	0-60 °C
φHCl1	1,5E ⁺⁹ (-3 log)	3.5 -10	0-60 °C

Los resultados se compararon con los reportados por otros autores como ser: Li *et al.* (2021) quienes emplearon el fago T156 perteneciente a la familia *Siphoviridae* similar a T5, este mostró características importantes como un pH alto (3,0–12,0), tolerancias

térmicas (30–50 °C), con un amplio espectro de hospederos y una potente capacidad lítica contra *Salmonella*, incluida *Salmonella* resistente a múltiples antibióticos.

Zhang et al. (2021) proponen un fago Pu20 de *Salmonella* de amplio espectro aislado de aguas residuales, que tiene un fuerte efecto lítico sobre las cepas MDR de *Salmonella*, alta tolerancia al pH (3 a 12), resistencia al calor y corto período de incubación. Se determinó también que Pu20 podía inhibir significativamente el crecimiento de *Salmonella* MDR de alto riesgo en huevos líquidos (clara y yema) a diferentes temperaturas.

6.3.5 Parámetros cinéticos de bacteriófagos

Se seleccionaron 5 fagos: ϕ C3/1 y ϕ C4/3, ϕ C2P, ϕ F4/1T, ϕ HC12, que presentaron una alta multiplicidad de infección, para proseguir con una caracterización en cuanto a los parámetros cinéticos tales como: periodo de latencia, tamaño de explosión (burst size) y constante de adsorción, con la finalidad de determinar la efectividad de la aplicación de bacteriófagos, cuando estos vayan a ser utilizados en el control biológico de *Salmonella*.

Con la finalidad de determinar los parámetros cinéticos mencionados, se estableció una curva de crecimiento de un solo paso (Figura 13) misma que determina el ciclo de vida de los bacteriófagos en estudio en la cepa de *Salmonella* spp. 16J como hospedero particular.

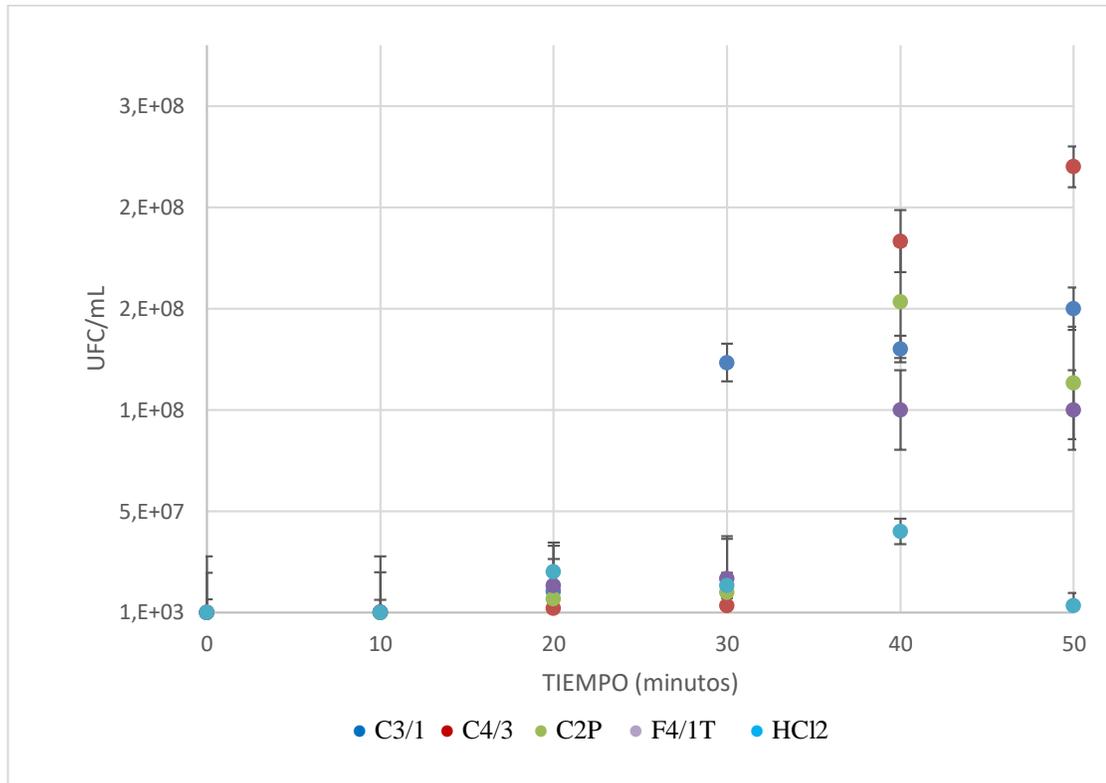


Figura 13. Curva de un paso de los bacteriófagos ϕ C2P, ϕ F4/1T, ϕ HCl2, ϕ C3/1 y ϕ C4/3 usando hospedero particular la cepa de *Salmonella* spp. 16J.

Los resultados de la curva muestran que, para el fago ϕ C3/1 la constante de adsorción es igual a 2×10^{-9} ml/min, el periodo de latencia dura 20 minutos y se liberan aproximadamente 27 partículas virales/célula (tamaño de explosión). Los fagos ϕ C4/3, ϕ C2P, ϕ F4/1T y ϕ HCl2, presentaron constantes de adsorción de 4×10^{-9} , $2,7 \times 10^{-8}$, $1,8 \times 10^{-9}$ y $1,1 \times 10^{-10}$ respectivamente, de periodos de latencia de 30 minutos y, se evidencia un incremento del título de fagos entre los 30 y 40 minutos después de la exposición del fago con la bacteria, determinando un tamaño de explosión de 163, 147, 87 y 27 partículas virales/célula, respectivamente (Tabla 10).

Tabla 10. Parámetros cinéticos de los bacteriófagos ϕ C2P, ϕ F4/1T, ϕ HCl2, ϕ F3/1 y ϕ C4/3

FAGO	CONSTANTE DE ADSORCION (ml/min)	PERIODO DE LATENCIA (minutos)	Tamaño de explosión (UFP/cel)
ϕ C3/1	2,5E-09	20	27
ϕ C4/3	4,0E-09	30	163
ϕ C2P	2,7E-08	30	147
ϕ F4/1T	1,8E-09	30	87
ϕ HCl2	1,1E-10	30	27

Resultados similares fueron obtenidos por Duc et al (2018) quienes determinaron los parámetros cinéticos de 5 fagos, indicando que el periodo de latencia fue de 15 min para los fagos STG2, SEG5 y STS9, mientras que para los fagos STG5 y SES8 fueron de 25 y 20 min, respectivamente. El fago STS9 tuvo el mayor tamaño de explosión con 209 UFP/célula, seguido de los fagos SEG5 (95 UFP/célula), SES8 (69 UFP/célula), STG2 (52 UFP/célula) Y STG5 (49 UFP/célula).

(Tayyarcán et al., 2022) demostraron en su estudio al determinar el periodo de latencia y tamaño de explosión a través de la curva de un paso, que el periodo de latencia de los fagos de *Salmonella* SE-PH1 y SE-PH2 fue de 10 y 20 minutos, respectivamente y el tamaño de explosión fue calculado como 88 UFP y 163 UFP por célula, correspondientemente.

6.3.6 Adsorciones posteriores a la infección por fagos

Se determinó la fracción de bacterias que adsorben fagos aun después de que haya sufrido infección (ASI) en función a la Distribución de Poisson, los parámetros cinéticos como la constante de adsorción (k) y el tiempo de latencia (L) y la concentración de fagos presentes (I).

Tabla 11. Fracción de bacterias que adsorben fagos después de ser infectadas

FAGO	K	L	I	ASI
ϕ C3/1	2,50E-09	20	1,00E+06	0,049
ϕ C4/3	4,00E-09	30	1,00E+06	0,113
ϕ C2P	2,70E-08	30	1,00E+06	0,555
ϕ F4/1T	1,80E-09	30	1,00E+06	0,053
ϕ HCl2	1,10E-10	30	1,00E+06	0,003

Los resultados del análisis (Tabla 11) determinó que el 56% de las bacterias presentes adsorbe fagos incluso después de haber sido infectado por el fago ϕ C2P, 11% de las bacterias adsorben al fago ϕ C4/3 después de haber sido infectado, aproximadamente 5 % de las bacterias adsorben a los fagos ϕ C3/1 y ϕ F4/1T después de haber sido infectadas. El único fago que no sufre adsorciones secundarias por fagos o la cantidad es más pequeña fue el fago ϕ HCl2.

Esto es importante debido a que más adsorciones secundarias lleva a una mayor inducción de ciclos lisogénicos por fagos o inhibición de la lisis, con una MDI altas empleadas en la terapia pasiva, la mayoría de las bacterias adsorben fagos dentro de un cultivo, y esto puede traer diversas consecuencias como ser: coinfección, recombinación genética, reactivación de multiplicidad y/o interferencia entre fagos. La coinfección puede resultar en mayores probabilidades de infecciones con lisogenia, mientras que adsorciones múltiples pueden cambiar el programa genético de una lisis rápida a uno de inhibición de la lisis (Clokic et al., 2017).

6.3 Eficacia del coctel de fagos en matrices alimentarias

Para la formulación del coctel de fagos a ser aplicado sobre matrices alimentarias, se seleccionaron los fagos ϕ C2P, ϕ F4/1T, ϕ HCl2, ϕ C3/1 y ϕ C4/3 que presentaban una alta multiplicidad de infección (MDI) y cuyos parámetros cinéticos fueron determinados anteriormente. Con esta finalidad, se ensayaron 2 soluciones a manera de vehículos para el coctel de fagos: Buffer SM y solución salina (NaCl 0.9%). Solamente la cepa de

Salmonella S5 fue usada como contaminante de las matrices alimentarias presentando recuentos bacterianos bajos cuando el coctel de fagos fue diluido en buffer SM.

