

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS
CARRERA DE BIOQUÍMICA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES FÁRMACO BIOQUÍMICAS



ESTABLECIMIENTO DE UN BANCO DE BACTERIÓFAGOS
LÍTICOS COMO POTENCIALES CONTROLADORES
BIOLÓGICOS EFICACES CONTRA LA PROLIFERACIÓN DE
CEPAS DE *Escherichia coli* RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS

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

ELABORADO POR: DAYANA PEREZ CONDORI

TUTOR: MARÍA TERESA ARMINDA ÁLVAREZ ALIAGA PhD

LA PAZ – BOLIVIA

2024

Dedicatoria

A mi querida mamá Justy, por sus palabras de aliento y amor que me han guiado a lo largo de este camino; a mi papá Alejandro, por su constante apoyo incondicional; a mis queridos hermanos Daniela, Alejandro y Ángela, por estar a mi lado; y a Alexander, por su compañía y aliento durante todo este tiempo.

Gracias por creer en mí y por enseñarme el valor del esfuerzo y la perseverancia.

"El futuro pertenece a quienes creen en la belleza de sus sueños."

Eleanor Roosevelt

Agradecimiento

Al área de Biología Molecular del Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas por darme la oportunidad y los recursos necesarios para llevar a cabo esta investigación.

Agradezco profundamente a mi tutora Dra. María Teresa Arminda Álvarez Aliaga, por su guía, su conocimiento, su apoyo y compromiso que fueron fundamentales para la culminación de esta tesis.

A mis colegas y compañeros de laboratorio, por su colaboración, su ayuda y por crear un ambiente de trabajo acogedor y alentador.

Finalmente, agradezco a todas las personas e instituciones que, de alguna manera, han contribuido a la realización de esta tesis. Sus aportes y esfuerzos han sido necesarios para la culminación de este trabajo.

TABLA DE CONTENIDO

Resumen	14
Abstract	15
I. Planteamiento del problema.....	17
A. Justificación	20
B. Objetivos	22
II. Diseño Teórico.....	22
A. Marco Referencial	22
1. Antecedentes generales sobre el problema de estudio.....	22
2. Descripción del ámbito de estudio.....	24
B. Marco Teórico.....	25
1. Resistencia Antimicrobiana: Un Desafío Global para la Salud Pública	25
1.1. El auge de los patógenos multidrogo-resistentes.....	25
1.3. Diseminación de la resistencia antimicrobiana en el medio ambiente	30
1.4. Contaminación del agua por bacterias resistentes a antibióticos.....	30
1.5. Impacto de la Agricultura y Ganadería en la Resistencia Antimicrobiana	31
1.6. Impacto sanitario y económico de la resistencia antibiótica	32
1.7. Nuevas Alternativas Antimicrobianas	33
2. Bacteriófagos como Herramienta Potencial para el Control de Cepas Resistentes a Antibióticos	34
2.1. Historia, origen y biología de fagos.....	34
2.1.1. Estructura y clasificación morfológica de los bacteriófagos	35
2.1.2. Clasificación de los bacteriófagos de acuerdo a su ciclo de vida	37
2.1.3. Clasificación de bacteriófagos según al rango de hospedero	38
2.1.4. Capacidad Lítica	39
2.2. Aplicaciones en base a bacteriófagos como agentes de control biológico	40
2.3. Resistencia a los fagos: causas y desafíos	43
2.4. Banco de bacteriófagos en países en vías de desarrollo	44

2.5.	Características de un banco de bacteriófagos	46
3.	<i>E. coli</i> como un Contaminante Ambiental Ubicuo: Bioindicador Ideal de Contaminación Fecal y Resistencia Antimicrobiana	47
3.1.	<i>E. coli</i> en el contexto de la Normativas y Estándares de Calidad del Agua para Consumo Humano y Uso Agrícola	48
3.2.	Características generales de <i>E. coli</i>	51
3.2.1.	Patotipos: cepas patógenas intestinales de <i>E. coli</i>	51
3.3.	Resistencia antimicrobiana por <i>E. coli</i>	53
C.	Marco conceptual	54
III.	Formulación de las hipótesis de investigación	55
IV.	Operacionalización de las variables de estudio.	55
V.	Diseño metodológico.	57
A.	Población en estudio, ámbito y periodo de investigación	57
B.	Tipo de investigación	57
C.	Materiales, métodos, técnicas y procedimientos a ser empleados	57
1.	Determinación del perfil de resistencia y susceptibilidad a antimicrobianos de las cepas de <i>Escherichia coli</i> aisladas.	57
1.1.	Obtención de muestras.....	57
1.2.	Aislamiento de cepas de <i>E. coli</i> a partir de heces y condiciones de cultivo bacteriano	57
1.3.	Aislamiento de cepas de <i>E. coli</i> a partir de aguas residuales y condiciones de cultivo bacteriano.....	58
1.6.	Prueba de susceptibilidad y resistencia a antimicrobianos.....	60
2.	Establecimiento y caracterización de un banco de bacteriófagos con actividad lítica frente a cepas <i>E. coli</i> multidrogo-resistentes aisladas	60
2.1.	Aislamiento de bacteriófagos	60
2.2.	Purificación de bacteriófagos	61
2.3.	Titulación de los bacteriófagos aislados.....	61
2.4.	Prueba puntual (Spot test).....	61
2.5.	Determinación del rango de hospedero	62
2.6.	Determinación de la estabilidad de los fagos a diferentes rangos de temperatura y pH	62
2.7.	Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM)	62

3.	Evaluación de la capacidad lítica de un bacteriófago aislado como modelo de caracterización de la eficiencia como controlador biológico.....	63
3.1.	Multiplicidad de infección (MOI)	63
3.2.	Curva de un solo paso.....	63
D.	Procesamiento de los datos.	63
E.	Procedimientos administrativos	67
VI.	Resultados y discusión.....	68
1.	<i>Escherichia coli</i> como bioindicador de contaminación fecal y de resistencia antimicrobiana en el contexto de “One Health”	68
1.1.	<i>E. coli</i> como bioindicador de contaminación fecal	68
1.2.	Fenómeno de la Resistencia Antimicrobiana en Cepas de <i>E. coli</i> Provenientes de Muestras Ambientales	73
2.	Banco de Bacteriófagos como Potenciales Agentes de Control Biológico	77
2.1.	Caracterización parcial de los bacteriófagos aislados	78
2.1.1.	Rango de Hospedero.....	79
2.1.2.	Estabilidad de los fagos a diferentes rangos de temperatura y pH	83
2.1.3.	Capacidad lítica del bacteriófago Ec 12 sobre cepas de <i>E. coli</i> resistentes a antibióticos	87
2.1.4.	Área bajo la curva (ABC).....	89
2.1.5.	Curva de un solo paso.....	90
VII.	Conclusiones.....	91
VIII.	Recomendaciones	92
IX.	Bibliografía	93
	ANEXOS.....	107

Tabla de anexos

Anexo 1. A) y B) Colonias de <i>E. coli</i> en medio ECC por el método de filtración por membranas (colonias azules aisladas). C) Colonias de <i>E.coli</i> , verde metálicas en medio EMB.	104
Anexo 2: Micrografía de microscopía electrónica de transmisión (TEM) que muestra el reconocimiento de receptores bacterianos por el fago	104
Anexo 3: tabla de datos de aislamiento de cepas de <i>Escherichia coli</i>	105
Anexo 4: tabla de porcentaje de resistencia y sensibilidad a cada antibiótico de las 40 cepas de <i>E. coli</i> aisladas.	106
Anexo 5: tabla de datos del aislamiento de los bacteriófagos y la familia a la que corresponden	106
Anexo 6: tabla de rango de hospedero de los 12 fagos frente a las 40 cepas de <i>E. coli</i> aisladas y las cepas ATCC. El valor 0 indica que no hubo actividad lítica, el valor 1 indica una ralentización del crecimiento bacteriano y el valor 2 indica lisis de la bacteria. ...	107
Anexo 7: tabla de media de las lecturas de OD 600 por hora del fago Ec 12 frente a <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	108
Anexo 8: tabla de media de las lecturas de OD 600 por hora del fago Ec 12 frente a <i>Escherichia coli</i> MDR, aislada de heces de aves corral.....	108
Anexo 9: tabla de media de las lecturas de OD 600 por hora del fago Ec 12 frente a <i>Escherichia coli</i> MDR, aislada de aguas residuales.....	109
Anexo 10: tabla de edia de las lecturas de OD 600 por hora del fago Ec 12 frente a <i>Escherichia coli</i> resistente a antibióticos, aislada de verduras	109

Índice de tablas

Tabla 1. patógenos prioritarios según la OMS..... 26

Tabla 2. Mecanismos de acción de los antibióticos 27

Índice de figuras

Figura 1. Interacciones entre humanos, animales y el medio ambiente en la propagación de la resistencia a los antibióticos (RAM). Las actividades humanas, especialmente en sistemas de producción animal y prácticas agrícolas, están estrechamente relacionadas con la resistencia a los antibióticos. Los microorganismos resistentes pueden transferir genes a través de compartimentos ambientales como agua, suelo y alimentos contaminados, afectando tanto a humanos como a animales.....	29
Figura 2. Hitos en la historia de los bacteriófagos	35
Figura 3. Metodología empleada en el alistamiento y caracterización de cepas de <i>E. coli</i> y bacteriófagos	58
Figura 4. Distribución de los sitios de muestreo en la provincia Murillo, que incluye los municipios de La Paz y Mecapaca, y en el municipio de Sorata de la provincia Larecaja.. ..	68
Figura 5. Número de colonias aisladas por sitio de aislamiento	69
Figura 6. A) Unidades formadoras de colonias por 100 mililitros (UFC/100 mL) de <i>E. coli</i> en aguas superficiales y sedimentos de ríos que desembocan en el río La Paz en diferentes épocas. El límite permisible de coliformes fecales según la OPS está representado por la línea punteada roja. La línea continua roja indica la temperatura del agua en grados Celsius (°C) de acuerdo a SENAMHI durante los muestreos. B) Unidades formadoras de colonias por gramo(UFC/g) de <i>E. coli</i> en muestras de verduras recolectadas del municipio de Mecapa. Limite permisible de <i>E.coli</i> (100 UFC/g) del Codex Alimentarius representado por la línea punteada roja . C) <i>E.coli</i> : Unidades formadoras de colonias por gramo de heces de aves de corral recolectadas del municipio de Sorata.....	71
Figura 7. Patrón de susceptibilidad de las cepas de <i>E. coli</i> a antibióticos de importancia crítica, clasificados en dos categorías: antimicrobianos de máxima prioridad y alta prioridad. Los datos muestran la resistencia y susceptibilidad de diferentes cepas de <i>E. coli</i> aisladas de tres fuentes distintas: aguas superficiales y sedimentos, verduras, y heces de aves de corral y su clasificación en sensible (S), resistente (R) y multidrogo-resistente (MDR), de acuerdo a su resistencia a antibióticos. Los colores indican el grado de resistencia (gindo) y susceptibilidad (gris) de las cepas a cada antibiótico. Los antibióticos evaluados fueron: ciprofloxacina (CIP), ceftazidima (CAZ), cefepima (FEP), ampicilina (AMP), ácido nalidíxico (NA), gentamicina (GM), amikacina (AK), amoxicilina- ácido clavulánico (AMC), cefotaxima (CTX), meropenem (MEM), imipenem (IMP), aztreonam (ATM), tetraciclina (TE), cefoxitina (FOX) y trimetoprim-sulfametoxazol (SXT).	75
Figura 8. Diferencia de halos de lisis entre un fago lisogénico y un fago lítico.....	78
Figura 9. Halos de lisis de distintos aislados de fagos por el método de doble capa y su correspondiente fotografía de microscopía electrónica de transmisión (TEM) demostrando que todos pertenecen a la familia <i>Myoviridae</i> . Códigos de los aislados: A) Ec 1, B) Ec 6, C) Ec 7, D) Ec 10, y E) Ec 1	79

Figura 10. Mapa de calor que visualiza la relación entre los bacteriófagos aislados y las cepas de *E. coli* provenientes de distintos entornos (aguas superficiales, verduras y heces de aves de corral), incluyendo *E. coli* ATCC 25922 y *E. coli* ATCC 35218, *Salmonella enterica* subsp. Tiphimurium ATCC, *S. aureus* ATCC 6538p, *S. entérica subvariedad Infantis*, *P. aeruginosa* ATCC 9027 81

Figura 11. A) Estabilidad de los 5 bacteriófagos en diferentes temperaturas y tiempos de incubación. Los puntos coloreados indican que los fagos impidieron el crecimiento de la bacteria, mientras que los puntos blancos indican que la bacteria no fue lisada por el fago y creció. Los resultados se presentan para dos tiempos de incubación: 60 y 120 minutos en un rango de temperatura desde -20 hasta 80 °C, B) Reducción de UFP/mL respecto a la concentración inicial de UFP/mL ($1 \cdot 10^8$)..... 84

Figura 12. A) Estabilidad de los 5 bacteriófagos en diferentes valores de pH y tiempos de incubación. Los puntos coloreados indican que los fagos impidieron el crecimiento de la bacteria, mientras que los puntos blancos indican que la bacteria no fue lisada por el fago y creció. Los resultados se presentan para dos tiempos de incubación: 60 minutos y 24 horas en un rango de pH desde 2 hasta 12, con un control sin ajuste de pH. B) Reducción de UFP/mL respecto a la concentración inicial de UFP/mL ($1 \cdot 10^8$)..... 86

Figura 13. Inhibición bacteriana por el fago Ec 12 en cepas aisladas de distintos entornos: A) *E. coli* ATCC, B) verduras, C) aguas superficiales y D) heces de aves de corral. Se evaluaron diferentes valores de MOI para cada cepa." 88

Figura 14. Áreas bajo la curva de la inhibición bacteriana por el fago Ec 12 en medio líquido utilizando cepas aisladas de distintos entornos: B) verduras, C) aguas superficiales y D) heces de aves de corral, incluida A) *E. coli* ATCC. 89

Figura 15. Curva de crecimiento de un paso de los bacteriófagos aislados durante 60 minutos.. 90

Tabla de abreviaturas

ABC	Área Bajo la Curva
AMC	Amoxicilina-Ácido Clavulánico
AMP	Ampicilina
ATM	Aztreonam
CAZ	Ceftazidima
CIP	Ciprofloxacina
CTX	Cefotaxima
ECC	Escherichia coli Chromocult
EMB	Eosin Methylene Blue Agar
FEP	Cefepime
FOX	Cefoxitina
GM	Gentamicina
IMP	Imipenem
MDR	Multidrogo-Resistente
MEM	Meropenem
MDI-WHO	Multiplicidad de Infección
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPS	Organización Panamericana de la Salud
RAM	Resistencia a los Antibióticos
SENAMHI	Servicio Nacional de Meteorología e Hidrología
SXT	Trimetoprim-Sulfametoxazol
TEM	Microscopía Electrónica de Transmisión
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
UFP	Unidades Formadoras de Placas

Resumen

El establecimiento de bancos de bacteriófagos en países en vías de desarrollo prometen ser una alternativa para el control de la diseminación de bacterias patógenas que contaminan distintos entornos como aguas de consumo, aguas de riego y cultivos. La disponibilidad de estas nuevas herramientas biológicas de control, permitirían mitigar el impacto de la resistencia antimicrobiana en la salud humana y ambiental, ofreciendo una solución sostenible y económica para gestionar la resistencia a los antimicrobianos en regiones con recursos limitados. El objetivo de esta investigación es establecer un banco de bacteriófagos líticos como potenciales controladores biológicos eficaces contra la proliferación de cepas de *Escherichia coli* resistentes a antibióticos.

En este sentido, se han aislado fagos que controlan cepas de *E. coli* resistente a antibióticos de sitios problema como ser el río La Paz y cultivos vegetales regados con estas aguas, cuyas concentraciones superan en ambos casos hasta cuatro órdenes logarítmicos al límite permisible establecido tanto para aguas clase D (Reglamento de Materia de Contaminación Hídrica - Ley del Medio Ambiente N° 1333) y los parámetros determinados por el CODEX alimentarius. Finalmente, se aislaron también fagos que controlan cepas de *E. coli* presentes en heces de aves de corral, cuya manipulación y condiciones de manejo contribuyen a la contaminación por bacterias multidrogo-resistentes.

Cinco fagos fueron caracterizados mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM), clasificándolos como *Myoviridae*. Estos fagos demostraron estabilidad a temperatura que van desde -20°C hasta 60°C y en un rango de pH de 3 a 10. Son efectivos contra cepas de *E. coli* multidrogo-resistentes habiendo determinado que 32/40 de las cepas aisladas de diferentes nichos, presentaron fenotipos de resistencia a múltiples antibióticos como ampicilina, amikacina, gentamicina, cefotaxima, ácido nalidíxico, ciprofloxacina, cefepime y amoxicilina-ácido clavulánico (antibióticos considerados como críticos en el tratamiento de infecciones humanas OMS). Estos hallazgos sugieren que los fagos aislados podrían servir como agentes de control biológico prometedores para combatir la resistencia antimicrobiana en *E. coli*.

Este es el primer paso a la institución de un banco de bacteriófagos que permiten la

colección de fagos de amplio rango de hospedero para su aplicación potencial y posteriores estudios de producción de enzimas líticas.

Palabras clave: Banco de bacteriófagos, resistencia antimicrobiana, bioindicador, *Escherichia coli*.

Abstract

The establishment of bacteriophage banks in developing countries promises to be an alternative for controlling the spread of pathogenic bacteria that contaminate different environments such as drinking water, irrigation water and crops. The availability of these new biological control tools would mitigate the impact of antimicrobial resistance on human and environmental health, offering a sustainable and cost-effective solution to manage antimicrobial resistance in resource-limited regions. The objective of this research is to establish a bank of lytic bacteriophages as potential effective biological controllers against the proliferation of antibiotic resistant *Escherichia coli* strains.

In this sense, phages that control antibiotic-resistant *E. coli* strains have been isolated from problem sites such as La Paz river and vegetable crops irrigated with these waters, whose concentrations exceed in both cases up to four logarithmic orders the permissible limit established for both class D waters (Regulation on Water Pollution - Environmental Law No. 1333) and the parameters determined by the CODEX alimentarius. Finally, phages that control *E. coli* strains present in poultry feces were also isolated. Handling conditions of these birds contribute to contamination by multidrug-resistant bacteria.

Five phages were characterized by transmission electron microscopy (TEM), classifying them as Myoviridae. These phages showed stability at temperatures ranging from -20°C to 60°C and in a pH range of 3 to 10. They are effective controlling *E. coli* strains isolated from different niches, considering that 32/40 of these strains showed antimicrobial resistance phenotypes to multiple antibiotics such as ampicillin, amikacin, gentamicin, cefotaxime, nalidixic acid, ciprofloxacin, cefepime and amoxicillin-clavulanic acid (antibiotics considered critical in the treatment of human infections WHO). These findings suggest that the isolated phages could serve as promising biological control agents to

control antimicrobial resistance in *E. coli*.

This is the first step towards the institution of a bacteriophage bank that allows the collection of broad host range phages for potential application and further lytic enzyme production studies.

Key words: Bacteriophage bank, antimicrobial resistance, bioindicator, *Escherichia coli*.

I. Planteamiento del problema

La contaminación del agua es un problema ambiental en todo el mundo, especialmente en los países en desarrollo y, a pesar de que en los últimos años se ha mejorado el tratamiento de aguas residuales, aún sigue siendo un desafío de sostenibilidad de alta prioridad. La contaminación de los ríos, lagos y mares es afectada por diversas fuentes antropogénicas como descargas de aguas residuales hospitalarias, efluentes municipales e industriales, productos químicos domésticos, escorrentías agrícolas, siendo la calidad del agua el problema más frecuente a nivel mundial debido a la disposición de aguas residuales sin tratamiento (Stanton et al., 2022). Estas descargas contienen una gran cantidad de microorganismos patógenos, genes de resistencia a antibióticos, productos químicos como detergentes, materia fecal, restos de alimentos y, entre otros tipos de basura, residuos tales como papeles, plásticos, latas y vidrios. Aproximadamente el 90% de todas las aguas residuales en los países en desarrollo se vierten a los recursos hídricos sin ningún tratamiento previo; de este porcentaje el 44% de las aguas residuales son generadas en las viviendas (du Plessis, 2022; UNESCO, 2021). Actualmente, más de 2 mil millones de personas utilizan una fuente de agua potable contaminada con heces, incluidos 144 millones que dependen del agua superficial (Wang et al., 2022).

En este contexto, es evidente que algunos ríos presentan altas concentraciones de materia orgánica y nutrientes, altos niveles de contaminación por metales pesados y altos niveles de contaminación con coliformes fecales que incluyen: *Escherichia coli*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Edwardsiella* y *Citrobacter*, bacterias que viven como saprófitos independientes. Dentro de estos ríos se encuentra el río Ganges en la India que abastece a más de 38 millones de personas convirtiéndola en una fuente vital para innumerables comunidades. Sin embargo, en enero de 2023 se registraron cantidades peligrosas de coliformes catalogándolo como el río más contaminado del mundo, sobre todo por la presencia de coliformes fecales (Acharya, 2023; du Plessis, 2022). Según el Programa Conjunto de Monitoreo (JMP) de la Organización Mundial de la Salud (OMS), en los países de ingresos bajos y medianos, el monitoreo del agua potable apenas está cubierto por los programas nacionales de agua potable; esto en base a datos del año 2020, que señalan que un alto porcentaje de la población depende de fuentes de agua contaminadas

con heces (OMS, 2022).

En Latinoamérica, varios países enfrentan desafíos relacionados con la presencia de coliformes totales y fecales en el suministro de agua potable y en fuentes de agua superficial. En Brasil, durante el periodo de 2014 a 2019 los datos mostraron que coliformes totales y *E. coli* estaban presentes en el 60% y el 30% de las muestras de agua potable analizadas en áreas rurales, respectivamente (Borja-serrano et al., 2020). Un estudio realizado en los ríos de Ecuador mostró concentraciones tanto de *E. coli* como de coliformes totales que superaron la concentración máxima permitida, según la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (US EPA) para aguas dulces destinadas a contacto total o parcial con humanos (Andueza, 2021). Las directrices de la OMS recomiendan que la cantidad de coliformes totales y fecales sea 0 UFC/100 mL (Unidades Formadoras de Colonias/mililitro) para las fuentes de suministro de agua potable, (Borja-serrano et al., 2020; Supply, n.d.).

La OMS señala a *Escherichia coli* como un indicador fecal más factible y eficaz para monitorear la calidad del agua. Aunque la mayoría de las cepas de *E. coli* son saprófitas, es crucial reconocer que ciertas variantes pueden ser patógenas tanto para humanos como para animales, representando así un riesgo significativo para la salud pública (Aabed et al., 2021; OMS, 2022). Varios estudios han identificado en aguas diferentes patotipos como la *E. coli* enterotoxigenica (ETEC), *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* productora de toxina Shiga (STEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) y un subgrupo de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC). ETEC se encuentra entre los 10 principales agentes promotores de diarrea en el mundo causando más de 50.000 muertes anuales y 223 millones de casos por año (Toledo et al., 2023). En Bolivia, alrededor del 21% de los niños menores de 5 años sufren de diarrea aguda al menos una vez al año. Esta condición contribuye a una tasa de mortalidad de 3,13 muertes por cada 1,000 niños anualmente, una de las más altas del hemisferio occidental. (Guzman-otazo et al., 2019; Roxana & Castillo, 2015).

La ciudad de La Paz – Bolivia, por su topografía, no cuenta con un sistema de tratamiento de aguas residuales, por lo tanto, todas las aguas residuales domésticas, públicas, comerciales, industriales y hospitalarias desembocan en los ríos que circundan la ciudad y representan una fuente de contaminación hídrica de consideración afectando la salud

humana (Poma et al., 2016). Un estudio realizado en el río La Paz, en los años 2021 – 2022, ha determinado concentraciones altas de *E. coli* ($1 \cdot 10^7$ UFC/100 mL) por encima del valor máximo aceptable de acuerdo a la normativa boliviana y, el perfil de resistencia antimicrobiana de estas cepas refleja que hay una resistencia sobre todo a azitromicina, ácido nalidixico, ciprofloxacino, levofloxacina, amikacina y gentamicina, incluidos cepas con genes BLEE (resistencia a betalactámicos de espectro extendidos) considerándolas multidrogo-resistentes (MDR) (datos no publicados del IIFB). Según la normativa boliviana de Control de Calidad del Agua para Consumo Humano, las aguas del río La Paz sobre todo las que circundan Río Abajo son consideradas como “clase D” (aguas de mala calidad) (Lieberman et al., 2021). Sin embargo, estas aguas son utilizadas sin previo tratamiento para el riego de verduras en la zona de Río Abajo, ocasionando una contaminación de las mismas que luego son expandidas en los mercados del municipio de La Paz (Poma et al., 2016).

Estudios realizados entre los años 2007 y 2010 en Bolivia mostraron la prevalencia de EAEC (11,2%) y ETEC (6,6%), como los patotipos de *Escherichia coli* diarrogénicas más prevalentes en muestras fecales de niños con diarrea, seguidas de EPEC (5,8%); mismas cepas presentaban altas tasas de resistencia a los antibióticos, en particular resistencia a ampicilina, trimetropim sulfametoxazol y tetraciclina (Gonzales et al., 2013; Guzman-otazo et al., 2019; Yohans et al., 2022). En 2019, un estudio realizado en la cuenca del río La Paz y suelos se encontró en abundancia genes que codifican enterobacterias y ETEC seguido de EAEC, EIEC, Salmonella y EPEC, además de diversos genes de resistencia a los antibióticos incluidos genes ESBL (resistencia a betalactámicos de espectro ampliado) como bla OXA-1 (resistencia a betalactámicos), bla TEM-1 (resistencia a penicilinas) y bla CTX-M-3 (resistencia a las cefalosporinas de tercera generación) (Guzman-otazo et al., 2019). Así también, reportes del Instituto Nacional de Laboratorios de Salud (INLASA) a través de la Red de laboratorios Oficiales de Análisis de Alimentos (RELOAA) el 2016, determinaron la presencia de coliformes totales y *E. coli* en alimentos de consumo masivo y una mayor resistencia a ácido nalidixico, tetraciclina y trimetropim sulfametoxazol (*Boletínreloaa*, n.d.).

A. Justificación

El impacto antropogénico evidenciado por *E. coli* fecal MDR en aguas del río La Paz determina un riesgo potencial de infección por transmisión mediante agua y alimentos, debido a que estas aguas son utilizadas para consumo propio y como fuentes acuíferas de riego de cultivos, mismos que son comercializados en la propia ciudad de La Paz y El Alto, hecho que se ha asociado con brotes de diarrea por el consumo de estos productos agrícolas distribuidos en los mercados de la ciudad (Poma et al., 2016).

A nivel mundial se ha determinado adoptar estrategias de mitigación de la concentración de *E coli* en aguas residuales y superficiales, principalmente por el riesgo de infecciones transmitidas por agua y alimentos. En este sentido, entre las alternativas de control del crecimiento de *E coli* se encuentra el uso de productos químicos desinfectantes como el cloro y la cloramina, así como la exposición a la luz ultravioleta. También, existen técnicas de filtración, como la ultrafiltración y la nanofiltración, empleo de plantas acuáticas y de microorganismos, incluyendo el uso de bacteriófagos como agentes de control biológico, siendo esta última una alternativa amigable con el medio ambiente, barata, y específica (Hernández-Crespo et al., 2022).

Dentro del marco de las nuevas innovaciones biotecnológicas, los bacteriófagos están siendo considerados como una alternativa prometedora para mejorar y monitorear el tratamiento de aguas residuales. La aplicación de bacteriófagos para mitigar la diseminación de cepas patógenas o cepas MDR, se ha convertido en los últimos años como una alternativa amigable con el medio ambiente, económicamente rentable y con una especificidad para atacar y lisar bacterias (Sattar et al., 2023). Esta especificidad de los bacteriófagos permite que puedan dirigirse selectivamente a las bacterias patógenas sin afectar a las bacterias que promueven la sostenibilidad ambiental. Además, los bacteriófagos son naturalmente abundantes en el medio ambiente y pueden replicarse en presencia de sus bacterias hospederas, lo que los convierte en agentes efectivos para controlar poblaciones bacterianas (Venturini et al., 2022).

Un banco de bacteriófagos brinda una mayor flexibilidad para seleccionar y probar diferentes fagos contra una amplia gama de bacterias patógenas y reduce el riesgo de generar resistencia bacteriana (Gordillo Altamirano & Barr, 2019). El papel de los fagos

en plantas de tratamiento de aguas residuales ha sido de creciente interés para evaluar el impacto de los fagos en las comunidades bacterianas y, en consecuencia, la eficiencia del proceso y la calidad del efluente. Varios países como Rusia, Estados Unidos, Israel y países de la Unión Europea están investigando y desarrollando tecnologías de tratamiento de aguas residuales que incluyen el uso de bacteriófagos, como parte de esfuerzos más amplios para mejorar la eficiencia y la sostenibilidad de los sistemas de tratamiento de aguas (Runa et al., 2021).

El presente estudio, estará dirigido a caracterizar parcialmente bacteriófagos aislados de muestras ambientales de agua residual, superficial y sedimentos, verduras y heces de aves de corral. Para dicho propósito se aislarán bacteriófagos de las muestras de agua utilizando técnicas de filtración y cultivo en placas de agar con bacterias hospederas previamente aisladas y caracterizadas en cuanto a su fenotipo de resistencia antimicrobiana. La caracterización de los bacteriófagos aislados consistirá específicamente en la determinación de la capacidad infectiva y multiplicidad de infección, así como su estabilidad en diferentes condiciones como cambios de pH o temperatura, determinación del rango de hospedero, determinación de la morfología viral mediante microscopía electrónica de transmisión. Esta caracterización parcial será fundamental para comprender la funcionalidad de los bacteriófagos presentes en estas muestras. Este conjunto diverso de fagos puede formar la base de un cóctel de fagos que, potencialmente determinaría una mejor eficacia para controlar la diseminación de bacterias y la aparición de resistencia a los fagos (Ghose & Euler, 2020; Morris et al. & et al., 2015).

La colección de todos los bacteriófagos caracterizados, permitirá establecer una fagoteca específica para el control de cepas de *Escherichia coli* MDR que podrían luego ser utilizadas entre otras potenciales aplicaciones, principalmente para el tratamiento de excretas y aguas residuales con altas concentraciones de *E.coli* fecal MDR.

B. Objetivos

1. Objetivo general

Establecer un banco de bacteriófagos líticos como potenciales controladores biológicos eficaces contra la proliferación de cepas de *Escherichia coli* resistentes a antibióticos.

2. Objetivos específicos

1. Caracterizar cepas de *E.coli*, aisladas de muestras de aguas, suelos contaminados de granjas avícolas y cultivos agrícolas, como bioindicadores de contaminación fecal y de resistencia antimicrobiana.
2. Caracterizar bacteriófagos, aislados a partir de muestras de aguas y suelos contaminados de granjas avícolas y cultivos agrícolas, como potenciales controladores de la proliferación de cepas aisladas de *E. coli* resistentes a antibióticos.
3. Evaluar la capacidad lítica de un bacteriófago aislado como modelo de caracterización de la eficiencia como controlador biológico.

II. Diseño Teórico

A. Marco Referencial

1. Antecedentes generales sobre el problema de estudio.

El uso de aguas residuales sin tratamiento previo en actividades agrícolas e industriales puede causar la propagación de bacterias patógenas. Dentro de estas bacterias se encuentra *E.coli*, un tipo de bacteria Gram negativa asociada al orden Enterobacteriales y la familia Enterobacteriaceae. Este microorganismo es el principal agente causante de infecciones gastrointestinales y urinarias en humanos. Además, *E. coli* es un bioindicador crucial de contaminación fecal en agua, alimentos y productos agrícolas, señalando la presencia de coliformes fecales en estas matrices (Maal et al., 2015).

Entre las diferentes especies bacterianas, *E. coli* es uno de los patógenos transmitidos por agua y alimentos que ha generado resistencia a múltiples antibióticos, y hoy en día es un

problema de salud pública (Montso et al., 2019). Se ha demostrado que *E. coli* puede tener una gran resistencia a muchos de los antibióticos utilizados por los seres humanos, esto puede deberse en parte a la alta tasa de adquisición de genes y la capacidad de transferencia horizontal de genes que poseen las cepas de *E. coli* (Kakooza et al., 2023). Hasta el 2019, se han reportado alrededor de 5 millones de muertes debidas a infecciones bacterianas resistentes a antibióticos y para el 2050 se prevé que más de 10 millones de personas morirán cada año debido a infecciones por cepas bacterianas MDRs (Chuppava et al., 2019). Dentro de este contexto, algunas de las cepas de *E. coli* producen betalactamasas de espectro extendido y metalo- β -lactamasas, enzimas que hacen que *E. coli* sea resistente a varios antibióticos, incluyendo los carbapenémicos, que han sido considerados como el último recurso para tratar infecciones graves causadas por *E. coli* MDR (Amarillas et al., 2017). En este sentido el control de la diseminación de cepas MDRs en el medio ambiente debe ser una política prioritaria de salud pública.

La OMS señaló que actualmente 90 antibióticos están en fase de desarrollo clínico; sin embargo, ninguno resuelve el problema de la multidrogo-resistencia de las bacterias de importancia. El escaso avance en la síntesis de nuevos antibióticos resalta la urgencia de explorar métodos innovadores para tratar infecciones bacterianas. El informe de la OMS de 2020 sobre productos en proceso de desarrollo, ofrece una perspectiva nueva al presentar 27 tratamientos antibacterianos no convencionales en distintas etapas de desarrollo. Estos tratamientos incluyen desde anticuerpos hasta bacteriófagos (OMS, 2022). El uso de bacteriófagos como agentes de control biológico contra cepas de *E. coli* resistentes a antibióticos ha mostrado avances significativos en los últimos años.

