

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

Identificación de Bacteriófagos de *S. enterica* por ensayos de seroneutralización y microscopía electrónica

Tesis en torno a una hipótesis o problema de investigación y su contrastación

Jorge Stuart Torres Ayala

**Sonia Zapata Mena PhD.
Director de Trabajo de Titulación**

Trabajo de titulación de posgrado presentado como requisito
para la obtención del título de Máster en Microbiología

Quito, 13 de diciembre, 2021

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ
COLEGIO DE POSGRADOS

HOJA DE APROBACIÓN DE TRABAJO DE TITULACIÓN

Identificación de Bacteriófagos de *S. enterica* por ensayos de seroneutralización y microscopía electrónica

Jorge Stuart Torres Ayala

Nombre del Director del Programa: Patricio Rojas
Título académico: M.D., Ph.D.
Director del programa de: Maestría en Microbiología

Nombre del Decano del colegio Académico: Carlos Valle
Título académico: Ph.D
Decano del Colegio: COCIBA

Nombre del Decano del Colegio de Posgrados: Hugo Burgos
Título académico: Ph.D

Quito, diciembre 2021

© DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en la Ley Orgánica de Educación Superior del Ecuador.

Nombre del estudiante: **Jorge Stuart Torres Ayala**

Código de estudiante: **00209305**

C.I.: **1722994561**

Lugar y fecha: **Quito, 13 de diciembre de 2021.**

ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN

Nota: El presente trabajo, en su totalidad o cualquiera de sus partes, no debe ser considerado como una publicación, incluso a pesar de estar disponible sin restricciones a través de un repositorio institucional. Esta declaración se alinea con las prácticas y recomendaciones presentadas por el Committee on Publication Ethics COPE descritas por Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing, disponible en <http://bit.ly/COPETheses>.

UNPUBLISHED DOCUMENT

Note: The following graduation project is available through Universidad San Francisco de Quito USFQ institutional repository. Nonetheless, this project – in whole or in part – should not be considered a publication. This statement follows the recommendations presented by the Committee on Publication Ethics COPE described by Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing available on <http://bit.ly/COPETheses>.

DEDICATORIA

Carl Sagan dijo que “cada uno de nosotros es una preciosidad, en una perspectiva cósmica (...) en un trillón de galaxias, no hallarías otro igual”, pero no necesito buscar en diferentes galaxias pues ya encontré a la persona única y sin igual que pone mi mundo de cabeza. Es por ello por lo que dedico esta investigación al amor de mi vida, mi hija, que en su tan corta vida ya me ha enseñado el significado de nuestra estadía en esta nave espacial llamada Tierra. Nuestro propósito es amar, aprender y transmitir nuestro conocimiento a las nuevas generaciones, con el fin de sacar el mejor provecho a nuestro corto tiempo bajo las estrellas.

Para ti mi Victoria, que, en tu llegada, ya te has robado mi alma y mi vida entera. La fuerza siempre estará contigo.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a Sonia Zapata Mena, por darme la oportunidad, su apoyo y liderazgo constante para poder realizar esta investigación

Quisiera agradecer a Teresa Guerrero, puesto que su enseñanza académica y su ayuda incondicional ha permitido la culminación de esta investigación.

Quisiera agradecer a todo el personal del Laboratorio de Parasitología y del Instituto de Microbiología por darme la oportunidad de aprender y trabajar en sus áreas, fomentando mi crecimiento tanto académico como personal.

Quisiera agradecer a mi esposa, Estefanía Parra por ser el pilar de mi vida, por guiarme con amor a donde debemos estar y por otorgarme una familia propia.

Quiero agradecer a mis padres y mi hermana por todo el apoyo incondicional que me han brindado a través de los años y la fuerza que me han otorgado para culminar cada etapa de mi vida.

RESUMEN

En Latinoamérica, diversas investigaciones han mostrado que *Salmonella* no tifoidea (NTS) está relacionada con un gran número de infecciones provenientes de alimentos, especialmente de productos cárnicos provenientes de aves de corral. Se conoce que la prevalencia de NTS en estos alimentos es alta; en el Ecuador, puede llegar hasta el 55.5% y el serotipo comúnmente aislado es *S. Infantis*. También se ha identificado un aumento de la prevalencia de NTS multirresistentes a antimicrobianos, y nuevamente *S. Infantis*, Enteritidis y Typhimurium los serotipos que más resistencia presentan. En Latinoamérica, cerca de 77 millones de personas sufren de infecciones bacterianas provenientes de alimentos y este problema se intensifica si las cepas causantes presentan resistencia a antimicrobianos. Con este fin, el uso de bacteriófagos para el control de *Salmonella enterica* en la industria avícola es cada vez más frecuente.

En este estudio, se aisló 3 fagos líticos de *S. enterica* a partir de una mezcla de fagos obtenidos de aguas residuales donde la una cepa de *Salmonella* *Infantis* fue la cepa hospedadora. Se produjo anticuerpos específicos para cada fago lítico en pollos broilers de 8 semanas. Se realizó cuatro inoculaciones (día 0, 8, 21 y 52) con una mezcla de fago a 10^{-9} UFP/mL y adyuvante incompleto de Freud. Luego, se realizó ensayos de sueroneutralización para evaluar la actividad del suero para bloquear la actividad lítica de los fagos. Siete bacteriófagos (Ph115-1, Ph115-2, Ph115-3, F3s2 α y F3s1 δ , M061-16 y M061-17) mostraron un perfil de respuesta diferente frente a los 3 antisueros y diferencias morfológicas bajo microscopía electrónica. Se determinó el rango de hospedador contra 4 cepas de *Salmonella* *Infantis*, donde el fago f3s1 δ mostró el mayor rango de lisis. En general, nuestros resultados demuestran que la tipificación de fagos por ensayos de sueroneutralización es una opción factible en el aislamiento y caracterización de fagos ambientales para su uso potencial como biocontrol de *Salmonella* en granjas de aves de corral.

Palabras Clave: Bacteriófagos, *Salmonella* no tifoidea (NTS), Tipificación de Bacteriófagos, Fago Terapia, Sueroneutralización

ABSTRACT

In Latin America, various investigations have shown that non-typhoid *Salmonella* (NTS) is associated with a large number of infections from food, mainly products derived from poultry. NTS prevalence on these products is high; in Ecuador, NTS prevalence can reach 55.5% and the commonly isolated serotype is *S. Infantis*. An increase in the prevalence of multidrug resistant NTS has also been identified, with *S. Infantis*, *Enteritidis* and *Typhimurium* being the serotypes with the highest resistance reported. In Latin America, about 77 million people suffer from bacterial foodborne infections, and the multidrug resistant serotypes makes recovery more difficult. To this end, the use of bacteriophages as biocontrol agents against *Salmonella* colonization is increasing in the poultry industry.