4.2 Eficacia del coctel de fagos en cascaras de huevo contaminadas con *Salmonella*

Los resultados de eficacia del coctel de fagos sobre cascaras de huevo determinaron que el coctel es eficaz (eficacia 0,32) cuando se emplea una MDI de 10000 (título de 10^{12}), donde en promedio se observó una reducción de 3 órdenes de Log UFC/mL después de las 16 horas de aplicación del coctel a diferencia del control (matriz contaminada sin tratamiento con fagos) donde se observa un incremento del recuento bacteriano contaminante. Se observó una reducción mínima en el recuento bacteriano (eficacia de 0,2) cuando se emplean dosis bajas de fagos, equivalentes a multiplicidades de infección de 0.0001, 0.001 y 1, presentándose incluso un ligero incremento del crecimiento bacteriano después de las 8 horas de la aplicación del coctel (Figura 14 y 15). De acuerdo con la determinación de ANOVA, se evidenció que hay un efecto altamente significativo cuando se combinan las variables dosis y tiempo de acción ($p= 0.002$).

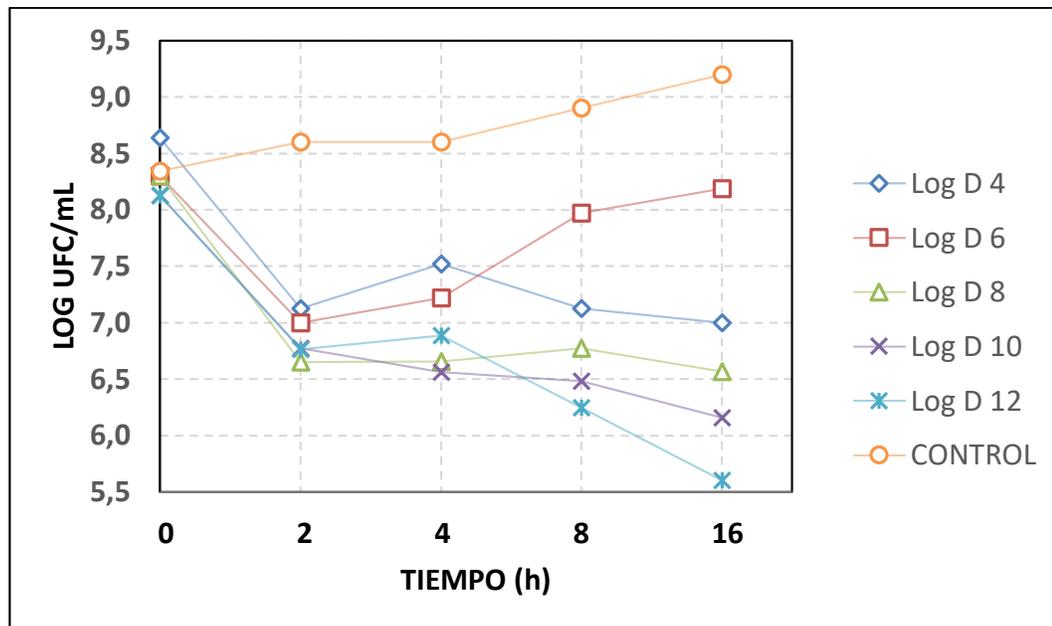


Figura 14. Recuento bacteriano (log UFC/mL) en función del tiempo de acción (horas) y dosis del coctel de fagos (Log UFP/mL) sobre cascaras de huevo contaminadas con la cepa 16J de *Salmonella* multirresistente a antibióticos. El ensayo fue realizado a una temperatura de incubación de 25 °C.

La eficacia del coctel de fagos puede verse afectada en matrices alimentarias secas como el huevo, donde los fagos de la progenie no pueden alcanzar e infectar bacterias adicionales por el limitado movimiento browniano de los fagos debido a la falta de humedad y baja actividad agua.

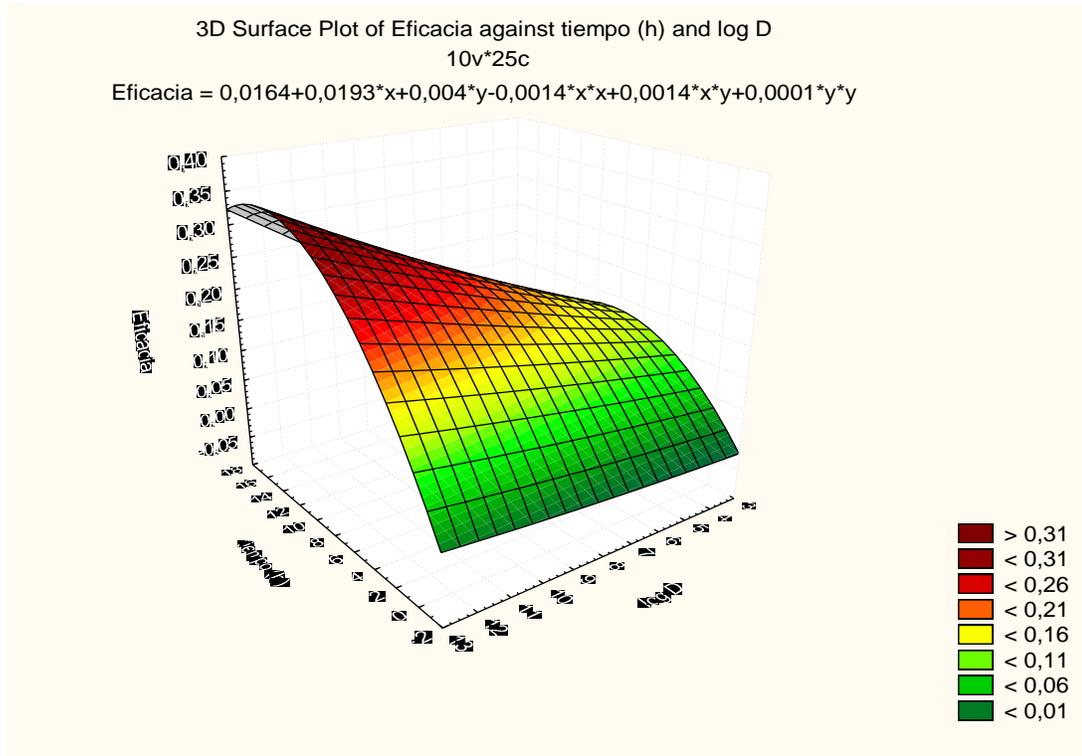


Figura 15. Superficie de respuesta en función del tiempo de acción (horas) y dosis del coctel de fagos (Log UFP/mL) sobre cascaras de huevo contaminadas con la cepa 16J de *Salmonella* multirresistente a antibióticos.

4.3 Eficacia del coctel de fagos en pechugas de pollo contaminadas con *Salmonella*

Los resultados de eficacia del coctel de fagos sobre pechugas de pollo contaminadas con la cepa 16J de *Salmonella* MDR, determinaron que el coctel es más eficaz cuando se emplea a MDI de 100 (título de 10^{10}), donde en promedio se observó una reducción de 3 órdenes Log UFC/mL a las 2 horas de aplicación del coctel, a diferencia del control donde se observa un incremento del recuento bacteriano contaminante. Se observó una reducción mínima en el recuento bacteriano cuando se emplean dosis bajas

de fagos, presentándose incluso un ligero incremento del crecimiento bacteriano después de las 8 horas de la aplicación del coctel (Figura 16 y 17). De acuerdo a ANOVA, existe un efecto altamente significativo cuando se combinan las variables dosis del coctel de bacteriófagos conjuntamente con el tiempo de acción ($p= 0.002$).

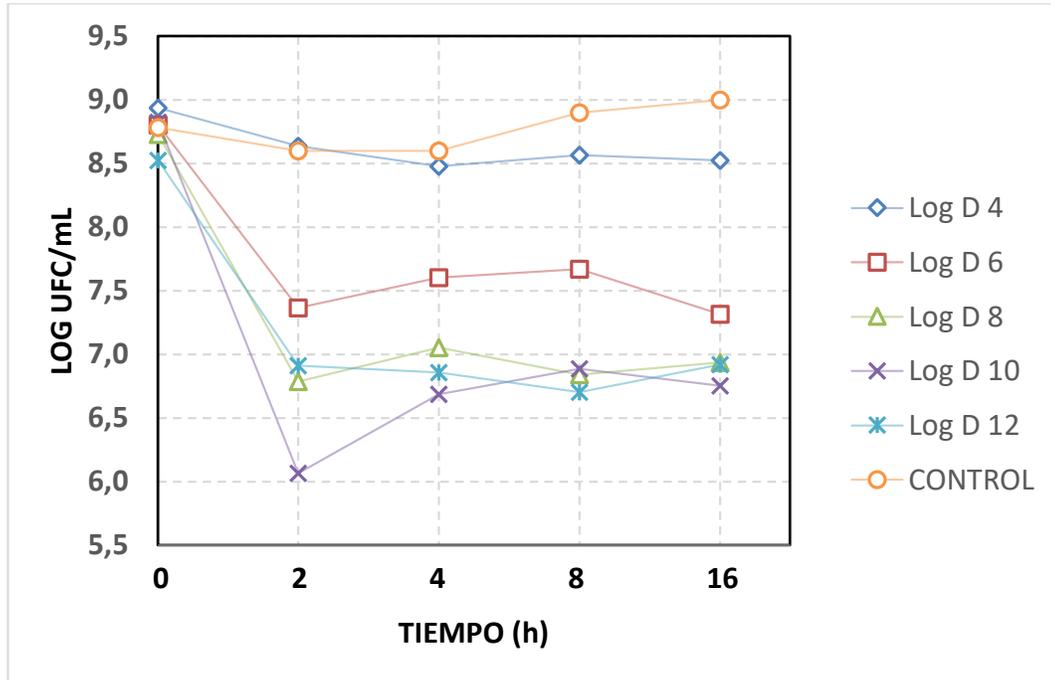


Figura 16. Recuento bacteriano (log UFC/mL) en función del tiempo de acción (horas) y dosis del coctel de fagos (Log UFP/mL) sobre pechugas de pollo contaminadas con la cepa 16J de *Salmonella* multirresistente a antibióticos. El ensayo fue realizado a una temperatura de incubación de 6 °C.

La lisis bacteriana mediada por fagos podría verse afectada por la temperatura de incubación, debido a que a bajas temperaturas la tasa de crecimiento de *Salmonella* se desacelera, afectando de igual manera la replicación de los bacteriófagos, debido a que los ciclos de lisis son más lentos. Este último fenómeno promueve la adsorción de fagos a bacterias previamente infectadas promoviendo el cambio del ciclo lítico al ciclo lisogénico (Clokier et al., 2017, Lewis & Hill, 2020).