Varios estudios evidencian que las cepas de *E. coli* productoras de BLEE pueden ser eliminadas con el uso de bacteriófagos disponibles comercialmente y aislados en laboratorio. El estudio realizado por Xu et al., (2018), destaca el descubrimiento de un bacteriófago denominado vB_EcoS-B2 aislado de aguas residuales que exhibe actividad lítica contra cepas de *E. coli* resistentes a múltiples antibióticos. Además, según los análisis genómicos, revelaron la ausencia de genes relacionados con proteínas integrasa, represoras y antirrepresoras en este bacteriófagos, lo que sugiere su potencial efectividad como agente terapéutico. Otro estudio determinó que el bacteriófago denominado LM33-

P1 puede infectar eficientemente cepas de *E. coli* resistentes a β -lactámicos y fluoroquinolonas tanto *in vitro* como *in vivo* (Dufour et al., 2016).

Otros estudios han investigado estrategias para la reducción de contaminación por *E. coli* en alimentos, mediante el uso de cocteles o mezclas de bacteriófagos demostrando una disminución significativa de cepas de *E. coli* O127:H6 en leche (McLean et al., 2013). Este enfoque también se ha aplicado con éxito en la reducción de la contaminación por *E. coli* con un cóctel bacteriófagos en verduras de hojas verdes almacenadas en envases (Boyacioglu et al., 2013).

Estos estudios destacan el potencial de los bacteriófagos como una alternativa prometedora en el control de cepas de *E. coli* resistentes a antibióticos y en la reducción de la contaminación por esta bacteria en alimentos, lo que subraya la importancia de continuar investigando en este campo para desarrollar estrategias preventivas efectivas. Sin embargo, es esencial abordar desafíos específicos, como la variabilidad genética de las bacterias MDR y la necesidad de estrategias de tratamiento adaptadas a condiciones ambientales particulares.

2. Descripción del ámbito de estudio

El estudio está comprendido dentro del ámbito de la microbiología y biotecnología ambiental con la finalidad de aportar conocimiento sobre: 1) El estudio a nivel de laboratorio acerca del potencial de bacteriófagos ambientales para el control del crecimiento de cepas MDRs, 2) Descripción de la resistencia antimicrobiana de cepas de *E. coli* aisladas de muestras de heces de aves de corral, sedimentos de ríos y cultivos agrícolas obtenidas de granjas avícolas, Rio La Paz y El Palomar colectadas en las localidades de Sorata, Rio abajo y Mecapaca respectivamente, durante el periodo comprendido del 2022-2023.

El estudio forma parte del proyecto “Control biológico de los principales patógenos transmitidos por alimentos con el uso de bacteriófagos” soportado por el convenio entre la Cooperación Sueca Asdi y la UMSA desarrollado en el área de Bioquímica Molecular en el Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas (IIFB).

B. Marco Teórico

La resistencia a los antibióticos se ha convertido en un problema grave de salud pública en todo el mundo, con serias implicaciones clínicas relacionadas con altas tasas de mortalidad, morbilidad y además riesgos ecológicos y ambientales (Tellez-Carrasquilla et al., 2023). La OMS señala que la resistencia a los antibióticos es una de las mayores amenazas para la salud pública. Además, dio a conocer una lista mundial de bacterias resistentes a los antibióticos para intensificar la investigación y el desarrollo de nuevos antibióticos contra las bacterias resistentes. Los análisis mostraron que el 60% de las bacterias patógenas se han vuelto resistentes a los antibióticos de uso común, incluidos los carbapenémicos y las cefalosporinas de tercera generación (OMS, 2021a; ONU, 2022; Tellez-Carrasquilla et al., 2023).

1. Resistencia Antimicrobiana: Un Desafío Global para la Salud Pública

La resistencia a los antibióticos es un problema global que conduce a infecciones intratables. Este fenómeno se produce principalmente por selección natural, pero está siendo impulsado por la exposición a antibióticos en diversos ámbitos como la atención médica, la agricultura y el medio ambiente (Liliana Serwecińska, 2020).

Los antibióticos son medicamentos que se usan para tratar una amplia gama de infecciones o enfermedades causadas por bacterias ya que tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de microorganismos o matarlos. Se estima que la producción anual mundial de antibióticos asciende entre 100.000 y 200.000 toneladas (Liliana Serwecińska, 2020), dando lugar a un aumento de las tasas de excreción de antibióticos y de liberación al medio ambiente y, por tanto, al aumento de la resistencia a los antibióticos en las cepas bacterianas (Murray et al., 2022).

1.1. El auge de los patógenos multidrogo-resistentes

Investigar la interacción entre humanos, animales y el medio ambiente, así como entre los diferentes sectores involucrados (por ejemplo, industria farmacéutica, industria alimentaria, empresas de gestión de residuos de agua), utilizando un enfoque de "Una Salud" (One Health), es de gran importancia para mitigar la resistencia.

La OMS advierte sobre una “una era post-antibióticos, en la que las infecciones comunes y las lesiones menores podrían ser letales, subrayando que esta no es una fantasía apocalíptica, sino una posibilidad muy real para el siglo XXI (Blondeau & Blondeau, 2021). El concepto de “UNA SOLA SALUD” (del inglés, One Health), reconoce a la multidrogo-resistencia como un problema crítico global que afecta a la salud humana, ambiental y animal (Velazquez-Meza et al., 2022). Así mismo, la OMS publicó una lista de patógenos prioritarios que representan la mayor amenaza para la salud humana debido a su resistencia a los antibióticos (tabla 1). Entre estos microorganismos se encuentran *Helicobacter pylori*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Salmonella* spp (OMS, 2021b), todos ellos demostrando altos niveles de resistencia a diversas generaciones de antibióticos y poniendo en grave riesgo la salud pública.

Estas bacterias tienen la capacidad innata de encontrar nuevas formas de resistir a los tratamientos y pueden transmitir material genético que permite que otras bacterias también se vuelvan resistentes a los antibióticos, agravando aún más el desafío. La lista de bacterias resistentes sigue creciendo, haciendo que la resistencia antimicrobiana sea un problema de salud pública cada vez más urgente (Blondeau & Blondeau, 2021).

Tabla 1. patógenos prioritarios según la OMS.

Prioridad 1: CRÍTICA	
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Resistente a carbapenémicos
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Resistente a carbapenémicos
<i>Enterobacteriaceae</i>	Resistente a carbapenémicos, productora de BLEE
Prioridad 2: ALTA	
<i>Enterococcus faecium</i>	Resistente a la vancomicina
<i>Staphylococcus aureus</i>	Resistente a la meticilina, intermedio a la vancomicina
<i>Helicobacter pylori</i>	Resistente a la claritromicina
<i>Campylobacter</i> spp.	Resistente a las fluoroquinolonas
<i>Salmonella</i>	Resistente a las fluoroquinolonas
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Resistente a cefalosporinas, resistente a fluoroquinolonas
Prioridad 3: MEDIA	

<i>Streptococcus pneumoniae</i>	No sensible a la penicilina
<i>Haemophilus influenzae</i>	Resistente a la ampicilina
<i>Shigella spp.</i>	Resistente a las fluoroquinolonas

A partir del descubrimiento de la penicilina en el siglo XX, la industria farmacéutica se propuso buscar nuevas sustancias activas frente a las infecciones. Así, en las décadas subsiguientes se hallaron compuestos con actividad antibiótica pertenecientes a diferentes familias (β - lactámicos, macrólidos, aminoglucosidos, tetraciclinas) (Belloso, 2009).

Los antibióticos ejercen una acción específica sobre estructuras o funciones bacterianas con alta potencia biológica a bajas concentraciones y mínima toxicidad para las células humanas. Actúan mediante cinco mecanismos generales: inhibición de la síntesis de la pared bacteriana, alteración de la membrana celular, inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos, inhibición de la síntesis proteica y alteración de las vías metabólicas bacterianas (tabla 2) (Treviño & Molina, 2022).

Tabla 2. Mecanismos de acción de los antibióticos

INHIBIDORES DE LA SÍNTESIS DE PARED CELULAR	INHIBIDORES DE LA SÍNTESIS PROTEICA		INHIBIDORES DE LA SÍNTESIS DE LOS ÁCIDOS NUCLEICOS	ACCIÓN SOBRE LAS VÍAS METABÓLICAS	ACCIÓN SOBRE LA MEMBRANA CELULAR
	UNIÓN A SUBUNIDAD 50S	UNIÓN A SUBUNIDAD 30S			
Betalactámicos	Macrólidos	Aminoglucósidos - Gentamicina - Amikacina	Rifamicinas - Rifampicina	Trimetoprima	Polimixinas - Polimixina B - Colistin
fosfomicina	Estreptograminas	Tetraciclinas - Minociclina - Tigeciclina	Quinolonas - Ciprofloxacina - Norfloxacina	Sulfonamidas	Daptomicina
Clindamicina					
linezolid					

En la actualidad, el uso extendido y, en muchos casos, el abuso y empleo inadecuado de antibióticos ha generado una presión selectiva en el medio ambiente, favoreciendo el desarrollo de genes de resistencia y la producción de enzimas inhibidoras como respuesta adaptativa de los microorganismos. Desde el descubrimiento de la penicilina, las bacterias han desarrollado diversos mecanismos para evadir la acción de los antibióticos, dando lugar

a patógenos multidrigo-resistentes que representan una seria amenaza para la salud pública (Tellez-Carrasquilla et al., 2023).

La OMS, ha declarado que la resistencia a los antimicrobianos es una de las principales amenazas de salud pública a las que se enfrenta la humanidad (OMS, 2020a). A medida que la resistencia se propaga globalmente, los antibióticos se vuelven cada vez más ineficaces, lo que conduce a infecciones más difíciles de tratar y al aumento de la mortalidad

1.2. Factores Contribuyentes a la Resistencia Antimicrobiana

La resistencia a los antibióticos está estrechamente relacionada con actividades humanas, especialmente en sistemas de producción animal y en prácticas agrícolas. Los microorganismos resistentes pueden transferir genes a través de compartimentos ambientales como agua, suelo y alimentos contaminados, afectando tanto a humanos como a animales. El uso indiscriminado de antimicrobianos en la agricultura contribuye significativamente a la presión selectiva que promueve la resistencia bacteriana. Además, el contacto directo entre humanos y animales en entornos agrícolas facilita la transmisión de microorganismos resistentes (figura 1) (Medina-Pizzali et al., 2021). La contaminación ambiental actúa como reservorio y fuente de exposición, mientras que los alimentos contaminados pueden introducir patógenos resistentes en la cadena alimentaria, exacerbando los riesgos para la salud pública al limitar las opciones de tratamiento antibiótico efectivo. Varios estudios muestran que ambientes contaminados con heces son reservorios de bacterias resistentes (Bai et al., 2022).

El agua es un factor importante en la propagación de la resistencia a los antibióticos, junto con el suelo, el entorno de las granjas y los vectores como moscas. La contaminación de las aguas superficiales por heces y las escorrentías son vías críticas para la diseminación de genes de resistencia en el medio ambiente (figura 1). *E. coli* puede sobrevivir en entornos acuáticos y movilizar genes resistentes más fácilmente que otras poblaciones de bacterias actuando como reservorio de genes de resistencia a antibióticos en el medio ambiente (Fuga et al., 2022)

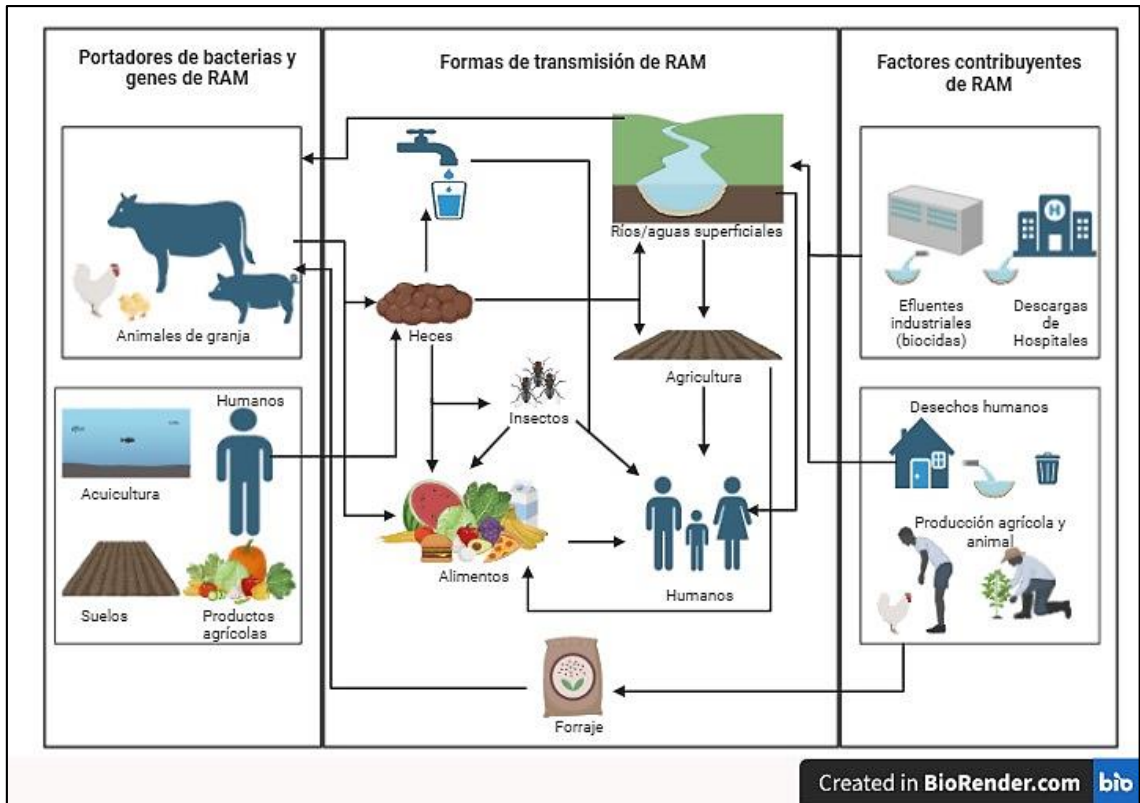


Figura 1. Interacciones entre humanos, animales y el medio ambiente en la propagación de la resistencia a los antibióticos (RAM). Las actividades humanas, especialmente en sistemas de producción animal y prácticas agrícolas, están estrechamente relacionadas con la resistencia a los antibióticos. Los microorganismos resistentes pueden transferir genes a través de compartimentos ambientales como agua, suelo y alimentos contaminados, afectando tanto a humanos como a animales.

El mal uso y abuso de antibióticos, junto con un control deficiente de infecciones, condiciones sanitarias inadecuadas y manipulación incorrecta de alimentos, fomentan la propagación de microorganismos resistentes a los antimicrobianos. Este exceso de antibióticos ha llevado a un aumento en enfermedades infecciosas difíciles de tratar y a una reducción en las opciones de tratamiento. Además, la prescripción excesiva y precoz de antimicrobianos contribuye a la resistencia, la cual está correlacionada con una mayor mortalidad y complicaciones (Chamorro-Toro et al., 2023). Investigaciones revelan que los países con altos niveles de uso de antimicrobianos presentan una mayor prevalencia de resistencia bacteriana, destacando el papel crucial de la sobredosificación, especialmente con betalactámicos, en el desarrollo de la resistencia a múltiples clases de antimicrobianos (Han et al., 2018).

La presencia de genes de resistencia a antibióticos es uno de los principales factores que contribuyen a la resistencia bacteriana. Las bacterias patógenas adquieren genes de resistencia a antibióticos mediante el intercambio de plásmidos a nivel genético y desarrollan resistencia a los antibióticos. Los plásmidos, integrones y transposones portadores de genes resistentes a antibióticos en bacterias pueden sufrir transferencia genética horizontal entre cepas de la misma especie y de diferentes especies (Borja-serrano et al., 2020; Han et al., 2018).

1.3. Diseminación de la resistencia antimicrobiana en el medio ambiente

La creciente actividad humana ha tenido un gran impacto en el medio ambiente, generando problemas como la presión selectiva en microorganismos terrestres y acuáticos debido a la inadecuada disposición de residuos químicos y biológicos. Actualmente, la presencia de antibióticos, productos bactericidas y desinfectantes en las aguas residuales está promoviendo el desarrollo de cepas resistentes a los antimicrobianos. Esto dificulta el tratamiento de infecciones causadas por microorganismos que no responden a los antibióticos convencionales, aumentando así los costos hospitalarios y la mortalidad y morbilidad en humanos (Hernández-Crespo et al., 2022).

La resistencia a los antibióticos es un fenómeno complejo que afecta no solo a la salud humana y animal, sino también al medio ambiente. Aunque los desafíos más evidentes se encuentran en el ámbito clínico, el medio ambiente desempeña un papel crucial en la generación y diseminación de la resistencia a los antibióticos. Diversas vías, como la agricultura, la producción animal, el tratamiento de aguas residuales y el uso humano, crean un entorno propicio para el desarrollo y propagación de bacterias resistentes (Chuppava et al., 2019). Diversos estudios han explorado la presencia de genes resistentes a antibióticos en diferentes entornos, especialmente en aguas residuales, que albergan una alta diversidad de genes y bacterias resistentes a antibióticos (Wang et al., 2022).

1.4. Contaminación del agua por bacterias resistentes a antibióticos

Las principales fuentes de contaminación hídrica provienen de diversas fuentes antropogénicas, como residuos de hospitales, aguas residuales urbanas e industriales,

incluyendo la defecación al aire libre. Una vez liberados en las fuentes acuíferas, estos antibióticos pueden ejercer presión selectiva sobre las bacterias presentes, promoviendo la aparición y propagación de genes de resistencia a antibióticos (Fundación.Aquae, 2022). Esta diseminación de genes de resistencia y bacterias resistentes a antibióticos puede ocurrir tanto dentro del agua como en los sedimentos, representando un riesgo significativo para la salud humana y ambiental, contribuyendo a la aparición de bacterias resistentes a antibióticos (Han et al., 2018).

Estas fuentes hídricas al ser utilizadas para el riego de cultivos pueden convertirse en un reservorio de bacterias resistentes y genes de resistencia a los antibióticos. Cuando las plantas son regadas con agua contaminada, estas bacterias pueden adherirse a sus superficies y permanecer en el suelo circundante. Como resultado, el suelo utilizado para el cultivo de alimentos puede contener bacterias resistentes a antibióticos, lo que aumenta el riesgo de contaminación bacteriana en los productos agrícolas (Salam et al., 2023).

Las aguas residuales contienen diferentes especies bacterianas como: *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia spp.* que presentan un riesgo importante para la salud. Las bacterias entéricas como *E. coli* ingresan a las aguas residuales a partir de desechos fecales humanos y animales. El ganado y las aves de corral pueden infectarse con patógenos entéricos a través del consumo de estas aguas, por lo también representan un riesgo para la salud humana (C et al., 2020).

1.5. Impacto de la Agricultura y Ganadería en la Resistencia Antimicrobiana

Estudios han confirmado que entre un 30 % y un 90 % de los antibióticos usados en animales aparece en los excrementos. El estiércol contaminado expone a los cultivos, incluso a los orgánicos, a la presencia de antibióticos. Esto, junto con el uso de aguas residuales para riego, provoca que estos agroecosistemas estén repetidamente expuestos a una considerable y variada carga de antibióticos durante largos periodos de tiempo (Murray et al., 2022; Usue Pérez López, 2019).

Los antibióticos suelen utilizarse para tratar enfermedades clínicas, prevenir y controlar eventos de enfermedades, y potenciar el crecimiento de los animales (Salyers, 2005). A nivel mundial, en 2015 se estimó un consumo global de antibióticos que oscilaba entre

63.000 y 240.000 toneladas. La Food and Drug Administration (FDA) en 2012 indican que el 93 % de los antibióticos clínicamente importantes se administraron a través de la alimentación o el agua en el sector agropecuario. Además, entre el 75 % y el 90 % de los antibióticos probados se excretan sin metabolizarse, ingresando activos a los sistemas de aguas residuales y fuentes de agua (Diayo et al., 2020; Salam et al., 2023). Esto constituye la fuente más importante de contaminación con residuos de antibióticos, y explica por qué el uso agropecuario se considera una de las principales causas de resistencia bacteriana. Este problema se magnifica en los países en desarrollo debido a sistemas sanitarios deficientes y al mayor riesgo de exposición a aguas residuales. Esto incrementa el riesgo de adquirir cepas resistentes a antibióticos y de desarrollar infecciones que pueden llegar a ser graves (Toledo et al., 2023).

1.6. Impacto sanitario y económico de la resistencia antibiótica

Más de 700 mil muertes anuales se presentan en el mundo debido a infecciones por bacterias resistentes a antibióticos, lo que se ha convertido en un serio problema de salud pública mundial (O'NEILL, 2024). Se estima que esta cifra podría alcanzar los 10 millones de muertes para 2050, con pérdidas económicas que superarían los 100 billones de dólares si no se toman medidas adecuadas. En 2019, aproximadamente 929 mil muertes en todo el mundo fueron atribuibles a seis patógenos principales asociados con la resistencia a los antimicrobianos: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa* (Murray et al., 2022).

En el Reino Unido, el número estimado de muertes atribuibles a bacterias resistentes a los antibióticos aumentó año tras año entre 2016 y 2019, con una pequeña disminución en 2020. Según la Unión Europea, la tasa de muertes humanas relacionadas con infecciones bacterianas resistentes a los antibióticos se estimó en 25,000 por año, con dos tercios de estas infecciones debidas a bacterias Gram-negativas. Entre estas bacterias potencialmente patógenas se encuentra *E. coli* (López-Lozano et al., 2021).

Se estima que el tratamiento de infecciones causadas por bacterias resistentes a antibióticos, junto con la pérdida de productividad de quienes las padecen, añade un coste

de aproximadamente 1,500 millones de euros cada año en la Unión Europea (UE). Para el año 2050, el impacto económico podría ser comparable al de la crisis financiera de 2008. En términos nacionales, esto supone un coste adicional de unos 150 millones de euros anuales para España (López-Lozano et al., 2021). Además, la resistencia a antimicrobianos conlleva a un aumento en la estancia promedio en los hospitales y en los costes de los pacientes ingresados. Se estima que el tratamiento de una infección por bacterias resistentes es entre 10,000 y 40,000 dólares más caro que el de una infección por bacterias sensibles (Costa et al., 2019). Diversos informes sobre el impacto económico de la RAM coinciden en que, sin medidas correctivas, el impacto económico será extremadamente relevante (López-Lozano et al., 2021).

1.7.Nuevas Alternativas Antimicrobianas

El informe de la OMS destaca el desarrollo clínico de agentes antibacterianos, de 80 en 2021 a 97 en 2023, pero subraya la urgente necesidad de innovaciones para combatir infecciones graves debido a la creciente resistencia. Se están investigando agentes no tradicionales, como bacteriófagos y anticuerpos monoclonales que ofrecen nuevas oportunidades para abordar las infecciones por bacterias resistentes a los antimicrobianos desde diferentes ángulos. La investigación preclínica se centra en patógenos gramnegativos resistentes, y se enfatiza la necesidad de diagnósticos rápidos y asequibles. Mayor transparencia en el desarrollo podría mejorar la colaboración y atraer más financiamiento (OMS, 2024; ONU, 2022).

Aunque los antibióticos convencionales siguen siendo cruciales para tratar enfermedades causadas por bacterias patógenas, están perdiendo efectividad frente a las bacterias MDR. Por ello, tratamientos antibacterianos altamente eficaces, como la terapia con bacteriófagos y la terapia de precisión basada en CRISPR-Cas, están atrayendo más atención y se consideran opciones prometedoras para combatir la resistencia bacteriana en el futuro (Guevara Agudelo et al., 2020).

Los bancos de fagos gestionados a nivel nacional podrían ser una solución efectiva, ya que permitirían el desarrollo de terapias con fagos adaptadas a las cepas bacterianas de cada región. Esto ofrecería alternativas rentables a los antibióticos y ayudaría a mitigar la

dependencia de los suministros externos. Además, el uso de fagos puede ser más eficiente para tratar infecciones específicas, aumentando así la eficacia del tratamiento y reduciendo los costos.

2. Bacteriófagos como Herramienta Potencial para el Control de Cepas Resistentes a Antibióticos

Para evitar este desastre con la RAM, los países en desarrollo deben desarrollar y fabricar alternativas a los antibióticos para sus propias poblaciones, en lugar de depender de recibir medicamentos recién desarrollados de los países industrializados. Una alternativa a la creciente resistencia a los antibióticos es la terapia con fagos, basada en fagos líticos o una combinación de fagos y antibióticos (Hernandez-morales et al., 2017). Esta tecnología antibacteriana se conoce desde hace más de 100 años y puede ser útil no solo para combatir bacterias resistentes y tolerantes a los antibióticos, sino también para tratar infecciones relacionadas con la formación de biopelículas, así como contra formadores de esporas. Se han establecido colecciones de fagos aislados localmente y caracterizados como "bancos de fagos" nacionales o regionales, que podrían desplegarse rápidamente para abordar brotes de infecciones resistentes a los antibióticos (Abedon, Kuhl, et al., 2011; Nikolich & Filippov, 2020).

2.1. Historia, origen y biología de fagos

Los bacteriófagos o también llamados fagos, son virus que infectan las células bacterianas y están ampliamente distribuidos en el medio ambiente. Fueron descubiertos de manera independiente por dos científicos a principios del siglo XX por Félix d'Hérelle y Frederick W. Twort. Sin embargo, varios estudios anteriores indican la existencia de actividad antimicrobiana similar a la de los bacteriófagos. En 1896, el químico inglés Ernest Hankin publicó sus observaciones en los registros del Instituto Pasteur que trataba de un agente de tipo vírico con actividad antimicrobiana sensible a la temperatura y podía reducir los títulos

de la bacteria *Vibrio cholerae* en cultivos de laboratorio (figura 2) (Abedon, Thomas-abedon, et al., 2011).

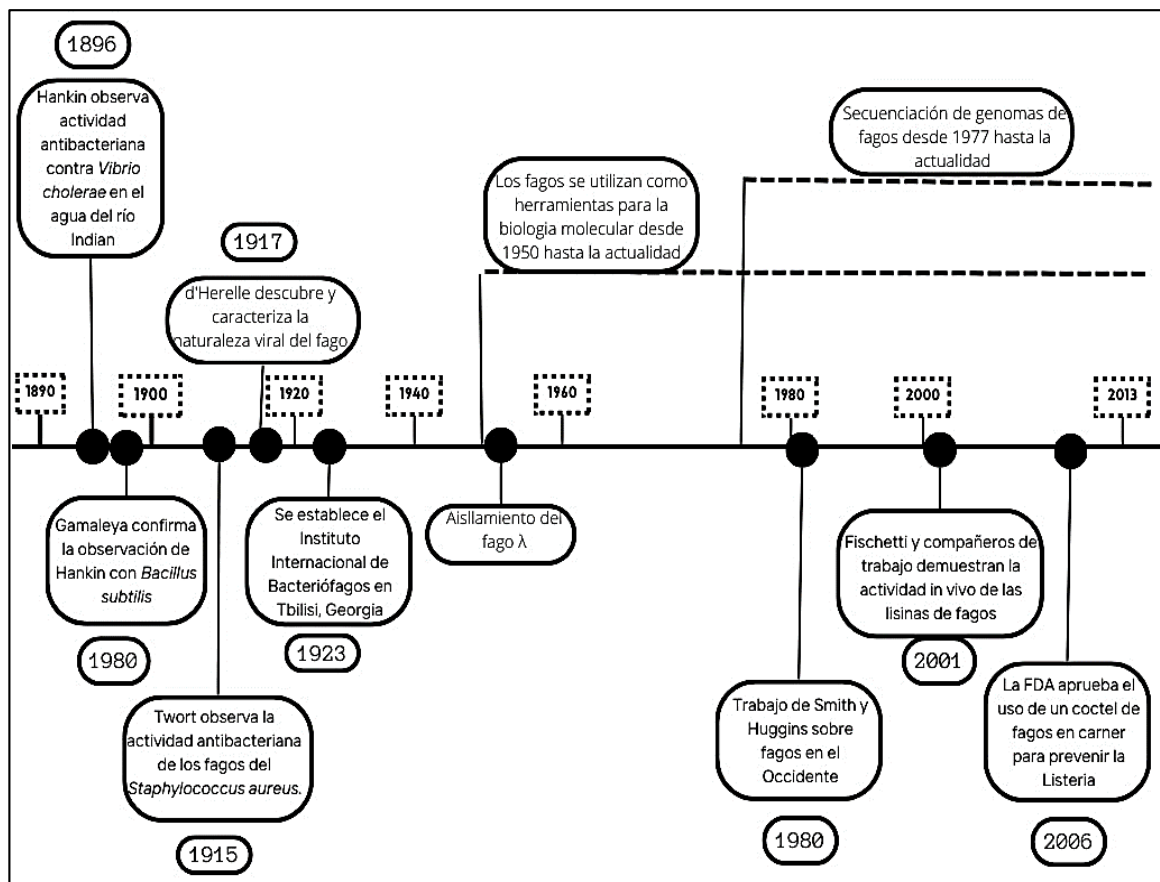


Figura 2. Hitos en la historia de los bacteriófagos.

Los fagos son las entidades biológicas más abundantes en la tierra, con más de 10^{30} viriones individuales estimados en el planeta. Esta vasta abundancia y diversidad de fagos en la naturaleza proporciona un recurso listo para explotar para la selección de fagos para una variedad de propósitos, incluyendo no solo la terapia antibacteriana sino también la descontaminación, el control de infecciones, la detección, el diagnóstico, etc. Sin embargo, no todos los fagos son buenos para aplicaciones terapéuticas (Abedon et al., 2011).

2.1.1. Estructura y clasificación morfológica de los bacteriófagos

La morfología de un bacteriófago está constituida por una cápside o cabeza, la cual encapsula el material genético. Además, algunos fagos poseen un cuello filamentososo o una cola. Estas colas tienen la capacidad de reconocer específicamente las células

hospedadoras y penetrar en su envoltura celular para introducir el material genético del fago (Wójcicki et al., 2021). Todos los fagos con cola tienen un genoma de ADN por lo que pertenecen al orden Caudovirales. Morfológicamente, se han clasificado tradicionalmente en tres familias: *Myoviridae*, *Siphoviridae* y *Podoviridae*. Los miofagos tienen colas largas y contráctiles, los sifofagos tienen colas largas y no contráctiles, y los podofagos tienen colas cortas y no contráctiles. Los miembros de los Caudovirales pueden infectar a una amplia variedad de huéspedes bacterianos y son frecuentes en muchos entornos (Nobrega et al., 2018).

Myoviridae

La familia *Myoviridae* incluye fagos con una cola larga y contráctil; siendo T4 el myovirus mejor estudiado. T4 posee una cápside, una cola contráctil y una placa basal con seis fibras cortas y seis fibras largas. El tubo de la cola está unido a la cápside y, en el otro extremo, al complejo de la placa base. Está rodeado por una vaina contráctil que facilita la perforación de la envoltura de la célula bacteriana y la entrega del ADN viral. La cápside icosaédrica elongada de T4 está formada principalmente por dos proteínas: gp23 y gp24. Gp23 (Doval, 2013; Galan et al., 2010). Además de estas proteínas, la cápside posee otras dos proteínas no esenciales en su superficie: Hoc (proteína externa de la cápside altamente antigénica) y Soc (proteína pequeña externa de la cápside). La proteína Soc proporciona al bacteriófago mayor estabilidad en condiciones hostiles, como pH altos, altas temperaturas, choques osmóticos o agentes desnaturalizantes. Por su parte, la proteína Hoc, con dominios similares a las inmunoglobulinas, podría facilitar la interacción con la superficie bacteriana, manteniendo al fago cerca de la célula y aumentando así las posibilidades de infección (Doval, 2013; Utiiversity et al., 1978).

La interacción de las proteínas de unión a receptor (RBP) y las espigas de la cola del fago con la superficie bacteriana desencadena la contracción de la cola. Inicialmente, una fibra de cola larga se une a su receptor específico en la superficie bacteriana (LPS o proteína C de membrana externa, OmpC). Esta unión es seguida por el contacto de una segunda fibra de cola larga, permitiendo al fago moverse y encontrar un sitio óptimo para la adsorción irreversible y la eyección del genoma. La unión reversible determina el rango de hospedador de T4. Cuando dos o tres de las seis fibras de cola larga se unen a sus

receptores, se transmite una señal a la placa base que cambia de conformación, permitiendo la unión irreversible de algunas fibras de cola corta a la región del núcleo externo del LPS. Tras otro cambio de conformación y la expansión de la placa base, las fibras de cola corta restantes se unen y orientan el virión para la expulsión del ADN (Doval, 2013; Nobrega et al., 2018).

Siphoviridae

Los bacteriófagos de la familia *Siphoviridae* se caracterizan por tener una cola larga, flexible y no contráctil. El fago más estudiado de la familia de *Siphoviridae* es el fago T5. La interacción del fago con la célula hospedera comienza con una unión reversible de sus fibras con forma de L (l_{tf}) a los lipopolisacáridos (LPS) de la célula. Esta interacción inicial puede aumentar significativamente la tasa de adsorción del fago. Posteriormente, se produce una unión irreversible de la proteína pb5, localizada en el extremo distal de la cola, a la proteína FhuA de *E. coli*, que es crucial para el transporte de hierro. La presencia de FhuA es suficiente para iniciar la eyección del ADN del fago T5 (Boulanger et al., 2008; Doval, 2013).