In our study, we isolated three lytic phages against *S. enterica* from a phage mixture taken from wastewater samples, using *S. Infantis* as the host strain. We produced specific antibodies for each lytic phage in six 8-week-old Broiler chickens. We did for inoculations (at day 0, 8, 21 and 52) with a phage mixture at 10^{-9} PFU/mL and incomplete Freund adjuvant. Then, we perform serological essays to assess the antisera neutralization activity against lytic phages. Seven phages (Ph115-1, Ph115-2, Ph115-3, F3s2 α y F3s1 δ , M061-16 y M061-17) showed a different response profile against the 3 types of antisera produced and showed morphological differences under electron microscopy. We determined the host range against four *Salmonella* *Infantis* serotypes, where phage F3s1 δ showed the highest lytic range. Overall, our results show that phage typing using serum-neutralization essays is a feasible option for environmental phage isolation and characterization in their potential use as biocontrol agents against *Salmonella* colonization in poultry farms.

Keywords: Bacteriophages, Non-Typhoidal *Salmonella* (NTS), Phage Typing, Phage Therapy, Serum-neutralization

TABLA DE CONTENIDO

Resumen.....	7
Abstract.....	9
Introducción	14
Revisión de literatura.....	17
<i>Salmonella</i> spp.....	17
Resistencia antimicrobiana en nts	19
Bacteriófagos	20
Ciclo de vida de los bacteriófagos.....	22
Ciclo lítico.....	24
Ciclo lisogénico.....	25
Fagoterapia.....	26
Sueroneutralización	28
Microscopia electrónica.....	29
Genómica viral de bacteriófagos.....	30
Metodología y diseño de la investigación.....	31
Zona de estudio.....	31
Periodo de investigación y permisos.....	31
Procedimiento	31
Cepas de <i>salmonella</i>	31

Aislamiento de bacteriófagos a partir de una mezcla	31
Determinación del rango de hospedador para fagos aislados	33
Producción de anticuerpos para fagos aislados	34
Determinación de la actividad neutralizante de los anticuerpos producidos	34
Ensayo de seroneutralización cruzada	35
Microscopia electrónica	35
Análisis de datos	36
Rango de hospedador de fagos aislados	36
Ensayo sueroneutralización	37
Microscopia electrónica	45
Discusión	47
Conclusiones	52
Referencias	53
Índice de Anexos	64

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla No 1: Características de las familias principales de bacteriófagos.....	21
Tabla No 2: Lista de productos comerciales basados en fagos aprobados por la FDA.....	28
Tabla No 3: Sistema de Puntuación del Rango de Hospedador	33
Tabla No 4: Rango de Hospedador de 5 fagos aislados contra <i>Salmonella enterica</i>	36
Tabla No 5: Resultados del ensayo de suero neutralización.....	38
Tabla No 6: Rango de Hospedador de Fagos aislados frente a 4 cepas de <i>S. Infantis</i>	45

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración No 1: Esquema de Infección de <i>Salmonella</i> spp.....	18
Ilustración No 2: Unión y Penetración del ácido nucleico bacteriófago	23
Ilustración No 3: Ciclo lítico y lisogénico de bacteriófagos.....	24
Ilustración No 4: Ensayo Sueroneutralización de fagos Ph115-1, Ph115-2 y Ph115-3	37
Ilustración No 5: Ensayo Sueroneutralización de fagos M061-16 y M061-17.....	39
Ilustración No 6: Ensayo Sueroneutralización cruzada	40
Ilustración No 7: Ensayo Sueroneutralización del fago F3s1 δ	43
Ilustración No 8: Ensayo Sueroneutralización del fago F3s2 α	43
Ilustración No 9: Micrografías tomadas mediante TEM de fagos F3s1 δ y F3s2 α	44
Ilustración No 10: Micrografías tomadas mediante TEM de fagos aislados	46

INTRODUCCIÓN

Diferentes serotipos de *Salmonella* no tifoidea (NTS) son una de las principales causas bacterianas de gastroenteritis en humanos (Majowicz, y otros, 2010). En algunos pacientes, las NTS causan infecciones invasivas (iNTS) graves que involucran infección de lugares estériles, como el torrente sanguíneo o las meninges. Las iNTSs tienen una tasa de letalidad de aproximadamente el 15% y se observó que la incidencia de la enfermedad en 2021 fue de 44.8 por cada 100000 personas por año (Marchello, Fiorino, & Pettini, 2021)

Se conoce que la mayoría de los casos de transmisión de NTS se da por el contacto con alimentos contaminados, principalmente por productos cárnicos (Mahon & Fields, 2016). Muchos animales se consideran reservorios de diferentes serotipos de NTS, pero se sabe que las aves de corral son el principal vehículo de infección bacteriana en la cadena alimenticia, esto se ha relacionado con diversos estudios en Latinoamérica que encontraron una conexión entre brotes de NTS con el consumo de pollos y gallinas (Mercado, Avila, & Rey, 2012) En Latinoamérica, la carne de pollo es una de las principales fuentes de alimentación y debido a esto su demanda ha aumentado a lo largo de los años, específicamente en Ecuador donde es la principal fuente de proteína animal con un consumo anual per cápita de 30.4 kg. En el Ecuador se ha reportado una prevalencia del 41.4% de *Salmonella enterica* en granjas de aves de corral y del 55.5% directamente en carne de pollo. El serotipo comúnmente aislado es *S. Infantis* con una prevalencia del 98.2% en granjas y 97.8% en carne de pollo (Mejia, Medina, Bayas, Satan, & Zapata, 2020)

En la industria y en los sistemas de producción de aves de corral, el uso de antibióticos es generalmente usado como prevención, control, tratamiento de infecciones bacterianas y como promotores de crecimiento animal (Vinueza-Burgos, Cevallos, Ron-Garrido, & Bertrand, 2016). Pero el uso indebido o excesivo de antibióticos y la falta de control ha llevado al apareamiento de

serotipos de NTS multirresistentes (OMS, 2018). En Latinoamérica, la mayor prevalencia de NTS multirresistentes proviene de productos animales y los serotipos multirresistentes comúnmente aislados fueron Enteritidis, Typhimurium e Infantis (Guerrero, Bayas-Rea, Erazo, & Zapata Mena, 2021).

El apareamiento de cepas multirresistentes constituye un riesgo a la salud pública, pues su potencial para afectar la eficacia de tratamientos con antibióticos en humanos es muy alto. Es importante encontrar nuevas alternativas para contrarrestar el apareamiento de cepas resistentes y el uso de bacteriófagos para controlar la colonización bacteriana constituye una opción efectiva; debido a su especificidad, rápido efecto bactericida y bajo costo de producción.

Varios estudios han encontrado cocteles de fagos líticos con la habilidad de reducir significativamente la colonización de NTS en aves de corral y muchos cocteles son vendidos como productos comerciales con este mismo fin (Clavijo, Baquero, & Hernandez, 2019). El uso de bacteriófagos solo puede realizarse una vez comprobada la actividad lítica de estos, de que no sean portadores de genes de factores de virulencia o de resistencia a antimicrobianos y de que no generen efectos secundarios en los animales (Garcia & Rodriguez, 2019).

La caracterización de fagos conlleva investigar sus características genotípicas y fenotípicas mediante secuenciamiento del genoma completo y microscopia electrónica. Sin embargo, estas técnicas son complicadas y bastante costosas, sin contar con la falta de personal experto en el tema (Helmy, Awad, & Mosa, 2016). Por lo tanto, se requiere de técnicas relativamente fáciles y económicas que ayuden en la caracterización de bacteriófagos y los ensayos de neutralización mediante antisuero (sueroneutralización) presentan resultados prometedores.