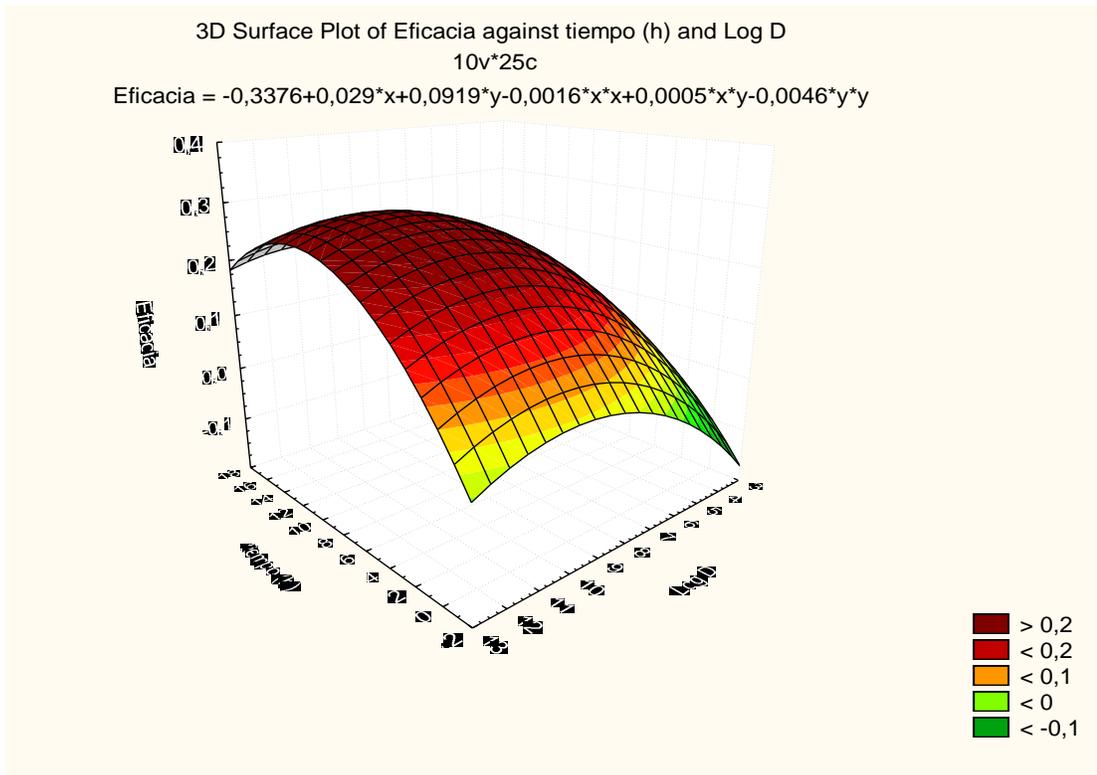


Figura 17. Superficie de respuesta en función del tiempo de acción (horas) y dosis del coctel de fagos (Log UFP/mL) sobre pechugas de pollo contaminadas con la cepa 16J de *Salmonella* multirresistente a antibióticos.

La cinética y los umbrales de la terapia pasiva con fagos son similares a las de la administración de antibióticos convencionales. Para que la terapia pasiva sea efectiva eliminando completamente a las bacterias se necesitan más fagos, generalmente en exceso del umbral de despeje o eliminación de bacterias (V_c) (Payne y Jansen, 2003; Rabinovitch et al., 2003) sin embargo, cuando los fagos se mezclan con bacterias susceptibles en proporciones en las que su título es superior en número al recuento de bacterias susceptibles y de esta manera sobrepasan el umbral de inundación (es decir, una alta multiplicidad de infección), las bacterias pueden "lisarse desde afuera", debido en gran parte a la desestabilización de la membrana bacteriana. Esto puede llevar a una caída inicial en el número de bacterias, pero también de fagos, ya que los fagos libres pueden adherirse al debrí celular bacteriano en lugar de a las células sanas. Este fenómeno es

conocido como "inundación pasiva", donde los fagos simplemente superan a las bacterias y no se replican (Payne y Jansen, 2001; Islam et al, 2019). Desde el punto de vista de Anjay et al (2022), este fenómeno de "lisis desde afuera", no debería ocurrir si se aplican los bacteriófagos en forma de coctel, donde los componentes de éste actúan a diferentes niveles frente a la cepa bacteriana susceptible.

Sharma et al., 2015 evaluaron la eficacia de la preparación de bacteriófagos líticos de *Salmonella* comercial (SalmoFresh) en la reducción de *Salmonella entérica* serotipo Heidelberg en chuletas de pechuga de pavo y pavo molido, las pechugas de pavo crudas fueron inoculadas con *Salmonella* Heidelberg ($\sim 10^3$ CFU/g) y tratadas con SalmoFresh a una dosis de 10^7 UFP/g y se almacenaron a 4 °C, el tratamiento con fagos provocó reducciones de 0,8, 0,6 y 1,3 log UFC/g de *Salmonella* Heidelberg en los días 0, 1 y 7, respectivamente, en comparación con los recuentos del control. Sin embargo, no se observó una reducción significativa de *Salmonella* Heidelberg en carne de pavo molida cuando los trozos de carne de pavo inoculados con *Salmonella* Heidelberg se trataron superficialmente con una preparación de fagos (10^7 UFP/g) antes de moler la carne.

Resultados similares fueron obtenidos por Duc et al (2018) quienes trataron pechugas de pollo crudas contaminadas con *Salmonella* Enteritidis y *Salmonella* Typhimurium, con un cóctel de cinco fagos a una MDI de 10000. Este redujo los recuentos de células viables en 1,41 y 1,86 log UFC/pieza a 4 °C. Sin embargo, cuando se incubó a 25 °C, los recuentos de células viables de *Salmonella* Enteritidis y *Salmonella* Typhimurium en las muestras tratadas son menores, observándose una disminución de 3.06 y 2.21 log UFC/pieza, respectivamente. Anjai et al (2021) aplicaron un cóctel de 3 fagos líticos a 3 MDI diferentes de 100, 1000 y 10000 sobre carne de pollo contaminada experimentalmente con *Salmonella* Typhimurium a una concentración de 10^4 UFC/mL, determinando que a una incubación de 4 °C la aplicación del coctel de fagos determinó una disminución del recuento de *Salmonella* de 1,29, 1,91 y 2,48 log₁₀ UFC/g al 7mo día de estudio.

Varios artículos referidos a la aplicación de fagos en biocontrol, refieren una disminución de la concentración bacteriana, aun aplicando MDI altas, sin embargo, pocos estudios reportan una eliminación total del contaminante bacteriano, como ser Islam et al (2019) que evaluaron un cóctel de fagos compuesto por una mezcla de fagos (LPSTLL, LPST94 y LPST153) a una proporción de 1:1:1 para el control biológico de *Salmonella* spp. en pechugas de pollo contaminadas experimentalmente. Las muestras de pechugas de pollo se inocularon con *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028) a una concentración final de 3 log UFC/mL, o con una mezcla de cultivos de *Salmonella* (*Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 y *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076) a la misma concentración e incubados a 4 °C y 25 °C. Tras la aplicación del cóctel de fagos a una MDI de 10000 y 1000 los recuentos de *Salmonella* Typhimurium determinaron una eliminación completa de las bacterias a las 3 h y 6 h, a 4 °C, mientras que, a 25 °C, se observó una tendencia similar de reducción del recuento de la mezcla de cepas de *Salmonella*.

En los casos anteriores utilizaron MDI altas y concentraciones bacterianas que van desde los 10^2 hasta 10^4 UFC/mL, sin embargo, otros autores como ser Spricigo et al. (2013) emplearon una concentración bacteriana de 10^7 UFC/mL de las cepas de *Salmonella* UA1894 o UA1872 sobre huevos que fueron tratados con un cóctel de bacteriófagos de título 1×10^{10} UFP/ml (MOI de 1.0×10^3). Yeh et al. (2017) inocularon carne roja, muslos de pavo y pollo triturado con un cóctel diluido que comprendía las cuatro cepas de *Salmonella* para producir aproximadamente 7 a 7,3 log UFC/g para luego tratarlo con una solución de fagos con títulos de 10^7 o 10^8 UFP/ml.

La dosis infectiva de *Salmonella* es de 10^5 a 10^8 UFC/g³, pero puede ser tan baja como 1 UFC/g dependiendo de la edad, la salud del huésped y características de la cepa (Walderhaug & Lampel, 2014). En el presente trabajo se empleó la dosis más alta (10^8 UFC/mL) por 2 motivos: el primero es que cuando las bacterias están en concentraciones inferiores a 10^3 UFC/mL muchas veces no son detectables, lo que nos proporcionaría resultados falsos negativos. Segundo figuramos que haya una alta contaminación, si bien no se logra la eliminación total del patógeno una reducción bacteriana es un gran progreso,

además, si consideramos las recomendaciones de Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), quienes indican que los productos a base de fagos solo debe considerarse como una herramienta adicional para reducir aún más la carga bacteriana patógena y constantemente debe estar presente la aplicación de Buenas Prácticas de Higiene (BPH) y Buenas Prácticas de Manufactura (GMP).

CAPITULO 7. Conclusiones

Se determinó el perfil de sensibilidad y resistencia antimicrobiana de 10 cepas de *Salmonella* spp, que fueron aisladas de muestras de heces de aves de corral (parrilleras y de postura) y muestras de agua provenientes del río La Paz, río Luribay y laguna de Achocalla del departamento de La Paz, Bolivia. Dos de estas cepas (Lu y 16J) fueron clasificadas como MDR.

Se estableció un banco de bacteriófagos conformado por 12 fagos aislados a partir de muestras de heces de aves de corral (parrilleras y de postura) y de suelo de jardines del Hospital de Clínicas, La Paz - Bolivia, con actividad lítica sobre cepas de *Salmonella* spp. previamente aisladas.

De acuerdo a la determinación de la multiplicidad de infección ($MDI > 8$) y el análisis de Poisson, 10 bacteriófagos ($\phi F3/2$, $\phi HC11$, $\phi HC12$, $\phi C2P$, $\phi C2G$, $\phi C3/1$, $\phi F4/1T$, $\phi C4/2$, $\phi C4/3$ y $\phi F4/C2$) mostraron capacidad de ser adsorbidos de manera múltiple por cepas de *Salmonella* tanto sensibles como resistentes a antibióticos.