Podoviridae

Los fagos pertenecientes a la familia *Podoviridae* presentan una cola corta no contráctil. A esta familia pertenece el fago T7, uno de los fagos mejor estudiados. El fago infecta cepas de *E. coli*, que carecen de la cadena del antígeno O en sus lipopolisacáridos. Su cápside icosaédrica, está compuesta por gp10, el conector y el núcleo. El DNA de 40 kpb dentro de la cápside está organizado en seis capas coaxiales. El conector dodecamérico, formado por gp8, une la cápside, el núcleo y la cola. En la parte proximal de la cola se unen seis fibras formadas por trímeros de gp17, con un extremo amino terminal que se une a la cola del fago y una región de hélice superenrollada seguida de dominios globulares en la parte distal. Las fibras se unen inicialmente a los LPS de la célula hospedadora de manera reversible y débil, lo que permite al fago localizar la superficie celular para una infección eficiente (Chabris et al., 2013; Doval, 2013).

2.1.2. Clasificación de los bacteriófagos de acuerdo a su ciclo de vida

Los bacteriófagos poseen diferentes ciclos de vida; lisogénico o templado, lítico o virulento (Sattar et al., 2023). Los fagos templados integrarán sus genomas en los cromosomas bacterianos mediante recombinación o transposición y se replicarán con su hospedero, se mantendrán en este estado hasta la escisión del genoma viral por las condiciones del medio ambiente, a estos se los llama profagos. Por el contrario, los fagos virulentos no integran sus genomas en los huéspedes, En el ciclo de vida lítico, después de la infección, el fago se replica rápidamente utilizando la maquinaria de replicación y traducción del hospedero y termina con la liberación de partículas de fago recién formadas (Maal et al., 2015; Yazdi et al., 2020).

Las enzimas líticas de bacteriófagos, son producidas durante la replicación viral dentro de los hospederos bacterianos, en el momento de la liberación de los viriones de la progenie, las lisinas escinden los enlaces principales en la capa de peptidoglicano de las paredes celulares bacterianas (Ghose & Euler, 2020).

2.1.3. Clasificación de bacteriófagos según al rango de hospedero

La clasificación de los bacteriófagos según su rango de hospedero se puede dividir en varias categorías, cada una reflejando su especificidad y capacidad para infectar diferentes cepas bacterianas (de Jonge et al., 2019). A continuación, se presentan las principales clasificaciones:

Fagos Monovalentes (Alta Especificidad)

Estos fagos son altamente específicos y solo infectan una cepa de una especie bacteriana. Esta especificidad se debe a la afinidad del fago por ciertos receptores específicos en la superficie bacteriana (Chung et al., 2023).

Fagos Divalentes (Especificidad Intermedia)

Algunos fagos tienen un rango de hospedero que se encuentra entre los monovalentes y los polivalentes. Estos fagos pueden infectar varias cepas, pero no tantas como los fagos polivalentes (Chung et al., 2023).

Fagos Polivalentes (Amplio Rango de Hospedero)

Estos fagos pueden infectar múltiples cepas dentro de una especie bacteriana o incluso

diferentes especies dentro de un mismo género. Los fagos polivalentes son como controladores biológicos debido a su capacidad de atacar una mayor variedad de patógenos (Kim et al., 2021).

Dentro de los factores asociados para determinar el rango de hospedero de los fagos, se encuentran varios elementos clave. Los receptores bacterianos específicos en la superficie de las bacterias determinan si un fago puede adherirse e infectar la célula huésped, ya que las variaciones en estos receptores entre diferentes cepas y especies influyen en el rango de hospedero del fago (Nobrega et al., 2018). Las RBP del fago juegan un papel crucial en la determinación de la especificidad del hospedero; cambios en estas proteínas pueden expandir o restringir el rango de hospedero del fago. Además, después de la adsorción inicial, la capacidad del fago para replicarse dentro de la célula bacteriana también afecta su rango de hospedero, ya que algunas bacterias pueden tener mecanismos de defensa que impiden la replicación del fago (de Jonge et al., 2019).

Los fagos monovalentes y polivalentes presentan ventajas dependiendo del objetivo terapéutico o de control biológico. Los fagos monovalentes son altamente específicos y se dirigen a una especie bacteriana específica. Esto es beneficioso cuando se necesita tratar una infección sin alterar la microbiota beneficiosa del cuerpo. Por ejemplo, una infección específica puede ser tratada eficientemente con fagos monovalentes, minimizando el impacto en el microbioma del paciente y reduciendo efectos secundarios indeseados (Chung et al., 2023; Kim et al., 2021).

2.1.4. Capacidad Lítica

La capacidad lítica de los bacteriófagos es una característica fundamental que determina su potencial como agentes de biocontrol en diversas aplicaciones. Los fagos líticos infectan las bacterias hospederas al adsorberse a su superficie y, a través de un ciclo lítico, rápidamente replican su material genético para ensamblar nuevas partículas virales. Eventualmente, la célula bacteriana se lisa, liberando nuevos fagos que pueden infectar bacterias adyacentes. Este proceso no solo reduce la carga bacteriana, sino que también previene la formación de biofilms y la propagación de genes de resistencia a antibióticos (Abedon, Kuhl, et al., 2011).

La eficacia de los fagos líticos depende de factores como la especificidad en el

reconocimiento del hospedero, la tasa de adsorción y la eficiencia en el ensamblaje y liberación de nuevas partículas virales. La cinética de acción, que incluye la curva de un solo paso y la multiplicidad de infección (MOI), se utiliza habitualmente para describir el proceso de adsorción de los bacteriófagos (Ranveer et al., 2024). En este contexto, en un entorno con muchas bacterias, los fagos que se adhieren rápidamente lo que se asemeja a un fago con una alta tasa de adsorción. Las cepas de fagos con una mayor tasa de adsorción tienen un período de lisis más corto, lo que optimiza el proceso de destrucción bacteriana (Ranveer et al., 2024; Yazdi et al., 2020).

2.2. Aplicaciones en base a bacteriófagos como agentes de control biológico

Los bacteriófagos han sido reconocidos desde hace mucho tiempo por su potencial como agentes bioterapéuticos, controladores biológicos en distintos ambientes y ecosistemas como entornos acuáticos, suelos agrícolas, entornos clínicos, ambientes industriales (Sieiro et al., 2020). La reciente aprobación del uso de fagos como controladores biológicos de patógenos con fines de seguridad alimentaria, ha aumentado el impulso de la investigación sobre fagos para el control de la diseminación de patógenos transmitidos por alimentos (Carrias et al., 2012; Gordillo Altamirano & Barr, 2019).

Existen varios enfoques para el diseño de terapias con fagos, que se adaptan a diferentes necesidades clínicas y ambientales como controladores biológicos. como Los enfoques generales para la terapia con fagos que se han empleado incluyen: mezclas fijas de cocteles, cócteles de fagos que se modifican periódicamente para agregar actividad frente a una bacteria o bacterias objetivo, terapia con fagos personalizada como un banco de fagos y terapias con fagos adaptadas in vitro y diseñadas genéticamente (Nikolich & Filippov, 2020).

Terapia Fágica

La terapia fágica, comenzó con el tratamiento de disentería utilizando fagos. Después de ensayos en animales y pruebas de seguridad en humanos, d'Herelle expandió su uso, comprobando la seguridad del tratamiento en su familia antes de hacerlo accesible al público. Sin embargo, la terapia fágica perdió protagonismo en Europa occidental y Estados Unidos con la llegada de los antibióticos, aunque continuó utilizándose en la antigua Unión Soviética y Europa del Este (Doval, 2013; Sulakvelidze et al., 2001). La

falta de estandarización y la mala calidad de los preparados comerciales, como se evidenció con el fago T7 descubierto por Max Delbrück, contribuyeron al escepticismo y al abandono de esta terapia (Sulakvelidze et al., 2001).

Seguridad alimentaria

La seguridad alimentaria y la producción sostenible de alimentos son importantes para alcanzar los Objetivos de Desarrollo Sostenible, que buscan proteger la salud y el bienestar de las personas, los animales y el medio ambiente. Las enfermedades transmitidas por alimentos son una causa significativa de morbilidad y mortalidad, exacerbadas por la creciente crisis de resistencia a los antimicrobianos (Fenibo et al., 2021). Para avanzar hacia una producción de alimentos sostenible, es crucial implementar opciones de biocontrol ecológico que prevengan y mitiguen las enfermedades infecciosas en la producción de alimentos. Reemplazar los pesticidas, antimicrobianos y desinfectantes químicos por alternativas ecológicas y orgánicas, como los biopesticidas, es un paso hacia un futuro sostenible (Fenibo et al., 2021; Garvey, 2022).

Productos de bioconservación de fagos han sido probados contra patógenos transmitidos por alimentos como *Shigella*, *Staphylococcus*, *L. monocytogenes*, *E. coli* y especies de *Salmonella*. El cóctel de fagos ListShield™ fue aprobado por la FDA en 2006 como conservante de alimentos contra 170 cepas de *L. monocytogenes*, logrando una reducción del 95% en la viabilidad bacteriana. En 2007, la FDA aprobó el producto fago Listex P100 para su uso en productos cárnicos listos para comer, y en 2011, aprobó EcoShield™ para su uso en carnes rojas contra *E. coli* O157. SalmoFresh™, desarrollado contra *Salmonella enterica*, es utilizado para el biocontrol de frutas, verduras y mariscos. Otros productos, como ShigaShield™, están en revisión para ser clasificados como Generalmente Reconocidos como Seguros (GRAS) (Garvey, 2022; Tang et al., 2019).

Control de Fitopatógenos

Los fitopatógenos causan enfermedades, pérdidas de cultivos, escasez de alimentos y pérdidas económicas significativas a nivel mundial. Entre los patógenos bacterianos asociados con las enfermedades infecciosas agrícolas se encuentran *Pseudomonas* spp.,

Xanthomonas spp., *Erwinia* spp., *Ralstonia* spp., *Agrobacterium* spp., *Xylella* spp., *Pectobacterium* spp. y *Dickeya* spp. (Sieiro et al., 2020). Actualmente, se utilizan antibióticos como la estreptomicina y tetraciclinas, junto con pesticidas para prevenir estas enfermedades, lo que contribuye a la contaminación ambiental y la proliferación de resistencia a los antimicrobianos. (Garvey, 2022).

En 2005, la FDA aprobó el producto basado en bacteriófagos Agriphage™ de OmniLytics Inc. para tratar la enfermedad de la mancha bacteriana en cultivos (Połaska & Sokołowska, 2019). Fagos como vB_DsoM_LIMEstone1 y vB_DsoM_LIMEstone2 han demostrado ser eficaces contra la podredumbre blanda en cultivos de papas. Además, cócteles de fagos han mostrado efectividad contra patógenos en rábanos, cebollas, lechugas, puerros, arroz y tomates. (Garvey, 2022; Sieiro et al., 2020).

Uso de Fagos en la Acuicultura

El uso de fagos como agentes de control biológico en la acuicultura ha demostrado ser eficaz a través de diversas aplicaciones, incluyendo la administración directa en el agua, los alimentos y la inyección (Garvey, 2022). El fago VPp1 y A3S y Vpms1 han controlado la diseminación de *V. parahaemolyticus* en ostras y camarones, al igual que el fago PpW-4, administrado a través del alimento para peces, ha combatido la enfermedad de ascitis hemorrágica. Varios estudios han demostrado la eficacia del fago PSV-D22 para tratar *F. psychrophilum* presente en huevos o alevines de peces. Las enfermedades infecciosas en la acuicultura causadas por el género *Vibrio* también han demostrado ser susceptibles al biocontrol con fagos (Nachimuthu et al., 2021). Proteon Pharmaceuticals ha desarrollado un producto comercial de fagos, BAFADOR®, para eliminar infecciones por *Pseudomonas* y *Aeromonas* en la acuicultura. (Garvey, 2022).

Enzimas Fágicas como Agentes de Biocontrol

Los bacteriófagos codifican enzimas que degradan la pared celular bacteriana, divididas en hidrolasas de peptidoglicano asociadas al virión (VAPGH) y endolisinas. Las VAPGH facilitan la infección del fago al perforar la envoltura celular bacteriana, permitiendo la inserción del material genético del fago. Estas enzimas incluyen sialidasas, ramnosidasas,

levanasas, xilanasas y dextranasas (Rodríguez-Rubio et al., 2013). Las endolisinas degradan el peptidoglicano de la pared celular bacteriana al final del ciclo lítico, resultando en la lisis celular y la liberación de nuevos fagos (Garvey, 2022).

Las endolisinas son eficaces contra bacterias Gram-positivas, pero encuentran obstáculos en la membrana externa de las bacterias Gram-negativas. Para superar esto, se pueden usar desestabilizadores de la membrana externa, como EDTA y ácidos orgánicos. Ejemplos de endolisinas eficaces incluyen LysH5 y LysCSA13 contra biopelículas de *Staphylococcus* y Ply6A3 contra la sepsis por *A. baumannii* en modelos de ratón. Algunas endolisinas han mostrado actividad contra bacterias Gram-negativas en ausencia de desestabilizadores, como SPN9CC contra *E. coli* y LysAB2 contra *A. baumannii* (Loponte et al., 2021).

A pesar del prometedor potencial de los fagos como potencial controlador biológico en distintos ambientes, uno de los principales desafíos que enfrenta este enfoque es la aparición de resistencia a los fagos. Al igual que las bacterias pueden desarrollar resistencia a los antibióticos, también pueden evolucionar mecanismos que les permitan evadir la acción de los fagos. Esta resistencia afecta la efectividad de los tratamientos y plantea una serie de retos para el desarrollo y la implementación de terapias fágicas (Garvey, 2022). A continuación, se explorarán las principales causas y mecanismos de resistencia a los fagos, así como las estrategias actuales para abordar este desafío en la práctica clínica y en la investigación científica.

2.3. Resistencia a los fagos: causas y desafíos

La resistencia a los fagos es un fenómeno que, al igual que la resistencia a los antibióticos, presenta un desafío significativo en el tratamiento de infecciones bacterianas. A pesar de la efectividad inicial de la terapia con fagos, algunas bacterias pueden desarrollar mecanismos de defensa que las hacen resistentes a estos virus bacterianos (Burmeister et al., 2020).

Mutaciones en los Receptores Bacterianos

Las bacterias pueden alterar las estructuras superficiales que los fagos utilizan para unirse e infectar. Las mutaciones en los genes que codifican estas proteínas receptoras pueden impedir que el fago se adhiera, volviendo a la bacteria resistente a la infección por fagos

específicos (Anand, 2022).

Sistemas de Restricción-Modificación

Estos sistemas bacterianos reconocen y degradan el ADN extracelular, incluyendo el de los fagos, una vez que ha ingresado en la célula bacteriana. Las bacterias con sistemas de restricción-modificación activos pueden destruir el material genético de los fagos, evitando así la replicación del fago dentro de la célula huésped (Garvey, 2022).

Sistemas CRISPR-Cas:

Este mecanismo adaptativo permite a las bacterias recordar y defenderse de infecciones por fagos. El sistema CRISPR-Cas almacena fragmentos de ADN de fagos y utiliza esta información para reconocer y cortar el ADN de fagos en futuras infecciones (Vale & Little, 2010).

Producción de Inhibidores de Fagos

Algunas bacterias pueden producir proteínas específicas que inhiben la replicación de los fagos dentro de la célula. Estos inhibidores pueden interferir en varios pasos del ciclo de vida del fago, desde la inyección de ADN hasta el ensamblaje de nuevas partículas virales.

La aparición de resistencia a los fagos subraya la necesidad de estrategias terapéuticas dinámicas y adaptables. Los cócteles de fagos a partir de un banco de bacteriófagos, con diferentes mecanismos de acción, pueden reducir la probabilidad de que las bacterias desarrollen resistencia. Además, la constante vigilancia y actualización de los cócteles de fagos son esenciales para mantener su efectividad contra las cepas bacterianas en circulación (Garvey, 2022).

2.4. Banco de bacteriófagos en países en vías de desarrollo

A lo largo del siglo pasado, distintas instituciones han creado grandes depósitos de fagos dirigidos a una amplia gama de especies bacterianas. Los bancos de fagos más conocidos incluyen el Instituto Eliava de Bacteriófagos, Microbiología y Virología en Georgia, que alberga más de 1,000 fagos, y el Instituto Hirsfeld de Inmunología y Terapia Experimental en Polonia, con más de 850 fagos. Estos bancos han tratado a decenas de miles de pacientes, ofreciendo tanto terapias personalizadas como cócteles de fagos

preestablecidos (Eliava, 2024; Weber-d & Mi, 2020). Los cócteles preestablecidos se actualizan semestralmente para asegurar su efectividad contra las bacterias en circulación, y este enfoque puede ser especialmente valioso para países en desarrollo debido a su capacidad para proporcionar tratamientos accesibles y eficientes(Weber-d & Mi, 2020).

En los últimos años, nuevos bancos de fagos han surgido con el objetivo específico de proporcionar tratamientos a pacientes individuales, financiados por subvenciones gubernamentales y donaciones privadas. Estos incluyen el Hospital Militar Reina Astrid en Bélgica, el Centro de Investigación Médica de la Marina de los EE. UU., el Instituto de Investigación del Ejército Walter Reed, la Universidad Hebrea y el Centro Médico Hadassah en Israel, el Fagenbank en los Países Bajos, el Baylor College of Medicine en los EE. UU. (a través de la iniciativa TAILΦR), y la Red Australiana de Biobancos de Fagos (Abdalahman et al., 2020; Djebara et al., 2019; Nagel et al., 2020). Estos bancos permiten el uso de fagos en tratamientos combinados, en ensayos clínicos, y algunos han establecido vías regulatorias específicas (Johnson, 2020).

Los fagos son adecuados para los países en desarrollo debido a que la producción de fagos es relativamente económica comparada con la producción de antibióticos y otros agentes antimicrobianos. Pueden aislarse localmente utilizando equipos de laboratorio que están fácilmente disponibles para los institutos de investigaciones de los países en desarrollo. Es mejor aislar los fagos en la región donde se utilizarán, ya que los fagos se adaptan naturalmente a las cepas de bacterias hospederas que han evolucionado localmente (Nagel et al., 2020).

Chile cuenta con un banco de fagos (PhageLab) para su aplicación en distintos entornos. PhageLab realiza formulaciones de cócteles de bacteriófagos altamente específicos diseñados para combatir infecciones. La primera aplicación de cócteles fue en la industria bovina para controlar *Salmonella* y *Escherichia coli* continuando con la aplicación en el mercado avícola, destinado al control de las mismas bacterias (Flores, 2024).

Los bancos de fagos podrían facilitar el control nacional o regional de fagos, ayudando a manejar brotes de resistencia a los antibióticos, patógenos en animales, tratamientos agrícolas y veterinarios, y patógenos bacterianos en plantas alimentarias (Nagel et al., 2020). Los bancos, deberían ser recursos nacionales que cumplan con los estándares

internacionales administrado por una autoridad central dentro de cada país en universidades o instituciones de investigación financiadas por el gobierno y respaldados con fondos públicos y filantrópicos, como los ejemplos que se están probando actualmente en Bélgica, los EE. UU., Israel, los Países Bajos y Australia (Murray et al., 2022; Nagel et al., 2020).

2.5. Características de un banco de bacteriófagos

Un banco de fagos proporciona acceso a bibliotecas de fagos con mecanismos eficaces frente a distintas bacterias patógenas. Atiende la demanda de datos de referencia a nivel nacional y mundial (Lin et al., 2021). Entre las características claves para un banco nacional de fagos incluye:

Gobernanza centralizada

Una red efectiva para el uso de fagos debe incluir a todos los miembros y partes interesadas en la toma de decisiones, aplicar un enfoque uniforme con descripciones estandarizadas de los fagos, sus rangos de hospedador. Además, es crucial cumplir con el protocolo de Nagoya, que regula el acceso y la distribución de beneficios de los recursos genéticos (Lajaunie & Ho, 2018; Lin et al., 2021).

Protocolos estandarizados para el aislamiento, purificación

La caracterización y procesamiento de la calidad de las colecciones de fagos deberán incluir detalles sobre los protocolos de almacenamiento y transporte. Una plataforma integrada que use Inteligencia Artificial y Tecnología de Libro Mayor Distribuido, junto con sistemas de gestión de calidad como la acreditación ISO 9001, asegura una auditoría efectiva y confianza entre los usuarios y partes interesadas. (Lin et al., 2021).

Definiciones normalizadas

El Subcomité de Virus Bacterianos y Arqueales del Comité Internacional de Taxonomía de Virus, establece una nomenclatura para los genomas de fagos y una anotación para las secuencias de fagos (Lin et al., 2021).

Diagnóstico complementario

Las aplicaciones en el área clínica probar combinaciones de fagos con otros fagos y/o

antibióticos para identificar posibles sinergias. Para coordinar estos diagnósticos de manera más eficiente, es útil almacenar especímenes de referencia, como fagos y cepas bacterianas clave, en un depósito centralizado (Lin et al., 2021).

Gestión de datos

Para gestionar el inventario en una red distribuida, se necesita una gestión de datos estandarizada y un Sistema de Gestión de la Información de Laboratorio (LIMS) eficiente. Una plataforma de navegación de bioespecímenes facilita la búsqueda centralizada de la ubicación de los fagos (Lin et al., 2021).

Fabricación y Bioprocesamiento

La eficacia de diversas vías de administración de fagos ha sido comprobada, pero las terapias parenterales, como las intravenosas o nebulizadas, requieren preparaciones de alta pureza y libres de endotoxinas de fagos individuales o cócteles de fagos, siguiendo estándares de Buenas Prácticas de Fabricación (GMP) (Lin et al., 2021).

En este contexto, es importante contar con una colección de bacteriófagos adecuados para el control de diferentes cepas bacterianas patógenas principalmente. La distribución de patógenos en los nichos ecológicos, depende del impacto de la contaminación biológica hecha al medio ambiente, que determina finalmente el riesgo de diseminación. La posibilidad de usar bacteriófagos o cocteles de bacteriófagos, por ejemplo, en plantas de tratamiento de aguas residuales, permite controlar bacterias patógenas resistentes a antibióticos y que se hallan de forma ubicua en la naturaleza, tal es el caso de *E.coli*, considerada como bioindicador de contaminación fecal y potencial indicador de la diseminación de genes de resistencia antimicrobiana (Anjum et al., 2021).

3. *E. coli* como un Contaminante Ambiental Ubicuo: Bioindicador Ideal de Contaminación Fecal y Resistencia Antimicrobiana

La contaminación ambiental afecta de manera significativa diversos entornos, incluyendo suelos, sedimentos, tierras agrícolas, plantas de tratamiento de aguas residuales y cuerpos de agua, como fuentes de agua potable, áreas recreativas y aguas subterráneas. En muchos países en desarrollo, las aguas residuales no tratadas se descargan directamente en cuerpos de agua superficiales, lo que puede llevar a la infiltración de contaminantes en el suelo y

comprometer la seguridad del agua subterránea utilizada para beber y fines agrícolas.

La contaminación del agua potable es una de las principales causas de mortalidad especialmente entre los niños pequeños. Identificar fuentes de agua contaminada sigue siendo un desafío importante, particularmente en regiones con recursos limitados (Unión Europea, 2006). *Escherichia coli* (*E. coli*) es un indicador clave en las directrices de la OMS para aguas recreativas debido a su capacidad para señalar la contaminación fecal de origen humano y animal. *E. coli* es eficaz como indicador porque, aunque está presente en concentraciones bajas en el medio ambiente, tiene una alta tasa de supervivencia (WHO, 2009).

La diversidad de *E. coli* parece ser mayor en aguas superficiales en comparación con las aguas residuales, aunque la resistencia antimicrobiana es más prevalente en las aguas residuales (Delgado-Blas et al., 2021; Hutinel et al., 2019). Estas observaciones subrayan la importancia de *E. coli* no solo como un indicador de la contaminación fecal, sino también como una herramienta para entender mejor la dinámica y la propagación de la resistencia a los antimicrobianos en diferentes entornos ambientales por lo cual se lo puede considerar como un potencial indicador de resistencia antimicrobiana (Anjum et al., 2021).

La OMS y otros organismos han establecido límites para la presencia de bacterias en el agua destinada al consumo humano. Según estas directrices, toda el agua potable no debe contener bacterias coliformes termotolerantes ni *E. coli* detectable en una muestra de 100 mL. Los métodos más utilizados para detectar coliformes en muestras de agua incluyen la filtración por membrana y la fermentación en tubos múltiples, utilizando el método del Número Más Probable (NMP) (Alonzo et al., 2022).

3.1.E. coli en el contexto de la Normativas y Estándares de Calidad del Agua para Consumo Humano y Uso Agrícola

En la lucha por garantizar la seguridad del agua y los alimentos, la calidad microbiológica es un aspecto crítico. Las normativas y estándares de calidad del agua y los alimentos han sido desarrollados para proteger la salud pública, especialmente en contextos agrícolas y de consumo humano (Hernández-Crespo et al., 2022).

Normas Internacionales y Nacionales de Calidad del Agua

La OMS y muchos organismos internacionales han establecido normas o estándares para las concentraciones máximas admisibles de distintas sustancias en el agua potable sobre coliformes fecales (OMS, 2022). Según la Organización Panamericana de la Salud (OPS) el límite máximo permisible de coliformes totales es de 1000 UFC/100 mL en aguas destinadas a riego de vegetales de tallo corto (como la espinaca, lechuga, brócoli) (B & G, 2010).

El Reglamento en Materia de Contaminación Hídrica (RMCH) de la Ley del Medio Ambiente N° 1333 de Bolivia clasifica los cuerpos de agua según su aptitud de uso, desde aguas de máxima calidad aptas para consumo humano sin tratamiento hasta aguas de calidad mínima que requieren tratamientos extensivos para ser seguras (Lieberman et al., 2021), En el caso de la contaminación fecal para cada cuerpo de agua tienen los siguientes parámetros:

- Clase “A”: Aguas naturales de máxima calidad, que las habilita como agua potable para consumo humano sin ningún tratamiento previo, o con simple desinfección bacteriológica en los casos necesarios verificados por laboratorio (<50 N/100 mL).
- Clase “B”: Aguas de utilidad general, que para consumo humano requieren tratamiento físico y desinfección bacteriológica (<1000 N/100mL).
- Clase “C”: Aguas de utilidad general, que para ser habilitadas para consumo humano requieren tratamiento físico químico completo y desinfección bacteriológica (<5000 N/100 mL).
- Clase “D”: Aguas de calidad mínima, que para consumo humano en casos extremos de necesidad pública requieren un proceso inicial de pre-sedimentación por el elevado contenido de sólidos en suspensión, luego tratamiento físico químico completo y desinfección bacteriológica especial contra huevos y parásitos intestinales (<50000 N/100 mL).

Para garantizar la seguridad y calidad del agua, es crucial adherirse a los Valores Máximos Admisibles de Parámetros en Cuerpos Receptores establecidos en el Reglamento en Materia de Contaminación Hídrica (Lieberman et al., 2021).

Criterios Microbiológicos de Coliformes fecales para la Inocuidad de Alimentos

Una amplia gama de alimentos pueden ser un vehículo para *E. coli* patógena en conjunto con sus respectivas ecologías. Los alimentos pueden contaminarse de manera directa o por contaminación cruzada durante la cosecha (hortalizas), recolección (leche) o faenado (carne). Se puede producir una contaminación adicional durante la manipulación pos-cosecha, transporte, elaboración y manipulación no higiénica de alimentos durante su preparación (FAO, 2011).

El Reglamento Técnico Centroamericano sobre Criterios Microbiológicos para la Inocuidad de Alimentos, alineado con los estándares del Codex Alimentarius, establece límites específicos para la presencia de *E. coli* en alimentos, asegurando así que frutas y hortalizas cumplan con estándares de seguridad que protejan a los consumidores. Este reglamento establece que la concentración máxima permisible de *E. coli* es de 100 UFC/g en frutas y hortalizas (Codex, 1996).

Para mejorar la vigilancia sanitaria y garantizar la seguridad alimentaria, la contaminación de alimentos se clasifican según su riesgo de causar daño a la salud, basado en su naturaleza, composición, proceso de producción, manipulación y la población a la que están dirigidos:

- Alimento Riesgo tipo A: Comprende los alimentos, que por su naturaleza, composición, proceso, manipulación y población a la que va dirigida, tienen una alta probabilidad de causar daño.
- Alimento Riesgo tipo B: Comprende los alimentos que por su naturaleza, composición, proceso, manipulación y población a la que va dirigida, tienen una media probabilidad de causar daño.
- Alimento Riesgo tipo C: Comprende los alimentos que por su naturaleza, composición, proceso, manipulación y población a la que va dirigida, tienen una baja probabilidad de causar daño.

El uso de agua contaminada para irrigar cultivos puede resultar en la contaminación directa de verduras, especialmente aquellas consumidas crudas como lechugas y espinacas. Esto aumenta el riesgo de brotes de enfermedades transmitidas por alimentos,

ya que *E. coli* patógena puede causar infecciones graves, especialmente en poblaciones vulnerables como niños y ancianos. Por lo tanto, la vigilancia y el control de la calidad del agua y los alimentos son esenciales para prevenir la propagación de esta bacteria y proteger la salud pública.

3.2. Características generales de *E. coli*

La primera descripción de la especie bacteriana *Escherichia coli* fue por el pediatra alemán Theodor Von Escherich en 1895 tras ser aislada de un niño. *E. coli* es un bacilo Gram negativo perteneciente a la familia Enterobacteriaceae, anaerobio facultativo, oxidasa negativa, indol positivo capaz de fermentar la glucosa y la lactosa. Forma parte de la microbiota intestinal facultativa de los humanos y animales de sangre caliente. Es una de las primeras especies bacterianas en colonizar al recién nacido a partir del tracto urogenital de la madre durante el parto, las colonizaciones posteriores se deben a bacterias procedentes de los alimentos ingeridos. En humanos, el contenido de *E. coli* por gramo de heces oscila entre 10^7 - 10^9 siendo en animales domésticos un poco inferior 10^4 - 10^7 (Leekitcharoenphon et al., 2021).

3.2.1. Patotipos: cepas patógenas intestinales de *E. coli*

E. coli puede causar infecciones sistémicas ya que codifican genes de virulencia específicos que las hacen capaces de causar enfermedades. El primer grupo importante de *E. coli* patógena causa síntomas característicos de la enfermedad gastrointestinal y consta de patotipos de *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* productora de toxina Shiga (STEC) y un subgrupo de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) y *E. coli* difusivamente adhesiva (DAEC). El segundo grupo principal de *E. coli* patógena comprende *E. coli* patógena extraintestinal (ExPEC) y *E. coli* uropatógena (UPEC) (Pokharel et al., 2023).

E. coli Enteropatógena (EPEC)

EPEC causa diarrea acuosa infecciosa, frecuentemente acompañada de fiebre, vómitos y deshidratación en niños menores de 2 años. EPEC se adhiere a las células epiteliales del intestino delgado para inducir la degeneración de las microvellosidades y altera la morfología normal de la región apical del enterocito a través de dos factores de virulencia

importantes de: los pelos formadores de penachos (BFP, por sus siglas en inglés) y el flagelo. Las infecciones pueden persistir más de dos semanas, resultando en pérdida de peso y desnutrición (Vidal et al., 2008).

E. coli Productora de Toxina Shiga (STEC)

La STEC se caracteriza por la presencia de genes de toxina Shiga 1 o 2. Estos patógenos pueden causar desde diarrea acuosa leve hasta diarrea sanguinolenta y colitis hemorrágica, con riesgo de síndrome hemolítico urémico (HUS). El serogrupo más común, O157, ha sido responsable de varios brotes importantes. Las infecciones son generalmente autolimitadas, resolviéndose en 7 días. El tratamiento es de soporte, y no se recomienda el uso de antibióticos. Se están desarrollando tratamientos alternativos, como el uso de anticuerpos monoclonales (Alonso, 2018).

E. coli Enterotoxigénica (ETEC)

ETEC es una causa principal de diarrea del viajero y es endémica en países subdesarrollados, afectando gravemente a los niños. Este patotipo produce enterotoxinas termoestables o termolábiles y utiliza factores de colonización para adherirse al epitelio intestinal. La infección provoca diarrea acuosa que puede llevar rápidamente a la deshidratación, acompañada de fiebre, calambres abdominales y vómitos (I et al., 2012).

E. coli Enteroinvasiva (EIEC)

EIEC, similar a *Shigella* spp., causa disentería bacilar al invadir las células epiteliales y propagarse de célula a célula. La infección inicialmente se presenta con diarrea acuosa, fatiga y fiebre, seguida de deshidratación, calambres abdominales y heces con sangre y moco. La mayoría de las infecciones son autolimitadas, pero pueden surgir complicaciones graves como perforación intestinal y peritonitis (I et al., 2012)

E. coli Enteroagregativa (EAEC)

EAEC, identificada en la década de 1980, causa diarrea persistente en niños de áreas endémicas y en pacientes con VIH, siendo también una causa importante de diarrea del viajero. Este patotipo utiliza adhesinas fimbriales y enterotoxinas para adherirse y causar enfermedad. Las infecciones se presentan con diarrea acuosa con moco, fiebre, vómitos y

dolor abdominal. Los casos persistentes pueden llevar a desnutrición (Alonso, 2018).

E. coli de Adherencia Difusa (DAEC)

DAEC causa diarrea al adherirse a las células epiteliales sin seguir patrones clásicos de adherencia. Su rol exacto como patotipo requiere más estudios epidemiológicos debido a dificultades en su clasificación e identificación (Pokharel et al., 2023).