Los ensayos de sueroneutralización se basan en la unión de anticuerpos a un epítipo bacteriano o viral, lo que resulta en la reducción o inhibición de la capacidad infectiva de un

microorganismo (Sadeghalvad & Rezaei, 2021). De acuerdo con Ackerman (1978) en su guía para clasificar bacteriófagos, se recomienda analizar las relaciones serológicas de cada fago mediante ensayos de sueroneutralización y si dos fagos pertenecen a un mismo grupo serológico, es muy posible que estos dos fagos sean morfológicamente idénticos, y viceversa.

En este estudio se realizó la caracterización de siete bacteriófagos líticos para *S. enterica* con métodos de sueroneutralización y microscopía electrónica.

REVISIÓN DE LITERATURA

***Salmonella* spp.**

Salmonella se clasifica en dos especies, *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori*, de acuerdo con diferencias encontradas en sus secuencias del gen 16S RNA. La especie *S. enterica* se clasifica en 6 subespecies basadas en su parecido genómico y propiedades bioquímicas (Reeves & Evins, 1989). Estas subespecies se marcan con números romanos: I, *S. enterica* subsp. *enterica*; II, *S. enterica* subsp. *salamae*; IIIb, *S. enterica* subsp. *diarizonae*; IV, *S. enterica* subsp. *houtenae*; y VI, *S. enterica* subsp. *indica*. De todas estas subespecies, *S. enterica* subsp. *enterica* (I) se encuentra predominantemente en mamíferos y contribuye al 99% de las infecciones de *Salmonella* en humanos y animales de sangre caliente (Brenner & Villar, 2000).

La severidad de las infecciones de *Salmonella* en humanos varía dependiendo del serotipo involucrado y del estado inmunológico del hospedador. Los niños menores de 5 años, ancianos y pacientes con inmunosupresión son más susceptibles al patógeno que individuos sanos. Casi todas las cepas de *Salmonella* son patogénicas debido a que tienen la habilidad de invadir, replicarse y sobrevivir en células humanas, resultando en una enfermedad potencialmente fatal. Cuando la bacteria ingresa al tracto digestivo vía alimentos o agua contaminada, tienden a penetrar las células epiteliales que recubren la pared intestinal (Ilustración 1). Una vez adentro, la bacteria expresa sistemas de secreción tipo III, que son proteínas de varios canales que permiten a la bacteria inyectar sus proteínas efectoras directamente en el citoplasma de las células epiteliales. Los efectores bacterianos activan vías de transducción de señales que desencadenan la reconstrucción del citoesqueleto de la célula hospedadora, lo que resulta en que la célula hospedadora engulla a la bacteria en un proceso similar a la fagocitosis (Takaya & Suzuki, 2003).

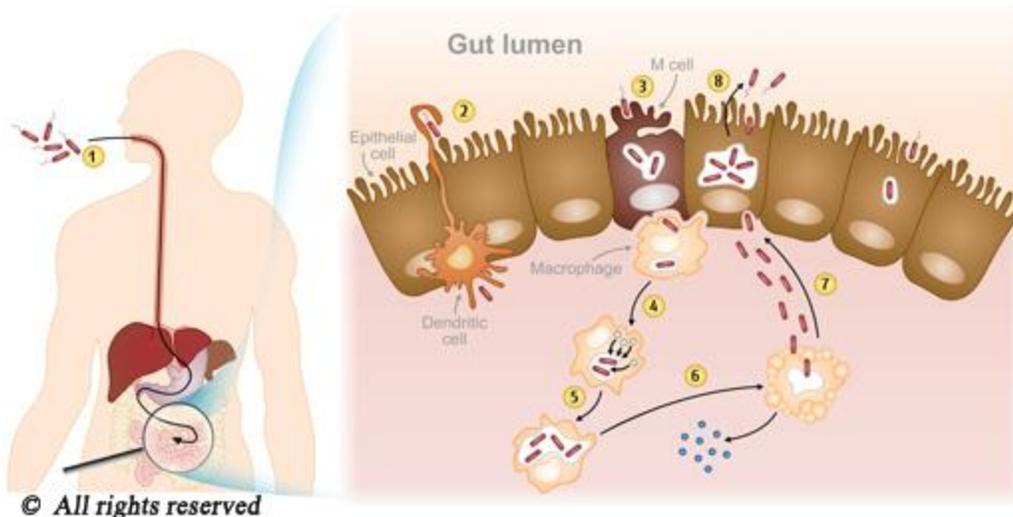


Ilustración 1: Esquema de Infección de *Salmonella* sp. (U.S FDA, 2015)

De acuerdo con los patrones clínicos de la salmonelosis humana, las cepas de *Salmonella* se pueden agrupar en *Salmonella* tifoidea y *Salmonella* no tifoidea (NTS). En las infecciones humanas, las cuatro manifestaciones clínicas son fiebre entérica, gastroenteritis, bacteriemia y complicaciones extraintestinales (Darby & Sheorey, 2008).

Las infecciones por NTS se caracterizan por gastroenteritis, una condición inflamatoria del tracto gastrointestinal que se acompaña por síntomas como diarrea sin sangre, vomito, nausea, cefaleas, dolores abdominales y mialgias. Las infecciones por NTS tienen un tiempo de incubación más corto (6 a 12 horas) y los síntomas son normalmente autolimitados, con un tiempo máximo de duración de 10 días (Crump & Kretsinger, 2008). Las complicaciones por NTS incluyen colecistitis, pancreatitis y apendicitis, esto se observa en mayor parte en pacientes inmunocomprometidos, bebés, niños pequeños y adultos mayores (Scallan & Hoekstra, 2011).

Se reporta cerca de 1 millón de casos de NTS anualmente en países desarrollados (Ajmera & Shabbir, 2021). El serotipo comúnmente aislado responsable de infecciones por NTS es *S. Enteritidis*, seguido por *S. Typhimurium* y *S. Newport*. En Latinoamérica, se encuentra una

prevalencia del 70% de NTS en productos cárnicos, frutas y vegetales y los serotipos comúnmente aislados de estos productos fueron Enteritidis, Typhimurium y Derby (Guerrero, Bayas-Rea, Erazo, & Zapata Mena, 2021).

Resistencia antimicrobiana en NTS

El grado de resistencia antimicrobiana en *Salmonella* varía de acuerdo con el país, y esta influenciado por dos factores importantes: 1) Las prácticas de uso de antibióticos en humanos y animales y 2) Diferencias geográficas en la epidemiología de *Salmonella* y diferencias de serotipos según la región (McDermott & Zhao, 2021). En el 2020, aislados de *Salmonella* sp., de casos humanos reportan niveles altos de resistencia a ampicilina, sulfonamidas y tetraciclinas, particularmente en serotipos encontrados en cerdos y otros animales de granja, mientras que la resistencia a cefalosporinas de tercera generación se encontró en niveles muy bajos. De igual forma se ha observado una reducción de resistencia a ampicilina y tetraciclina en *Salmonella* Typhimurium aislada de humanos en el periodo de 2013 a 2018 (EFSA; ECDC, 2020).