De acuerdo al rango de hospederos: Los bacteriófagos $\phi C4/3$, $\phi F4/1T$, $\phi F4/1$, $\phi HC12$, $\phi C3/1$ Y $\phi C4/2$ fueron clasificados como fagos de amplia gama de hospederos y los fagos $\phi F1/2$, $\phi F1/3$, $\phi F3/1$, $\phi HC11$, $\phi C2P$ y $\phi C2G$ se clasificaron como fagos de muy amplia gama de hospederos.

Todos los bacteriófagos aislados demostraron estar viables y ser estables en un rango de pH de 3.5 a 9 y resisten temperaturas de hasta 60 °C. La criopreservación de los fagos a 4 °C por 12 meses determina una variación del título inicial de los fagos, observándose un decaimiento de 2 a 3 órdenes logarítmicos.

Se formuló cocteles en base a los fagos $\phi C3/1$, $\phi C4/3$, $\phi C2P$, $\phi F4/1T$ y $\phi HC12$ en proporciones de 1:1:1:1:1 con concentraciones finales de 10^{12} UFP/mL (MDI de 10000), de 10^{10} UFP/mL (MDI de 100), 10^8 UFP/mL (MDI de 1), de 10^6 UFP/mL (MDI de 0,01) y finalmente una solución de 10^4 UFP/mL (MDI de 0,0001).

En función al análisis de la curva de un solo paso, se determinó los parámetros cinéticos de los fagos seleccionados para el coctel, donde el fago ϕ C3/1 presento un periodo de latencia de 20 minutos donde se liberan aproximadamente 27 partículas virales/célula (tamaño de explosión), los restantes 4 fagos ϕ C4/3, ϕ C2P, ϕ F4/1T y ϕ HCl2, presentaron periodos de latencia de 30 minutos con un tamaño de explosión de 163, 147, 87 y 27 partículas virales/célula, respectivamente.

Se evaluó la Eficacia de los bacteriófagos aislados en el control biológico, mediante la aplicación de los cocteles de fagos descritos en este estudio, sobre matrices alimentarias contaminadas experimentalmente con una cepa MDR de *Salmonella* spp. a una concentración de 10^8 UFC/mL. Donde se observó una disminución del recuento viable de cepas de *Salmonella* en promedio de 3 órdenes logarítmicos de UFC/mL en cascaras de huevo cuando se emplea una dosis de 10^{12} UFP (equivalente a una MDI de 10000) a las 16 horas después de la aplicación del fago a 25 °C y, de aproximadamente 3 órdenes log UFC/ml en pechugas de pollo durante las 2 primeras horas, aplicando una dosis de fagos de 10^{10} (equivalente a una MDI de 100) cuando son almacenadas a 6° C.

BIBLIOGRAFÍA

- Abedon, S. T. (2016). Phage therapy dosing: The problem(s) with multiplicity of infection (MOI). *Bacteriophage*, 6(3), e1220348. <https://doi.org/10.1080/21597081.2016.1220348>
- Abedon, S. T. (2022). Bacteriophages as drivers of evolution: An Evolutionary Ecological Perspective. Springer Nature.
- Achtman, Mark & Wain, John & Weill, François-Xavier & Nair, Satheesh & Zhou, Zhemin & Sangal, Vartul & Krauland, Mary & Hale, James & Harbottle, Heather & Uesbeck, Alexandra & Dougan, Gordon & Harrison, Lee & Brisse, Sylvain & Brown, Derek & Calva, Edmundo & Chu, Chishih & Cormican, Martin & Didelot, Xavier & Haase, Jana & Sanderson, Kenneth. (2012). Multilocus Sequence Typing as a Replacement for Serotyping in Salmonella enterica. *PLoS Pathogens*. 8. e1002776. 10.1371/journal.ppat.1002776.
- Aiello, S. E. (2016). The Merck Veterinary Manual (Número 1). <http://ci.nii.ac.jp/ncid/BA36734440>
- Al Kraiem, A. A., Zeng, Y., Huo, X., Yang, K., al Kraiem, F., Qin, J., Cui, Y., Kan, B., Yan, M., Yang, G., & Chen, T. (2019). Identification of Salmonella Bredeney Resistant to Third Generation Cephalosporins in Saudi Arabia. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00390>
- Andreatti Filho, R., Higgins, J., Higgins, S., Gaona, G., Wolfenden, A., Tellez, G., & Hargis, B. (2007, September). Ability of Bacteriophages Isolated from Different Sources to Reduce Salmonella enterica Serovar Enteritidis In Vitro and In Vivo. *Poultry Science*, 86(9), 1904–1909. <https://doi.org/10.1093/ps/86.9.1904>
- Anjay, Kumar, A., Abhishek, Malik, H., Dubal, Z. B., Jaiswal, R. K., Kumar, S., Kumar, B. M., & Agarwal, R. (2022). Isolation and characterization of salmonella phages and phage cocktail Mediated biocontrol of salmonella enterica serovar typhimurium in chicken meat. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 155, 112957. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112957>
- Aslam, B., Khurshid, M., Arshad, M. I., Muzammil, S., Rasool, M., Yasmeen, N., Shah, T., Chaudhry, T. H., Rasool, M. H., Shahid, A., Xueshan, X., & Baloch, Z. (2021). Antibiotic Resistance: One Health One World Outlook. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.771510>
- Atterbury, R. J., van Bergen, M. A. P., Ortiz, F., Lovell, M. A., Harris, J. A., de Boer, A., Wagenaar, J. A., Allen, V. M., & Barrow, P. A. (2007). Bacteriophage Therapy To Reduce *Salmonella* Colonization of Broiler Chickens. *Applied and*

- Environmental Microbiology*, 73(14), 4543–4549.
<https://doi.org/10.1128/aem.00049-07>
- Autoridad de Fiscalización de Empresas. (2022, abril). *Estudio de mercado del complejo avícola en bolivia* (N.o 1).
<https://www.autoridadempresas.gob.bo/descargas?download=1221:estudio-de-mercado-del-complejo-avicola-en-bolivia>
- Bai, J., Jeon, B., & Ryu, S. (2019, February). Effective inhibition of Salmonella Typhimurium in fresh produce by a phage cocktail targeting multiple host receptors. *Food Microbiology*, 77, 52–60.
<https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.08.011>
- Bellows, T. S., & Van Driesche, R. (2012, January 1). *Biological Control*. Springer Publishing.
- Berger, C. N., Sodha, S. V., Shaw, R. K., Griffin, P. M., Pink, D., Hand, P., & Frankel, G. (2010, July 15). Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens. *Environmental Microbiology*, 12(9), 2385–2397.
<https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02297.x>
- Bhardwaj, N., K. Bhardwa, S., Deep, A., Dahiya, S., & Kapoor, S. (2015, October 15). Lytic Bacteriophages as Biocontrol Agents of Foodborne Pathogens. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, 10(11), 708–723.
<https://doi.org/10.3923/ajava.2015.708.723>
- Borie, C., Albala, I., Sánchez, P., Sánchez, M. L., Ramírez, S., Navarro, C., Morales, M. A., Retamales, J., & Robeson, J. (2008, March). Bacteriophage Treatment Reduces Salmonella Colonization of Infected Chickens. *Avian Diseases*, 52(1), 64–67.
<https://doi.org/10.1637/8091-082007-reg>
- Borowiak, M., Fischer, J., Hammerl, J. A., Hendriksen, R. S., Szabo, I., & Malorny, B. (2017a). Identification of a novel transposon-associated phosphoethanolamine transferase gene, mcr-5, conferring colistin resistance in d-tartrate fermenting Salmonella enterica subsp. enterica serovar Paratyphi B. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72(12), 3317–3324. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx327>
- Brands, D. A., & Alcamo, I. E. (2005). *Salmonella*. Chelsea House Pub.
- Brooks, G. F. (2011). MICROBIOLOGIA MEDICA.
- Castro-Vargas, R. E., Herrera-Sánchez, M. P., Rodríguez-Hernández, R., & Rondón-Barragán, I. S. (2020). Antibiotic resistance in Salmonella spp. isolated from poultry: A global overview. *October-2020*, 13(10), 2070–2084.
<https://doi.org/10.14202/vetworld.2020.2070-2084>
- Catry, B., Cavaleri, M., Baptiste, K., Grave, K., Grein, K., Holm, A., Jukes, H., Liebana, E., Navas, A. L., Mackay, D., Magiorakos, A. P., Romo, M. A. M., Moulin, G.,

- Madero, C. M., Pomba, M. C. M. F., Powell, M., Pyörälä, S., Rantala, M., Ružauskas, M., . . . Edo, J. T. (2015). Use of colistin-containing products within the European Union and European Economic Area (EU/EEA): development of resistance in animals and possible impact on human and animal health. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 46(3), 297–306. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2015.06.005>
- Cenens, W., Mebrhatu, M. T., Makumi, A., Ceyskens, P., Lavigne, R., Van Houdt, R., Taddei, F., & Aertsen, A. (2013). Expression of a Novel P22 ORFan Gene Reveals the Phage Carrier State in *Salmonella* Typhimurium. *PLOS Genetics*, 9(2), e1003269. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003269>
- Chai, S. J., Cole, D., Nisler, A., & Mahon, B. E. (2016). Poultry: the most common food in outbreaks with known pathogens, United States, 1998–2012. *Epidemiology and Infection*, 145(2), 316–325. <https://doi.org/10.1017/s0950268816002375>
- Chanishvili, N. (2012). Phage Therapy—History from Twort and d’Herelle Through Soviet Experience to Current Approaches. *Advances in Virus Research*, 3–40. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-394438-2.00001-3>
- Chibani, C. M., Farr, A., Klama, S., Dietrich, S., & Liesegang, H. (2019). Classifying the Unclassified: A Phage Classification Method. *Viruses*, 11(2), 195. <https://doi.org/10.3390/v11020195>
- Clokic, M. R. J., Kropinski, A. M., & LaVigne, R. (2017, November 15). *Bacteriophages: Methods and Protocols, Volume 3: 1681* (2nd 2018 ed.). Humana.
- Colás-Medà, P., Viñas, I., & Alegre, I. (2023). Evaluation of Commercial Anti-Listerial Products for Improvement of Food Safety in Ready-to-Eat Meat and Dairy Products. *Antibiotics*, 12(2), 414. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12020414>
- Control de la salmonelosis por medio de la vacunación*. (n.d.). Elsitio Avicola. Retrieved September 27, 2022, from <https://www.elsitioavicola.com/articles/2552/control-de-la-salmonelosis-por-medio-de-la-vacunacion/>
- Cordero, P. & Guardia, M. (2021) Presencia de *Salmonella* spp., en granjas reproductoras durante la gestión 2021. Universidad Mayor de San Simón. Facultad de Ciencias Veterinarias.
- Cossart, P., & Sansonetti, P. J. (2004). Bacterial Invasion: The Paradigms of Enteroinvasive Pathogens. *Science*, 304(5668), 242–248. <https://doi.org/10.1126/science.1090124>
- Critzer, F. J., & Doyle, M. P. (2010, April). Microbial ecology of foodborne pathogens associated with produce. *Current Opinion in Biotechnology*, 21(2), 125–130. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.01.006>