Infecciones Extraintestinales por E. coli (ExPEC)

ExPEC, especialmente *E. coli* uropatógena (UPEC), es común en infecciones fuera del tracto intestinal, incluyendo ITUs y infecciones sistémicas como bacteriemia y meningitis neonatal. ExPEC muestra diversidad genómica y utiliza una variedad de factores de virulencia, como toxinas, para infectar. UPEC es la principal causa de ITUs, especialmente en mujeres, y puede ser transmitida a través de actividades sexuales o alimentos contaminados. El tratamiento de ExPEC incluye antibióticos como cefalosporinas de tercera generación y fluoroquinolonas, aunque se observa resistencia creciente (Pokharel et al., 2023)

E. coli uropatógena (UPEC)

UPEC es causante de infecciones urinarias especialmente en mujeres causando el 90% de las ITU comunitarias y el 50% de las hospitalarias. UPEC muestra alta diversidad genética y contiene factores de virulencia como fimbrias tipo 1 y P, adhesinas, hemolisina, sideróforos y la cápsula K1. *E. coli* asciende al área periuretral, facilitada por adhesinas que permiten la adherencia a las células uroepiteliales. Toxinas como la hemolisina y el factor necrotizante citotóxico también contribuyen a la colonización. Estos factores varían entre subgrupos, sugiriendo múltiples mecanismos de patogénesis (Pokharel et al., 2023).

3.3. Resistencia antimicrobiana por *E. coli*

Aunque generalmente es susceptible a casi todos los agentes antimicrobianos de importancia clínica, *E. coli* demuestra una alta capacidad para adquirir resistencia genética, especialmente mediante la transferencia horizontal de genes. En las últimas décadas se ha reportado la aparición de *E. coli* multidrogo-resistentes en varios países. El principal mecanismo de resistencia corresponde a la producción de enzimas β -lactamasas

de espectro extendido (BLEE), transmitidas por plásmidos que confiere resistencia a las cefalosporinas de amplio espectro (Majumder et al., 2021).

Una amplia gama de agentes antimicrobianos inhibe eficazmente el crecimiento de *E. coli*. Las β -lactamas, fluoroquinolonas, aminoglucósidos y trimetoprima-sulfametoxazol se utilizan comúnmente para tratar infecciones comunitarias y hospitalarias. Las β -lactamas interrumpen la síntesis de la pared celular al unirse a proteínas de unión a la penicilina, esenciales para la formación del peptidoglicano. Las fluoroquinolonas interfieren con el superenrollamiento del ADN y promueven la ruptura del ADN bicatenario. Los aminoglucósidos se unen irreversiblemente a la subunidad ribosómica 30S, inhibiendo la síntesis proteica bacteriana (Nasrollahian et al., 2024).

C. Marco conceptual

Bacteriófago: Virus que infecta y replica dentro de bacterias.

Lítico: Ciclo de vida del bacteriófago en la que destruye la célula bacteriana huésped durante la liberación de nuevas partículas virales.

Lisis: Ruptura o destrucción de una bacteria.

Control Biológico: Uso de organismos vivos, en este caso, bacteriófagos, para controlar el crecimiento o la proliferación de bacterias.

Unidad formadora de colonia (UFC): Estimación del número de organismos vivos presentes en la muestra que tienen la capacidad de formar colonias bajo las condiciones específicas de cultivo utilizadas.

Unidad formadora de placa (UFP): Indica el número de partículas virales capaces de infectar células y formar placas de lisis en cultivos bacterianos.

Resistencia: Capacidad de las bacterias para resistir los efectos de los antibióticos, lo que dificulta el tratamiento de las infecciones

Banco de Bacteriófagos: Colección de diferentes bacteriófagos líticos específicos para ciertos patógenos. Puede ser utilizado como una fuente para seleccionar fagos específicos para el control de cepas resistentes.

Aislamiento: Proceso de obtener y purificar bacteriófagos específicos a partir de muestras ambientales.

Especificidad: La capacidad de un bacteriófago para infectar selectivamente una especie o cepa bacteriana específica.

Interacción Hospedero-Fago: La relación entre el bacteriófago y la bacteria hospedera.

Propagación: Proceso de aumentar la cantidad de bacteriófagos en una muestra.

Multiplicidad de infección (MOI): Relación entre el número de partículas virales y el número de bacterias hospedadoras, indica cuántas partículas virales están presentes en relación con el número de bacterias susceptibles a la infección.

III. Formulación de las hipótesis de investigación

Hipótesis Nula (H_0)

Ninguno de los bacteriófagos aislados de aguas superficiales y heces de aves de corral, son efectivos como agentes de control biológico contra cepas de *Escherichia coli* resistentes a antibióticos y otros patógenos.

Hipótesis Alternativa (H_i)

Los bacteriófagos aislados de aguas superficiales y heces de aves de corral, son efectivos como agentes de control biológico contra cepas de *Escherichia coli* resistentes a antibióticos y otros patógenos.

IV. Operacionalización de las variables de estudio.

Caracterizar cepas de <i>E.coli</i> aisladas de muestras de aguas, suelos contaminados de granjas avícolas y cultivos agrícolas como bioindicadores de contaminación fecal y de resistencia antimicrobiana.					
Variable	Definición	Dimensión	Indicador	Unidad de Medida	Tipo de Variable
Resistencia antimicrobiana de <i>Escherichia coli</i> .	Capacidad de las cepas de <i>E. coli</i> para presentar resistencia a diferentes antimicrobianos.	Tamaño del halo de inhibición.	Diámetro de inhibición en mm.	Categoría de resistencia (Resistente, Intermedia, Susceptible).	Cualitativa nominal
Secuenciación de cepas aisladas	Técnica para identificar bacterias, mediante la secuenciación del gen 16S rRNA.	Similitud con secuencias de referencia 16S rRNA.	Porcentaje de identidad.	Porcentaje %	Cualitativa nominal
Caracterizar bacteriófagos aislados a partir de muestras de aguas y suelos contaminados de granjas avícolas y cultivos agrícolas como potenciales controladores de la proliferación de cepas aisladas de <i>E. coli</i> resistentes a antibióticos.					
Actividad Lítica frente a Cepas <i>E. coli</i>	Capacidad de los fagos aislados de lisar las cepas aisladas de <i>E. coli</i> multidrogo-resistentes.	Halos de lisis o placas.	Reducción del porcentaje de células viables.	Unidades formadoras de placa/ mililitro (UFP/mL).	Cuantitativa continua
Rango de Hospedero	Indica qué bacterias pueden ser lisadas por un bacteriófago.	Halos de lisis en placas de agar de diferentes cepas.	Reducción del porcentaje de células viables.	Unidades formadoras de placa UFP	Cuantitativa discreta
Estabilidad a Diferentes Temperaturas:	Capacidad de los fagos para mantener su actividad lítica a diferentes temperaturas.	Halos de lisis después del tratamiento en placas de agar.	Reducción del porcentaje de células viables.	Unidades formadoras de placa/Unidades formadoras de colonia. UFP/UFC, tiempo horas.	Cuantitativa continua
Estabilidad a Diferentes pH	Capacidad de los fagos para mantener su actividad lítica en diferentes pH.	Halos de lisis después del tratamiento en placas de agar.	Reducción del porcentaje de células viables.	Unidades formadoras de placa/Unidades formadoras de colonia. UFP/UFC, tiempo horas.	Cuantitativa continua
Evaluar la capacidad lítica de un bacteriófago aislado como modelo de caracterización de la eficiencia como controlador biológico.					
Multiplicidad de infección (MOI)	Número de fagos por célula hospedadora.	Número de fagos por célula infectada.	Densidad óptica	DO λ 600 nm Hora	Cuantitativa continua.
Área bajo la curva	Es una medida cuantitativa de bacterias lisadas por los fagos durante un periodo de tiempo	Número de fagos por célula infectada.	Densidad óptica	DO λ 600 nm Hora	Cuantitativa continua.

V. Diseño metodológico.

A. Población en estudio, ámbito y periodo de investigación

La población en estudio comprende bacteriófagos y cepas de *Escherichia coli* aisladas del río La Paz, verduras de la localidad de Mecapaca y heces de aves de corral de la localidad de Sorata. Se seleccionarán bacteriófagos específicos con potencial actividad contra cepas de *E. coli* multidrogo-resistentes presentes en estos ambientes. Se tomaron muestras de agua superficiales y sedimentos del Río La Paz, cultivos agrícolas y muestras de heces de aves de corral en granjas avícolas para evaluar la presencia y actividad de bacteriófagos durante las gestiones 2022-2023.

B. Tipo de investigación

El tipo de investigación que se realizará es de tipo “experimental”, según el diseño “transversal” y según el propósito “descriptiva”.

C. Materiales, métodos, técnicas y procedimientos a ser empleados

1. Determinación del perfil de resistencia y susceptibilidad a antimicrobianos de las cepas de *Escherichia coli* aisladas.

1.1. Obtención de muestras

Las muestras se recolectaron de heces de aves de corral en la localidad de Sorata, sedimentos obtenidos del río La Paz y cultivos agrícolas de la localidad de Mecapaca, las muestras se trasladaron al laboratorio en un lapso de 1 hora en cadena de frío.

1.2. Aislamiento de cepas de *E. coli* a partir de heces y condiciones de cultivo bacteriano

Las muestras de heces se recolectaron en tubos de centrifuga de 50 mL con Soft-agar (0,6 % p/v). Un asa llena de la suspensión de cultivo se sembró en agar MacConkey y medio CHROMAgar® ECC, se incubó durante 18 h a 42 °C. Al día siguiente, las colonias lisas, circulares convexas de color rosa en agar MacConkey y las colonias azules del medio CHROMAgar® ECC se subcultivaron en agar eosina azul de metileno (EMB). Posteriormente, las colonias con brillo verde metálico en EMB se caracterizaron microscópicamente usando la tinción de Gram e identificación mediante pruebas

bioquímicas como agar Citrato de Simmons, agar hierro tres azucres (TSI), agar lisina hierro (LIA), agar sulfuro de hidrogeno indol motilidad (SIM) y caldo urea. Las cepas identificadas se cultivaron en caldo Luria-Bertani (LB) y con agitación a 180 rpm a 37 °C para la incubación durante 8 h, posterior fueron almacenadas con glicerol al 80 % a -80°C (figura 3).

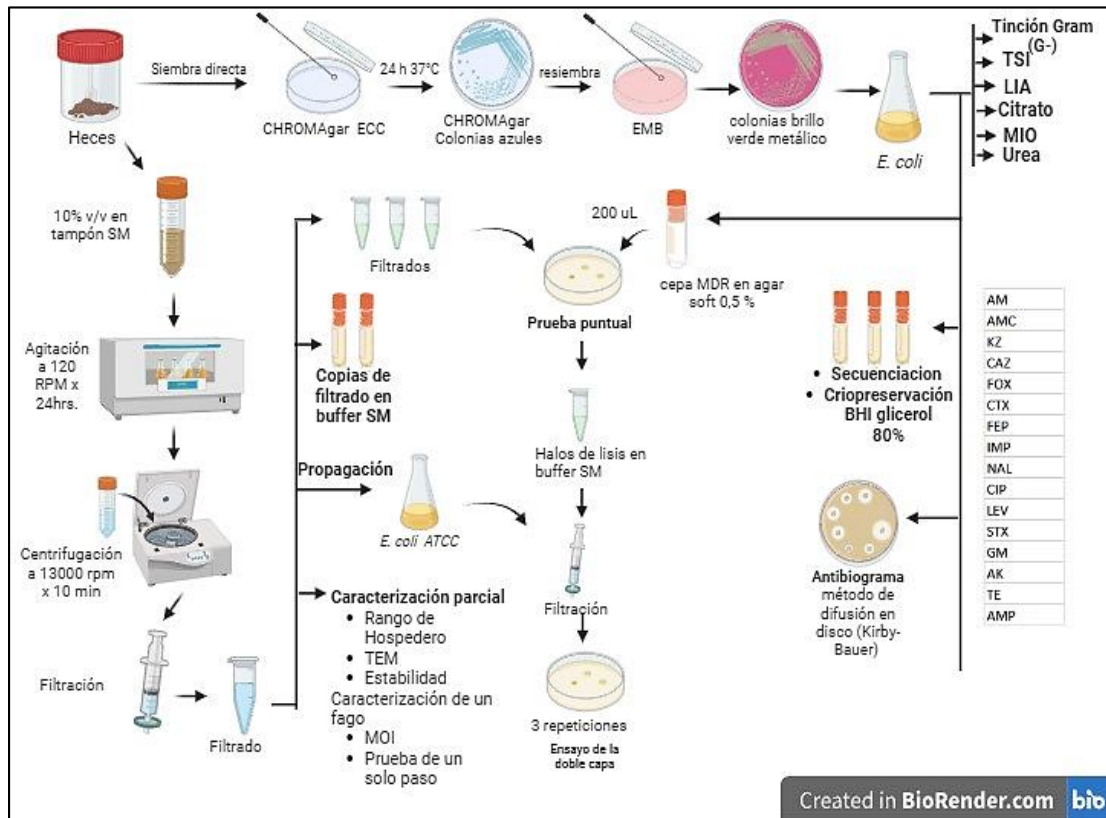


Figura 3. Metodología empleada en el alistamiento y caracterización de cepas de *E. coli* y bacteriófagos.

1.3. Aislamiento de cepas de *E. coli* a partir de aguas residuales y condiciones de cultivo bacteriano

Se recolectaron 150 mL de agua del río La Paz. Se realizaron diluciones 1:10 con solución fisiológica en cinco tubos de ensayo 10^1 , 10^2 , 10^3 y 10^4 y 10^5 . De las diluciones realizadas solo se filtraron 1000 μ L de las tres últimas, en membranas de 0,22 μ m las mismas que fueron pasadas a placas con medio CHROMAgar® ECC, se incubaron a 42 °C durante 24 h. Se realizó el repique de las colonias azules utilizando la técnica de estría de agotamiento sobre el medio CHROMAgar® ECC (1,2 % p/v), se cultivó a 42°C durante 24 h. Las colonias axénicas de color azul se tiñeron usando el kit de tinción de

Gram y se realizaron pruebas bioquímicas como agar Citrato de Simmons, agar hierro tres azúcares (TSI), agar lisina hierro (LIA), agar sulfuro de hidrogeno indol motilidad (SIM) y caldo urea. Las colonias se cultivaron en caldo Luria-Bertani (LB) se incubaron a 37°C en agitación a 180 rpm durante 8 h, posterior fueron almacenadas con glicerol al 80 % a -80°C.

1.4. Aislamiento de cepas de *E. coli* a partir de muestras de verduras y condiciones de cultivo bacteriano

Las muestras de verduras se recolectaron en balsas de cierre hermético. En el laboratorio, se colocaron las muestras en envases con solución fisiológica y se los dejó en agitación durante 1 hora. Posterior, con un asa llena de la suspensión se sembró en agar MacConkey y medio CHROMAgar® ECC, se incubó durante 18 h a 42 °C. Al día siguiente, las colonias lisas, circulares convexas de color rosa en agar MacConkey y las colonias azules del medio CHROMAgar® ECC, se subcultivaron en agar eosina azul de metileno (EMB). Posteriormente, las colonias con brillo verde metálico en EMB se caracterizaron microscópicamente usando la tinción de Gram e identificación mediante pruebas bioquímicas como agar Citrato de Simmons, agar hierro tres azúcares (TSI), agar lisina hierro (LIA), agar sulfuro de hidrogeno indol motilidad (SIM) y caldo urea. Las cepas identificadas se cultivaron en caldo Luria-Bertani (LB) y con agitación a 180 rpm a 37 °C para la incubación durante 8 h, posterior fueron almacenadas con glicerol al 80 % a -80°C.

1.5. Secuenciación de las cepas aisladas

Para la identificación de las cepas aisladas, se llevó a cabo la amplificación por PCR y la secuenciación del gen 16S rRNA con secuenciación ONT (Oxford Nanopore Technologies). Las secuencias obtenidas se analizaron utilizando herramientas bioinformáticas como: EPI2ME (v5.1.14, ONT), OmicsBox (v2.0, BioBam) y BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). La secuenciación se realizó usando un kit de secuenciación con barcodes (Native Barcoding Kit, ONT). Las bibliotecas de ADN se secuenciaron en celdas de flujo FLO-MIN114 durante 28 h. Los archivos RAW obtenidos pasaron por un proceso de basecalling usando el modelo Super Accurate (SUP) en Dorado (v0.7, ONP). Finalmente, los archivos fasta resultantes fueron procesados en

el Laboratorio de biología molecular de Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas.

1.6. Prueba de susceptibilidad y resistencia a antimicrobianos

La prueba de susceptibilidad antimicrobiana de los aislados de *E. coli* se realizó utilizando el método de difusión en disco (Kirby-Bauer) en agar Mueller-Hinton de acuerdo con las directrices del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) con los siguientes antimicrobianos: ceftazidime (CAZ), cefoxitina (FOX), imipenem (IMP), amoxicilina- ácido clavulánico (AMC), cefepime (FEP), cefotaxima (CTX), levofloxacin (LEV), gentamicina (GM), trimetoprim-sulfametoxazol (STX), amikacina (KZ), ampicilina (AMP), ciprofloxacina (CIP), tetraciclina (TE), ácido nalidixico (NAL). Las cepas aisladas se inocularon en caldo nutritivo y se dejó se incubando a 37°C por 12 h. Se preparó una suspensión estandarizada de acuerdo a la escala 0,5 de McFarland, de las cepas aisladas en solución fisiológica y con un hisopo de algodón estéril se inoculó en placas de agar Mueller-Hinton. A continuación, se colocaron los discos y se presionaron suavemente con la punta de las pinzas para asegurar un contacto completo con la superficie del agar y se incubó a 37 °C en condiciones aeróbicas durante 16 a 18 h.

Las zonas claras de inhibición del crecimiento bacteriano se midieron en mm utilizando como control *E. coli* ATCC 25922 (sensible a todos los antibióticos). Los hallazgos se registraron como susceptible y resistente de acuerdo con los puntos de quiebre de la CLSI.

2. Establecimiento y caracterización de un banco de bacteriófagos con actividad lítica frente a cepas *E. coli* multidrogo-resistentes aisladas

2.1. Aislamiento de bacteriófagos

Se añadió tampón SM en una proporción 1:1 (v/v) a las muestras de heces y de ríos, se estabilizaron toda la noche en agitación a 120 rpm, se tomaron 10 mL del sobrenadante en un tubo de centrifuga, el sobrenadante se centrifugó a 13000 rpm por 10 min. El sobrenadante se filtró en membranas de 0,22 µm en tubos de microcentrífuga de 1,5 mL. En viales, se añadió 1 mL de los caldos con las cepas aisladas y 2 mL del filtrado, se dejó

en agitación por 180 rpm a 37°C durante 48 h. Al día siguiente, el lisado de fago obtenido se centrifugó a 13000 rpm durante 10 min, el sobrenadante se filtró en membranas de 0,22 µm en tubos de microcentrífuga de 1,5 mL. Para detectar la presencia de bacteriófagos se realizó la prueba puntual que consiste en placas de agar LB vertidas en 4 mL de agar soft (0,5% p/v) con 200 µL de la cepa y en puntos específicos se inoculó 5 µL de cada filtrado. Se rescataron los halos de lisis de las placas de agar LB con la punta del tip, se almacenaron a 4 °C en tampón SM (Figura 3).

2.2. Purificación de bacteriófagos

Para la purificación de bacteriófagos se utilizó la prueba puntual que consiste en extraer una porción del gel del halo de lisis con la ayuda de la punta de un tip, posteriormente se colocó el tip en un tubo con 3 ml de caldo LB con *E. coli*, los tubos se dejaron en agitación a 120 rpm durante 24 h. El lisado de fago obtenido, se centrifugó a 13000 rpm por 10 min, el sobrenadante se filtró en membranas de 0,22 µm en tubos de microcentrífuga de 1,5 mL. Se hicieron diluciones seriadas y se sembraron en placas de acuerdo con el ensayo de prueba puntual. Este proceso se repitió hasta que todas las morfologías de las placas de lisis sean consistentes.

2.3. Titulación de los bacteriófagos aislados

Se realizaron diluciones seriadas de cada filtrado con bacteriófagos y un recuento del número de halos de lisis y la dilución de la misma que se registraron como unidad formadora de placa sobre mililitro (UFP/mL).

2.4. Prueba puntual (Spot test)

se mezcló 100 µL del cultivo bacteriano con 3 mL de agar blando y se vertió sobre una placa de agar sólida, formando una capa uniforme de bacterias. Posteriormente, se depositaron pequeñas gotas de las soluciones de fagos (aproximadamente 5 µL) de los títulos de fagos. Las placas se incubaron a 37°C durante 18-24 horas. La presencia de halos de lisis alrededor de las gotas indicó la actividad lítica de los fagos. Posterior, se realizó la propagación de una sola unidad formadora de placa (UFP) y la técnica de spot test 3 veces para aislar al bacteriófago. Para la titulación de bacteriófagos se realizó el ensayo de doble capa.

2.5. Determinación del rango de hospedero

Cada cepa bacteriana aislada se cultivó en caldo LB hasta la fase logarítmica media de crecimiento en agitación 120 rpm a 37°C durante 12 h. Se colocó 200 µL de caldo con bacteria a tubos de tapa rosca con 4 mL agar-soft (0,5%), se los homogenizó y se vertió sobre placas de agar LB (1,2% p/v), se dejaron solidificar durante 15 min. Se inoculó 5 µL de cada filtrado de fagos en las placas.

2.6. Determinación de la estabilidad de los fagos a diferentes rangos de temperatura y pH

Para determinar la estabilidad térmica de los bacteriófagos, se colocó 50 µL del filtrado de bacteriófagos con títulos de 10^8 en 7 tubos de microcentrifuga se pre-incubó a -20 °C, 25 °C, 37 °C, 50 °C, 60 °C, 70 °C y 80 °C durante 60 y 120 minutos, posteriormente se realizó la prueba puntual. Para determinar la estabilidad de los fagos en pH se probó en un amplio rango de: 2, 3, 5, 7, 8, 10, 12. Se utilizó buffer PBS y para ajustar el pH del mismo se usó NaOH y HCl a los cuales se les añadió un volumen de lisado de fago filtrado y se incubó a 37°C durante 24 h. Para neutralizar los filtrados, se tomaron 100 µL de cada uno de los tubos y se los colocó en 900 µL de tampón SM. Para observar la actividad lítica de los filtrados se realizó la prueba puntual.

2.7. Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM)

El procedimiento para la obtención de micrografías se realizó en la Universidad de Uppsala, Suecia, como parte de las actividades englobadas en el subprograma de Control biológico de patógenos transmitidos a través de alimentos. La metodología empleada fue la siguiente: Las muestras se fijaron con un volumen igual de formaldehído al 4%. Se colocaron 5 µl de muestra en una rejilla de cobre de 200 mallas recubierta de formaldehído y carbono (Ted Pella). El exceso de solución se eliminó secando con papel de filtro. A continuación, se lavó la rejilla dos veces sobre gotas de agua MQ directamente y se contrastó dos veces sobre una gota con acetato de uranilo al 2%. El exceso de acetato de uranilo se eliminó mediante secado con papel de filtro y la rejilla se secó al aire. Las imágenes se adquirieron con un microscopio electrónico de transmisión Tecnai™ G2 Spirit BioTwin (Thermo Fisher/FEI) a 80 kV con una cámara CCD ORIUS SC200 y el software Gatan Digital Micrograph (ambos de Gatan Inc./Blue Scientific).

3. Evaluación de la capacidad lítica de un bacteriófago aislado como modelo de caracterización de la eficiencia como controlador biológico.

3.1. Multiplicidad de infección (MOI)

En microplacas de 96 pocillos, se evaluó la capacidad lítica de los bacteriófagos colocando las cepas de *E. coli* junto con los bacteriófagos a distintas MOI (10; 1; 0,1; 0,01 y 0,001). La densidad óptica de cada placa se midió en un espectrofotómetro (EPOCH) a $\lambda 600$ nm. El cultivo bacteriano incubado durante la noche se ajustó a 0,5 de la escala de McFarland en 1 mL de solución fisiológica, que se inoculó en 5 mL de caldo LB (Luria Bertani), 100 μ L de esta suspensión y 100 μ L de bacteriófagos se colocaron en los pocillos de una microplaca de 96 pocillos. Se incubó a 37 °C en un agitador y se midió cada hora la DO600 nm. Como control negativo de crecimiento solo se empleó una mezcla de 100 μ L de LB y 100 μ L de buffer SM y como control positivo de crecimiento 100 μ L de suspensión bacteriana y 100 μ L de caldo LB.

3.2. Curva de un solo paso

Una cepa de *E. coli* aislada se cultivó en caldo LB hasta la fase logarítmica media de crecimiento en agitación 120 rpm a 37°C durante 12 h. Se mezcló 1 mL de cultivo bacteriano (1×10^6 CFU/mL) con 100 μ L de la suspensión de fagos (1×10^8 UFP/mL) para obtener una MOI de 100. Se dejó incubando a 37°C durante 5 minutos para permitir la adsorción de los fagos a las bacterias. Posterior, se centrifugó la mezcla a 11,000 \times g durante 30 segundos para separar las bacterias infectadas de los fagos libres. Se desechó el sobrenadante cuidadosamente y se re-suspendió el pellet bacteriano en 50 mL de medio LB fresco en agitación 120 rpm a 37°C. Se tomó una muestra de 1 mL a intervalos de 5 minutos durante 40 minutos. Cada muestra inmediatamente se centrifugó a 11,000 \times g durante 30 segundos para separar las bacterias, se recuperó el sobrenadante y posterior se realizó diluciones en serie de cada muestra en solución salina estéril para luego realizar la prueba puntual. Pasadas las 16 horas se contó las unidades formadoras de placa (UFP) en las placas incubadas.

D. Procesamiento de los datos.

Objetivo 1: Determinar el perfil de resistencia y sensibilidad a antimicrobianos de las cepas de <i>Escherichia coli</i> aisladas de heces de granjas avícolas de la localidad de Sorata, verduras de la localidad de Mecapaca y el río La Paz.		
Actividad 1: Toma de muestra		
Resultado	Recolección de Datos	Análisis de Resultados
- Número de muestras de heces de granjas avícolas. - Número de muestras del río La Paz. - Número de muestras verduras	Cuaderno de datos: - Identificación de la muestra. - Fecha y hora de recolección. - Ubicación geográfica. - Coordenadas del lugar de muestreo.	No corresponde
Actividad 2: Aislamiento de cepas de <i>Escherichia coli</i>		
Identificación de cepas de <i>Escherichia coli</i> de muestras de heces de granjas avícolas, ríos y verduras	Registro de resultados de la tinción Gram y pruebas bioquímicas.	- Gráfica de barras en excel indicando dónde se encuentra mayor resistencia antimicrobiana. - Tabla resultados de las pruebas bioquímicas.
Actividad 3: Perfil de resistencia y sensibilidad a antimicrobianos de las cepas aisladas.		
- Sensibilidad a Antibióticos de las cepas aisladas. - Resistencia a antibióticos de las cepas aisladas. - Identificación de mecanismo de resistencia por la sinergia de antibióticos combinados.	- Registro del diámetro de la zona de inhibición alrededor del disco. - Clasificación en resistente o sensible desacuerdo a las normas de la CLSI 2023.	Mapa de calor utilizando el paquete heatmap2 en R, indicando si es sensible o resistente al antibiótico a través de colores.
Objetivo 2: Aislar bacteriófagos a partir de aguas y suelos contaminados de granjas avícolas y cultivos agrícolas con actividad lítica frente a cepas <i>E. coli</i> multidrogo-resistentes aisladas.		
Actividad 1: Toma de muestra		
- Número de muestras de heces de granjas avícolas. - Número de muestras del río La Paz. - Número de muestras de verduras.	Cuaderno de datos: - Identificación de la muestra. - Tipo de muestra (agua, suelo, heces). - Fecha y hora de recolección. - Ubicación geográfica. - Coordenadas del lugar de muestreo.	No corresponde
Actividad 2: Banco de bacteriófagos		
- Número de bacteriófagos aislados de muestras de heces de granjas avícolas.	Cuaderno de registro: - Descripción del método utilizado para aislar fagos.	Titulación de bacteriófagos. UFP/mL Por triplicado se obtiene: - Media \bar{X}

<ul style="list-style-type: none"> - Número de bacteriófagos aislados de muestras del río La Paz. - Numero de bacteriófagos aislados de muestras de verduras. 	<ul style="list-style-type: none"> - Registro de la efectividad de la lisis. - Registro del tamaño de halo de lisis. - Registro de la titulación de los filtrados de bacteriófagos. 	$\bar{X} = \frac{\sum XI}{n}$ <p>$\sum XI$=suma de todas las medidas n= número de datos - Desviación estándar DS</p> $\sigma = \sqrt{\frac{\sum (X_i - \bar{X})^2}{N}}$ <p>X= variable X_j= observación número j de la variable X. N= número de observaciones \bar{X}= es la media de la variable X. - Error Estándar de la Media EE</p> $EE = \frac{DS}{\sqrt{n}}$ <p>DS= desviación estándar n= número de datos.</p>
Actividad 3: Rango de Hospedero en cepas de <i>E. coli</i> MDR aisladas.		
<ul style="list-style-type: none"> - Especificidad del bacteriófago. - Resistencia bacteriana. 	<ul style="list-style-type: none"> - Registro de los halos de lisis en diferentes cepas bacterianas. 	<ul style="list-style-type: none"> - UFP en cada placa. - Diagrama de cuerdas por R a través de los paquetes circlize, Python.
Actividad 4: Estabilidad a diferentes pH y temperaturas.		
<ul style="list-style-type: none"> - Temperatura optima de almacenamiento. - Termoestabilidad. - Tasa de inactivación de los fagos a temperaturas elevadas. - Efecto del pH en la estabilidad. 	<ul style="list-style-type: none"> - Registro de la viabilidad y actividad infectiva de los fagos. - Registro del perfil de pH y temperatura óptimo. 	<ul style="list-style-type: none"> - Conteo de las UFP Todo por triplicado: - Media o promedio - Desviación estándar - Grafica de puntos por R a través de los paquetes ggplot 2.
Objetivo 3: Evaluación de la capacidad lítica de un bacteriófago aislado como modelo de caracterización de la eficiencia como controlador biológico. .		
Actividad 1: Multiplicidad de Infección		

<ul style="list-style-type: none"> - Relación entre el número de partículas virales y el número de bacterias hospedadoras en una infección. - Estimación de concentraciones virales e interacciones entre fagos y bacterias. 	<ul style="list-style-type: none"> - Registro de las diferentes MOI para cada filtrado. - Registro de los datos de densidad óptica. 	<ul style="list-style-type: none"> -UFP/UFC Todo por triplicado: - Media o promedio - Desviación estándar - Curva de crecimiento viral y celular y grafica del área bajo la curva utilizando los paquetes ggplot2, tidyr gggrid, paletteer en R.
<p>Actividad 4: Curva de un solo paso</p>		
<ul style="list-style-type: none"> - Adsorción del fago - Tiempo de latencia - Numero de partículas virales liberadas. - Estudio de parámetros cinéticos. 	<ul style="list-style-type: none"> - Registro del tiempo de adsorción y de latencia. - Registro del número de fagos adsorbidos y partículas liberadas. 	<ul style="list-style-type: none"> - Conteo de las UFP - Tiempo de latencia - Tasa de liberación - A través del paquete ggplot 2 en R studio.

E. Procedimientos administrativos

La investigación forma parte del proyecto “Control biológico de los principales patógenos transmitidos por alimentos con el uso de bacteriófagos”, que cuenta con financiamiento del Programa de cooperación Asdi-UMSA 2021 - 2025.

VI. Resultados y discusión

1. *Escherichia coli* como bioindicador de contaminación fecal y de resistencia antimicrobiana en el contexto de “One Health”

1.1. *E. coli* como bioindicador de contaminación fecal

La contaminación ambiental por *E. coli* y su creciente resistencia a los antimicrobianos es un problema de salud pública, debido a que puede propagarse rápidamente en el medio ambiente, facilitando la transferencia de genes de resistencia a antimicrobianos a otros patógenos o heterótrofos. Debido a su capacidad para adaptarse tempranamente a genes de resistencia a los antibióticos, *E. coli* es considerado un bioindicador eficaz de resistencia antimicrobiana. Además, su presencia generalizada en diversos entornos lo convierte en un bioindicador clave de la contaminación fecal en agua y alimentos (Anjum et al., 2021; Smit et al., 2023). La OMS ha reconocido la prioridad crítica de *E. coli* debido a su resistencia a antibióticos esenciales para el tratamiento de infecciones graves. Su propagación en diversas fuentes ambientales resalta la necesidad de una vigilancia integrada y de medidas de control para abordar la contaminación fecal y la resistencia antimicrobiana en distintos entornos (OMS, 2021a).

En el presente estudio, se aislaron un total de 40 cepas de *E. coli* a partir de diversas fuentes (Figura 5), incluyendo heces de aves de corral del municipio de Sorata, aguas superficiales (ríos: agua y sedimentos) y vegetales de plantaciones localizadas en el municipio de La Paz y Mecapaca (figura 4).