En Latinoamérica, las resistencias frecuentemente encontradas son contra tetraciclina, ampicilina, estreptomicina, ácido nalidíxico, sulfametoxazol/trimetoprima, cloranfenicol y gentamicina y los serotipos de NTS resistentes a antimicrobianos más comunes son Typhimurium, Enteritidis e Infantis, aislados tanto de granjas avícolas y porcinas, alimentos derivados de animales e infecciones humanas (Guerrero, Bayas-Rea, Erazo, & Zapata Mena, 2021).

La terapia antimicrobiana, normalmente, no se recomienda para infecciones sin complicaciones, la terapia debería ser dada para la población que tiene un mayor riesgo de infección invasiva, por ejemplo, personas mayores de 50 años, con aterosclerosis, individuos inmunocomprometidos y aquellos con enfermedades cardiacas (McDermott & Zhao, 2021).

Bacteriófagos

Los bacteriófagos, referidos comúnmente como “fagos”, son parásitos intracelulares que se multiplican dentro de la bacteria usando parte de, o toda la maquinaria biosintética de la célula bacteriana. Se encuentran distribuidos ampliamente en la naturaleza y pueden ser aislados de heces o de aguas residuales (Rao, 2016). Su alto nivel de especificidad, supervivencia a largo plazo y su habilidad para reproducirse de forma rápida en hospedadores apropiados contribuyen a la conservación del equilibrio dinámico entre la gran variedad de especies bacterianas en cualquier ecosistema natural (Kutter & Sulakvelidze, 2004).

El genoma de los fagos está compuesto por DNA o RNA, que puede ser tanto monocatenario o bicatenario, este material genético está empacado en una cápside que puede ser poliédrica (*Microviridae*, *Corticoviridae*, *Tectiviridae*, *Leviviridae*, y *Cystoviridae*), filamentosa (*Inoviridae*), pleomórfica (*Plasmaviridae*) o conectado a una cola (*Caudovirales*), hasta la fecha, la mayoría de fagos aislados poseen una cola y tienen genomas de DNA bicatenario (dsDNA) (Dion, Oeschlin, & Moineau, 2020). Fagos simples pueden tener solo de 3 a 5 genes mientras que fagos complejos pueden llegar a tener más de 100 genes (Rao, 2016).

Tabla 1: Características de las familias principales de bacteriófagos (Prada, Holguín, González, & Vives, 2015)

Familia	Naturaleza del genoma	Hospedero	Morfología
<i>Corticoviridae</i>	dsADN	Bacteria	
<i>Tectiviridae</i>	dsADN	Bacteria	
<i>Podoviridae</i>	dsADN	Bacteria	
<i>Myoviridae</i>	dsADN	Bacteria, Archaea	
<i>Myoviridae</i>	dsADN	Bacteria, Archaea	
<i>Fuselloviridae</i>	dsADN	Archaea	
<i>Guttaviridae</i>	dsADN	Archaea	
<i>Salterprovirus</i>	dsADN	Archaea	
<i>Lipothrixviridae</i>	dsADN	Archaea	

Los fagos con cola pertenecen al orden de los *Caudovirales*. Este orden viral está bajo reclasificación y actualmente comprende cinco familias: *Myoviridae*, *Siphoviridae*, *Podoviridae*, *Ackermannviridae* y *Herelleviridae* (Dion, Oeschlin, & Moineau, 2020). Las dos últimas familias fueron creadas recientemente debido a que diversos estudios metagenómicos demuestran que representan a un grupo distinto dentro de la familia *Myoviridae* (Barylski, 2019).

Se observa una gran variación entre el tamaño de la cápside entre miembros del orden *Caudovirales*, con diámetros que varían entre los 45 y 185 nm, generalmente esto está relacionado con el tamaño del genoma. La mayoría de los fagos con cola (75%) tienen una cápside con

estructura icosaédrica y el resto (15%) posee cápsides elongadas alineadas con el axis de su cola (Dion, Oeschlin, & Moineau, 2020). En el orden *Caudovirales*, la cápside está conectada a la cola a través de un complejo conector compuesto de una proteína portal anclada a proteínas conectoras, este “complejo portal” es un anillo dodecamérico con una estructura general similar compartida entre la mayoría de los fagos con cola a pesar de tener una baja similitud en la secuencia genética (Olia, Prevelige, & Johnson, 2011).

Dentro del orden *Caudovirales*, las colas de la familia *Siphoviridae* están compuestas de una proteína central rodeada por un tubo de cola que final en una proteína terminadora, esta arquitectura se observa también en fagos de la familia *Myoviridae* donde existe una capa adicional (la vaina de la proteína) que permite contracción para la inserción del tubo de la cola al hospedador bacteriano (Adrien, Effantin, & Vivés, 2017). Miembros de la familia *Podoviridae* tienen una cola corta y no contráctil, que en esencia es una extensión similar a un tubo que penetra ambas membranas celulares y es esencial para el ingreso del genoma al hospedador (Wang, Tu, & Liu, 2019)

Ciclo de vida de los bacteriófagos

Los Bacteriófagos emplean mecanismos que les permite adherirse a receptores específicos (formados por proteínas y lípidos) ubicados en la superficie bacteriana, las proteínas presentes les permiten fijarse y penetrar en la bacteria iniciando el mecanismo endolítico.

El primer paso para el proceso de infección es la adsorción del fago a la célula bacteriana. Este paso está controlado por las fibras de la cola o por estructuras análogas en aquellos fagos que carecen de estas fibras (Rao, 2016). La naturaleza y localización de los receptores bacterianos que son reconocidos por los fagos depende del tipo de fago y tipo de hospedador. Estos receptores pueden ser desde secuencias peptídicas hasta restos de polisacáridos. De hecho, se ha observado

que los fagos se unen a receptores localizados en las paredes de bacterias Gram positivas y Gram negativas, en cápsulas bacterianas, pilis y hasta flagelos (Bertozzi, Storms, & Sauvageau, 2016). Este proceso de adherencia es reversible por parte de la bacteria y para evitar esto, el fago presenta uno o más componentes en la base de la cola que aseguran la fijación del fago a la bacteria (McGrath, Fitzgerald, & Sinderen, 2004).

La unión irreversible del bacteriófago al hospedero tiene como resultado la contracción de la envoltura (en los bacteriófagos que presentan envoltura) y la cola hueca atraviesa la membrana bacteriana. Algunos bacteriófagos poseen enzimas que digieren varios componentes de la envoltura bacteriana (Kimura, Reddy, & Marcus, 2004). El ácido nucleico de la cabeza pasa a través de la cola hueca e ingresa al citoplasma bacteriano. El resto del bacteriófago se mantiene en las afueras de la bacteria como un “fantasma” (Rao, 2016) (Ilustración 2).

Dependiendo del ciclo de vida, los fagos pueden ser líticos (virulentos) o lisogénicos (temperados). Los fagos que siguen el ciclo lítico destruyen las células infectadas en un proceso llamado lisis celular (Rakhuba & Kolomiets, 2010), mientras que los fagos que poseen un ciclo lisogénico se incorporan en el genoma del hospedero y establecen una infección latente de la célula sin destruirla (Ilustración 2).