- Dandekar, T., Fieselmann, A., Fischer, E., Popp, J., Hensel, M., & Noster, J. (2015). Salmonella—how a metabolic generalist adopts an intracellular lifestyle during infection. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 4. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00191>
- de Mesquita Souza Saraiva, M., Lim, K., do Monte, D. F. M., Givisiez, P. E. N., Alves, L. B. R., de Freitas Neto, O. C., Kariuki, S., Júnior, A. B., de Oliveira, C. J. B., & Gebreyes, W. A. (2021). Antimicrobial resistance in the globalized food chain: a One Health perspective applied to the poultry industry. *Brazilian Journal of Microbiology*, 53(1), 465–486. <https://doi.org/10.1007/s42770-021-00635-8>
- De Souza, C. M., Tanir, T., Orellana, M., Escalante, A., & Koeris, M. (2021). Manufacturing Bacteriophages (Part 2 of 2): Formulation, analytics and quality control considerations. *Pharmaceuticals*, 14(9), 895. <https://doi.org/10.3390/ph14090895>
- Dini, C. (2011). Aislamiento y caracterización molecular de bacteriófagos de bacterias enteropatógenas para biocontrol de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA). Universidad Nacional de la Plata. http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/2686/Documento_completo.pdf?sequence=1
- Dion, M. B., Oechslin, F., & Moineau, S. (2020). Phage diversity, genomics and phylogeny. *Nature Reviews Microbiology*, 18(3), 125-138. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0311-5>
- Duc, H. M., Son, H. M., Honjoh, K. I., & Miyamoto, T. (2018). Isolation and application of bacteriophages to reduce Salmonella contamination in raw chicken meat. *LWT*, 91, 353–360. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.01.072>
- Elois, M. A., Silva, R. D., Pilati, G. V. T., Rodríguez-Lázaro, D., & Fongaro, G. (2023). Bacteriophages as Biotechnological Tools. *Viruses*, 15(2), 349. <https://doi.org/10.3390/v15020349>
- Estado Plurinacional de Bolivia & Ministerio de Desarrollo Rural y Tierras. (2021). *REGLAMENTO GENERAL DE SANIDAD ANIMAL - REGENSA*. https://www.senasag.gob.bo/phocadownload/REGENSA_v21_Consulta%20Publica.pdf
- European Centre for Disease Prevention and Control - ECDC. (2015). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and

- food-borne outbreaks in 2013. *EFSA Journal*, 13(1), 3991. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.3991>
- Flavahan, W. A., Gaskell, E., & Bernstein, B. E. (2017). Epigenetic plasticity and the hallmarks of cancer. *Science*, 357(6348), eaal2380. <https://doi.org/10.1126/science.aal2380>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO., World Health Organization, & Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2002). *Risk Assessments of Salmonella in Eggs and Broiler Chickens*. World Health Organization.
- García, P., Martínez, B., Obeso, J., & Rodríguez, A. (2008). Bacteriophages and their application in food safety. *Letters in Applied Microbiology*, 47(6), 479–485. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765x.2008.02458.x>
- Garvey, M. (2022). Bacteriophages and Food Production: Biocontrol and Bio-Preservation Options for Food Safety. *Antibiotics*, 11(10), 1324. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11101324>
- Ge, H., Lin, C., Xu, Y., Hu, M., Xu, Z., Geng, S., Jiao, X., & Chen, X. (2022). A phage for the controlling of Salmonella in poultry and reducing biofilms. *Veterinary Microbiology*, 269, 109432. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2022.109432>
- 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>
- Gordillo Altamirano, F. L., & Barr, J. J. (2019, March 20). Phage Therapy in the Postantibiotic Era. *Clinical Microbiology Reviews*, 32(2). <https://doi.org/10.1128/cmr.00066-18>
- Guthrie, R. K. (2017). *Salmonella*. Taylor & Francis.
- Hajek, A. (2004). *Natural enemies: An introduction to biological control* (Vol. 1).
- Haq, I. U., Chaudhry, W. N., Andleeb, S., & Qadri, I. (2011). Isolation and partial characterization of a virulent bacteriophage IHQ1 specific for *Aeromonas punctata* from stream water. *Microbial Ecology*, 63(4), 954–963. <https://doi.org/10.1007/s00248-011-9944-2>
- Harper, D. R., Abedon, S. T., Burrowes, B. H., & McConville, M. L. (2021). *Bacteriophages: Biology, Technology, Therapy*. Springer Publishing.
- Hatfull, G. F., & Hendrix, R. W. (2011). Bacteriophages and their genomes. *Current Opinion in Virology*, 1(4), 298–303. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2011.06.009>

- Hooton, S. P., Atterbury, R. J., & Connerton, I. F. (2011, December). Application of a bacteriophage cocktail to reduce *Salmonella* Typhimurium U288 contamination on pig skin. *International Journal of Food Microbiology*, *151*(2), 157–163. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.015>
- Huang, C., Shi, J., Ma, W., Li, Z., Wang, J., Li, J., & Wang, X. (2018). Isolation, characterization, and application of a novel specific *Salmonella* bacteriophage in different food matrices. *Food Research International*, *111*, 631–641. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.05.071>
- INLASA, C. (2019, mayo). *El INLASA halla resistencia plasmídica al colistín en una cepa de Salmonella Typhimurium*. Instituto Nacional de Laboratorios de Salud “Dr. Néstor Morales Villazón” INLASA. Recuperado 23 de junio de 2022, de <https://www.inlasa.gob.bo/2019/05/el-inlasa-halla-resistencia-plasmidica-al-colistin-en-una-cepa-de-salmonella-typhimurium/>
- Instituto Nacional de Estadística. (2022, 30 abril). *Avicultura*. INE. <https://www.ine.gob.bo/index.php/estadisticas-economicas/ganaderia-y-avicultura/avicultura-introduccion/>
- Ishaq, A., Ebner, P. D., Syed, Q. A., & Ubaid Ur Rahman, H. (2020). Employing list-shield bacteriophage as a bio-control intervention for *Listeria monocytogenes* from raw beef surface and maintain meat quality during refrigeration storage. *LWT*, *132*, 109784. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109784>
- Islam, M. S., Zhou, Y., Liang, L., Nime, I., Liu, K., Yan, T., Wang, X., & Li, J. (2019). Application of a Phage Cocktail for Control of *Salmonella* in Foods and Reducing Biofilms. *Viruses*, *11*(9), 841. <https://doi.org/10.3390/v11090841>
- Jassim, S. A., & Limoges, R. G. (2017). *Bacteriophages: Practical applications for Nature’s Biocontrol*. Springer.
- Koch-Weser, J. (1970). Adverse Effects of Sodium Colistimethate. *Annals of Internal Medicine*, *72*(6), 857. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-72-6-857>
- Kutter, E & Sulakvelidze. (2004). *Bacteriophages: Biology and Applications* (UK ed.). Taylor & Francis Inc.
- Kwon, H. J., Cho, S. H., Kim, T. E., Won, Y. J., Jeong, J., Park, S. C., Kim, J. H., Yoo, H. S., Park, Y. H., & Kim, S. J. (2008). Characterization of a T7-Like Lytic Bacteriophage (ϕ SG-JL2) of *Salmonella enterica* Serovar Gallinarum Biovar Gallinarum. *Applied and Environmental Microbiology*, *74*(22), 6970–6979. <https://doi.org/10.1128/aem.01088-08>
- Lainez, M., Hernandis, A., & Marin, C. (2008). Limpieza y desinfección de granjas de puesta: la herramienta para luchar contra *Salmonella* spp. *Jornadas Profesionales de Avicultura de Duero*, 19/23-5-2008. <https://seleccionesavicolas.com/pdf->

[files/2008/11/4439-limpieza-y-desinfeccion-de-granjas-de-puesta-la-herramienta-para-luchar-contr-salmonella-spp.pdf](https://doi.org/10.1177/003335491212700103)