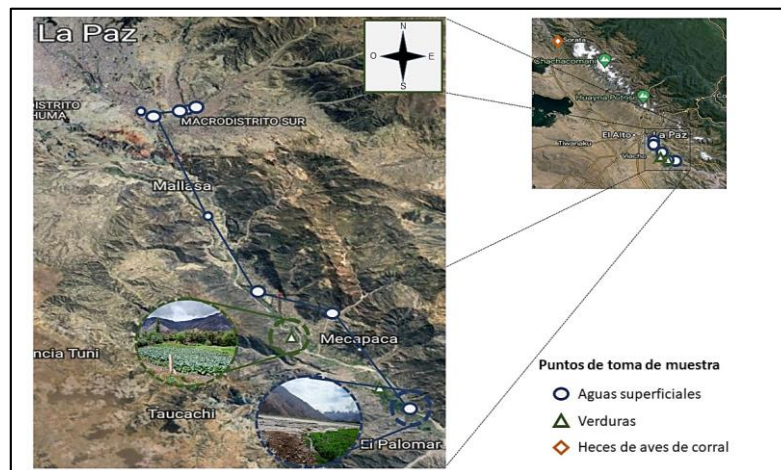


Figura 4. Distribución de los sitios de muestreo en la provincia Murillo, que incluye los municipios de La Paz y Mecapaca, y en el municipio de Sorata de la provincia Larecaja.

Estas cepas fueron aisladas inicialmente mediante técnicas de cultivo selectivo y diferencial, donde las colonias exhibieron las características típicas de *E. coli*, tales como el color azul en CHROMagar ECC y la presencia de colonias con centro negro azulado y brillo verde metálico en agar EMB. Los resultados de las pruebas bioquímicas de las cepas putativas fueron; SIM positivo, TSI positivo, LIA positivo, citrato negativo y urea negativa (ver tabla en los anexos).

Con la finalidad de confirmar la identidad de estas cepas, se llevó a cabo la amplificación y secuenciación del gen 16S rRNA, lo cual confirmó su clasificación como *Escherichia coli*.

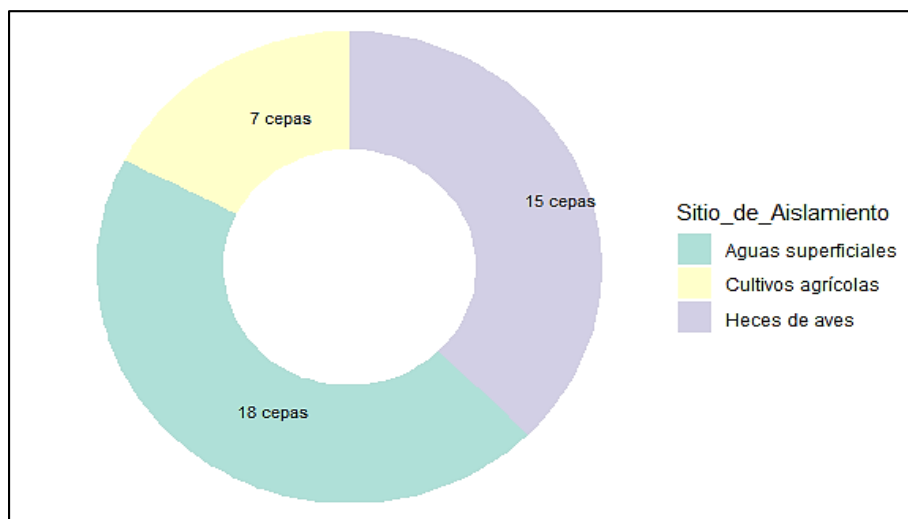


Figura 5. Número de colonias aisladas por sitio de aislamiento.

En la época seca del año 2022, así como en la época húmeda del año 2023, se observó que la concentración de *E. coli* en las aguas superficiales de la región superó el límite permisible de 1,000 UFC/100 mL hasta en cuatro órdenes logarítmicos. La Figura 6 muestra las Unidades Formadoras de Colonias por 100 mililitros (UFC/100 mL) de *E. coli* en aguas superficiales y sedimentos de ríos que desembocan en el río La Paz en diferentes épocas, junto con la temperatura del agua durante los muestreos de acuerdo al Servicio Nacional de Meteorología e Hidrología (SENAMHI) (Ambiente, 2023). Los resultados obtenidos reflejan que, durante la época seca las concentraciones de *E. coli* en los ríos estudiados mostraron variaciones, influenciadas por la temperatura. En 2023, se notó un aumento en la densidad microbiana durante la época seca en el río La Paz tanto en aguas superficiales como sedimentos a comparación con la época húmeda.

La densidad microbiana en los cuerpos de agua varía entre la época seca y húmeda del año, influenciada por diversos factores fisicoquímicos, ambientales y actividades antropogénicas. Durante la época seca, la reducción del caudal contribuye a un aumento en las concentraciones de coliformes fecales en el agua. Además, factores como el pH, la temperatura y la oxigenación del agua juegan un papel crucial en el aumento de la densidad microbiana (Smit et al., 2023). . En contraste, durante la época de lluvias, el aumento del caudal suele diluir la densidad microbiana, lo que podría explicar el descenso en la concentración de *E. coli* en la época húmeda (Hill et al., 2015). Los resultados obtenidos revelaron un incremento en la concentración bacteriana durante la época seca. Poma y colaboradores (2016) determinaron que el pH, la temperatura y la conductividad de los ríos que desembocan en el río La Paz influyen en la concentración de coliformes fecales durante la época seca.

Un estudio realizado por Guzman-Otazo y colaboradores (2019), analizaron muestras de aguas superficiales, suelos agrícolas y cultivos de distintos sitios a lo largo de la cuenca del río La Paz. Los resultados mostraron un aumento significativo en el número de enterobacterias, especialmente de *Escherichia coli* (incluyendo los patotipos ETEC, EPEC, EHEC, EAEC, y EIEC). Otro estudio encontró una alta densidad de coliformes termotolerantes asociada con la presencia de patógenos entéricos en aguas que desembocan en el río La Paz como ETEC y *Salmonella* sobre todo durante la estación lluviosa, especialmente en diciembre que coincidía con un aumento de episodios diarreicos (Poma et al., 2016).

Según la Organización Panamericana de la Salud (OPS) el límite máximo permisible de coliformes totales es de 1000 UFC/100 mL en aguas destinadas a riego de vegetales de tallo corto (como la espinaca, lechuga, brócoli) (B & G, 2010). En nuestros resultados, obtuvimos valores muy por encima de los límites permisibles (figura 6). La OMS establece parámetros para considerar qué aguas sin tratamiento contienen coliformes fecales (*E. coli* y *Klebsiella*) que oscilan entre 10^6 - 10^{10} UFC/100mL (Adenda, 2020).

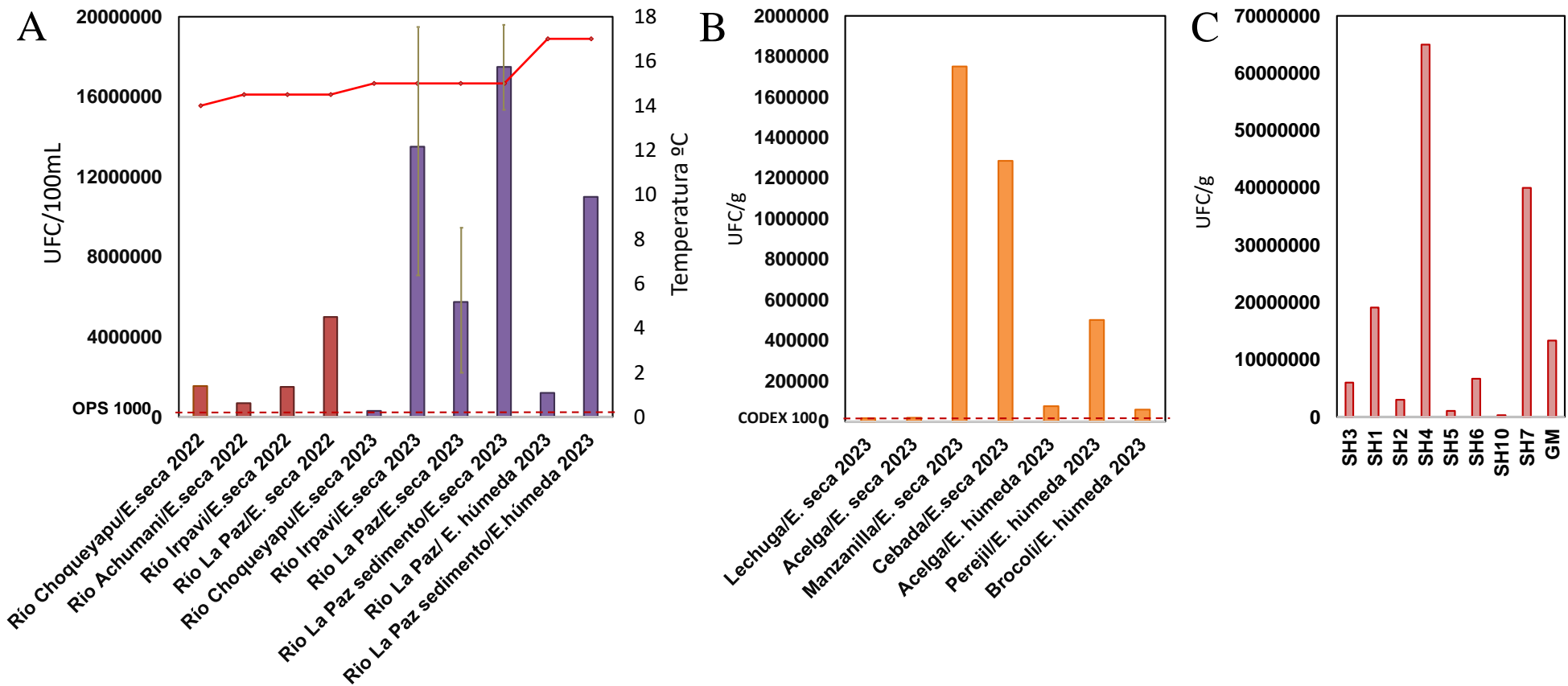


Figura 6. A) Unidades formadoras de colonias por 100 mililitros (UFC/100 mL) de *E. coli* en aguas superficiales y sedimentos de ríos que desembocan en el río La Paz en diferentes épocas. El límite permisible de coliformes fecales según la OPS está representado por la línea punteada roja. La línea continua roja indica la temperatura del agua en grados Celsius (°C) de acuerdo a SENAMHI durante los muestreos. B) Unidades formadoras de colonias por gramo(UFC/g) de *E. coli* en muestras de verduras recolectadas del municipio de Mecapa. Limite permisible de *E.coli* (100 UFC/g) del Codex Alimentarius representado por la línea punteada roja . C) *E.coli*: Unidades formadoras de colonias por gramo de heces de aves de corral recolectadas del municipio de Sorata.

Comparándolo con los resultados obtenidos, los ríos que desembocan en el río La Paz contienen una alta contaminación fecal. Según el Establecimiento de la Línea Base e Indicadores para el Monitoreo de la Biodiversidad y Fuentes de Agua en el Municipio de La Paz del Gobierno Autónomo Municipal de La Paz, los ríos que convergen en el río La Paz son clasificados como agua clase “D” (aguas de mala calidad) con un valor máximo admisible de coliformes fecales de $<50,000$ NMP/100mL. (Lieberman et al., 2021) . Los análisis microbiológicos demuestran que estas aguas son de pésima calidad sanitaria con una alta concentración de *E. coli*, indicando que los ríos no son aptos para riego, especialmente si se trata del riego de hortalizas.

Las muestras de verduras revelaron concentraciones alarmantemente elevadas de *E. coli* al igual que en aguas superficiales. Las concentraciones oscilaban entre $1,6 \cdot 10^4$ UFC/g – $1,7 \cdot 10^6$ UFC/g entre las diferentes muestras (figura 6). Estos resultados son preocupantes por varias razones, en primer lugar, la presencia de *E. coli* en las verduras indica una contaminación fecal significativa en el agua de riego que se ve reflejado en los resultados mencionados anteriormente, lo que no solo compromete la seguridad alimentaria, sino que también pone en riesgo la salud de los consumidores (Lieberman et al., 2021). *E. coli* es un indicador de contaminación fecal y su presencia en los alimentos sugiere que estos productos pueden estar contaminados con otros patógenos fecales que pueden causar enfermedades graves (Wang et al., 2022).

De acuerdo con el Reglamento Técnico Centroamericano sobre Criterios Microbiológicos para la Inocuidad de Alimentos, los límites permisibles están alineados con los estándares establecidos por el Codex Alimentarius. Este reglamento establece que la concentración máxima permisible de *E. coli* es de 100 UFC/g en frutas y hortalizas. Los datos obtenidos de las muestras de verduras superan este límite, clasificándolas dentro de la categoría: Alimento de Riesgo tipo B, que incluye alimentos que, debido a su naturaleza, composición, proceso, manipulación y la población a la que están dirigidos, tienen una probabilidad media de causar daño a la salud (DECRETOS ·c, 1996).

Los vegetales pueden actuar como reservorios de ETEC debido a que estos patógenos tienen la capacidad de adherirse a su superficie a través de flagelos. Esta característica

es relevante ya que las ETEC han sido identificadas como fuentes de varios brotes transmitidos por alimentos, especialmente aquellos asociados con el consumo de vegetales crudos (Shaw et al., 2011). Poma y colaboradores (2016), determinaron que las muestras de vegetales recolectadas en el Río La Paz, revelaron la presencia de al menos un enteropatógeno, siendo ETEC y *Salmonella* los más comunes. Además, se observaron diferentes patrones de genes de toxinas en los aislados de ETEC entre los sitios de muestreo.

En 2006, el Centro de Noticias OPS/OMS informó que dos comunidades que suministran productos agrícolas a los mercados de la ciudad de La Paz utilizan las aguas del río La Paz tanto para regar sus cultivos como para consumo propio (Lieberman et al., 2021). Un reporte en el año 2013, señaló la presencia de *E. coli* en distintos productos agrícolas relacionados con canales de riego que se abastecen del río La Paz en las comunidades de Avircato, Palomar, Huaricana y Millocato (Achocalla, 2013).

Los resultados de las muestras de heces de aves de corral revelaron concentraciones de *E. coli* que variaban desde $3 \cdot 10^5$ hasta $6.5 \cdot 10^7$ UFC/g (figura 6). Estas aves estaban alojadas en un ambiente cerrado defecando en el mismo lugar donde se les suministraba alimento y agua. La carga bacteriana en las heces de aves de corral puede atribuirse a diversos factores, como el manejo de las aves y las condiciones de saneamiento en las instalaciones avícolas (Pleydell et al., 2007). Los pollitos infectados, los embriones muertos y las cáscaras de huevos contaminadas también pueden actuar como fuentes potenciales de infección en el criadero, conduciendo a la transmisión horizontal entre pollitos no infectados y a la contaminación del entorno (Pokharel et al., 2023). La gestión inadecuada de los residuos animales puede llevar a la contaminación ambiental, facilitando la diseminación de *E. coli* en aguas y el suelo circundante (Jara et al., 2014).

No hay que pasar por alto la concentración de *E. coli* encontrada; aunque forme parte de la microbiota normal, también es un indicador de contaminación fecal en el agua y los alimentos (Bai et al., 2022; E. Li et al., 2021).

1.2. Fenómeno de la Resistencia Antimicrobiana en Cepas de *E. coli* Provenientes de Muestras Ambientales

Se determinó el perfil de resistencia y susceptibilidad de las 40 cepas aisladas de *E. coli*

por el método de difusión de discos, tal y como se observa en el mapa de calor (figura 7). Se estableció la clasificación de resistente (R), multidrogo-resistente (MDR) de las cepas aisladas según la terminología internacional estandarizada desarrollada por el Centro Europeo para el Control de Enfermedades (ECDC) y el Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) que define a MDR como la falta de susceptibilidad adquirida de al menos un agente en tres o más categorías de antimicrobianos (Magiorakos et al., 2011). En el estudio, se identificaron un total de 32 cepas que cumplen con esta definición, lo que las clasifica como MDR. Por otro lado, se identificaron 7 cepas que presentaron resistencia a distintos antibióticos, pero no cumplieron con los criterios para ser clasificadas como MDR. Estos hallazgos resaltan la importancia de vigilar y abordar la resistencia antimicrobiana de manera proactiva para garantizar un manejo efectivo de las infecciones bacterianas.

En nuestros resultados, se observó resistencia significativa a varios antibióticos, entre los cuales destacan la ampicilina, amikacina, gentamicina, cefotaxima, ácido nalidíxico, ciprofloxacina, cefepime y amoxicilina-ácido clavulánico. Estos antibióticos están incluidos en la lista de la OMS dentro de la categoría de importancia crítica para la medicina humana debido a su papel esencial en el tratamiento de infecciones graves y mortales por bacterias patógenas o con genes de resistencia (Group et al, 2021). Además, se identificó resistencia a la tetraciclina, la cual se encuentra dentro de la categoría de alta prioridad según la OMS (figura 7).

Durante el período comprendido entre 2010 y 2015, el Laboratorio de Referencia Nacional en Bacteriología Clínica (LRNBC) del INLASA informó sobre patrones de resistencia antimicrobiana observados en cepas de *E. coli* obtenidas tanto de pacientes ambulatorios como intrahospitalarios. Estos patrones indicaron resistencia a ampicilina, ciprofloxacina, ácido nalidíxico, gentamicina y cefotaxima (Cardenas, 2017). Estos resultados son similares a los obtenidos en nuestro estudio. La resistencia a la ampicilina es especialmente preocupante, ya que este antibiótico es uno de los más utilizados para el

tratamiento de infecciones urinarias en Latinoamérica (Sebastian et al., 2023).

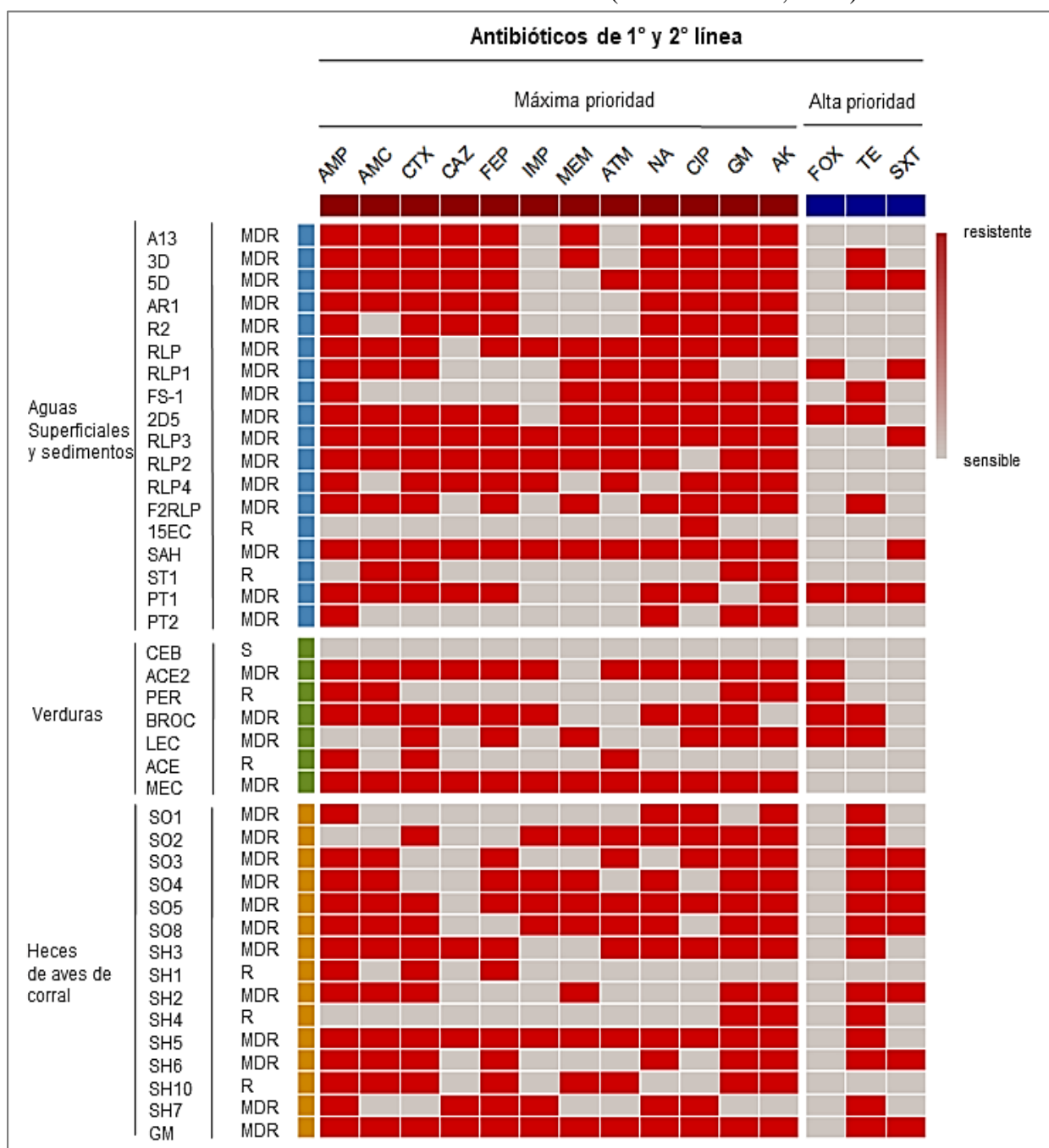


Figura 7. Patrón de susceptibilidad de las cepas de *E. coli* a antibióticos de importancia crítica, clasificados en dos categorías: antimicrobianos de máxima prioridad y alta prioridad. Los datos muestran la resistencia y susceptibilidad de diferentes cepas de *E. coli* aisladas de tres fuentes distintas: aguas superficiales y sedimentos, verduras, y heces de aves de corral y su clasificación en sensible (S), resistente (R) y multidrogo-resistente (MDR), de acuerdo a su resistencia a antibióticos. Los colores indican el grado de resistencia (rojo) y susceptibilidad (gris) de las cepas a cada antibiótico. Los antibióticos evaluados fueron: ciprofloxacina (CIP), ceftazidima (CAZ), cefepima (FEP), ampicilina (AMP), ácido nalidíxico (NA), gentamicina (GM), amikacina (AK), amoxicilina- ácido clavulánico (AMC), cefotaxima (CTX), meropenem (MEM), imipenem (IMP), aztreonam (ATM), tetraciclina (TE), ceftioxitina (FOX) y trimetoprim-sulfametoxazol (SXT).

Entre los perfiles de resistencia a los antibióticos, se puede observar resistencia a los antibióticos ampliamente utilizados para el tratamiento de infecciones urinarias, gastrointestinales, en particular, el ácido nalidíxico y la ciprofloxacina son comúnmente utilizados para tratar estas infecciones. La diarrea del viajero, causada por ETEC y EPEC, se trata frecuentemente con ciprofloxacina y trimetoprim-sulfametoxazol (Bruzzese et al., 2018; Tribble & Disease, 2018). En Bolivia, el uso de ciprofloxacina para tratar infecciones diarreicas es común debido a su efectividad contra una variedad de bacterias que pueden causar estas infecciones. (Sullivan, 2008). Además, los patrones de resistencia hallados se relacionan con un estudio anterior realizado por Poma y colaboradores, donde la mayoría de los aislados eran susceptibles a la ampicilina y al ácido nalidíxico. (Poma et al., 2016).

La resistencia a otros antibióticos como la amikacina y la gentamicina, que son aminoglucósidos, es preocupante dado su uso frecuente en tratamientos hospitalarios para infecciones graves como las infecciones del tracto urinario y las bacteriemias (Gad et al., 2011). En Latinoamérica, la cefotaxime y cefepime, ambas cefalosporinas son ampliamente utilizadas para tratar infecciones severas, incluidas las neumonías, septicemias y meningitis (Chavala et al., 2011).

La transferencia de genes de resistencia desde la microbiota hasta el medio ambiente es una contribución ampliamente identificada. Además, el uso inadecuado o no regulado de antimicrobianos veterinarios es un factor significativo en la diseminación de bacterias resistentes en la cadena alimentaria humana. Aunque algunos estudios no reconocen estas contribuciones animales, la mayoría muestra pruebas sólidas del papel de los animales como reservorios o portadores de genes de resistencia, utilizando métodos moleculares y pruebas fenotípicas (Medina-Pizzali et al., 2021).

En los aislados de heces de aves de corral se vio una mayor resistencia a la tetraciclina que probablemente este asociado al uso extensivo de este fármaco durante la cría de pollos, tanto con fines preventivos como curativos (Kabiswa et al., 2018). Un estudio realizado en Nepal destaca que es una práctica común tratar a los pollos enfermos con medicamentos como la tetraciclina, obtenidos en el mercado abierto, en veterinarias o incluso medicamentos propios del dueño (Koju et al., 2022). La tetraciclina se usa especialmente

en la alimentación animal para la prevención de enfermedades causadas por *Mycoplasma*, *Pasteurella maltocida* y *E. coli*.

La multidrogo-resistencia observada en los aislados de *E. coli* en este estudio son consistentes con otros informes de Bolivia (Gonzales et al., 2013; Guzman-otazo et al., 2019; Poma et al., 2016; Toledo et al., 2023), América Latina (Alexandra & Hinostroza, 2021) y otros países de ingresos bajos y medianos. Según la OMS, los principales impulsores de la resistencia a los antimicrobianos incluyen el uso indebido y excesivo de estos medicamentos, la falta de acceso a agua potable y saneamiento, el acceso limitado a medicamentos y diagnósticos asequibles y de calidad, la falta de conocimiento y conciencia, y la falta de aplicación de la legislación (OMS, 2021a). Estos hallazgos subrayan la urgente necesidad de implementar políticas de salud pública más estrictas para controlar el uso de antibióticos y prevenir la propagación de la resistencia.

2. Banco de Bacteriófagos como Potenciales Agentes de Control Biológico

En la última década, se ha retomado el criterio de uso de bacteriófagos como controladores biológicos, aislados de distintas fuentes como: agua de ríos, granjas y suelos, mismos que se están utilizando para reducir el crecimiento de patógenos bacterianos en distintos ambientes (Bhetwal et al., 2017; Dalmasso et al., 2016).

El uso de un banco de bacteriófagos con actividad lítica permite la selección de los fagos más adecuados para un patógeno específico. Esto facilita el diseño de cócteles de fagos que pueden ser utilizados para el control biológico de bacterias patógenas en diferentes entornos (Anand, 2022). Varios estudios han demostrado que los fagos líticos pueden reducir eficazmente la concentración de *E. coli* y sus diferentes patotipos. Además, los fagos líticos también se pueden utilizar para controlar el crecimiento de bacterias resistentes a antibióticos (Bhetwal et al., 2017; Ngoc et al., 2023; Wójcicki et al., 2021).

La caracterización parcial de los fagos aislados en este estudio se centró en su capacidad lítica y en su rango de hospedero, con el objetivo de identificar aquellos con el mayor potencial para aplicaciones de control biológico. Con esta finalidad, se realizó la prueba de doble capa para aislar bacteriófagos capaces de lisar cepas de *E. coli*, que consiste básicamente en cubrir una placa de agar con una mezcla de cultivo bacteriano y fagos con agar blando. La aparición de placas o zonas claras en el césped bacteriano confirmó

la presencia de bacteriófagos. Se generó un lisado de fagos con una concentración superior a 10^8 PFU/ml, por un enriquecimiento en caldo y placas de agar LB. Se aislaron un total de 12 bacteriófagos que provienen de muestras de heces de aves de corral y aguas superficiales (tabla en anexos), de los cuales 5 resultaron tener un amplio rango de hospedero. Tras la propagación con sus respectivas cepas hospederas, todos los bacteriófagos formaron placas homogéneas, que variaron en tamaño del halo de lisis.

Algunos filtrados presentaron halos turbios, una característica típica de los fagos lisogénicos (figura 8). Estos halos indican que no todas las bacterias en esa zona fueron lisadas; algunas pueden haber entrado en un estado de lisogenia, donde el fago integra su ADN en el genoma bacteriano. Los fagos lisogénicos o también llamados templados, pueden alternar entre el ciclo lítico y lisogénico, generalmente producen placas turbias debido a que retardan el crecimiento bacteriano (Abril et al., 2022; Arce et al., 2024).

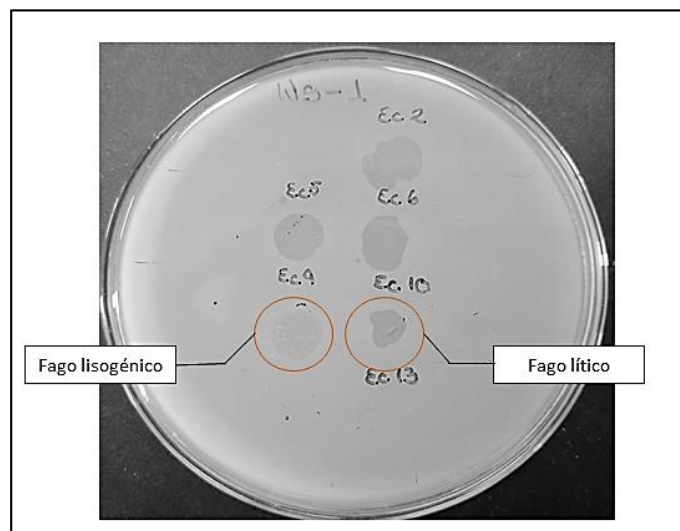


Figura 8. Diferencia de halos de lisis entre un fago lisogénico y un fago lítico.

2.1. Caracterización parcial de los bacteriófagos aislados

La microscopía electrónica de transmisión (TEM) se utilizó para determinar los rasgos morfológicos de los bacteriófagos aislados. Los resultados de TEM mostraron que todos los bacteriófagos tenían una cabeza hexagonal y una cola contráctil (figura 9), características que los clasifican morfológicamente como representantes del grupo *Myoviridae*, orden *Caudovirales*, de acuerdo a las directrices actuales del Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV). Sin embargo, se necesitan más datos, como la secuenciación del genoma de los bacteriófagos, para garantizar su clasificación precisa.

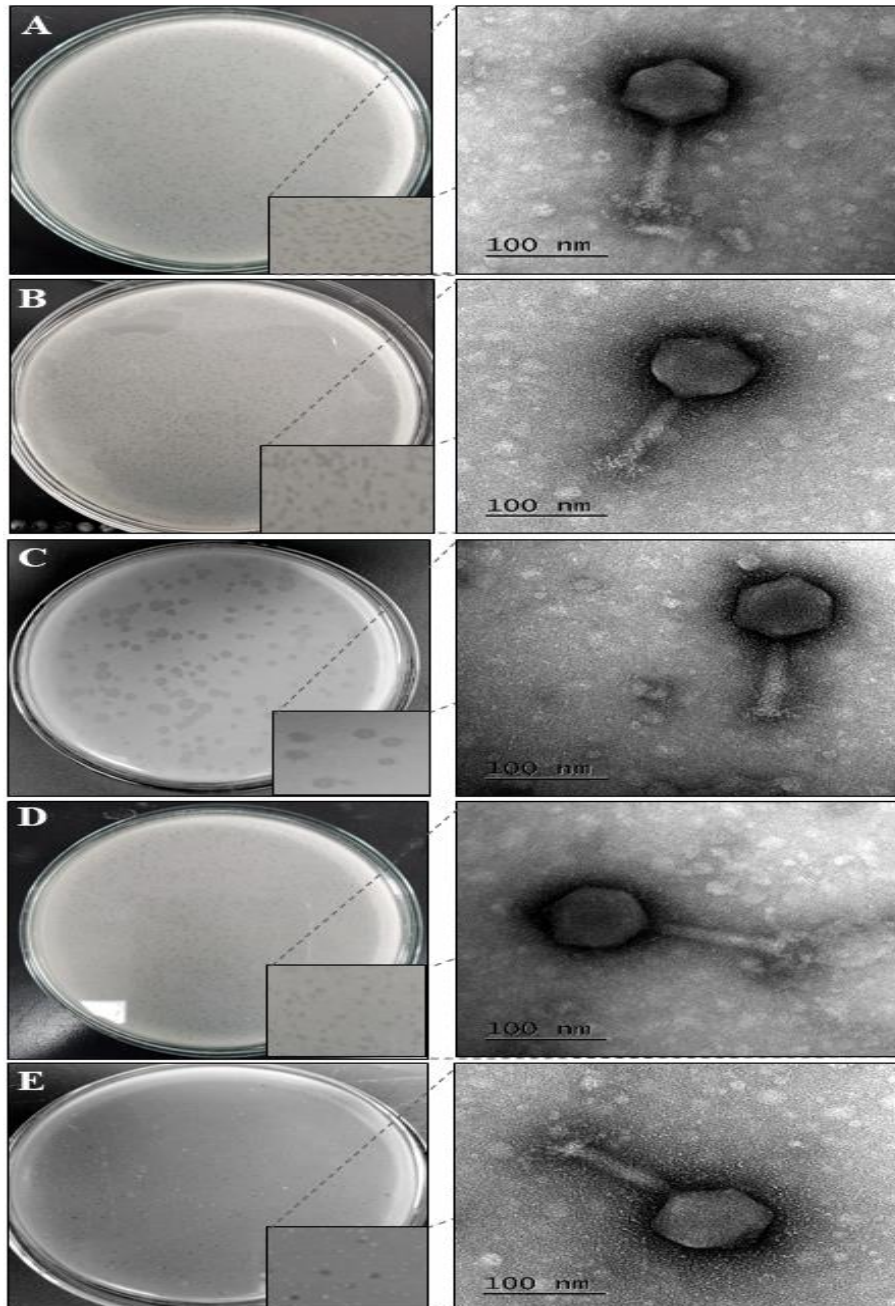


Figura 9. Halos de lisis de distintos aislados de fagos por el método de doble capa y su correspondiente fotografía de microscopía electrónica de transmisión (TEM) demostrando que todos pertenecen a la familia *Myoviridae*. Códigos de los aislados: A) Ec 1, B) Ec 6, C) Ec 7, D) Ec 10, y E) Ec 12.