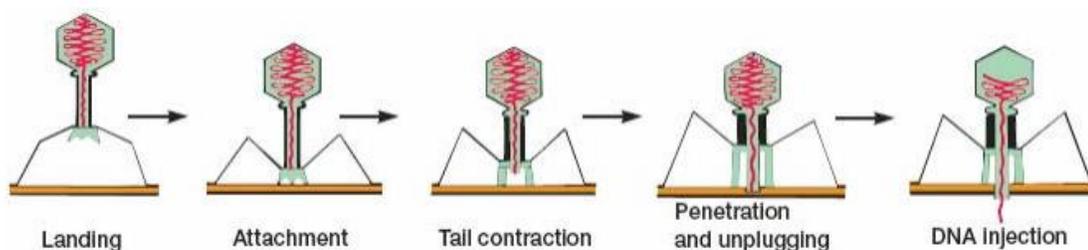


Ilustración 2: Unión y Penetración del ácido nucleico bacteriófago (Rao, 2016)

Ciclo lítico

Como se mencionó anteriormente, los bacteriófagos virulentos o líticos se multiplican dentro de sus hospederos bacterianos y destruyen a la célula por lisis al final del ciclo (Atterbury, Bergen, & Ortiz, 2007). Se conoce como período de eclipse al intervalo de tiempo que existe entre el ingreso del material genético a la bacteria y la liberación de fagos maduros luego del proceso de lisis (Gaviria, González, & Castaño, 2012). Esta fase está dedicada a la síntesis de componentes y su ensamblaje para formar partículas maduras de bacteriófagos (Rakhuba & Kolomiets, 2010) (Ilustración 3).

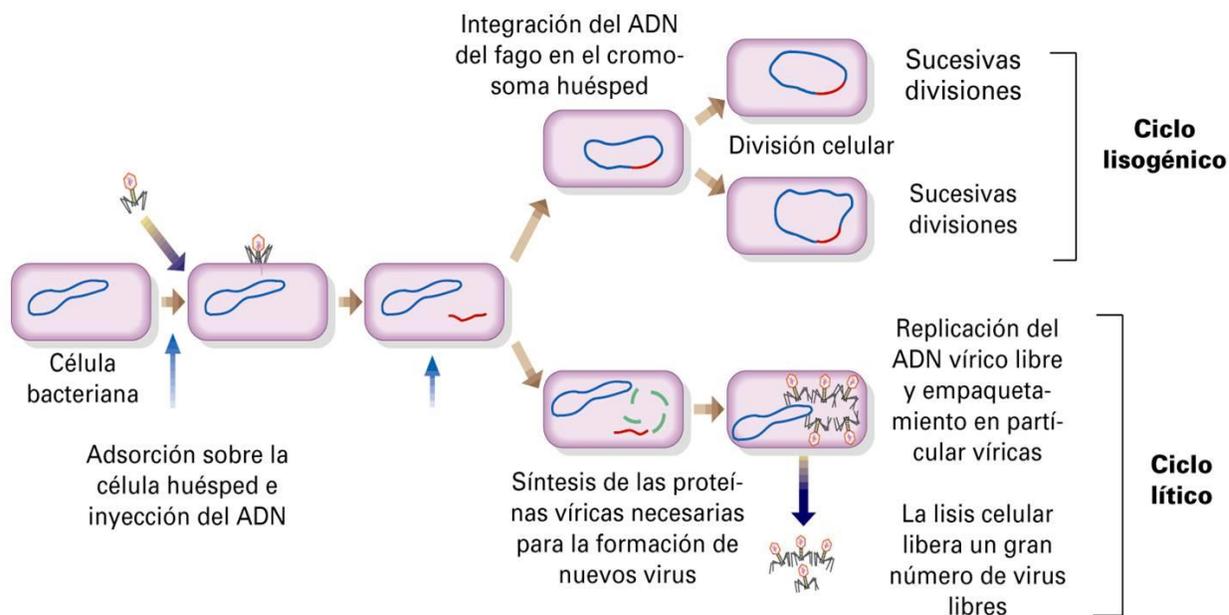


Ilustración 3: Ciclo lítico y lisogénico de bacteriófagos (Peñafiel, 2019).

La maquinaria biosintética del hospedero es controlada por el fago para formar ARN mensajeros y proteínas específicas. Las proteínas estructurales del bacteriófago como las que forman parte de la cabeza o la cola, así como las proteínas necesarias para la lisis del hospedero, se sintetizan por separado (Rakhuba & Kolomiets, 2010). El ácido nucleico es empacado dentro de la cabeza y la cola es adherida, este proceso donde el fago se ensambla a partículas maduras e infectivas se denomina maduración (Rao, 2016). Finalmente, en la fase de lisis y liberación, la

bacteria empieza a lisarse debido a la acumulación de las proteínas de lisis del bacteriófago y los fagos intracelulares se liberan al medio, se cree que el número de partículas liberadas por bacteria puede llegar a más de 1000 unidades (McGrath, Fitzgerald, & Sinderen, 2004).

Ciclo lisogénico

Bacteriófagos lisogénicos o temperados son aquellos que pueden multiplicarse por el ciclo lítico o entrar a un estado latente en la célula. En muchos casos, el material genético del fago se integra en el genoma bacteriano y se replica junto con el mismo, este material genético es pasado a la progenie. El estado integrado del material genético del fago se denomina profago. Este proceso se conoce como lisogenia y la bacteria que lleva el profago se llama bacteria lisogénica. Como el profago contiene genes, puede conferir nuevas propiedades a la bacteria (Caldentey, Hänninen, & Bamford, 1994). Cuando la célula es “lisogenizada”, genes extra que lleva el fago son expresados en la célula. Estos genes pueden cambiar las propiedades de la célula bacteriana. Este proceso se conoce como conversión lisogénica o conversión del bacteriófago (Rao, 2016). Entre los ejemplos de la conversión lisogénica tenemos:

- Fagos lisogénicos llevan genes que pueden modificar el antígeno O de *Salmonella*.
- La producción toxica de *Corynebacterium diphtheriae* es mediada por un gen llevado por una beta fago, solo las cepas que han sido convertidas por lisogenia son patogénicas.
- *Clostridium botulinum*, un agente común en la contaminación alimenticia genera diferentes toxinas, dos de las cuales son codificadas por el genoma de profagos.
- Bacterias lisogénicas son resistentes a superinfección por los mismos genes de fagos. Esto se conoce como inmunidad a superinfección. Esto es causado por fagos temperados que, al integrar su material genético, dejan susceptible a su bacteria hospedadora a ser infectada por otros fagos líticos o temperados, como resultado, los fagos temperados que

integran su genoma crean una inmunidad a superinfección mediante el uso de circuitos genéticos que controlan la expresión temporal de genes requeridos para el ciclo lítico (Mavrich & Hatfull, 2019). Esto causa que cualquier otro fago infectivo ingrese al citoplasma bacteriano, pero no puede utilizar la maquinaria celular para continuar con el ciclo lítico.