- Landers, T. F., Cohen, B., Wittum, T. E., & Larson, E. L. (2012). A Review of Antibiotic Use in Food Animals: Perspective, Policy, and Potential. *Public Health Reports*, 127(1), 4–22. <https://doi.org/10.1177/003335491212700103>
- Lapierre, L., Cornejo, J., Zavala, S., Galarce, N., Sánchez, F., Benavides, M. B., Guzmán, M., & Sáenz, L. (2020). Phenotypic and Genotypic Characterization of Virulence Factors and Susceptibility to Antibiotics in *Salmonella* Infantis Strains Isolated from Chicken Meat: First Findings in Chile. *Animals*, 10(6), 1049. <https://doi.org/10.3390/ani10061049>
- Lavilla, M., Domingo-Calap, P., Sevilla-Navarro, S., & Lasagabaster, A. (2023). Natural Killers: Opportunities and Challenges for the Use of Bacteriophages in Microbial Food Safety from the One Health Perspective. *Foods*, 12(3), 552. <https://doi.org/10.3390/foods12030552>
- Letellier, L. (2004). Main features on tailed phage, host recognition and DNA uptake. *Frontiers in Bioscience*, 9(1–3), 1228. <https://doi.org/10.2741/1333>
- Lewis, R., & Hill, C. (2020). Overcoming barriers to phage application in food and feed. *Current Opinion in Biotechnology*, 61, 38–44. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.09.018>
- Li, J., Li, Y., Ding, Y., Huang, C., Zhang, Y., Wang, J., & Wang, X. (2021). Characterization of a novel Siphoviridae salmonella bacteriophage T156 and its microencapsulation application in food matrix. *Food Research International*, 140, 110004. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.110004>
- Li, M., Lin, H., Jing, Y., & Wang, J. (2020). Broad-host-range *Salmonella* bacteriophage STP4-a and its potential application evaluation in poultry industry. *Poultry Science*, 99(7), 3643–3654. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.03.051>
- Li, Y., Yang, X., Zhang, H., Jia, H., Liu, X., Yu, B., Zeng, Y., Zhang, Y., Pei, X., & Yang, D. (2020). Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* in the commercial eggs in China. *International Journal of Food Microbiology*, 325, 108623. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108623>
- Lima, T., Domingues, S., & da Silva, G. (2019). Plasmid-Mediated Colistin Resistance in *Salmonella enterica*: A Review. *Microorganisms*, 7(2), 55. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7020055>
- Liu, Y. Y., Wang, Y., Walsh, T. R., Yi, L. X., Zhang, R., Spencer, J., Doi, Y., Tian, G., Dong, B., Huang, X., Yu, L. F., Gu, D., Ren, H., Chen, X., Lv, L., He, D., Zhou, H., Liang, Z., Liu, J. H., & Shen, J. (2016). Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a

- microbiological and molecular biological study. *The Lancet Infectious Diseases*, 16(2), 161–168. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(15\)00424-7](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(15)00424-7)
- Łobocka, M., & Szybalski, W. T. (2012). Bacteriophages. Academic Press.
- Mahmoud, M., Askora, A., Barakat, A. B., Rabie, O. E. F., & Hassan, S. E. (2018, February). Isolation and characterization of polyvalent bacteriophages infecting multi drug resistant *Salmonella* serovars isolated from broilers in Egypt. *International Journal of Food Microbiology*, 266, 8–13. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.11.009>
- Makky, S., Dawoud, A., Safwat, A., Abdelsattar, A. S., Rezk, N., & El-Shibiny, A. (2021). The bacteriophage decides own tracks: When they are with or against the bacteria. *Current Research in Microbial Sciences*, 2, 100050. <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2021.100050>
- Manual de buenas prácticas pecuarias en la producción de pollo de engorda. (3.a ed.). (2019). https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/588543/Manual_de_BP_de_Produccion_de_Pollo_de_Engorda2019-comprimido2.pdf
- Martínez-Padrón, H. V., Osorio-Hernández, E. O., Estrada-Drouaillet, B., López-Santillán, J. A., Varela-Fuentes, S. E., & Torres-Castillo, J. A. (2017, February). CONTROL BIOLÓGICO DE FITOPATÓGENOS MEDIANTE AISLADOS DE *Trichoderma* spp. *Agroproductividad*, 10(3).
- Massé, D., Saady, N., & Gilbert, Y. (2014, April 4). Potential of Biological Processes to Eliminate Antibiotics in Livestock Manure: An Overview. *Animals*, 4(2), 146–163. <https://doi.org/10.3390/ani4020146>
- Mather, A. E., Reid, S. W. J., Maskell, D. J., Parkhill, J., Fookes, M. C., Harris, S. R., Brown, D. J., Coia, J. E., Mulvey, M. R., Gilmour, M. W., Petrovska, L., de Pinna, E., Kuroda, M., Akiba, M., Izumiya, H., Connor, T. R., Suchard, M. A., Lemey, P., Mellor, D. J., . . . Thomson, N. R. (2013). Distinguishable Epidemics of Multidrug-Resistant *Salmonella* Typhimurium DT104 in Different Hosts. *Science*, 341(6153), 1514–1517. <https://doi.org/10.1126/science.1240578>
- Maxwell, K. L., & Davidson, A. R. (2014). A Shifty Chaperone for Phage Tail Assembly. *Journal of Molecular Biology*, 426(5), 1001–1003. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2013.08.004>
- McVey, D. S., Kennedy, M., & Chengappa, M. M. (2013). Veterinary microbiology. John Wiley & Sons.
- Mejía, L., Medina, J. L., Bayas, R., Salazar, C. S., Villavicencio, F., Zapata, S., Matheu, J., Wagenaar, J. A., González-Candelas, F., & Vinuesa-Burgos, C. (2020). Genomic Epidemiology of *Salmonella* Infantis in Ecuador: From Poultry Farms to

- Human Infections. *Frontiers in Veterinary Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.547891>
- Moldovan, R., Chapman-McQuiston, E., & Wu, X. (2007). On Kinetics of Phage Adsorption. *Biophysical Journal*, 93(1), 303-315. <https://doi.org/10.1529/biophysj.106.102962>
- Montesdeoca, V., & Iveth, M. (2021). *Estudio de la prevalencia de Salmonella spp y E. coli en huevos comerciales para consumo humano en el cantón Ibarra, para la reacción de un banco de recursos microbianos en la PUCE-SI* (Doctoral dissertation, Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra).
- Moye, Z., Woolston, J., & Sulakvelidze, A. (2018). Bacteriophage Applications for Food Production and Processing. *Viruses*, 10(4), 205. <https://doi.org/10.3390/v10040205>
- Naureen, Z., Dautaj, A., Anpilogov, K., Camilleri, G., Dhuli, K., Tanzi, B., Maltese, P. E., Cristofoli, F., De Antoni, L., Beccari, T., Dundar, M., & Bertelli, M. (2020). Bacteriophages presence in nature and their role in the natural selection of bacterial populations. *Acta bio-medica: Atenei Parmensis*, 91. <https://doi.org/10.23750/abm.v91i13-s.10819>
- Olson, E. G., Micciche, A. C., Rothrock, M. J., Yang, Y., & Ricke, S. C. (2022, January 5). Application of Bacteriophages to Limit Campylobacter in Poultry Production. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.458721>
- OMS. (2011). *Critically Important Antimicrobials for Human Medicine* (N.o 3). <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/77376/?jsessionid=0C947CA333F9F82CF7708F537AE6FB85?sequence=1>
- Pandit, M. A., Kumar, J., Gulati, S., Bhandari, N., Mehta, P., Katyal, R., Rawat, C. D., Mishra, V., & Kaur, J. (2022). Major Biological Control Strategies for Plant Pathogens. *Pathogens*, 11(2), 273. <https://doi.org/10.3390/pathogens11020273>
- Payne, R. J., & Jansen, V. A. (2001). Understanding Bacteriophage Therapy as a Density-dependent Kinetic Process. *Journal of Theoretical Biology*, 208(1), 37–48. <https://doi.org/10.1006/jtbi.2000.2198>
- Payne, R. J., & Jansen, V. A. (2003). Pharmacokinetic Principles of Bacteriophage Therapy. *Clinical Pharmacokinetics*, 42(4), 315–325. <https://doi.org/10.2165/00003088-200342040-00002>
- Publiagro. (2022, 25 agosto). *En 10 años la avicultura en Santa Cruz continúa con las mismas enfermedades bacterianas y virales*. Publiagro. <https://publiagro.com.bo/2022/08/mismas-enfermedades-bacterianas-virales/>

- Rabinovitch, A., Aviram, I., & Zaritsky, A. (2003). Bacterial debris—an ecological mechanism for coexistence of bacteria and their viruses. *Journal of Theoretical Biology*, 224(3), 377–383. [https://doi.org/10.1016/s0022-5193\(03\)00174-7](https://doi.org/10.1016/s0022-5193(03)00174-7)
- RENAPRA [Red Nacional de Protección de Alimentos] & ANMAT. (s. f.). *Salmonelosis Enfermedades Transmitidas por Alimentos*. <http://www.anmat.gov.ar/alimentos/salmonelosis.pdf>
- Rodríguez-Hernández, R., Bernal, J. F., Cifuentes, J. F., Fandiño, L. C., Herrera-Sánchez, M. P., Rondón-Barragán, I., & Verjan García, N. (2021). Prevalence and Molecular Characterization of Salmonella Isolated from Broiler Farms at the Tolima Region—Colombia. *Animals*, 11(4), 970. <https://doi.org/10.3390/ani11040970>
- Sabour, P. M., & Griffiths, M. W. (2010). *Bacteriophages in the Control of Food- and Waterborne Pathogens*. Amsterdam University Press.
- Sánchez-Salazar, E., Gudiño, M. E., Sevillano, G., Zurita, J., Guerrero-López, R., Jaramillo, K., & Calero-Cáceres, W. (2020). Antibiotic resistance of *Salmonella* strains from layer poultry farms in central Ecuador. *Journal of Applied Microbiology*, 128(5), 1347–1354. <https://doi.org/10.1111/jam.14562>
- Sanz, V. (2019). Potencial actividad biocontroladora de bacteriófagos, aislados de muestras ambientales, frente a cepas de *Escherichia coli* multirresistentes. Universidad Mayor de San Andrés. Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas.
- Sekatawa, K., Byarugaba, D. K., Kato, C. D., Wampande, E. M., Ejobi, F., Tweyongyere, R., & Nakavuma, J. L. (2020). A review of phage mediated antibacterial applications. *Alexandria Journal of Medicine*, 57(1), 1–20. <https://doi.org/10.1080/20905068.2020.1851441>
- Shang, Y., Sun, Q., Chen, H., Wu, Q., Chen, M., Yang, S., Du, M., Zha, F., Ye, Q., & Zhang, J. (2021). Isolation and characterization of a novel Salmonella phage VB_SALP_TR2. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.664810>
- Sharma, C. S., Dhakal, J., & Nannapaneni, R. (2015, July 1). *Efficacy of Lytic Bacteriophage Preparation in Reducing Salmonella In Vitro, on Turkey Breast Cutlets, and on Ground Turkey*. Allen Press. Retrieved September 28, 2022, from <https://meridian.allenpress.com/jfp/article/78/7/1357/173929/Efficacy-of-Lytic-Bacteriophage-Preparation-in>
- Silva, C., Calva, E., & Maloy, S. (2014, January 17). One Health and Food-Borne Disease: *Salmonella* Transmission between Humans, Animals, and Plants. *Microbiology Spectrum*, 2(1). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.oh-0020-2013>