2.1.1. Rango de Hospedero

Para que un bacteriófago pueda ser considerado como un potencial controlador biológico, debe ser un fago lítico con un amplio rango de hospederos, no debe portar genes de virulencia o patogenicidad en su genoma. La mayoría de los fagos

caracterizados hasta la fecha pertenecen a las familias *Myoviridae* o *Siphoviridae*, conocidas por la estructura de sus colas que facilitan el reconocimiento y la unión al hospedador. Sin embargo, los fagos documentados en bases de datos hasta ahora solo representan una pequeña fracción de la amplia diversidad de fagos en la naturaleza (Sui et al., 2021; Yu et al., 2006).

Mediante el ensayo puntual, se estudió el rango de hospedero de los bacteriófagos utilizando las 40 cepas de *E. coli* aisladas y descritas arriba, como también, *E. coli* ATCC 25922 y *E. coli* ATCC 35218, *Salmonella entérica subsp. Typhimurium* ATCC 14028, *S. entérica subvariedad* Infantis, *S. aureus* ATCC 6538p, *P. aeruginosa* ATCC 9027.

De los 12 bacteriófagos aislados, 5 demostraron actividad lítica en distintas cepas, especialmente en cepas MDR, denominándolos polivalentes (Ec 1, Ec 6, Ec 7, Ec 10 y Ec 12), 4 resultaron ser monovalentes (Ec 3, Ec 4, Ec 5 y Ec 8) y 3 divalentes (Ec 2, Ec 9 y Ec 11) (Figura 10).

Se resalta de manera importante que, los fagos Ec 7 y Ec 10 mostraron un amplio rango de especificidad, con capacidad lítica no solo contra cepas de *E. coli*, sino también contra cepas de *S. enterica subsp. Typhimurium* y *S. entérica subvariedad* Infantis. Este resultado es consistente con los hallazgos de Sui et al., (2021), quienes aislaron un fago de la familia *Myoviridae* capaz de lisar tanto *E. coli* y *S. enteritidis*. Este fago utiliza una proteína de unión al receptor (RBP) en la fibra de la cola para adsorberse a la superficie de la bacteria hospedera y comenzar el proceso de infección. Además, Park et al., (2012) aislaron el fago SFP10 de la familia *Myoviridae*, que también infecta tanto a *E. coli* como a *S. enterica*, indicando que las proteínas en la cola del fago reconocen y se unen específicamente a los receptores de lipopolisacáridos en la superficie de cada bacteria hospedera. Esto subraya cómo los fagos pueden adaptarse eficazmente para atacar diferentes tipos de bacterias mediante proteínas específicas de la cola.

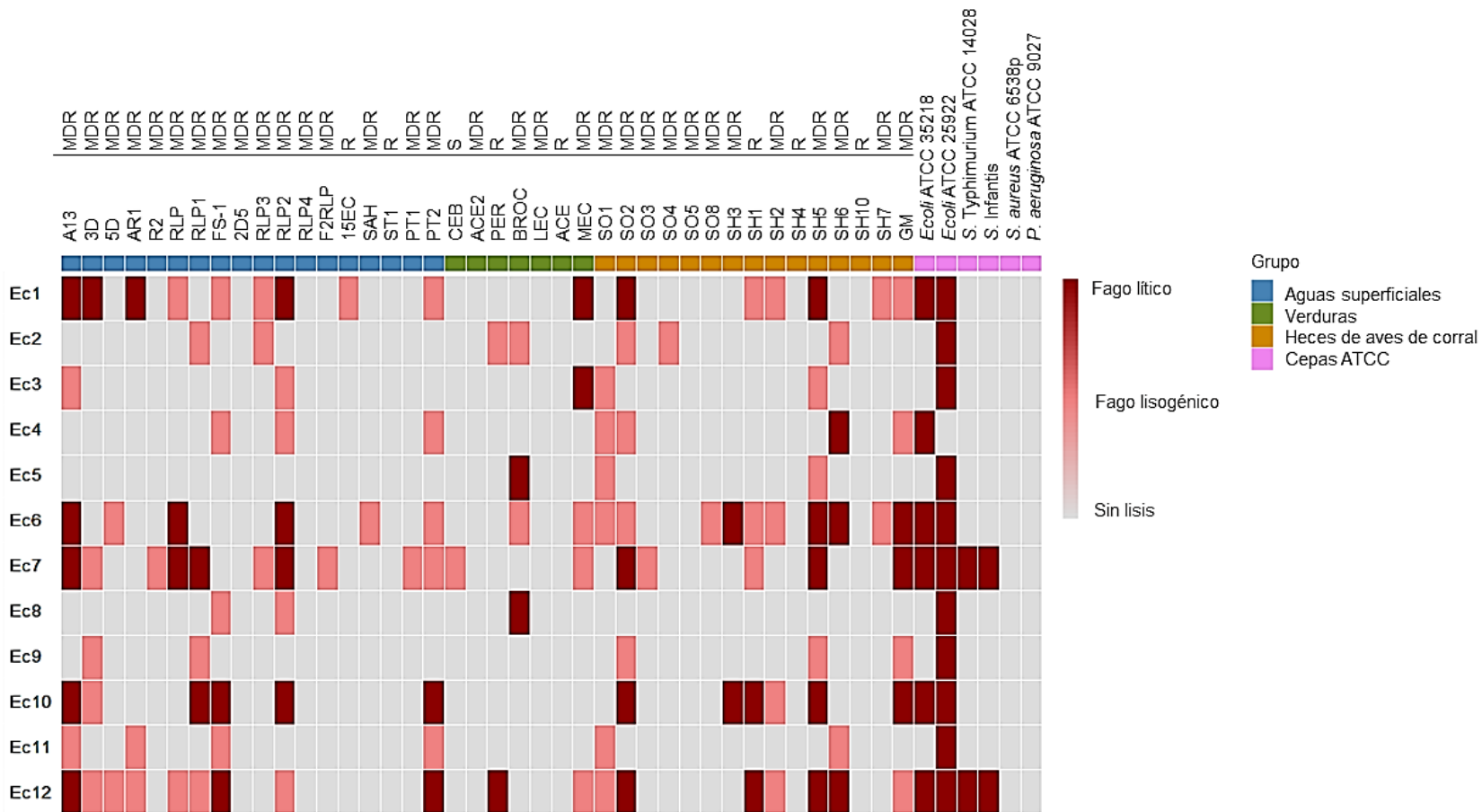


Figura 10. Mapa de calor que visualiza la relación entre los bacteriófagos aislados y las cepas de *E. coli* provenientes de distintos entornos (aguas superficiales, verduras y heces de aves de corral), incluyendo *E. coli* ATCC 25922 y *E. coli* ATCC 35218, *Salmonella enterica* subsp. *Typhimurium* ATCC, *S. aureus* ATCC 6538p, *S. entérica* subvariedad *Infantis*, *P. aeruginosa* ATCC 9027.

Las características mencionadas anteriormente son típicas de la familia *Myoviridae*, que posee una cola con diversas proteínas de unión a receptores. Esto les permite utilizar tanto proteínas de membrana, las porinas, como núcleos de lipopolisacáridos, como receptores de adsorción secundarios. Esta diversidad de proteínas de unión a receptores, aumenta la diversidad de bacterias que pueden infectar y lisar. A diferencia de los miembros de la familia de los *Siphoviridae* y *Podoviridae* tienen un rango de hospedero más restringido debido a la estructura de sus proteínas receptoras ya que son más específicas y menos versátiles (Nobrega et al., 2018; Zhang et al., 2023).

Los fagos reportados comúnmente tienen un rango de hospedero limitado, siendo pocos los que pueden infectar más de una especie. En contraste, los fagos de la familia *Myoviridae* son conocidos por su amplio rango de hospedero. Esta versatilidad los hace ideales para aplicaciones en el control biológico, especialmente en entornos donde coexisten distintos patógenos como *E. coli* y *Salmonella*. La capacidad de estos fagos para infectar una variedad de bacterias es fundamental para desarrollar formulaciones efectivas destinadas a mejorar la seguridad alimentaria en instalaciones de procesamiento y entornos agrícolas (Chibani-chenoufi et al., 2004; Sui et al., 2021).

Varios estudios han demostrado que los cócteles de fagos son eficaces para controlar patógenos transmitidos por alimentos como *E. coli* y *Salmonella*. Nale et al., (2021) demostraron que un cóctel reducía las poblaciones de *Salmonella* en varios alimentos y biopelículas, un problema común en la seguridad alimentaria debido a la alta resistencia de *Salmonella* a los desinfectantes y antibióticos convencionales. De igual manera se han diseñado cocteles para controlar las infecciones por *E. coli* en el ganado y por *Salmonella* en granjas avícolas. Estos cócteles no solo reducen la posibilidad de desarrollar resistencia a los fagos, sino que también mejoran su actividad antimicrobiana y mantienen su eficacia en una variedad de condiciones ambientales (Costa et al., 2019).

El uso de cocteles de fagos también puede ser combinado con otros agentes antimicrobianos como antibióticos para minimizar el impacto en distintas infecciones. Estos cócteles de fagos ofrecen varias ventajas sobre los métodos tradicionales, ya que pueden atacar bacterias específicas sin afectar a la microbiota normal, lo que los convierte en una solución ideal para el control biológico en distintos ambientes

(Venturini et al., 2022).

Asimismo, se debe tomar en cuenta que los bacteriófagos y las bacterias co-evolucionan de manera antagonista en ambientes naturales. Una investigación realizada por el Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) en colaboración con la Universidad de Oxford, demostró que los mecanismos de defensa de las bacterias contra los fagos y la capacidad de los fagos para infectar bacterias evolucionan recíprocamente (Ibañez, 2011). La investigación destaca que los fagos al adaptarse continuamente, pueden ser herramientas efectivas para el control biológico de bacterias patógenas como *E. coli* y *Salmonella* en diversos nichos ecológicos reforzando la importancia de considerar la co-evolución en el desarrollo de estrategias de biocontrol y terapias fágicas (Domingo-Calap, 2022; Ibañez, 2011).

2.1.2. Estabilidad de los fagos a diferentes rangos de temperatura y pH

Numerosos estudios han indicado que la efectividad de los bacteriófagos puede variar según las condiciones ambientales, como el pH y los rangos de temperatura, que desempeñan roles cruciales en las interacciones entre bacterias y fagos. Los 5 bacteriófagos mantuvieron su actividad después de la incubación dentro de un rango de temperatura entre -20 °C, 25 °C, 37 °C, 50 °C y 60 °C dentro de los 60 minutos, sin embargo, a los 120 min los bacteriófagos Ec6, Ec 10 y Ec 12 presentaron estabilidad térmica hasta los 50 °C (figura 11).

Los cinco bacteriófagos estudiados redujeron hasta 2 órdenes logarítmicas tanto a bajas temperaturas (-20°C) como a altas temperaturas (60°C) durante el periodo de una hora. A los 120 minutos, los fagos Ec 1 y Ec 7 mantuvieron su capacidad de infectar bacterias después de la incubación a 60°C reduciendo hasta 3 órdenes logarítmicas, pero perdieron estabilidad a 70°C. Este aspecto es relevante porque algunos procesos tecnológicos utilizados en la formulación de fagos, como el secado por aspersión, requieren que la actividad viral se mantenga a temperaturas extremadamente altas que a menudo superan los 60°C (Śliwka et al., 2023).

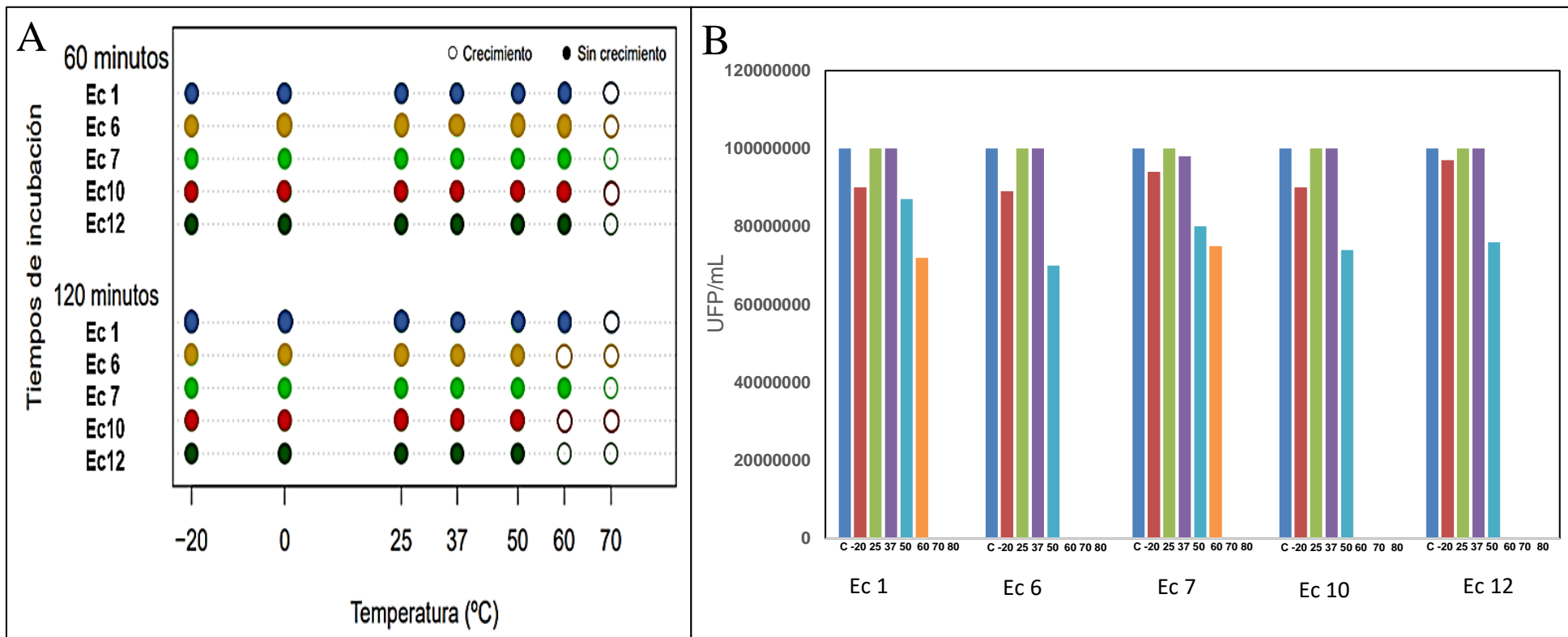


Figura 11. A) Estabilidad de los 5 bacteriófagos en diferentes temperaturas y tiempos de incubación. Los puntos coloreados indican que los fagos impidieron el crecimiento de la bacteria, mientras que los puntos blancos indican que la bacteria no fue lisada por el fago y creció. Los resultados se presentan para dos tiempos de incubación: 60 y 120 minutos en un rango de temperatura desde -20 hasta 80 °C, B) Reducción de UFP/mL respecto a la concentración inicial de UFP/mL (1×10^8).

El almacenamiento de los alimentos a bajas temperaturas es crucial para la seguridad alimentaria, ya que es necesario controlar la contaminación por patógenos transmitidos por los alimentos. En este contexto, la aplicación de fagos en los alimentos a bajas temperaturas puede ser una estrategia efectiva para inhibir estos patógenos. Los bacteriófagos aislados en este estudio mantienen su capacidad lítica a bajas temperaturas, lo que es particularmente beneficioso para su uso en alimentos refrigerados.

Alex et al., (2022) realizó una investigación comparativa de métodos de almacenamiento de los fagos en distintas condiciones: estériles a temperatura ambiente y a 4 °C. Los resultados mostraron que el almacenamiento del cóctel de bacteriófagos de *E. coli* desarrollado en condiciones estériles a 4 °C preservó completamente su actividad lítica sin reducir el título del fago durante 8 meses. El almacenamiento del cóctel de bacteriófagos a temperatura ambiente redujo gradualmente su actividad lítica. Esto es importante debido a que los fagos pueden ser almacenados a 4°C sin reducir los órdenes logarítmicos por periodos largos de tiempo.

Los cinco bacteriófagos conservan la actividad lítica en un amplio rango de pH: neutro, ligeramente ácido y ligeramente alcalino. Los bacteriófagos mantuvieron la estabilidad en el rango de pH 5 a 8 sin reducir la concentración inicial (Figura 12). A pH 3 y 10 después de las 24 horas, el bacteriófago Ec 10 perdió estabilidad a diferencia de los otros fagos que redujeron hasta tres órdenes logarítmicas.

La actividad lítica de los fagos a pH 1–2 se ha identificado en casos excepcionales, posiblemente debido a la acumulación de mutaciones irreversibles durante la incubación a pH bajo (Nobrega et al., 2016). Estas características sugieren que los bacteriófagos podrían ser aplicables en ambientes extremos. Sin embargo, típicamente los bacteriófagos son menos estables en entornos ácidos debido a la desnaturalización de sus proteínas (Zhang et al., 2023).

A partir de los resultados anteriores, se seleccionó un fago que tiene actividad lítica con cepas resistentes y multidrogo-resistentes a antibióticos, por lo cual se realiza los estudios posteriores.

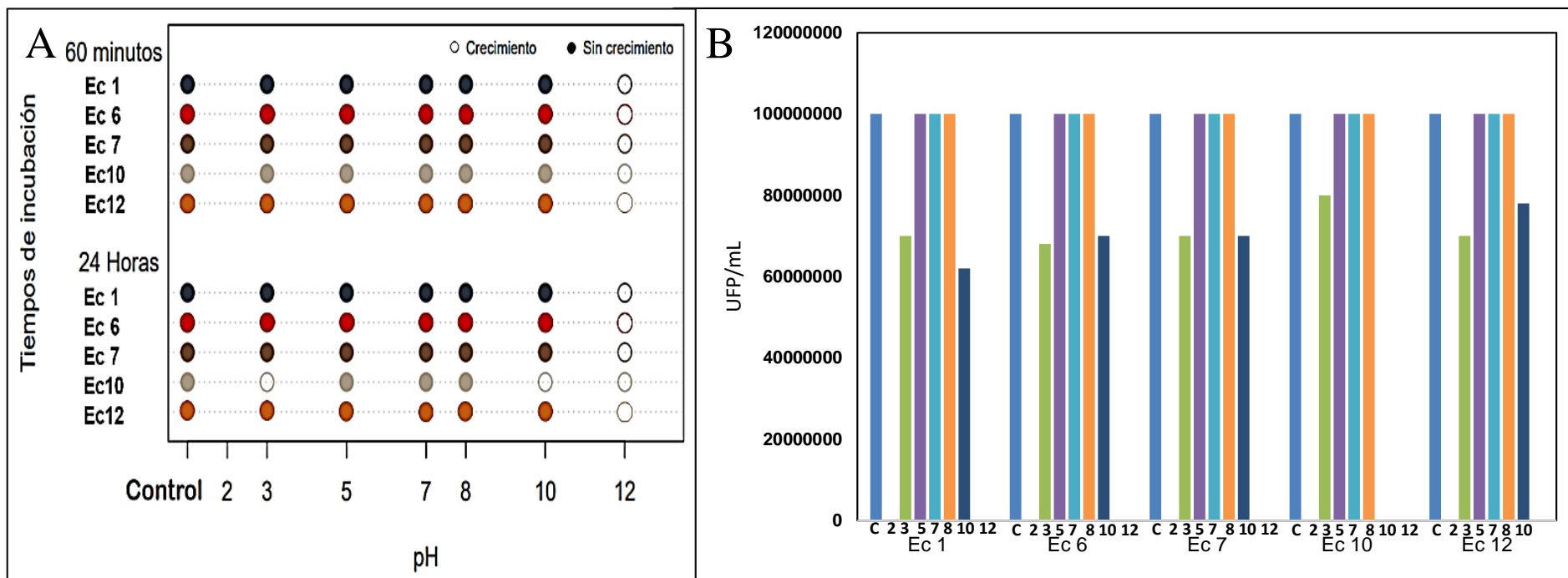


Figura 12. A) Estabilidad de los 5 bacteriófagos en diferentes valores de pH y tiempos de incubación. Los puntos coloreados indican que los fagos impidieron el crecimiento de la bacteria, mientras que los puntos blancos indican que la bacteria no fue lisada por el fago y creció. Los resultados se presentan para dos tiempos de incubación: 60 minutos y 24 horas en un rango de pH desde 2 hasta 12, con un control sin ajuste de pH. B) Reducción de UFP/mL respecto a la concentración inicial de UFP/mL ($1 \cdot 10^8$).

2.1.3. Capacidad lítica del bacteriófago Ec 12 sobre cepas de *E. coli* resistentes a antibióticos

Para evaluar la capacidad lítica del bacteriófago Ec 12 que mostro un amplio rango de hospedero, se utilizaron distintos valores de multiplicidad de infección (MDI) (100, 10, 1, 0.1 y 0.01) en placas de 96 pocillos. Se cultivaron varias cepas: *E. coli* SH5 MDR aislada de heces de aves de corral, *E. coli* A13 MDR aislada de aguas superficiales, *E. coli* PER resistente aislada de verduras, y la cepa de referencia *E. coli* ATCC 25922. Todas las cepas se cultivaron en caldo LB y fueron infectadas con el bacteriófago Ec 12 para determinar su efectividad lítica.

El fago Ec 12 inhibió el crecimiento de la cepa MDR aislada de aguas superficiales hasta las 10 horas con una MDI de 100 y hasta las 6 horas con un MDI de 10, en comparación con los otros MDI, este mismo resultado se vio con la cepa resistente aislada de verduras reduciendo hasta 5 órdenes logarítmicas a MDI de 100 a las 16 horas (figura 13).

Un aumento en la concentración de fagos, hasta dos órdenes de magnitud, limitó significativamente el crecimiento de la cepa MDR. Sin embargo, se observó un control menos efectivo con el uso de MDI más bajos. Este hecho indica que la lisis no fue completa y quedaron algunas bacterias resistentes a la infección por fagos que proliferaron gradualmente o tuvieron tiempo de formarse nuevas cepas resistentes (Alexyuk et al., 2022). Estos hallazgos sugieren que es necesario utilizar concentraciones de fago más altas para compensar la reducción del crecimiento del hospedador.

Fischer et al, (2017) demostraron que a diferencia del uso de bacteriófagos individuales, el uso de un coctel de fagos es mucho más eficaz ya que impide el desarrollo de resistencia a los mismos. En el presente estudio se evaluaron individualmente los fagos aislados para caracterizarlos Se observó que su actividad lítica varía según la cepa aislada y el control ATCC.

Existen varias hipótesis que explican la sinergia entre los bacteriófagos en un cóctel. Alexyuk y colaboradores (2022) sugieren que la infección con múltiples fagos implica la síntesis de diversas enzimas de despolimerización de polisacáridos, que dañan las paredes celulares bacterianas, facilitando el acceso de los fagos a la membrana

citoplasmática y aumentando la eficacia de la infección. Por otro lado, Mangalea et al., (2020) proponen que, las modificaciones genéticas que las bacterias realizan para resistir simultáneamente a múltiples fagos en un cóctel pueden comprometer su adaptabilidad, lo que resulta en una reducción de su tasa de reproducción. En cualquier caso, el efecto sinérgico de los cócteles de fagos permite ampliar significativamente el espectro de bacterias afectadas y suprimir su crecimiento de manera más efectiva, sin provocar un rápido desarrollo de formas resistentes a los fagos.

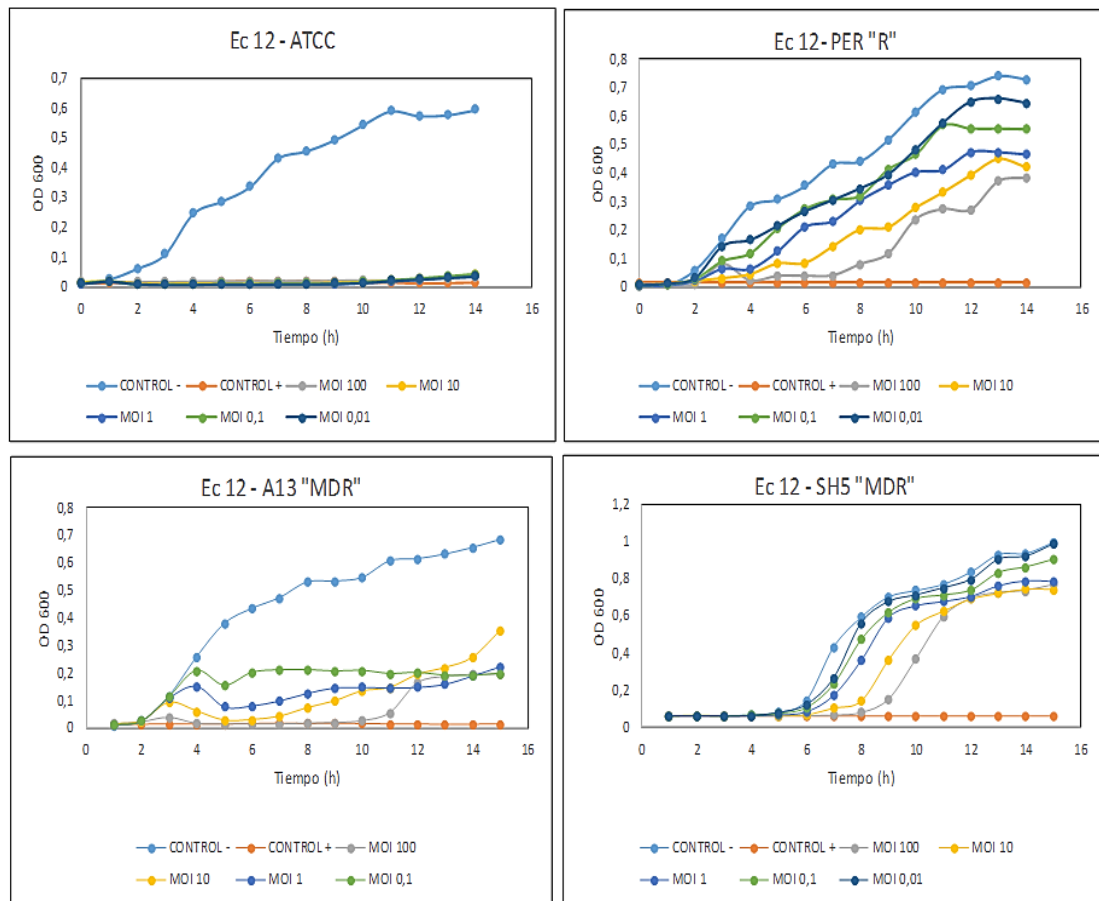


Figura 13. Inhibición bacteriana por el fago Ec 12 en cepas aisladas de distintos entornos: A) *E. coli* ATCC, B) verduras, C) aguas superficiales y D) heces de aves de corral. Se evaluaron diferentes valores de MOI para cada cepa."

Estudios en el área de la fagoterapia indican que la eficacia de los fagos para controlar la bacteria hospedera depende de la concentración utilizada. La alta especificidad de los bacteriófagos hacia sus hospederos requiere un enfoque individualizado para cada caso, lo que incrementa el tiempo y el coste de obtener un efecto positivo. Por ello, es crucial

determinar el posible espectro de hospedadores de los bacteriófagos para su uso eficaz en el control bacteriano (Yazdi et al., 2020).

Con la finalidad de determinar la capacidad lítica del bacteriófago Ec 12, se estableció el área bajo la curva de cada MDI a través del análisis de Dunnett.

2.1.4. Área bajo la curva (ABC)

Los cálculos del área bajo la curva (ABC) se realizaron con los datos obtenidos en la evaluación de la capacidad lítica del bacteriófago. Estos cálculos se llevaron a cabo de acuerdo a los cálculos descritos en la sección de metodología, utilizando el análisis de Dunnett ($\alpha=0,05$) para determinar si las áreas bajo la curva eran significativamente diferentes en comparación con el control negativo.

Los resultados del fago Ec 12 mostraron diferencias significativas en todas las MDI evaluadas ($p = 0.029$) con las cuatro cepas probadas: *E. coli* ATCC, una cepa resistente aislada de verduras y dos cepas multidrogo-resistentes aisladas de aguas y heces de aves de corral. Esto sugiere que Ec 12 es altamente eficaz incluso a las concentraciones más bajas, demostrando una amplia actividad lítica en todo el rango de MOI estudiado (figura 14).

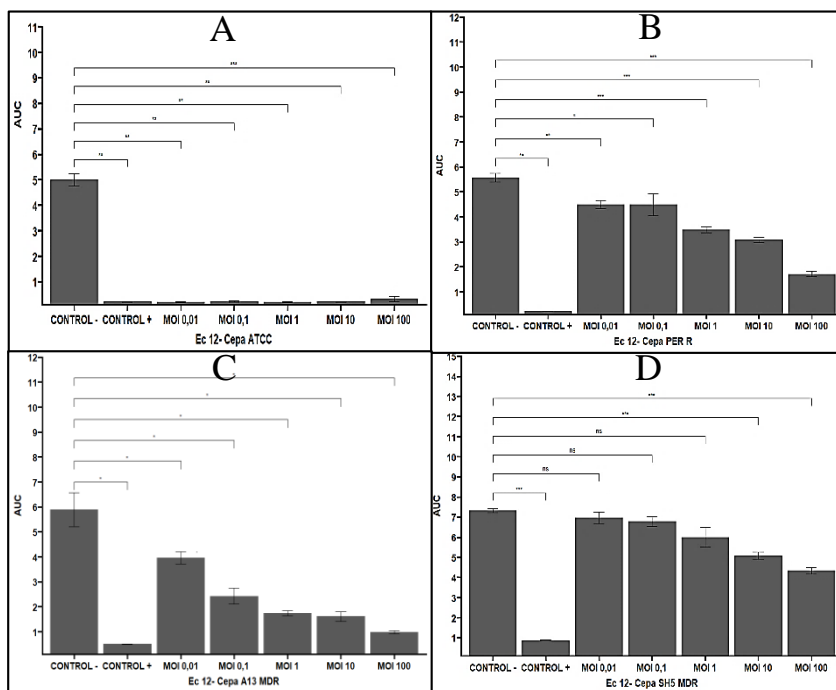


Figura 14. Áreas bajo la curva de la inhibición bacteriana por el fago Ec 12 en medio líquido utilizando cepas aisladas de distintos entornos: B) verduras, C) aguas superficiales y D) heces de aves de corral, incluida A) *E. coli* ATCC.

Los resultados indican que la eficacia de los bacteriófagos en la lisis de cepas de *E. coli* MDR depende de la MOI, con concentraciones más altas generalmente están asociadas a una mayor actividad lítica. Estos datos respaldan el potencial de los fagos aislados en formulaciones de cocteles de fagos como una estrategia efectiva para controlar la diseminación bacteriana MDR aumentando el espectro de bacterias afectadas y reduciendo su crecimiento de manera más eficiente.

2.1.5. Curva de un solo paso

La virulencia de un fago depende de la tasa de adsorción a las bacterias hospederas, el período de latencia y su capacidad para superar los mecanismos de resistencia por las bacterias. Además, el tamaño de ráfaga del fago es un factor importante que afecta su virulencia (Gill & Hyman, 2010). Los resultados de la curva de crecimiento de un paso mostraron que los períodos de latencia de los bacteriófagos fue aproximadamente 10 min, y los tamaños de explosión fue de 32.5 UFP/UFC (Unidades Formadoras de Placa/Unidades Formadoras de Colonia) (figura 15).

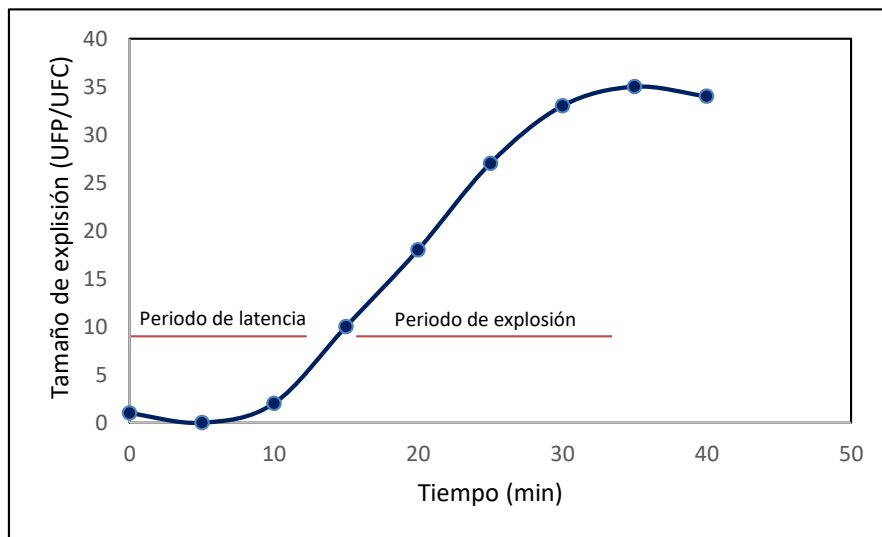


Figura 15. Curva de crecimiento de un paso de los bacteriófagos aislados durante 60 minutos.

Diferentes estudios indican que el período de latencia para fagos de *E. coli* van de 15 a 25 min y los tamaños de ráfaga van de 50 y 200 PFU/CFU, respectivamente (figura 15) (P. Li et al., 2022). El período de latencia relativamente corto y el gran tamaño de ráfaga que es el número total de partículas de fago que se liberan de una célula hospederas

después de una infección lítica completa de los fagos, indican una alta actividad lítica y una capacidad reproductiva significativa. Estos resultados demuestran que los fagos aislados podrían ser potenciales controladores biológicos de cepas MDR.