El estado lisogénico de una bacteria puede ser terminado en cualquier momento que se exponga a condiciones desfavorables. Este proceso se conoce como inducción (Rao, 2016). Las condiciones que terminan el estado lisogénico incluyen: desecación, exposición a UV o radiación ionizante, exposición a químicos mutagénicos, entre otros. El material genético del fago inicia un ciclo lítico que resulta en la lisis celular y la liberación de las partículas virales. Estos fagos son capaces de infectar nuevas células susceptibles y volverlas lisogénicas.

Fagoterapia

Desde su descubrimiento hace más de un siglo, los bacteriófagos se han utilizado para prevenir y tratar una multitud de infecciones bacterianas (Atterbury, 2009). Los bacteriófagos ofrecen ventajas como agentes de biocontrol por diversos motivos: 1) Alta especificidad para distinguir a su hospedero mediante receptores en la membrana de la bacteria, sin afectar a la microbiota acompañante, esta propiedad es una gran ventaja para los bacteriófagos comparándolos con otros antimicrobianos que causan un desbalance en la microbiota. 2) Auto replicación y auto limitación, significa que concentraciones altas o bajas de bacteriófagos se multiplicaran mientras exista la bacteria huésped, aumentando su actividad antimicrobiana. 3) Adaptabilidad por parte del bacteriófago a los mecanismos de defensa que podría desarrollar la bacteria. 4) Baja toxicidad pues en su mayoría solo consisten en ácidos nucleicos y proteínas. 5) Los bacteriófagos son relativamente baratos y fáciles de aislar y propagar. 6) Pueden sobrevivir al estrés ambiental

generalmente creado en el procesamiento de alimentos (incluidas las condiciones fisicoquímicas de los alimentos). 7) Se ha comprobado que son estables por largo tiempo pues son abundantes en alimentos y han sido aislados de productos sin procesar (carne, pollos) (Hsu, Shieh, & Sobsey, 2002), productos fermentados (queso, yogurt) y comida del mar (ostras y mejillones) (Kennedy, Wei, & Oblinger, 1986). Esto sugiere que los fagos se encuentran en el mismo ambiente que habitan sus hospederos bacterianos y que son consumidos diariamente por humanos.

La eficacia de los bacteriófagos como antimicrobianos ha llevado a la aprobación y comercialización de varios productos destinados a reducir el riesgo de contaminación en alimentos por bacterias patogénicas. Por ejemplo, la empresa holandesa Microcos Food Safety (antes EBI Food Safety) lanzó al mercado el producto Listex P-100 que fue aprobado como una ayuda en la reducción de *L. monocytogenes* en productos cárnicos, vegetales y frutas (Gutiérrez, y otros, 2017).

Para *Salmonella* no tifoidea, en EE. UU., ya existen dos preparaciones comerciales con fagos, que muestran ser eficaces para controlar la contaminación por NTS en diferentes alimentos, por ejemplo, un estudio reciente muestra la reducción de *Salmonella* en 5 log en lechugas y 0.8 log en coles usando el producto comercial SalmoFresh, que en esencia es un coctel compuesto por seis fagos (Vikram, Woolston, & Sulakvelidze, 2021). Otros estudios muestran igual eficacia para reducir *Salmonella* en productos cárnicos de pollos y pavos (Sharma, Dhakal, & Nannapaneni, 2015). En la tabla 2 tenemos una lista de los productos comerciales basados en fagos aprobados por la FDA.

Tabla 2: Lista de productos comerciales basados en fagos aprobados por la FDA (Jamal, Andleeb, & Ali, 2018).

PRODUCTO Y COMPANIA	MICROORGANISMO CONTROLADO	APROBACION REGULATORIA	APLICACIONES
ListShield, Intralytix, Inc. USA	<i>Listeria monocytogenes</i>	US FDA (2006) and USDA for direct application onto foods (21CFR 172.785.) EPA (EPA registration 74234-1)	Alimentos listos para comer, salami, salchichas, mariscos, superficies en contacto con alimentos
EcoShield, Intralytix, Inc. USA	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	FDA (2011) cleared as "Food Contact Notification" or FCN, (FCN No. 1018). FSIS Directive 7120.1 (safe and suitable antimicrobial)	Carnes rojas y productos carnicos destinados a trituracion
SalmoFresh, Intralytix, Inc. USA	<i>Salmonella enterica</i> serov: Typhimurium, Enteritidis, Heidelberg, Newport, Hadar, Kentucky, Thompson, Georgia, Agona, Grampian, Senftenberg, Alachua, Infantis, Reading, y Schwarzengrund	FDA (GRAS Notice No. GRN 000435), FSIS Directive the StarK-certified Kosher and IFANCA-certified Halal product. OMRI-listed suitable in the production of organic foods	Aves de corral, mariscos, frutas, vegetales frescos y procesados
LISTEX MicrosEBI, Food Safety, Netherlands	<i>Listeria monocytogenes</i>	In 2006 approved by the FDA as GRAS, and by the USDA in 2007 and by the EFSA, Health Canada, BAG (Switzerland) and FSANZ (Food Standards Australia New Zealand)	Carne lista para comer, pescado y queso
Agriphage, Omnilytics USA	<i>Xanthomonas campestris</i> , <i>Clavibacter michiganensis</i> , <i>Erwinia amylovora</i> , <i>Xanthomonas citri</i>	EPA 2005 for use in agriculture	Frutas y verduras

Ciertas desventajas que pueden presentar los fagos al usarse como biocontrol es que no todos pueden ser usados con este fin, por ejemplo, los fagos temperados. También no todos los fagos garantizan seguridad total en los alimentos si estos están contaminados por diferentes patógenos alimenticios y por ende no pueden ser eliminados por el fago. Otro problema es el rango de hospedador de los fagos, al tener un rango específico, se limita la utilidad del fago, este problema se puede solucionar al utilizar un coctel o combinación de fagos. Finalmente, otro problema que puede darse es el apareamiento de resistencia bacteriana, pero se ha visto que, usando cocteles de fagos, esta resistencia es mínima (Vikram, Woolston, & Sulakvelidze, 2021).

Sueroneutralización

El concepto general de la neutralización en fagos se basa en el ensayo de neutralización viral. Este ensayo utiliza anticuerpos neutralizantes que son capaces de inhibir la infección del virión. El ensayo también detecta a grupos de virus que están relacionados entre sí y que pueden

compartir antígenos, pero solo una fracción de estos antígenos son reconocidos por anticuerpos neutralizantes (Payne, 2017).

En el caso de bacteriófagos, la producción de anticuerpos se realiza de igual manera que en virus de mamíferos. Estos animales son inoculados con una emulsión que contiene el antígeno, en este caso el fago. A diferencia de los virus de mamíferos, de los cuales se utiliza líneas celulares como hospedadores, en los fagos se utiliza bacterias hospedadoras. Luego los fagos son incubados con diluciones de antiseros (para diluir cualquier compuesto contaminante o neutralizante que no sean los anticuerpos y que esté presente en el antisuero) y sembrados junto a su bacteria hospedadora. El nivel de neutralización se determina de acuerdo con la capacidad del fago para formar placas de lisis.