- Simmonds, P., Adams, M. J., Benkő, M., Breitbart, M., Brister, J. R., Carstens, E. B., Davison, A. J., Delwart, E., Gorbalenya, A. E., Harrach, B., Hull, R., King, A. M., Koonin, E. V., Krupovic, M., Kuhn, J. H., Lefkowitz, E. J., Nibert, M. L., Orton, R., Roossinck, M. J., . . . Zerbini, F. M. (2017). Virus taxonomy in the age of metagenomics. *Nature Reviews Microbiology*, 15(3), 161-168. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.177>
- Spricigo, D. A., Bardina, C., Cortés, P., & Llagostera, M. (2013). Use of a bacteriophage cocktail to control Salmonella in food and the food industry. *International Journal of Food Microbiology*, 165(2), 169-174. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.05.009>
- Sritha, S. K., & Bhat, S. G. (2021). In vitro efficiency evaluation of phage cocktail for biocontrol of salmonella Spp. in food products. *Archives of Microbiology*, 203(9), 5445-5452. <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02522-0>
- Sulakvelidze, A. (2019). GRAS Notice No. GRN 000834. Food and Drug Administration FDA. Retrieved January 9, 2023, from <https://www.fda.gov/media/134000/download>
- Tayyarcan, E. K., Evran, S., Akin, P. A., Soykut, E. A., & Boyaci, I. H. (2022). The use of bacteriophage cocktails to reduce salmonella enteritidis in hummus. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 154, 112848. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112848>
- Turner, D., Kropinski, A. M., & Adriaenssens, E. M. (2021). A Roadmap for Genome-Based Phage Taxonomy. *Viruses*, 13(3), 506. <https://doi.org/10.3390/v13030506>
- Velasquez, C., Macklin, K., KumarSa, S., Bailey, M., Ebner, P., Oliver, H., Martin-Gonzalez, F., & Singh, M. (2018). Prevalence and antimicrobial resistance patterns of Salmonella isolated from poultry farms in southeastern United States. *Poultry Science*, 97(6), 2144–2152. <https://doi.org/10.3382/ps/pex449>
- Vikram, A., Woolston, J., & Sulakvelidze, A. (2021). Phage Biocontrol Applications in Food Production and Processing. *Current Issues in Molecular Biology*, 267-302. <https://doi.org/10.21775/cimb.040.267>
- Walderhaug, M., & Lampel, K. A. (2014). *Bad Bug Book: Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook*. Van Haren Publishing.
- Wall, S. K., Zhang, J., Rostagno, M. H., & Ebner, P. D. (2010, January). Phage Therapy To Reduce Preprocessing *Salmonella* Infections in Market-Weight Swine. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(1), 48–53. <https://doi.org/10.1128/aem.00785-09>
- Wang, I. N. (2006). Lysis Timing and Bacteriophage Fitness. *Genetics*, 172(1), 17–26. <https://doi.org/10.1534/genetics.105.045922>

- Wang, I. N., Smith, D. L., & Young, R. (2000). Holins: The Protein Clocks of Bacteriophage Infections. *Annual Review of Microbiology*, 54(1), 799–825. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.54.1.799>
- World Bank Group. (2021). The Safe Food Imperative: Accelerating Progress in Low- and Middle-Income Countries. In World Bank. <https://www.worldbank.org/en/topic/agriculture/publication/the-safe-food-imperative-accelerating-progress-in-low-and-middle-income-countries>
- Xu, Y. (2021b). Phage and phage lysins: New era of bio-preservatives and food safety agents. *Journal of Food Science*, 86(8), 3349–3373. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15843>
- Young, R., Wang, I. N., & Roof, W. D. (2000). Phages will out: strategies of host cell lysis. *Trends in Microbiology*, 8(3), 120-128. [https://doi.org/10.1016/s0966-842x\(00\)01705-4](https://doi.org/10.1016/s0966-842x(00)01705-4)
- Żbikowska, K., Michalczuk, M., & Dolka, B. (2020). The Use of Bacteriophages in the Poultry Industry. *Animals*, 10(5), 872. <https://doi.org/10.3390/ani10050872>
- Zhang, Z., He, S., Yang, B., Shi, C., Liu, Y., & Shi, X. (2021). Genomic characterization of an extensively drug-resistant chicken-borne *Salmonella* Indiana isolate carrying an IncHI2-IncHI2A plasmid. *Food Control*, 125, 107761. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107761>

ANEXOS

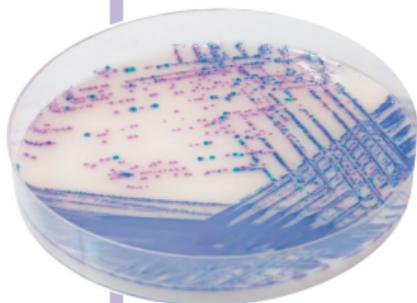
Anexo 1. Mecanismos de resistencia de las cepas de Salmonella frente a los mecanismos de acción de los antimicrobianos.

ANTIBIÓTICO	MECANISMO DE ACCIÓN DEL ANTIBIÓTICO	MECANISMO DE RESISTENCIA
Aminoglucósidos	Inhibición de la síntesis de proteínas de membrana (unirse a la proteína P10 en el complejo ribosomal 30S)	Modificación enzimática
Cefalosporinas	Inhibe la reacción enzimática requerida para estabilizar la síntesis de pared celular (unión a PBP)	Alteración de la permeabilidad de membrana; modificación enzimática (beta lactamasas); alteración de sitio blanco (PBP)
Cloranfenicol	Inhibe la síntesis de proteínas (por unión a 50S ribosomal inhibiendo la transpeptidación)	Modificación enzimática (cloranfenicol transacetilasa)
Quinolonas	Unión a topoisomerasa II bloqueando la replicación de DNA; unión a topoisomerasa IV interfiere con la separación de moléculas de ADN replicadas entrelazadas	Alteración de sitio blanco (mutaciones en la topoisomerasa II o IV), sistema de eflujo activo
Sulfonamidas	Inhibición de síntesis de ácido fólico	Objetivo insensible
Tetraciclina	Inhibición de síntesis de proteínas (Unión a subunidad 30S ribosomal e inhibe la unión del amonoacil-RNAt al complejo de ribosomas de RNAm)	Exportación activa; bombas de eflujo
Cotrimoxazol	Interferencia secuencial con la síntesis de ácido fólico (requerido para la síntesis de ADN)	Reducción de permeabilidad; blanco insensible

Anexo 2. Medios de cultivos empleados para el aislamiento de *Salmonella* spp de muestras ambientales

● CHROMagar™ Salmonella Plus

www.CHROMagar.com



Placa opaca : con un suplemento CHROMagar™ White Opaque

Lectura de placa

- *Salmonella* incluida *S. typhi*, *S. paratyphi* A y *Salmonella* lactosa positiva
→ malva
- Coliforme
→ azul
- *Proteus*
→ incoloro o inhibido



Para la detección y aislamiento de especies de *Salmonella* incluyendo la *Salmonella* lactosa positiva

Antecedentes

Debido principalmente a la contaminación en la cadena alimentaria y/o durante los procesos de producción de alimentos, la *Salmonella* provoca a menudo enfermedades entéricas cuyos síntomas principales son dolor abdominal, diarrea, náuseas, vómitos.

Rendimiento del medio

1 **EN CONFORMIDAD CON LOS REQUISITOS DE LA ISO 6579-1** detectando la *Salmonella* lactosa positiva con un color malva intenso.

2 **FACIL DE LEER A SIMPLE VISTA**

Otra característica de este nuevo medio reside en su agradable contraste de color debido a que las *E. coli* son incoloras. Las *E. coli*, que suelen estar presentes en abundancia en las muestras de análisis de *Salmonella* y podrían ocultar las colonias sospechosas, ya no son una preocupación.

3 **ALTA SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD**

incluyendo la *Salmonella* lactosa positiva
Sensibilidad: **99 %***

*Especificidad y Sensibilidad según el estudio científico: "Evaluation of a new chromogenic medium CHROMagar Salmonella Plus for the detection of *Salmonella* species including lactose positive *Salmonella*, *S. Typhi* and *S. Paratyphi*" de Beaumont C.,

¿Lo sabía usted? El caldo de enriquecimiento RambaQUICK™ *Salmonella* se puede utilizar antes de la etapa de inoculación de la placa de cultivo de CHROMagar™ *Salmonella* Plus, siguiendo el Método RambaQUICK™ *Salmonella* para detectar rápidamente la *Salmonella*. El código de producto de este caldo de enriquecimiento es SQ001.

Descripción del medio

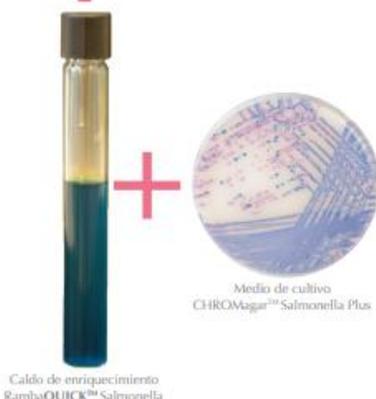
Base en polvo	Total	32,8 g/L
	Agar	15,0
	Peptona Y extracto de levadura	8,0
	Sales	8,5
	Mezcla cromogénica	1,3
	Almacenamiento a 15/30 °C - pH: 7,5 ± 0,2	
	Vida útil	3 años
+		
Suplemento (incluidos en el envase)	1° : En liquido	6 mL/L
	Almacenamiento a 15/30 °C Vida útil	5 años
Suplemento CHROMagar™ White Opaque	Para conseguir un fondo blanco opaco (en polvo):	
	2° : suplemento blanco opaco (en polvo)	1,0 g/L
	Almacenamiento a 15/30 °C Vida útil	3 años

Muestras habituales	comida, carne, huevos frescos, lácteos, etc.
Procedimiento	Inoculación tras caldo de enriquecimiento selectivo de las muestras de acuerdo con la ISO 6579. Incubación 18-24 h a 37 °C Condiciones aeróbicas

Publicaciones científicas sobre este producto disponibles en www.CHROMagar.com
Por favor lea cuidadosamente las instrucciones de uso (documento IFU) disponibles en www.CHROMagar.com

RambaQUICK™ Salmonella Método

www.CHROMagar.com



Caldo de enriquecimiento RambaQUICK™ Salmonella

Medio de cultivo CHROMagar™ Salmonella Plus

Para la detección rápida de especies de *Salmonella* incluyendo *S. typhi*, *S. paratyphi* y *Salmonella* lactosa positiva en muestras de comida

Antecedentes

Del informe del CDC "Trends in Foodborne Illness", 1996-2010: «El informe de este año (publicado en el Informe Semanal del CDC "Morbidity and Mortality (MMWR)) resume los datos del 2010 de FoodNet y pone en evidencia la tendencia de las enfermedades transmitidas por los alimentos entre 1996-2010, confirmando que la infección por *Salmonella* no ha disminuido en 15 años, ...». Una de las recomendaciones del informe para reducir el número de infecciones por *Salmonella* es «Incrementar las pruebas de laboratorio y la notificación de enfermedades para identificar más rápidamente los brotes y sus causas»

Método RambaQUICK™ Salmonella : Rápido y Simple !