VII. Conclusiones

El límite permisible de la concentración de *E. coli* en el río La Paz durante las épocas seca y húmeda de las gestiones 2022 y 2023 de acuerdo a la clasificación de calidad de agua tipo D (agua de mala calidad – Reglamento en Materia de Contaminación Hídrica de la Ley del Medio Ambiente N° 1333), se halla excedido hasta en 4 órdenes logarítmicos. Por lo tanto, no se debería permitir el uso de estas aguas con fines de riego.

El uso de aguas del río La Paz para el riego de cultivos vegetales en la localidad de Mecapaca, está incidiendo en la contaminación fecal de verduras y hortalizas cultivadas en la zona debido a que las mismas presentan una concentración de *E. coli* incrementada hasta en 4 órdenes logarítmicos sobre el límite permisible establecido por el Reglamento Técnico Centroamericano sobre Criterios Microbiológicos para la Inocuidad de Alimentos (Codex Alimentarius).

El recuento de la concentración de *E. coli* fue de 10^7 UFC/g en heces de aves de corral. Estas concentraciones pueden ser diseminadas por las aves o a través del contacto.

La mayoría de las cepas de *E. coli* aisladas tanto de ríos (aguas y sedimentos), verduras y heces de aves de corral, fueron multidrogo-resistentes (32/40), presentando fenotipos de resistencia a antibióticos críticos y esenciales determinados por la OMS para tratar infecciones graves en humanos, como ser: ampicilina, amikacina, gentamicina, cefotaxima, ácido nalidíxico, ciprofloxacina, cefepime y amoxicilina-ácido clavulánico.

Cinco fagos seleccionados fueron identificados morfológicamente mediante TEM, determinando su pertenencia a la familia Myoviridae. Presentaron estabilidad a temperaturas de -20 a 60 y pH de 3 a 10. Su capacidad lítica frente a cepas *E. coli* resistentes a antibióticos, *Salmonella entérica subsp. Typhimurium* ATCC 14028 y *S. entérica subvariedad* Infantis, determinando el amplio rango de hospedero que poseen estos bacteriófagos.

Este es el primer paso a la institución de un banco de bacteriófagos para controlar la diseminación de diferentes bacterias patógenas y/o resistentes a antibióticos en distintos entornos como aguas y cultivos. Para lograr esta meta, es necesario incorporar vehículos o sistemas de inmovilización que permitan una liberación controlada y eficiente de los fagos en el ambiente entre algunas de las estrategias empleadas para la diseminación de los mismos. La formulación de cócteles de fagos aislados podría aumentar la eficacia del control biológico y reducir el riesgo de desarrollo de resistencia bacteriana. No obstante, se requieren estudios adicionales, como la secuenciación del genoma de los fagos y la evaluación de su efectividad en condiciones reales, para asegurar su aplicación práctica y sostenible en el control de patógenos bacterianos.

VIII. Recomendaciones

Estos resultados subrayan la necesidad urgente de implementar medidas de control y monitoreo para reducir la contaminación fecal en las fuentes de agua y alimentos. Es crucial mejorar las prácticas de manejo de aguas residuales y agrícolas y aplicar tecnologías de tratamiento innovadoras como el uso de bacteriófagos, fomentar la colaboración interinstitucional, implementar políticas públicas efectivas, y capacitar a los profesionales de la salud y el medio ambiente. Además, es esencial llevar a cabo programas de educación y sensibilización dirigidos a productores y a la comunidad para minimizar los riesgos asociados a la contaminación fecal y proteger la salud pública.

Para la institución de un banco de fagos, se sugiere fomentar programas de investigación para identificar fagos efectivos contra diversas bacterias patógenas, especialmente cepas multidrogo-resistentes. Es crucial capacitar a profesionales en técnicas de manejo y aplicación de fagos y establecer colaboraciones con instituciones nacionales e internacionales. Además, es necesario desarrollar políticas claras y regulaciones para el uso seguro de fagos, implementar campañas de educación y sensibilización y promover la innovación en aplicaciones con fagos, incluyendo la formulación de cócteles de fagos y su combinación con otras estrategias de control biológico.

IX. Bibliografía

- Aabed, K., Moubayed, N., & Alzahrani, S. (2021). Antimicrobial resistance patterns among different *Escherichia coli* isolates in the Kingdom of Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(7), 3776–3782. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.03.047>
- Abdalahman, M., Copenhagen-glazer, S., Nir-paz, R., & Hazan, R. (2020). *The Israeli Phage Bank (IPB)*. 1–7.
- Abedon, S. T., Kuhl, S. J., Blasdel, B. G., & Kutter, E. M. (2011). *Phage treatment of human infections*. 1(2), 66–85. <https://doi.org/10.4161/bact.1.2.15845>
- Abedon, S. T., Thomas-abedon, C., Thomas, A., & Mazure, H. (2011). *Is or is not Hankin, 1896, a phage reference?* 1(3), 174–178.
- Abril, A. G., Carrera, M., Notario, V., S, Á., & Villa, G. (2022). *The Use of Bacteriophages in Biotechnology and Recent Insights into Proteomics*.
- Acharya, D. (2023). *Justice for Ganga Requires Urgent Collective Action*. The WIRE. <https://thewire.in/environment/justice-for-ganga-requires-urgent-collective-action>
- Achocalla. (2013). *Verduras de rio Abajo tienen parasitos, bacterias y toxicos*. <https://circuloachocalla.org/verduras-de-rio-abajo-tienen-bacterias-parasitos-y-toxicos/>
- Adenda, L. A. P. (n.d.). *Guías para la calidad del agua de consumo humano*.
- Alexandra, K., & Hinostroza, A. (2021). *Mecanismos de resistencia de Escherichia Coli en América Latina*. 11, 203–216.
- Alexyuk, P., Bogoyavlenskiy, A., Alexyuk, M., Akanova, K., Moldakhanov, Y., & Berezin, V. (2022). Isolation and Characterization of Lytic Bacteriophages Active against Clinical Strains of *E. coli* and Development of a Phage Antimicrobial Cocktail. *Viruses*, 14(11). <https://doi.org/10.3390/v14112381>
- Alonso, C. A. (2018). *Epidemiología molecular en Escherichia coli procedente de fauna salvaje : resistencia antimicrobiana , virulencia y diversidad y diversidad genética*. 1–307.
- Alonzo, L. F., Jain, P., Hinkley, T., Clute-Reinig, N., Garing, S., Spencer, E., Dinh, V. T. T., Bell, D., Nugen, S., Nichols, K. P., & Le Ny, A. L. M. (2022). Rapid, sensitive, and low-cost detection of *Escherichia coli* bacteria in contaminated water samples using a phage-based assay. *Scientific Reports*, 12(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-11468-2>
- Amarillas, L., Rubí-Rangel, L., Chaidez, C., González-Robles, A., Lightbourn-Rojas, L., & León-Félix, J. (2017). Isolation and characterization of phiLLS, a novel phage with

potential biocontrol agent against multidrug-resistant *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology*, 8(JUL), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01355>

Ambiente, M. (2023). *Servicio nacional de meteorología e hidrología*. 41.

Anand, T. (2022). *Tracking the phage trends : A comprehensive review of applications in therapy and food production*. November, 1–17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.993990>

Andueza, F. (2021). *LOS RESISTOMAS AMBIENTALES Y SU IMPACTO EN LA SALUD Y EN EL*. July.

Anjum, M. F., Schmitt, H., Börjesson, S., Berendonk, T. U., Donner, E., Stehling, E. G., Boerlin, P., Topp, E., Jardine, C., Li, X., Li, B., Dolejska, M., Madec, J. Y., Dagot, C., Guenther, S., Walsh, F., Villa, L., Veldman, K., Sunde, M., ... Pedersen, K. (2021). The potential of using *E. coli* as an indicator for the surveillance of antimicrobial resistance (AMR) in the environment. *Current Opinion in Microbiology*, 64(November), 152–158. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2021.09.011>

Arce, M., Venegas, G., Paez, K., Latz, S., Navarrete, P., Caruffo, M., Feijoo, C., García, K., & Bastías, R. (2024). Valp1, a Newly Identified Temperate Phage Facilitating Coexistence of Lysogenic and Non-Lysogenic Populations of *Vibrio anguillarum*. *Pathogens*, 13(4). <https://doi.org/10.3390/pathogens13040285>

B, M. L. F., & G, E. (2010). *DEL RIO JILLUSAYA*. 2, 75–80.

Bai, H., He, L. Y., Wu, D. L., Gao, F. Z., Zhang, M., Zou, H. Y., Yao, M. S., & Ying, G. G. (2022). Spread of airborne antibiotic resistance from animal farms to the environment: Dispersal pattern and exposure risk. *Environment International*, 158, 106927. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.106927>

Belloso, W. H. (2009). Historia de los antibióticos Belloso, W. H. (2009). Historia de los antibióticos. *Rev Hosp Ital B Aires Dic*, 29, 102-111. *Revista Del Hospital Italiano de Buenos Aires.*, 29(2), 102–111. https://www.hospitalitaliano.org.ar/multimedia/archivos/noticias_attachs/47/documentos/7482_102-111-belloso.pdf

Bhetwal, A., Maharjan, A., Shakya, S., Satyal, D., Ghimire, S., Khanal, P. R., & Parajuli, N. P. (2017). *Isolation of Potential Phages against Multidrug-Resistant Bacterial Isolates : Promising Agents in the Rivers of Kathmandu , Nepal*. 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/3723254>

Blondeau, L. D., & Blondeau, J. M. (2021). Antimicrobial Resistance. *Diagnostics and Therapy in Veterinary Dermatology*, 163–174. <https://doi.org/10.1002/9781119680642.ch16>

boletinreloaa2.pdf.crdownload. (n.d.).

- Borja-serrano, P., Ochoa-herrera, V., Maurice, L., Morales, G., Quilumbaqui, C., & Tejera, E. (2020). *Determination of the Microbial and Chemical Loads in Rivers from the Quito Capital Province of Ecuador (Pichincha)— A Preliminary Analysis of Microbial and Chemical Quality of the Main Rivers.*
- Boulanger, P., Jacquot, P., Planc, L., Chami, M., Engel, A., Parquet, C., Herbeuval, C., & Letellier, L. (2008). *Phage T5 Straight Tail Fiber Is a Multifunctional Protein Acting as a Tape Measure and Carrying Fusogenic and Muralytic Activities* *. 283(20), 13556–13564. <https://doi.org/10.1074/jbc.M800052200>
- Boyacioglu, O., Sharma, M., Sulakvelidze, A., & Goktepe, I. (2013). Biocontrol of *Escherichia coli* O157 . *Bacteriophage*, 3(1), e24620. <https://doi.org/10.4161/bact.24620>
- Bruzzese, E., Giannattasio, A., & Guarino, A. (2018). *Antibiotic treatment of acute gastroenteritis in children [version 1; referees : 2 approved]*. 7, 1–10. <https://doi.org/10.12688/f1000research.12328.1>
- Burmeister, A. R., Fortier, A., Roush, C., Lessing, A. J., Bender, R. G., Barahman, R., Grant, R., Chan, B. K., & Turner, P. E. (2020). Pleiotropy complicates a trade-off between phage resistance and antibiotic resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(21). <https://doi.org/10.1073/pnas.1919888117>
- C, C., B, V. D. A., F, Y., & C, F. (2020). free information in English and Mandarin on the novel coronavirus COVID- Pathogen and Particle Associations in Wastewater : Significance and Implications for Treatment and Disinfection Processes. *Advances in Applied Microbiology*, 97(January), 63:118.
- Cardenas, V. S. (2017). Potencial actividad biocontroladora de bacteriófagos, aislados de muestras ambientales, frente a cepas de *Escherichia coli* multiresistentes. *Estadística I*, 5(48), 01–75. [http://www.zonaeconomica.com/analisis-financiero/cuentas-cobrar%0Ahttp://www.redalyc.org/pdf/290/29012059009.pdf%0Ahttps://www.fae-ditorial.es/capitulos/gestion-morosidad.pdf%0Ahttps://unadmexico.blackboard.com/bbcswebdav/institution/DC/SBA/Bloque 1/NA/02/N](http://www.zonaeconomica.com/analisis-financiero/cuentas-cobrar%0Ahttp://www.redalyc.org/pdf/290/29012059009.pdf%0Ahttps://www.fae-ditorial.es/capitulos/gestion-morosidad.pdf%0Ahttps://unadmexico.blackboard.com/bbcswebdav/institution/DC/SBA/Bloque%201/NA/02/N)
- Carrias, A., Ran, C., Terhune, J. S., & Liles, M. R. (2012). Bacteria and bacteriophages as biological agents for disease control in aquaculture. In *Infectious Disease in Aquaculture*. Woodhead Publishing Limited. <https://doi.org/10.1533/9780857095732.3.353>
- Chabris, C. F., Pentland, A., Hashmi, N., Malone, T. W., Pitchford, J. W., Simpson, S. D., Walton, A., Mangel, M., Pratt, S. C., Mallon, E. B., Britton, N. F., Sumpter, D. J., Fryxell, J. M., Sinclair, A. R. E., Parrish, J. K., Kennedy, J., Blackwell, T., Fiorelli, E., Leonard, N. E., ... Wissel, C. (2013). *The Bacteriophage T7 Virion*. 339(February).

- Chamorro-Toro, D. F., Rosero-Moreano, M., & Gaviria-arias Duverney. (2023). Aplicación de Métodos Microbiológicos y Químicos en la Exploración de Bacterias Resistentes a Antibióticos en Aguas y Lodos Activados Hospitalarios. *NBER Working Papers*, 89. <http://www.nber.org/papers/w16019>
- Chavala, A. K., Bannimath, G., Sama, N. S., & Prasanth, K. V. R. (2011). Spectrophotometric determination some cephalosporins containing amino group using 1, 2-naphthaquinone-4-sulfonic acid sodium in pharmaceutical dosage form. *International Journal of Pharmacy and Technology*, 3(1), 1750–1767. <https://doi.org/10.1586/14787210.6.6.805.Cefepime>
- Chibani-chennoufi, S., Bruttin, A., Dillmann, M., & Bru, H. (2004). *MINIREVIEW Phage-Host Interaction: an Ecological Perspective*. 186(12), 3677–3686. <https://doi.org/10.1128/JB.186.12.3677>
- Chung, K. M., Liau, X. L., & Tang, S. S. (2023). Bacteriophages and Their Host Range in Multidrug-Resistant Bacterial Disease Treatment. *Pharmaceuticals*, 16(10), 1–19. <https://doi.org/10.3390/ph16101467>
- Chuppava, B., Keller, B., Abd El-Wahab, A., Sürrie, C., & Visscher, C. (2019). Resistance Reservoirs and Multi-Drug Resistance of Commensal *Escherichia coli* From Excreta and Manure Isolated in Broiler Houses With Different Flooring Designs. *Frontiers in Microbiology*, 10(November), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02633>
- Costa, P., Pereira, C., Gomes, A. T. P. C., & Almeida, A. (2019). Efficiency of single phage suspensions and phage cocktail in the inactivation of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: An in vitro preliminary study. *Microorganisms*, 7(4). <https://doi.org/10.3390/microorganisms7040094>
- Dalmasso, M., Strain, R., Neve, H., Franz, C. M. A. P., Cousin, J., Ross, R. P., & Hill, C. (2016). *Three New Escherichia coli Phages from the Human Gut Show Promising Potential for Phage Therapy*. 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156773>
- de Jonge, P. A., Nobrega, F. L., Brouns, S. J. J., & Dutilh, B. E. (2019). Molecular and Evolutionary Determinants of Bacteriophage Host Range. *Trends in Microbiology*, 27(1), 51–63. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.08.006>
- DECRETOS* .c. (1996).
- Delgado-Blas, J. F., Ovejero, C. M., David, S., Montero, N., Calero-Caceres, W., Garcillan-Barcia, M. P., de la Cruz, F., Muniesa, M., Aanensen, D. M., & Gonzalez-Zorn, B. (2021). Population genomics and antimicrobial resistance dynamics of *Escherichia coli* in wastewater and river environments. *Communications Biology*, 4(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-01949-x>
- Diayo, L. M., García, J. D., Juez, D., & Vargas, R. C. (2020). Factores Asociados a El Desarrollo De Resistencia Bacteriana. *Universidad Del Norte. Facultad de Medicina*, 3–24. <http://hdl.handle.net/10584/9598>

- Djebara, S., Maussen, C., Vos, D. De, Merabishvili, M., Damanet, B., Pang, K. W., Leenheer, P. De, Strachinaru, I., Soentjens, P., & Pirnay, J. (2019). *Processing Phage Therapy Requests in a Brussels Military Hospital: Lessons Identified*. 1–11. <https://doi.org/10.3390/v11030265>
- Domingo-Calap, C. F.-G. y P. (2022). *Fagos como herramientas biomédicas contra superbacterias*. https://genotipia.com/revista_gm/gmgrev29-fagos-bacterias/#:~:text=La coevolución de bacterias MDR,et al.%2C 2021).
- Doval, C. G. (2013). *ESTRUCTURA DE FIBRAS DE BACTERIÓFAGOS*.
- du Plessis, A. (2022). Persistent degradation: Global water quality challenges and required actions. *One Earth*, 5(2), 129–131. <https://doi.org/10.1016/j.oneear.2022.01.005>
- Dufour, N., Clermont, O., La Combe, B., Messika, J., Dion, S., Khanna, V., Denamur, E., Ricard, J. D., Debarbieux, L., Eveillard, M., Kouatchet, A., Lasocki, S., Asfar, P., Billard-Pomares, T., Magdoud, F., Barnaud, G., Corvec, S., Lakhal, K., Armand, L., ... Maury, E. (2016). Bacteriophage LM33_P1, a fast-acting weapon against the pandemic ST131-O25b: H4 Escherichia coli clonal complex. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71(11), 3072–3080. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw253>
- Eliava, I. (2024). *Instituto de Bacteri'ofagos, Microbiología y Virología George Eliava*. Recolección de cepas y fagos
- Europea, U. (2006). *relativa a la gestión de la calidad de las aguas de baño y por la que se deroga la Directiva 76/160/CEE*. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=celex%3A32006L0007>
- FAO. (2011). *PREVENCIÓN DE E. coli EN LOS ALIMENTOS*.
- Fenibo, E. O., Ijoma, G. N., & Matambo, T. (2021). Biopesticides in Sustainable Agriculture: A Critical Sustainable Development Driver Governed by Green Chemistry Principles. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5(June), 1–6. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.619058>
- Fischer, S., Kittler, S., Klein, G., & Glünder, G. (2017). Impact of a Single Phage and a Phage Cocktail Application in Broilers on Reduction of Campylobacter jejuni and Development of Resistance. *PLoS ONE*, 8(10), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078543>
- Flores, R. (2024). *La biotech chilena que está erradicando enfermedades en granjas de Brasil*. <https://www.latercera.com/piensa-digital/noticia/la-biotech-chilena-que-esta-erradicando-enfermedades-en-granjas-de-brasil/HD3WPR4C3ZGSZKBQJFHFYHW66Y/>
- Fuga, B., Sellera, F. P., Cerdeira, L., Esposito, F., Cardoso, B., Fontana, H., Moura, Q., Cardenas-Arias, A., Sano, E., Ribas, R. M., Carvalho, A. C., Tognim, M. C. B., de

- Morais, M. M. C., Quaresma, A. J. P. G., Santana, Â. P., Reis, J. N., Pilonetto, M., Vespero, E. C., Bonelli, R. R., ... Lincopan, N. (2022). WHO Critical Priority *Escherichia coli* as One Health Challenge for a Post-Pandemic Scenario: Genomic Surveillance and Analysis of Current Trends in Brazil. *Microbiology Spectrum*, *10*(2). <https://doi.org/10.1128/spectrum.01256-21>
- Fundación.Aquae. (2022). *El problema de la contaminación hídrica*. Fundación Aquae. <https://www.fundacionaquae.org/wiki/el-problema-de-la-contaminacion-hidrica/>
- Gad, G. F., Mohamed, H. A., & Ashour, H. M. (2011). *Aminoglycoside Resistance Rates , Phenotypes , and Mechanisms of Gram-Negative Bacteria from Infected Patients in Upper Egypt*. *6*(2), 1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017224>
- Galan, S., Garcia-doal, C., Alonso, J., Schoehn, G., & Raaij, M. J. Van. (2010). Two-chaperone assisted soluble expression and purification of the bacteriophage T4 long tail fibre protein gp37. *Protein Expression and Purification*, *70*(1), 116–121. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2009.11.005>
- Garvey, M. (2022). *Bacteriophages and Food Production : Biocontrol and Bio-Preservation Options for Food Safety*. 1–16.
- Ghose, C., & Euler, C. W. (2020). Gram-negative bacterial lysins. *Antibiotics*, *9*(2), 1–13. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9020074>
- Gonzales, L., Joffre, E., Rivera, R., & Gonzales, L. (2013). *Prevalence , seasonality and severity of disease caused by pathogenic Escherichia coli in children with diarrhoea in Bolivia Printed in Great Britain*. 1697–1706. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.060798-0>
- Gordillo Altamirano, F. L., & Barr, J. J. (2019). Phage therapy in the postantibiotic era. *Clinical Microbiology Reviews*, *32*(2). <https://doi.org/10.1128/CMR.00066-18>
- Group, W. H. O. A., Surveillance, I., & Resistance, A. (n.d.). *No Title*.
- Guevara Agudelo, F. A., Muñoz Molina, L. C., Navarrette Ospina, J., Salazar Pulido, L. M., & Pinilla Bermúdez, G. (2020). Innovaciones en la terapia antimicrobiana. *Nova*, *18*(34), 9–25. <https://doi.org/10.22490/24629448.3921>
- Guzman-otazo, J., Gonzales-siles, L., Poma, V., & Bengtsson-, J. (2019). *Diarrheal bacterial pathogens and multi- resistant enterobacteria in the Choqueyapu River in La Paz , Bolivia*. 1–20.
- Han, X. M., Hu, H. W., Chen, Q. L., Yang, L. Y., Li, H. L., Zhu, Y. G., Li, X. Z., & Ma, Y. B. (2018). Antibiotic resistance genes and associated bacterial communities in agricultural soils amended with different sources of animal manures. *Soil Biology and Biochemistry*, *126*, 91–102. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2018.08.018>
- Hernández-Crespo, C., Fernández-Gonzalvo, M. I., Miglio, R. M., & Martín, M. (2022).

- Escherichia coli removal in a treatment wetland - pond system: A mathematical modelling experience. *Science of the Total Environment*, 839(May). <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.156237>
- Hernandez-morales, A., Lancaster, J., Lessor, L., Barr, J. J., Reed, S. L., Rohwer, F., Benler, S., Segall, A. M., Taplitz, R., Smith, D. M., Kerr, K., Kumaraswamy, M., Nizet, V., Lin, L., Mccauley, M. D., Strathdee, S. A., Benson, C. A., Pope, R. K., Leroux, B. M., ... Bishop-lilly, K. A. (2017). *crossm Development and Use of Personalized Bacteriophage-Based Therapeutic Cocktails To Treat a Patient with a Disseminated*. 61(10), 1–14.
- Hill, D. D., Owens, W. E., & Tchounwou, P. B. (2015). *The Impact of Rainfall on Fecal Coliform Bacteria in Bayou Dorcheat (North The Impact of Rainfall on Fecal Coliform Bacteria in Bayou Dorcheat (North Louisiana)*. April 2006. <https://doi.org/10.3390/ijerph2006030013>
- Hutinel, M., Huijbers, P. M. C., Fick, J., Åhrén, C., Larsson, D. G. J., & Flach, C. F. (2019). Population-level surveillance of antibiotic resistance in Escherichia coli through sewage analysis. *Eurosurveillance*, 24(37), 1–11. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.37.1800497>
- I, Yu, C., Chen, R., Li, J. J., Li, J. J., Drahansky, M., Paridah, M. ., Moradbak, A., Mohamed, A. ., Owolabi, FolaLi, H. abdulwahab taiwo, Asniza, M., Abdul Khalid, S. H. ., Sharma, T., Dohare, N., Kumari, M., Singh, U. K., Khan, A. B., Borse, M. S., Patel, R., ... Reading, F. (2012). We are IntechOpen , the world ' s leading publisher of Open Access books Built by scientists , for scientists TOP 1 % . *Intech, i(tourism)*, 13. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2011.12.014>
- Ibañez, J. J. (2011). *La Rápida Coevolución Bacterias-Virus: Repercusiones Sobre la Estructura de las Comunidades Microbianas del Suelo*. <https://www.madrimasd.org/blogs/universo/2011/10/20/138956>
- Jara, L. M., Ulloa-stanojlovic, F. M., & Carlos, S. (2014). *Aislamiento y detección de Escherichia coli y Campylobacter jejuni potencialmente patogénicas en palomas urbanas de un distrito de la ciudad de*. October 2019.
- Johnson, A. (2020). *Science Education Alliance*. <https://www.hhmi.org/programs/science-education-alliance>
- Jorge E. Vidal, PhDI, II; Adrián Canizález-Román, PhDIII, IV; Javier Gutiérrez-Jiménez, PhDV; Fernando Navarro-García, P. (n.d.). *Patogénesis molecular, epidemiología y diagnóstico de Escherichia coli enteropatógena*. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-36342007000500008
- Kakooza, S., Tayebwa, D. S., Njalira, K. R., Kayaga, E. B., Asimwe, I., Komugisha, M., Wanyana, M., Kisekka, R., Kyabarongo, A., Kiryabwire, D. H., Nabatta, E., & Eneku, W. (2023). *Reflections on Drivers for the Emergence and Spread of*

Antimicrobial Resistant Bacteria Detected from Chickens reared on Commercial Layer Farms in Mukono District , Uganda. December.

- Kim, S. H., Adeyemi, D. E., & Park, M. K. (2021). Characterization of a new and efficient polyvalent phage infecting e. Coli o157:H7, salmonella spp., and shigella sonnei. *Microorganisms*, 9(10). <https://doi.org/10.3390/microorganisms9102105>
- Lajaunie, C., & Ho, C. W. L. (2018). Pathogens collections, biobanks and related-data in a One Health legal and ethical perspective. *Parasitology*, 145(5), 688–696. <https://doi.org/10.1017/S0031182017001986>
- Leekitcharoenphon, P., Johansson, M. H. K., Munk, P., Malorny, B., Skarżyńska, M., Wadepohl, K., Moyano, G., Hesp, A., Veldman, K. T., Bossers, A., Graveland, H., van Essen, A., Battisti, A., Caprioli, A., Blaha, T., Hald, T., Daskalov, H., Saatkamp, H. W., Stärk, K. D. C., ... Aarestrup, F. M. (2021). Genomic evolution of antimicrobial resistance in Escherichia coli. *Scientific Reports*, 11(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-93970-7>
- Li, E., Saleem, F., Edge, T. A., & Schellhorn, H. E. (2021). Biological indicators for fecal pollution detection and source tracking: A review. *Processes*, 9(11). <https://doi.org/10.3390/pr9112058>
- Li, P., Wang, H., Li, M., Qi, W., Qi, Z., Chen, W., Dong, Y., Xu, Z., & Zhang, W. (2022). Characterization and genome analysis of a broad lytic spectrum bacteriophage P479 against multidrug-resistant Escherichia coli. *Virus Research*, 308(August 2021), 198628. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2021.198628>
- Liberman, M., Soliz, H., Mercado, M., Zeballos, M., Martinez, O., & Rocabado, P. (2021). Línea Base e indicadores para el monitoreo de la Biodiversidad y fuentes de Agua en el Municipio de La Paz. *Gobierno Autónomo Municipal de La Paz - GAMLP*, 263–422. <http://sitservicios.lapaz.bo/biodiversidad/presentacion-linea-base.html>
- Liliana Serwecińska. (2020). Antimicrobials and Antibiotic-Resistant Bacteria : *Water*, 12, 3313–3330.
- Lin, R. C., Sacher, J. C., Ceysens, P. J., Zheng, J., Khalid, A., & Iredell, J. R. (2021). Phage Biobank: Present Challenges and Future Perspectives. *Current Opinion in Biotechnology*, 68, 221–230. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2020.12.018>
- López-Lozano, L., González-Barón, S., Jiménez-Martínez, A., Martín-Sánchez, A., Martín-Barriga, J., ... & García-Rodríguez, J. M. (2021). Informe sobre Resistencia Antimicrobiana 2021. *Quimioterapia, Sociedad Española De*, 35(1), 3–12. <https://seq.es/wp-content/uploads/2021/10/Informe-RAM-2021.pdf>
- Loponte, R., Pagnini, U., Iovane, G., & Pisanelli, G. (2021). Phage therapy in veterinary medicine. *Antibiotics*, 10(4). <https://doi.org/10.3390/antibiotics10040421>
- Maal, K. B., Delfan, A. S., & Salmanizadeh, S. (2015). *Isolation and Identification of Two*

Novel Escherichia coli Bacteriophages and Their Application in Wastewater Treatment and Coliform 's Phage Therapy. 8(3). <https://doi.org/10.5812/jjm.14945>

- Magiorakos, A., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., Harbarth, S., & Hindler, J. F. (2011). bacteria : an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(3), 268–281. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>
- Majumder, S., Jung, D., Ronholm, J., & George, S. (2021). Correction to: Prevalence and mechanisms of antibiotic resistance in Escherichia coli isolated from mastitic dairy cattle in Canada (BMC Microbiology, (2021), 21, 1, (222), 10.1186/s12866-021-02280-5). *BMC Microbiology*, 21(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12866-021-02301-3>
- Mangalea, M. R., & Duerkop, B. A. (2020). Fitness Trade-Offs Resulting from Bacteriophage Resistance. *American Society for Microbiology*, June, 1–15.
- McLean, S. K., Dunn, L. A., & Palombo, E. A. (2013). Phage inhibition of escherichia coli in ultrahigh-temperature-treated and raw milk. *Foodborne Pathogens and Disease*, 10(11), 956–962. <https://doi.org/10.1089/fpd.2012.1473>
- Medina-Pizzali, M. L., Hartinger, S. M., Salmon-Mulanovich, G., Larson, A., Riveros, M., & Mäusezahl, D. (2021). Antimicrobial resistance in rural settings in latin America: A scoping review with a one health lens. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(18), 1–18. <https://doi.org/10.3390/ijerph18189837>
- Montso, P. K., Mlambo, V., & Ateba, C. N. (2019). Characterization of Lytic Bacteriophages Infecting Multidrug-Resistant Shiga Toxigenic Atypical Escherichia coli O177 Strains Isolated From Cattle Feces. *Frontiers in Public Health*, 7(November), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2019.00355>
- Morris et al., 2012, & et al., 2012. (2015). 基因的改变 NIH Public Access. *Gerontology*, 61(6), 515–525. <https://doi.org/10.1007/s12275-014-4087-z>.Phage
- Murray, C. J., Ikuta, K. S., Sharara, F., Swetschinski, L., Robles Aguilar, G., Gray, A., Han, C., Bisignano, C., Rao, P., Wool, E., Johnson, S. C., Browne, A. J., Chipeta, M. G., Fell, F., Hackett, S., Haines-Woodhouse, G., Kashef Hamadani, B. H., Kumaran, E. A. P., McManigal, B., ... Naghavi, M. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*, 399(10325), 629–655. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)
- Nachimuthu, R., Madurantakam Royam, M., Manohar, P., & Leptihn, S. (2021). Application of bacteriophages and endolysins in aquaculture as a biocontrol measure. *Biological Control*, 160(May), 104678. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2021.104678>
- Nagel, T., Musila, L., Muthoni, M., Nikolich, M., Nakavuma, J. L., & Clokie, M. R. J.