La sueroneutralización se ha utilizado previamente para agrupar serológicamente a diversos bacteriófagos (Nutter, Bullas, & R, 1970). Por ejemplo, los fagos D3 y F116 de *Pseudomona aeruginosa* pertenecen a los grupos serológicos con reacción cruzada D y F, respectivamente (Waddell, Franklin, Mazzocco, & Johnson, 2009). De igual manera para neutralizar fagos no adsorbidos en experimentos de crecimiento de un solo paso y para inactivar fagos líticos en análisis de transducción (Canosi, Luder, & T, 1982).

Microscopia electrónica

Las primeras micrografías de bacteriófagos fueron publicadas desde 1940, pero la técnica de tinción negativa fue introducida en 1959 y revolucionó el estudio de los virus, de esta forma la microscopía electrónica (EM) se volvió la base de la virología comparativa (Ackermann & DuBow, 1987). La microscopia de transmisión (TEM) incluye tinción negativa y positiva de partículas virales aisladas. La tinción negativa en particular es una técnica que tiene una gran importancia en la virología, puesto que permite comparación instantánea, clasificación e

identificación de virus, muchas veces hasta el nivel de especie. De esta forma, más de 5000 bacteriófagos se han examinado bajo EM (Ksiazek & Erdman, 2003).

El principio de la tinción negativa es mezclar partículas con una solución densa en electrones de una sal metálica de alto peso molecular, de esta forma las partículas que se incrustan con esta sal metálica se observan con un color blanco sobre un fondo oscuro. Las tinciones usadas en la investigación en bacteriófagos incluyen tungstos (fosfotungstato de potasio y sodio, tungstato de litio, silicotungstato de sodio), sal de uracilo (acetato, formato, acetato de magnesio, nitrato y oxalacetato), molibdato de amonio o vanadio, y ácido molibdico (Ackermann & DuBow, 1987).

Genómica viral de bacteriófagos.

Hasta septiembre del 2019, el NCBI reporta 8437 genomas de fagos secuenciados completamente divididos en 12 familias. Más de la mitad de estas secuencias pertenecen a miembros de la familia *Siphoviridae*, 17% pertenecen a la familia *Myoviridae* y 12% pertenecen a la familia *Podoviridae*, esto indica que el orden *Caudovirales* es el grupo de fagos más abundante en las bases de datos públicas (Dion, Oeschlin, & Moineau, 2020). El número de genomas completos de fagos aún está en crecimiento, pero la base de datos del NCBI aun representa solo una pequeña fracción de la verdadera diversidad genómica de estos virus, debido a que la mitad de ellos solo infectan a siete géneros bacterianos, siendo estos *Mycobacterium*, *Streptococcus*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Gordonia*, *Lactococcus* y *Salmonella*. En cuanto al tamaño del genoma, estos pueden variar ampliamente. El genoma más pequeño reportado para un fago hasta la fecha es el del fago L5 de *Leuconostoc* con solo 2435 pb; mientras que, al extremo opuesto, se ha descubierto un nuevo grupo de fagos que poseen el genoma más grande reportado hasta la fecha, estos “megafagos” poseen un genoma de más de 540 Kb, y fueron descubiertos de metagenomas realizados del intestino de humanos y animales (Devoto & Santini, 2019).

METODOLOGÍA Y DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

Zona de estudio

El trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de parasitología del Instituto de Microbiología de la Universidad San Francisco de Quito, ubicada en la calle Diego de Robles s/n, Cumbayá, cantón Quito, provincia de Pichincha.

Periodo de investigación y permisos

El proyecto se realizó en un periodo de 1 año, desde noviembre de 2020 hasta noviembre del 2021. Todos los procedimientos relacionados a la trata animal en este estudio fueron aprobados por el Comité de Ética en el Uso de Animales en investigación y Docencia de la Universidad San Francisco de Quito (Aval 2019-020).

Procedimiento

Cepas de *Salmonella*

Todas las cepas fueron obtenidas del Instituto de Microbiología de la Universidad San Francisco de Quito, las cuales se encontraban congeladas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Para su reactivación fueron sembradas en agar nutritivo y las colonias aisladas fueron sembradas en agar *Salmonella Shigella* (SSA) para confirmar la ausencia de contaminación. Para los ensayos, se usaron 22 cepas de *Salmonella enterica* de diferentes serotipos (Tabla 4).

Aislamiento de bacteriófagos a partir de una mezcla

La purificación de fagos empezó a partir del coctel M115. Este coctel fue aislado de muestras de agua residual del río Machángara y mostró eficacia para el control de *Salmonella* en granjas avícolas en investigaciones anteriores. Se utilizó una cepa de *Salmonella* Infantis (POL 115A) como bacteria hospedadora y propagadora del coctel. Para aislar los bacteriófagos se utilizó el protocolo de Benson (2006). Para esto se colocó 50 μL , 150 μL y 300 μL del coctel M115 en 3

tubos estériles, a cada tubo se añadió 300 μL de un cultivo de *S. Infantis* POL115-A en TSB con 18 horas de crecimiento y 4 mL de agar semisólido (TSB enriquecido con Sulfato de magnesio 10 mM y 0,7% de agar a 45°C). Las soluciones de cada tubo fueron vertidas en cajas Petri con 20 mL de agar sólido (TSB enriquecido con Sulfato de magnesio 10 mM y 1,5% de agar) y se esperó que el medio semisólido solidifique, finalmente se incubó a 37°C por 24 horas. Al día siguiente se determinó la presencia de calvas y se realizó el recuento únicamente en las cajas Petri que presentaban entre 10 a 100 calvas.

Con la ayuda de una punta estéril de micropipeta, se tomaron calvas aisladas con diferente morfología, cada una fue resuspendida en 500 μL de buffer SM (100 mM NaCl, 8mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 50 mM Tris-Cl pH 7,5) y se dejó reposar por 30 minutos a temperatura ambiente de acuerdo con la metodología de Maniatis (2012). Para el aislamiento se realizaron diluciones seriadas hasta la dilución 10^{-10} y se repitió el protocolo de Benson (2006) con las diluciones 10^{-9} y 10^{-10} con el fin de obtener calvas aisladas, este proceso se repitió 4 veces más hasta obtener calvas similares en tamaño y morfología.

Para determinar la concentración viral, se expresó como unidades formadoras de placas (UFP) por cada mililitro usando la siguiente ecuación:

$$\frac{\text{UFP}}{\text{mL}} = \frac{\text{Número de placas}}{\text{d. v}}$$

Dónde:

d= dilución.

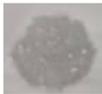
v= volumen de fago en ml.

Determinación del rango de hospedador para fagos aislados

Se analizó la actividad lítica de cada fago aislado frente a 17 cepas de *Salmonella* sp. aisladas de granjas de pollos y 1 cepa *S. Typhimurium* 14028 ATCC. Para esto se utilizó un ensayo de Spot Test que consistió en preparar un cultivo de *Salmonella* sp. de 18 a 24 horas de crecimiento con una turbidez equivalente a 0,5 de la escala de McFarland.