El método RambaQUICK™ Salmonella fue diseñado con el objetivo de simplificar el procedimiento de los análisis, manteniendo un alto nivel de sensibilidad dentro de la metodología convencional de cultivos.

1 ETAPA DE ENRIQUECIMIENTO DOS EN UNO

El caldo selectivo RambaQUICK™ es una combinación de las mejores funciones que se encuentran en los enriquecimientos convencionales RVS y MKTTn. Después de la fase de revivificación en agua de peptona tamponada, la *Salmonella* se replica en la fase de competitividad.

2 MÉTODO RÁPIDO

- Negativo en 2 días.
- **Positivo en 3 días.**

3 SIMPLE

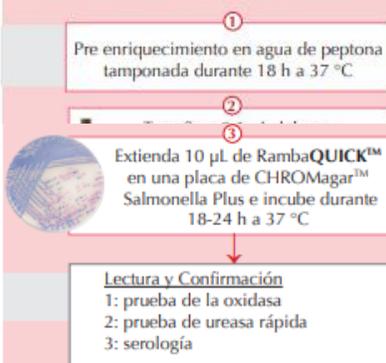
- un enriquecimiento selectivo.
- una placa de cultivo.

4 CONFORME A LOS REQUERIMIENTOS DE LA ISO 6579

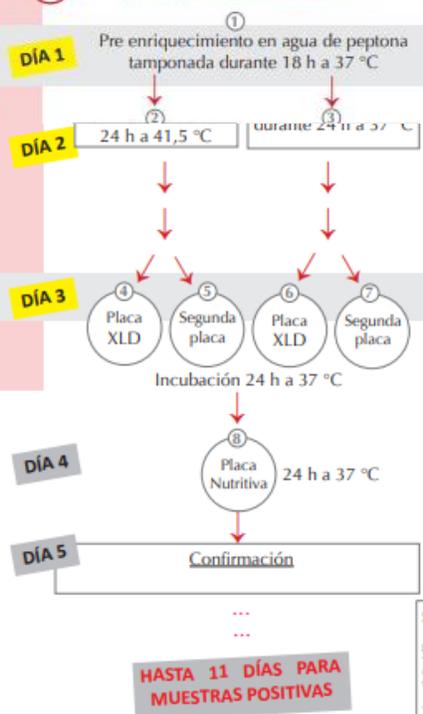
detectando la *Salmonella* lactosa positiva en un color intenso con CHROMagar™ Salmonella Plus

- *Salmonella* incluidas *S. typhi*, *S. paratyphi* y *Salmonella* lactosa positiva → Malva

Método RambaQUICK™ Salmonella



Método estándar ISO 6579



Descripción del método

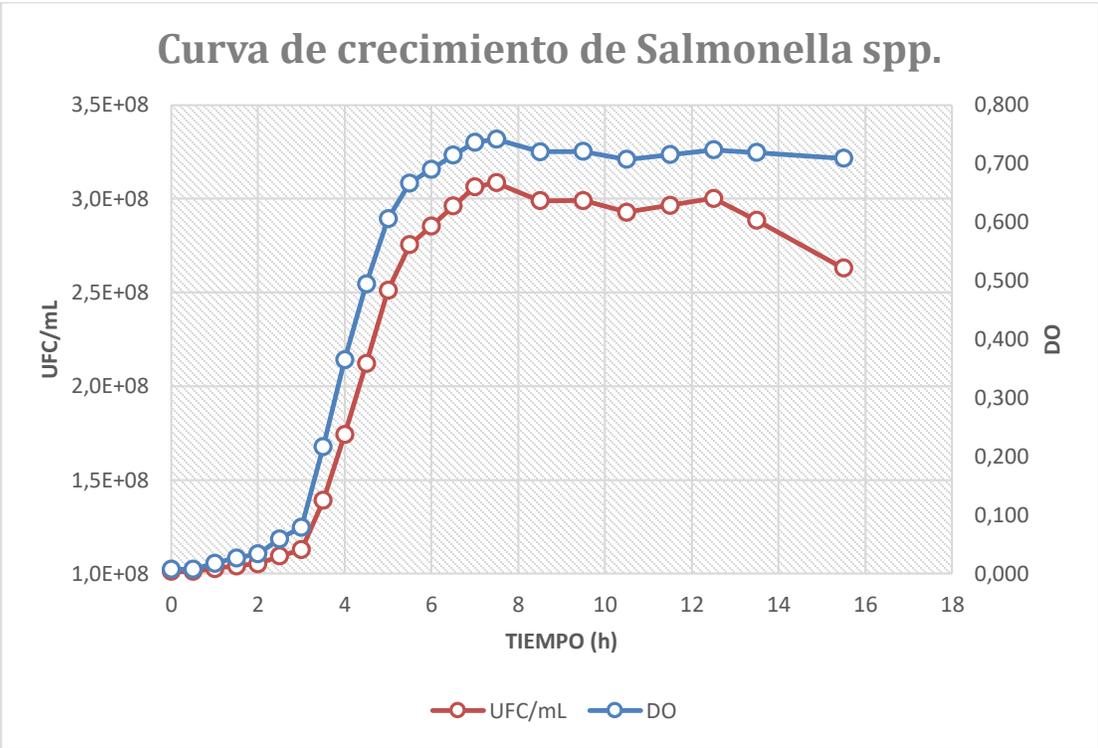
RambaQUICK™ Caldo de Enriquecimiento en polvo (+)	Total 34,2 g/L Sales 8,6 Peptona 4,5 Mezcla selectiva 21,1 Almacenamiento del polvo a 15/30 °C - pH: 5,6 +/- 0,2 Vida útil : 2 años
	CHROMagar™ Salmonella Plus Medio de cultivo en polvo

Publicaciones científicas sobre este producto disponibles en www.CHROMagar.com
 Por favor lea cuidadosamente las instrucciones de uso (documento IFU) disponibles en www.CHROMagar.com

CHROMagar and RambaQUICK son marcas comerciales creadas por el Dr. A. Ramibach

Version 3.0 / Dec-18
 LF-EXT-036-ES

Anexo 3. Curva de crecimiento bacteriano de *Salmonella* spp.



Anexo 4. Perfil de resistencia individual de las cepas de *Salmonella* aisladas de muestras ambientales

ANTIBIÓTICO	16 J	LU	RLP1	RLP2	H	S1	S2	S3	S14	S5	% R	% I	% S
Ampicilina(10 ug)	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	20	0	80
Amoxicilina/ac clavulanico (20/10 ug)	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	20	0	80
Cefalotina (30 ug)	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	20	0	80
Ceftazidima (30 ug)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0	0	100
Cefotaxima (30 ug)	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R	30	0	70
Cefepima (30 ug)	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	20	0	80
Aztreonam (30 ug)	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	20	0	80
Cefoxitina (30 ug)	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	10	0	90
Ceftriaxon (30 ug)	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	20	0	80
Fosfomicina (200 ug)	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	20	0	80
Gentamicina (30 ug)	R	R	S	S	R	S	S	S	R	S	40	0	60
Tobramicina (10 ug)	R	R	S	S	R	S	R	S	R	S	50	0	50
Sulfametoxazol/ trimetoprim	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	20	0	80
Amikacina (30 ug)	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	10	0	90
Estreptomicina (10 ug)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0	0	100
Ac. Nalidixico (30 ug)	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S	40	0	60
Ciprofloxacina (5 ug)	I	I	I	S	I	I	I	I	I	I	0	90	10
Oxitetraciclina (30 ug)	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	30	0	70
Cloranfenicol (30 ug)	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	20	0	80
Neomicina (30 ug)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0	0	100
Cloxacilina (200 ug)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	100	0	0
% DE RESISTENCIA INDIVIDUAL	71	76	14	4	19	5	10	10	14	10			

R= resistente, I= resistencia intermedia, S=sensibles

Anexo 5. Título de bacteriófagos (UFP/mL) de una calva única y después de la amplificación usando S5 de *Salmonella* como cepa hospedera.

FAGO	UFP/mL calva única	UFP/mL amplificado
ϕ F3/2	1,27E ⁺¹⁰	4,5E ⁺⁴²
ϕ F3/1	4,20E ⁺⁰⁸	2,2E ⁺³²
ϕ HC11	1,50E ⁺¹¹	6,3E ⁺⁴⁰
ϕ F1/1P	6,20E ⁺⁰⁸	2,0E ⁺⁴⁰
ϕ F1/3	4,70E ⁺¹⁰	1,0E ⁺³⁴
ϕ HC12	5,00E ⁺¹¹	2,0E ⁺⁴²
ϕ C2P	1,90E ⁺¹²	3,4E ⁺⁴³
ϕ C2G	2,80E ⁺¹⁰	3,0E ⁺⁴²
ϕ C3/1	4,50E ⁺¹¹	5,6E ⁺³²
ϕ F4/1T	1,85E ⁺¹¹	8,5E ⁺³⁰
ϕ C4/2	2,10E ⁺¹¹	1,5E ⁺³²
ϕ C4/3	1,20E ⁺¹²	5,5E ⁺³²

FIN...

¿O acaso es sólo un nuevo principio?

*Fragmento de libro “Quien se ha llevado
mi queso” de Spencer Johnson*