(2020). *Since January 2020 Elsevier has created a COVID-19 resource centre with free information in English and Mandarin on the novel coronavirus COVID- 19. The COVID-19 resource centre is hosted on Elsevier Connect , the company ' s public news and information . January.*

- Nale, J. Y., Vinner, G. K., Lopez, V. C., Thanki, A. M., Phothaworn, P., Thiennimitr, P., Garcia, A., AbuOun, M., Anjum, M. F., Korbsrisate, S., Galyov, E. E., Malik, D. J., & Clokie, M. R. J. (2021). An Optimized Bacteriophage Cocktail Can Effectively Control Salmonella in vitro and in Galleria mellonella. *Frontiers in Microbiology, 11*(January). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.609955>
- Nasrollahian, S., Graham, J. P., & Halaji, M. (2024). A review of the mechanisms that confer antibiotic resistance in pathotypes of E. coli. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 14*(April), 1–28. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2024.1387497>
- Ngoc, T. O. H., Oanh, D. T. H., Duyen, L. E. T. M., Xuan, T. T. T., & Hoang, H. A. (2023). *Bacteriophage PVN06 protected catfish Pangasianodon hypophthalmus from Edwardsiella ictaluri infection. 28*(2), 57–64.
- Nikolich, M. P., & Filippov, A. A. (2020). *Bacteriophage Therapy : Developments and Directions.*
- Nobrega, F. L., Vlot, M., de Jonge, P. A., Dreesens, L. L., Beaumont, H. J. E., Lavigne, R., Dutilh, B. E., & Brouns, S. J. J. (2018). Targeting mechanisms of tailed bacteriophages. *Nature Reviews Microbiology, 16*(12), 760–773. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0070-8>
- O'NEILL, J. (2024). a Review on Antibiotic Resistance. *Indian Journal of Health Care Medical & Pharmacy Practice, 5*(1), 50–56. <https://doi.org/10.59551/ijhmp/25832069/2024.5.1.70>
- OMS. (2021a). *La escasez mundial de antibióticos innovadores favorece la aparición y propagación de la farmacorresistencia.* <https://www.who.int/es/news/item/15-04-2021-global-shortage-of-innovative-antibiotics-fuels-emergence-and-spread-of-drug-resistance>
- OMS. (2021b). *Patógenos multirresistentes que son prioritarios para la OMS.* <https://www.paho.org/es/noticias/4-3-2021-patogenos-multirresistentes-que-son-prioritarios-para-oms>
- OMS. (2022). *Agua y Saneamiento.* Organizacion Mundia de La Salud. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/sanitation>
- OMS. (2024). *La OMS publica un informe sobre el estado del desarrollo de los antibacterianos.* <https://www.who.int/news/item/14-06-2024-who-releases-report-on-state-of-development-of-antibacterials>

- ONU. (2022). *La OMS alerta de que el desarrollo de nuevos antibióticos está “estancado.”* <https://news.un.org/es/story/2022/06/1510742#:~:text=El desarrollo de nuevos antibióticos está “estancado” y es insuficiente,clases que ya enfrentan resistencias.>
- Park, M., Lee, J. H., Shin, H., Kim, M., Choi, J., Kang, D. H., Heu, S., & Ryu, S. (2012). Characterization and comparative genomic analysis of a novel bacteriophage, SFP10, simultaneously inhibiting both *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(1), 58–69. <https://doi.org/10.1128/AEM.06231-11>
- Pleydell, E. J., Brown, P. E., Woodward, M. J., Davies, R. H., & French, N. P. (2007). *Sources of Variation in the Ampicillin-Resistant Escherichia coli Concentration in the Feces of Organic Broiler Chickens*. 73(1), 203–210. <https://doi.org/10.1128/AEM.01482-06>
- Pokharel, P., Dhakal, S., & Dozois, C. M. (2023). The Diversity of *Escherichia coli* Pathotypes and Vaccination Strategies against This Versatile Bacterial Pathogen. *Microorganisms*, 11(2). <https://doi.org/10.3390/microorganisms11020344>
- Pońska, M., & Sokołowska, B. (2019). Review bacteriophages—a new hope or a huge problem in the food industry. *AIMS Microbiology*, 5(4), 324–347. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2019.4.324>
- Poma, V., Mamani, N., & Iñiguez, V. (2016). Impact of urban contamination of the La Paz River basin on thermotolerant coliform density and occurrence of multiple antibiotic resistant enteric pathogens in river water, irrigated soil and fresh vegetables. *SpringerPlus*, 5(1). <https://doi.org/10.1186/s40064-016-2132-6>
- Ranveer, S. A., Dasriya, V., Ahmad, F., Dhillon, H. S., Samtiya, M., & Shama, E. (2024). *Positive and negative aspects of bacteriophages and their immense role in the food chain.* <https://doi.org/10.1038/s41538-023-00245-8>
- Rodríguez-Rubio, L., Martínez, B., Donovan, D. M., Rodríguez, A., & García, P. (2013). Bacteriophage virion-associated peptidoglycan hydrolases: Potential new enzymes. *Critical Reviews in Microbiology*, 39(4), 427–434. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2012.723675>
- Roxana, L., & Castillo, M. (2015). *SECRETARIA EDUCACIÓN CONTINUA.*
- Runa, V., Wenk, J., Bengtsson, S., Jones, B. V., & Lanham, A. B. (2021). Bacteriophages in Biological Wastewater Treatment Systems: Occurrence, Characterization, and Function. *Frontiers in Microbiology*, 12(October). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.730071>
- Salam, M. A., Al-Amin, M. Y., Salam, M. T., Pawar, J. S., Akhter, N., Rabaan, A. A., & Alqumber, M. A. A. (2023). Antimicrobial Resistance: A Growing Serious Threat for Global Public Health. *Healthcare (Switzerland)*, 11(13), 1–20.

<https://doi.org/10.3390/healthcare11131946>

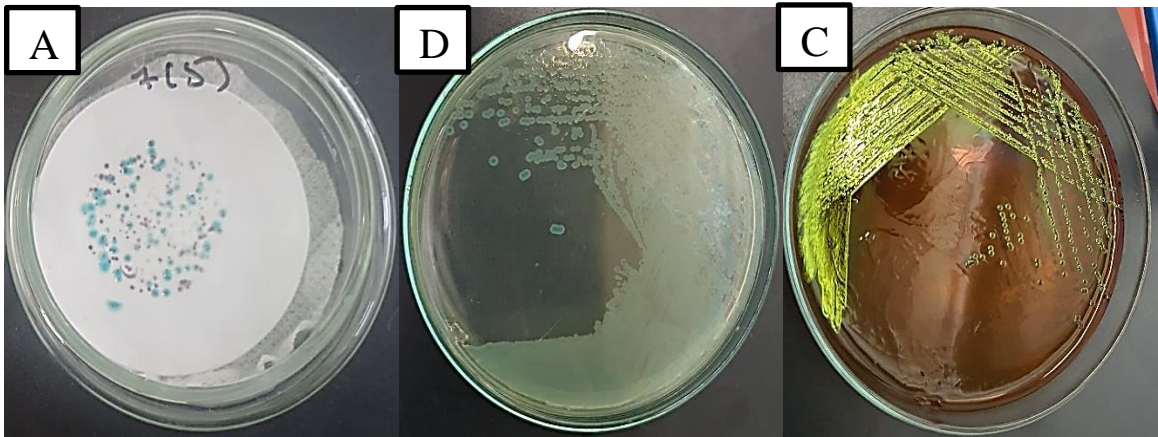
- Sattar, S., Bailie, M., Yaqoob, A., Khanum, S., Fatima, K., Altaf, A. U. R. Bin, Ahmed, I., Shah, S. T. A., Munawar, J., Zehra, Q. A., Daud, S., Arshad, A., Imdad, K., Javed, S., Tariq, A., Bostan, N., & Altermann, E. (2023). Characterization of two novel lytic bacteriophages having lysis potential against MDR avian pathogenic *Escherichia coli* strains of zoonotic potential. *Scientific Reports*, *13*(1), 1–20. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-37176-z>
- Shaw, R. K., Berger, C. N., Pallen, M. J., Sjöling, Å., & Frankel, G. (2011). *Flagella mediate attachment of enterotoxigenic Escherichia coli to fresh salad leaves*. *3*, 112–117. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2010.00195.x>
- Sieiro, C., Areal-hermida, L., Pichardo-gallardo, Á., Almuiña-gonzález, R., de Miguel, T., Sánchez, S., Sánchez-pérez, Á., & Villa, T. G. (2020). A hundred years of bacteriophages: Can phages replace antibiotics in agriculture and aquaculture? *Antibiotics*, *9*(8), 1–30. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9080493>
- Smit, C. C. H., Lambert, M., Rogers, K., Djordjevic, S. P., Van Oijen, A. M., Keighley, C., Taxis, K., Robertson, H., & Pont, L. G. (2023). One Health Determinants of *Escherichia coli* Antimicrobial Resistance in Humans in the Community: An Umbrella Review. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(24). <https://doi.org/10.3390/ijms242417204>
- Stanton, I. C., Bethel, A., Leonard, A. F. C., Gaze, W. H., & Garside, R. (2022). Existing evidence on antibiotic resistance exposure and transmission to humans from the environment: a systematic map. *Environmental Evidence*, *11*(1), 1–24. <https://doi.org/10.1186/s13750-022-00262-2>
- Sui, B., Han, L., Ren, H., Liu, W., & Zhang, C. (2021). A Novel Polyvalent Bacteriophage vB_EcoM_swi3 Infects Pathogenic *Escherichia coli* and *Salmonella enteritidis*. *Frontiers in Microbiology*, *12*(July), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.649673>
- Sulakvelidze, A., Alavidze, Z., & Morris, J. (2001). Bacteriophage therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *45*(3), 649–659. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.3.649-659.2001>
- Sullivan, K. (2008). *Increasing Resistance in Commensal Escherichia coli , Bolivia and Peru*. *14*(20060204), 2007–2009.
- Supply, F. O. R. W. (n.d.). *Integrating water quality testing into household surveys*.
- Tang, S., Biswas, S. K., Tan, W. S., Saha, A. K., & Leo, B. (2019). *Efficacy and potential of phage therapy against multidrug resistant Shigella spp* . 1–31. <https://doi.org/10.7717/peerj.6225>
- Tellez-Carrasquilla, S., Rodríguez, E. A., & Jiménez, J. N. (2023). Alta frecuencia de

- bacilos Gram negativos de importancia clínica resistentes a betalactámicos en efluentes de aguas residuales hospitalarias. *Infectio*, 27(2), 78–85. <https://doi.org/10.22354/24223794.1126>
- Toledo, C. C., Mentzer, A. Von, Agramont, J., Thorell, K., Zhou, Y., Szabó, M., Colque, P., Kuhn, I., Gutiérrez-cortez, S., & Joffré, E. (2023). *expressing CS23 from the environment to clinical settings*. 8(5).
- Treviño, N., & Molina, N. B. (2022). Antibióticos: mecanismos de acción y resistencia bacteriana. *Material de Cátedra Correspondiente a La Clase: Generalidades de Bacteriología, figura 1*, 1–9. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/136280>
- Tribble, D. R., & Disease, I. (2018). *HHS Public Access*. 182(Suppl 2), 17–25. <https://doi.org/10.7205/MILMED-D-17-00068.Antibiotic>
- UNESCO. (2021). *The global water quality challenge & SDGs*. <https://en.unesco.org/waterquality-iiwq/wq-challenge>
- Usue Pérez López, M. L. calvo. (2019). *¿Qué papel tiene la agricultura en la transmisión de la resistencia a antibióticos?* <https://theconversation.com/que-papel-tiene-la-agricultura-en-la-transmision-de-la-resistencia-a-antibioticos-126369>
- Utiiversity, K., Yamaguchi, Y., & Yanagida, M. (1978). *Binding of the Structural Protein sot to the Head Shell of*.
- Vale, P. F., & Little, T. J. (2010). *CRISPR-mediated phage resistance and the ghost of coevolution past*. *March*, 2097–2103. <https://doi.org/10.1098/rspb.2010.0055>
- Velazquez-Meza, M. E., Galarde-López, M., Carrillo-Quiróz, B., & Alpuche-Aranda, C. M. (2022). Antimicrobial resistance: One Health approach. *Veterinary World*, 15(3), 743–749. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2022.743-749>
- Venturini, C., Petrovic Fabijan, A., Fajardo Lubian, A., Barbirz, S., & Iredell, J. (2022). Biological foundations of successful bacteriophage therapy. *EMBO Molecular Medicine*, 14(7), 1–20. <https://doi.org/10.15252/emmm.202012435>
- Wang, J., Pan, R., Dong, P., Liu, S., Chen, Q., Borthwick, A. G. L., Sun, L., Xu, N., & Ni, J. (2022). Supercarriers of antibiotic resistome in a world's large river. *Microbiome*, 10(1), 1–19. <https://doi.org/10.1186/s40168-022-01294-z>
- Weber-d, B., & Mi, R. (2020). *Phage Therapy in Poland – a Centennial Journey to the First Ethically Approved Treatment Facility in Europe*. 11(June). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01056>
- WHO. (2009). Addendum To the Who Guidelines for Safe Recreational Water Environments , Volume 1 , Coastal and Fresh Waters. *Water*, 1, 36.
- Wójcicki, M., Średnicka, P., Błażej, S., Gientka, I., Kowalczyk, M., Emanowicz, P.,

- Świder, O., Sokołowska, B., & Juszcuk-kubiak, E. (2021). Characterization and genome study of novel lytic bacteriophages against prevailing saprophytic bacterial microflora of minimally processed plant-based food products. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(22). <https://doi.org/10.3390/ijms222212460>
- Xu, Y., Yu, X., Gu, Y., Huang, X., Liu, G., & Liu, X. (2018). Characterization and genomic study of phage vB_EcoS-B2 infecting multidrug-resistant Escherichia coli. *Frontiers in Microbiology*, 9(MAY). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00793>
- Yazdi, M., Bouzari, M., Ghaemi, E. A., & Shahin, K. (2020). Isolation, Characterization and Genomic Analysis of a Novel Bacteriophage VB_EcoS-Golestan Infecting Multidrug-Resistant Escherichia coli Isolated from Urinary Tract Infection. *Scientific Reports*, 10(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63048-x>
- Yohans, H., Mitiku, B. A., & Tassew, H. (2022). Levels of Escherichia coli as Bio-Indicator of Contamination of Fish Food and Antibiotic Resistance Pattern Along the Value Chain in Northwest Ethiopia. *Veterinary Medicine: Research and Reports*, Volume 13, 299–311. <https://doi.org/10.2147/vmrr.s373738>
- Yu, M. X., Slater, M. R., & Ackermann, H. W. (2006). Isolation and characterization of Thermus bacteriophages. *Archives of Virology*, 151(4), 663–679. <https://doi.org/10.1007/s00705-005-0667-x>
- Zhang, H. Z., Shu, M., Yang, W. Y., Pan, H., Tang, M. X., Zhao, Y. Y., Zhong, C., & Wu, G. P. (2023). Isolation and characterization of a novel Salmonella bacteriophage JNwz02 capable of lysing Escherichia coli O157:H7 and its antibacterial application in foods. *Lwt*, 173(June 2022), 114251. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.114251>

ANEXOS

Anexo 1. A) y B) Colonias de *E. coli* en medio ECC por el método de filtración por membranas (colonias azules aisladas). C) Colonias de *E. coli*, verde metálicas en medio EMB.



Anexo 2: Micrografía de microscopía electrónica de transmisión (TEM) que muestra el reconocimiento de receptores bacterianos por el fago.

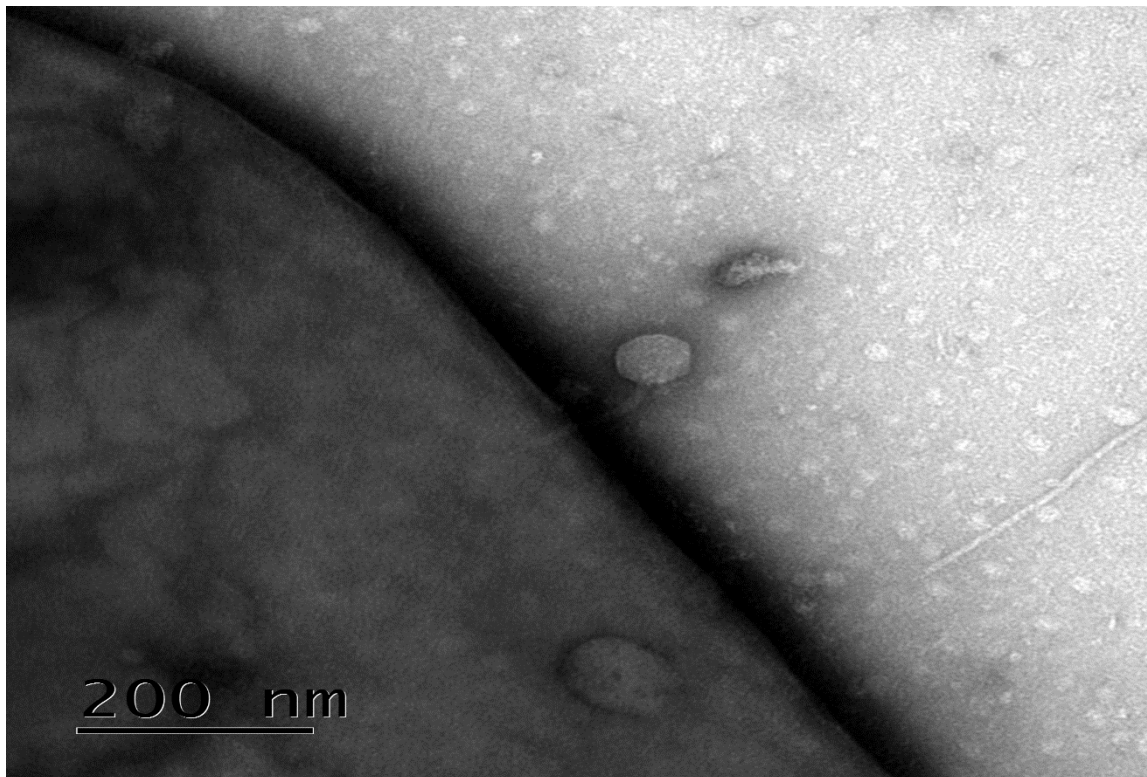


Tabla 1: Datos de aislamiento de cepas de *Escherichia coli*

DATOS DE MUESTREO											Pruebas bioquímicas				
Fecha	Sitio	Ubicación	Tipo de Muestra	Código	Factor de dilución	Peso (g)	UFC	UFC/mL	UFC/100mL	UFC/g	SIM	TSI	LIA	Urea	Citrato
19/4/2022	Río Choqueyapu	16°32'23.559"S 68°5'40.581"W	Agua superficial	A13	10000	-	2	20000	2000000	-	+	A/A	+	-	-
19/4/2022	Río Choqueyapu	16°31'59.029"S 68°5'53.344"W	Agua superficial	3D	1000	-	11	11000	1100000	-	+	A/A	+	-	-
21/9/2022	Florida. P. Amor de Dios	16°32'58.153"S 68°5'32.725"W	Agua superficial	5D	10000	-	5	50000	5000000	-	+	A/A	+	-	-
21/9/2022	Pasarela achumani	16°31'47.043"S 68°4'25.854"W	Agua superficial	AR1	1000	-	7	7000	700000	-	+	A/A	+	-	-
21/9/2022	Río Irpavi	16°31'33.083"S 68°5'22.257"W	Agua superficial	R2	1000	-	15	15000	1500000	-	+	A/A	+	-	-
	Sorata	15°46'45.821"S 68°37'56.621"W	Heces de aves de corral	SO1	-	-	-	-	-	-	+	A/A	+	-	-
	Sorata	15°46'45.821"S 68°37'56.621"W	Heces de aves de corral	SO2	-	-	-	-	-	-	+	A/A	+	-	-
	Sorata	15°46'45.821"S 68°37'56.621"W	Heces de aves de corral	SO3	-	-	-	-	-	-	+	A/A	+	-	-
	Sorata	15°46'45.821"S 68°37'56.621"W	Heces de aves de corral	SO4	-	-	-	-	-	-	+	A/A	+	-	-
	Sorata	15°46'45.821"S 68°37'56.621"W	Heces de aves de corral	SO5	-	-	-	-	-	-	+	A/A	+	-	-
	Sorata	15°46'45.821"S 68°37'56.621"W	Heces de aves de corral	SO8	-	-	-	-	-	-	+	A/A	+	-	-
2/6/2023	Palomar	16°41'12.992"S 68°0'19.182"W	Lechuga	LEC	1000	75	12	12000	1200000	16000	+	A/A	+	-	-
2/6/2023	Palomar	16°41'12.992"S 68°0'19.182"W	Acelga	ACE	1000	34	6	6000	600000	17647	+	A/A	+	-	-
2/6/2023	Palomar	16°41'12.992"S 68°0'19.182"W	Manzanilla	MEC	10000	8	14	140000	14000000	1750000	+	A/A	+	-	-
15/6/2023	Palomar	16°41'12.992"S 68°0'19.182"W	Cebada	CEB	10000	7	9	90000	9000000	1285714	+	A/A	+	-	-
2/6/2023	Río Irpavi	16°41'12.992"S 68°0'19.182"W	Agua superficial	RLP	10000	5	22	220000	22000000	4400000	+	A/A	+	-	-
2/6/2023	Florida. P. Amor de Dios	16°32'58.153"S 68°5'32.725"W	Agua superficial	RLP1	1000	-	45	45000	4500000	-	+	A/A	+	-	-
2/6/2023	Valencia	16°38'20.479"S 68°0'58.336"W	Agua superficial	FS-1	1000	-	32	32000	3200000	-	+	A/A	+	-	-
2/6/2023	Valencia	16°38'20.479"S 68°0'58.336"W	Sedimento	2D5	10000	-	12	120000	12000000	-	+	A/A	+	-	-
8/6/2023	Río Choqueyapu	16°32'23.559"S 68°5'40.581"W	Agua superficial	RLP3	1000	-	3	3000	300000	-	+	A/A	+	-	-
9/6/2023	Mecapaca	16°40'30.610"S 68°1'0.4208"W	Agua superficial	RLP2	10000	-	4	40000	4000000	-	+	A/A	+	-	-
9/6/2023	Valencia	16°38'20.479"S 68°0'58.336"W	Agua superficial	RLP4	10000	-	12	120000	12000000	-	+	A/A	+	-	-
12/6/2023	El palomar	16°41'12.992"S 68°0'19.182"W	Sedimento	F2RLP	10000	-	23	230000	23000000	-	+	A/A	+	-	-
12/6/2023	El palomar	16°41'12.992"S 68°0'19.182"W	Agua superficial	15EC	10000	-	12	120000	12000000	-	+	A/A	+	-	-
15/6/2023	Sorata	15°46'45.821"S 68°37'56.621"W	Heces de aves de corral	SH3	1000	0,1	6	6000	600000	6000000	+	A/A	+	-	-
15/6/2023	Sorata	15°46'45.821"S 68°37'56.621"W	Heces de aves de corral	SH1	10000	1,1	21	210000	21000000	19090909	+	A/A	+	-	-
15/6/2023	Sorata	15°46'45.821"S 68°37'56.621"W	Heces de aves de corral	SH2	1000	0,8	24	24000	2400000	3000000	+	A/A	+	-	-
15/6/2023	Sorata	15°46'45.821"S 68°37'56.621"W	Heces de aves de corral	SH4	10000	0,2	13	130000	13000000	65000000	+	A/A	+	-	-
15/6/2023	Sorata	15°46'45.821"S 68°37'56.621"W	Heces de aves de corral	SH5	1000	1,4	15	15000	1500000	1071429	+	A/A	+	-	-
15/6/2023	Sorata	15°46'45.821"S 68°37'56.621"W	Heces de aves de corral	SH6	10000	1,2	8	80000	8000000	6666667	+	A/A	+	-	-
15/6/2023	Sorata	15°46'45.821"S 68°37'56.621"W	Heces de aves de corral	SH10	1000	1	3	3000	300000	300000	+	A/A	+	-	-
15/6/2023	Sorata	15°46'45.821"S 68°37'56.621"W	Heces de aves de corral	SH7	10000	0,4	16	160000	16000000	40000000	+	A/A	+	-	-
15/6/2023	Sorata	15°46'45.821"S 68°37'56.621"W	Heces de aves de corral	GM	10000	0,9	12	120000	12000000	13333333	+	A/A	+	-	-
15/6/2023	Río Irpavi	16°31'33.083"S 68°5'22.257"W	Agua superficial	SAH	10000	-	5	50000	5000000	-	+	A/A	+	-	-
15/6/2023	Florida. P. Amor de Dios	16°32'58.153"S 68°5'32.725"W	Agua superficial	ST1	10000	-	7	70000	7000000	-	+	A/A	+	-	-
12/11/2023	Mecapaca	16°39'46.246"S 68°1'50.879"W	Agua superficial	PT1	1000	-	12	12000	1200000	-	+	A/A	+	-	-
12/11/2023	Mecapaca	16°39'46.246"S 68°1'50.879"W	Sedimento	PT2	10000	-	11	110000	11000000	-	+	A/A	+	-	-
12/11/2023	Mecapaca	16°40'25.099"S 68°1'19.712"W	Acelga	ACE2	1000	29	22	22000	2200000	75862	+	A/A	+	-	-
12/11/2023	Mecapaca	16°40'25.099"S 68°1'19.712"W	Perejil	PER2	10000	8	4	40000	4000000	500000	+	A/A	+	-	-
12/11/2023	Mecapaca	16°40'25.099"S 68°1'19.712"W	Brocoli	BROC	1000	22	13	13000	1300000	59091	+	A/A	+	-	-

Las cepas presuntivas fueron inoculadas en medio SIM, observándose la formación del anillo indólico. En agar TSI, se detectó la producción de gas y ácido con una reacción ácido-alcalina. La prueba de LIA mostró una reacción positiva para la descarboxilación de lisina y la desaminación oxidativa de la arginina. La prueba de urea resultó negativa, indicando que *E. coli* no hidroliza urea, y la prueba de citrato también fue negativa

Tabla 2. Porcentaje de resistencia y sensibilidad a cada antibiótico de las 40 cepas de *E. coli* aisladas.

	Resistencia	%	Sensibilidad	%
AMP	34	85	6	15
AMC	27	67,5	13	32,5
IMP	15	37,5	25	62,5
CAZ	18	45	22	55
CTX	30	75	10	25
FEP	27	67,5	13	32,5
FOX	7	17,5	33	82,5
ATM	20	50	20	50
MEM	20	50	20	50
GM	32	80	8	20
AK	33	82,5	7	17,5
CIP	27	67,5	13	32,5
NA	28	70	12	30
TE	21	52,5	19	47,5
SXT	12	30	28	70

Tabla 3. Datos del aislamiento de los bacteriófagos y la familia a la que corresponden.

CODIGO	FAGO	Sitio de muestra	Familia
FS-5	Ec 1	Heces de aves de corral	<i>Myoviridae</i>
SW-3	Ec 2	Heces de aves de corral	-
HMCO-4	Ec 3	Aguas superficiales	-
SW-1	Ec 4	Heces de aves de corral	-
SW-2	Ec 5	Heces de aves de corral	-
HMPI-4	Ec 6	Aguas superficiales	<i>Myoviridae</i>
WS-2	Ec 7	Aguas superficiales	<i>Myoviridae</i>
WS-1	Ec 8	Aguas superficiales	-
FS-1	Ec 9	Heces de aves de corral	-
MIX	Ec 10	Aguas superficiales	<i>Myoviridae</i>
HMPO-4	Ec 11	Aguas superficiales	-
CS-2	Ec 12	Aguas superficiales	<i>Myoviridae</i>

Tabla 4. Rango de hospedero de los 12 fagos frente a las 40 cepas de *E. coli* aisladas y las cepas ATCC. El valor 0 indica que no hubo actividad lítica, el valor 1 indica una ralentización del crecimiento bacteriano y el valor 2 indica lisis de la bacteria.

	Ec1	Ec2	Ec3	Ec4	Ec5	Ec6	Ec7	Ec8	Ec9	Ec10	Ec11	Ec12
A13	2	0	1	0	0	2	2	0	0	2	1	2
3D	2	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1
5D	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
AR1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
R2	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
RLP	1	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0	1
RLP1	0	1	0	0	0	0	2	0	1	2	0	1
FS-1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	2	1	2
2D5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RLP3	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
RLP2	2	0	1	1	0	2	2	1	0	2	0	1
RLP4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
F2RLP	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
15EC	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SAH	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
ST1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PT1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
PT2	1	0	0	1	0	1	1	0	0	2	1	2
CEB	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
ACE2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PER	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
BROC	0	1	0	0	2	1	0	2	0	0	0	0
LEC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ACE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MEC	2	0	2	0	0	1	1	0	0	0	0	1
SO1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1
SO2	2	1	0	1	0	1	2	0	1	2	0	2
SO3	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
SO4	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SO5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SO8	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
SH3	0	0	0	0	0	2	0	0	0	2	0	0
SH1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	2	0	2
SH2	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1
SH4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SH5	2	0	1	0	1	2	2	0	1	2	0	2
SH6	0	1	0	2	0	2	0	0	0	0	1	2
SH10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SH7	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
GM	1	0	0	1	0	2	2	0	1	2	0	1
<i>E. coli</i> ATCC 35218	2	0	0	2	0	2	2	0	0	2	0	2
<i>E. coli</i> ATCC 25922	2	2	2	0	2	2	2	2	2	2	2	2
<i>S. Typhimurium</i>	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	2
<i>S. infantis</i>	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	2
<i>S. aureus</i> ATCC 6538p	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabla 5. Media de las lecturas de OD 600 por hora del fago Ec 12 frente a *Escherichia coli* ATCC 25922.

TIEMPO	CONTROL -	CONTROL +	MOI 100	MOI 10	MOI 1	MOI 0,1	MOI 0,01
0	0,013	0,013	0,016	0,015	0,01	0,013	0,011
1	0,026	0,014	0,017	0,018	0,017	0,02	0,019
2	0,062	0,0145	0,016	0,0105	0,0095	0,01	0,01
3	0,11	0,015	0,016	0,009	0,008	0,01	0,008
4	0,246	0,015	0,018	0,01	0,008	0,01	0,008
5	0,287	0,016	0,019	0,01	0,008	0,011	0,01
6	0,335	0,018	0,018	0,009	0,007	0,011	0,009
7	0,431	0,016	0,02	0,01	0,008	0,012	0,01
8	0,455	0,018	0,019	0,01	0,008	0,012	0,01
9	0,492	0,016	0,02	0,013	0,009	0,013	0,011
10	0,542	0,015	0,022	0,015	0,013	0,016	0,014
11	0,589	0,015	0,021	0,021	0,018	0,023	0,021
12	0,573	0,013	0,025	0,026	0,023	0,029	0,026
13	0,576	0,014	0,029	0,033	0,031	0,035	0,031
14	0,593	0,015	0,033	0,04	0,037	0,042	0,036

Tabla 6. Media de las lecturas de OD 600 por hora del fago Ec 12 frente a *Escherichia coli* MDR, aislada de heces de aves corral.

TIEMPO h	CONTROL -	CONTROL +	MOI 100	MOI 10	MOI 1	MOI 0,1	MOI 0,01
1	0,062	0,058	0,065	0,064	0,063	0,062	0,062
2	0,062	0,059	0,065	0,065	0,063	0,064	0,062
3	0,063	0,06	0,065	0,064	0,063	0,062	0,062
4	0,067	0,06	0,064	0,064	0,063	0,066	0,064
5	0,081	0,06	0,065	0,065	0,068	0,075	0,08
6	0,145	0,061	0,066	0,068	0,084	0,106	0,122
7	0,433	0,063	0,069	0,104	0,173	0,233	0,266
8	0,593	0,061	0,082	0,142	0,359	0,472	0,56
9	0,702	0,063	0,155	0,364	0,591	0,619	0,676
10	0,736	0,061	0,371	0,55	0,654	0,693	0,711
11	0,77	0,06	0,596	0,626	0,677	0,712	0,75
12	0,836	0,06	0,694	0,691	0,704	0,739	0,795
13	0,93	0,058	0,723	0,721	0,762	0,833	0,903
14	0,936	0,059	0,735	0,744	0,788	0,863	0,92
15	0,996	0,06	0,766	0,743	0,784	0,904	0,985

Tabla 7. Media de las lecturas de OD 600 por hora del fago Ec 12 frente a *Escherichia coli* MDR, aislada de aguas residuales.

MOI 0,01	CONTROL -	CONTROL +	MOI 100	MOI 10	MOI 1	MOI 0,1	MOI 0,01
0,015	0,00608276	0,00057735	0,00057735	0,0011547	0,00305505	0,00152753	0,00173205
0,028	0,0087178	0,001	0,001	0,00152753	0,005	0,003	0,00208167
0,12	0,02515949	0,00057735	0,00264575	0,00665833	0,00953939	0,00503322	0,002
0,258	0,00057735	0,00264575	0,00665833	0,00953939	0,00503322	0,002	1
0,275	0,05636784	0,0011547	0,00152753	0,00754983	0,01852026	0,02396525	0,02424871
0,301	0,05781292	0	0,001	0,00754983	0,01457166	0,03951371	0,01404754
0,32	0,06954135	0,0011547	0,001	0,00953939	0,01106044	0,04118657	0,01852026
0,32	0,06724086	0,00057735	0,00208167	0,0211266	0,0080829	0,03404409	0,02635021
0,352	0,06533758	0,00152753	0,00757188	0,02055075	0,00650641	0,03464583	0,02080865
0,361	0,06533758	0,00152753	0,00757188	0,02055075	0,00650641	0,03464583	0,02080865
0,364	0,03702702	0,00152753	0,03239341	0,01665333	0,0057735	0,02500667	0,02638813
0,37	0,03666061	0,0011547	0,03064311	0,01664332	0,01101514	0,02100794	0,02858321
0,366	0,04828043	0,00378594	0,01069268	0,01457166	0,00960902	0,02302897	0,03187998
0,367	0,06184928	0,0023094	0,04326662	0,02052641	0,00776745	0,02500667	0,03011644
0,375	0,07771958	0,001	0,05129327	0,12701181	0,02402776	0,02236813	0,0322542

Tabla 8. Media de las lecturas de OD 600 por hora del fago Ec 12 frente a *Escherichia coli* resistente a antibióticos, aislada de verduras.

TIEMPO	CONTROL -	CONTROL +	MOI 100	MOI 10	MOI 1	MOI 0,1	MOI 0,01
0	0,005	0,016	0,008	0,005	0,003	0,007	0,007
1	0,008	0,016	0,009	0,01	0,007	0,01	0,012
2	0,06	0,016	0,007	0,021	0,022	0,028	0,032
3	0,169	0,016	0,08	0,03	0,065	0,091	0,144
4	0,285	0,016	0,022	0,044	0,064	0,118	0,165
5	0,308	0,016	0,038	0,082	0,126	0,206	0,215
6	0,356	0,016	0,038	0,084	0,212	0,275	0,266
7	0,432	0,016	0,04	0,143	0,232	0,307	0,305
8	0,442	0,016	0,08	0,203	0,304	0,321	0,346
9	0,516	0,016	0,116	0,21	0,357	0,413	0,394
10	0,614	0,016	0,237	0,279	0,403	0,465	0,482
11	0,694	0,016	0,273	0,334	0,411	0,568	0,576
12	0,707	0,016	0,271	0,395	0,473	0,557	0,65
13	0,741	0,016	0,371	0,452	0,473	0,557	0,661
14	0,73	0,016	0,383	0,423	0,465	0,555	0,645