Luego con la ayuda de un hisopo estéril se sembró en césped en cajas con agar sólido, se añadió 2 μ L de cada fago aislado sobre la superficie del medio y se incubó a 37°C por 24 horas. Al día siguiente se observó la presencia de zonas de aclaramiento en donde se sembraron los fagos. La actividad lítica de cada fago se determinó según el sistema de puntuación mostrando en la siguiente tabla (Huang, y otros, 2018).

Tabla 3: Sistema de Puntuación del Rango de hospedador (Huang, y otros, 2018).

	Score: 4 = Strong Lytic Activity
	Score: 3 = Strong Lytic Activity with Bacterial Colonies
	Score: 2 = Weak Lytic Activity with Turbidity
	Score: 0 = No Halo Formation

Producción de anticuerpos para fagos aislados

Para la producción de anticuerpos se trabajó con 3 fagos aislados. Para esto se colocó 0,5 mL de fago y 0,5 mL de adyuvante incompleto de Freund (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis MO – USA), en dos jeringas distintas y se las conectó con ayuda de una manguera flexible, se mezcló vigorosamente por 10 a 15 minutos hasta formar una emulsión homogénea blanquecina que fue utilizada para la inmunización. Se realizó el mismo procedimiento para cada fago aislado.

La inmunización se realizó por duplicado para cada fago en 6 pollos Broiler de 8 semanas, identificados por un anillo metálico en la pata derecha. Se inoculó 1 ml de la emulsión en el músculo pectoral de cada animal a los días 0, 8, 21 y 52. En el día 60 los animales fueron sacrificados mediante la inoculación peritoneal de Eutanex (0,3 mL por cada Kg de peso). Luego se extrajo la sangre arterial por punción cardíaca, se dejó coagular a temperatura ambiente y se obtuvo el suero por centrifugación a 1000g por un tiempo de 15 minutos. El suero se distribuyó en viales de 2 ml y se almacenó a -20°C. La granja de pollos usada en este estudio se construyó en una propiedad privada en Pelileo-Ecuador

Determinación de la Actividad Neutralizante de los Anticuerpos Producidos

Se realizaron 5 diluciones seriadas 1 en 10 del fago aislado Ph115-1 para esto se colocó 5 μ L del fago en 45 μ L de agua destilada estéril para la primera dilución ó 10^{-1} y así sucesivamente hasta la dilución 10^{-5} . Luego se añadió 50 μ L del antisuero antiph115-1 a 50 μ L de cada dilución de fago y se incubó a 37°C por 30 minutos. Luego de la incubación, esta mezcla se añadió a 300 μ L de un cultivo de *S. Infantis* POL115-A en medio líquido con 18 horas de crecimiento y se repitió el ensayo de producción de calvas de acuerdo con el protocolo de Benson descrito anteriormente. Este proceso se repitió para los otros fagos aislados Ph115-2, Ph115-3 y sus

respectivos antisueros. La ausencia de calvas en el césped bacteriano indica que el suero induce una actividad neutralizante en los fagos y evita la lisis bacteriana.

Ensayo de Seroneutralización Cruzada

Con la técnica anterior se enfrentó 50 μL de una dilución 10^{-3} del fago Ph115-1 frente a 50 μL del antisuero antiph115-2 y 50 μL del antisuero antiph115-3. Este procedimiento se repitió enfrentando el fago Ph115-2 a los antisueros 1 y 3, el fago Ph115-3 frente los antisueros 2 y 1, y los fagos F3s2 α y F3s1 δ , así como los fagos M061-16 y M061-17 aislados de otro coctel a los antisueros, 1, 2 y 3. Las calvas observadas luego de 24 horas de incubación a 37°C fueron purificadas siguiendo el protocolo de Maniatis (2012). Las calvas purificadas fueron usadas para análisis de rango de hospedador mediante Spot Test frente a cuatro cepas de *Salmonella* Infantis.

Microscopia Electrónica

Todos los fagos aislados en este estudio fueron enviados al Laboratorio de Caracterización de Nanomateriales, CENCINAT de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE. Un microscopio electrónico de transmisión (TEM) (Tecnai G2 Spirit Twin, FEI, Holland) operado a 80 kV fue usado para observar a los bacteriófagos. Se preparo ácido tungstofósforico (PTA) a una solución acuosa del 0,5% (w/v), ajustado a pH 7. Se aplicó una técnica de tinción negativa de gota única en la suspensión acuosa semipurificada y se utilizaron películas de soporte de formvar (malla 300). El tamaño de los bacteriófagos en las micrografías se evaluó utilizando el software analizador de imágenes Fiji ImageJ Versión 1.53f5.

ANÁLISIS DE DATOS

Rango de hospedador de fagos aislados

A partir de un coctel de fagos líticos para *S. enterica* se aisló 5 fagos los cuales fueron nombrados como: Ph115-1, Ph115-2, Ph115-3, Ph115-4 y Ph115-5, el rango de hospedador para los 5 fagos aislados se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 4: Rango de Hospedador de 5 fagos aislados contra 18 serotipos de *Salmonella enterica* analizados mediante Spot Test. Los fagos fueron calificados de acuerdo con la siguiente puntuación: 4: aclaramiento completo, 3: aclaramiento con colonias puntiformes en las calvas, 2: aclaramiento con turbidez en la zona despejada y 0: no existe aclaramiento. (Huang et al. 2018).

Strain Phage	POL057C Infantis	POL061C Infantis	POL115A Infantis	S. Enteritidis	14028 Typhimurium	HD2.269 Infantis	ZH.171 Infantis	2647 H9 Sp.	2643 H7 Sp.	POL750H Dublin	POL 419C Braenderup	POL505E Heidelberg	POL556B Stanley	POL635D Typhimurium	3241F2 Infantis	2646H9 Infantis	3243F3 Saint Paul	2644 H7 Sp.
Ph115-1	3	3	4	0	0	4	4	2	3	3	3	3	3	2	3	2	0	0
Ph115-2	3	3	4	4	2	4	4	2	3	3	3	3	3	2	3	0	0	0
Ph115-3	3	3	4	0	0	4	4	2	3	3	3	3	3	2	3	2	0	0
Ph115-4	3	3	4	4	2	4	4	2	3	3	3	3	3	2	3	2	0	0
Ph115-5	3	3	4	3	2	4	4	2	3	3	3	3	3	2	3	2	0	0

Se observó que algunos de los fagos aislados mostraron patrones de lisis similares frente a las cepas de *Salmonella* utilizadas. Los fagos ph115-1 y ph115-3 fueron líticos para 14 de las 18 cepas de *Salmonella* y se consideró que probablemente se trata de un mismo fago y se lo nombró Ph115-1. Al igual que, los fagos ph115-4 y ph115-5 lisan 16 de 18 cepas de *Salmonella* y estos se unificaron en el grupo Ph115-3.

Por otro lado, el fago Ph115-2 probablemente es un fago diferente porque muestra un patrón de lisis particular. Los fagos Ph115-1 y Ph115-2 mostraron un título viral de 1×10^8 UFP/mL y Ph115-3 de 1×10^9 UFP/mL.

Ensayo Sueroneutralización

La inoculación en pollos produjo 3 antisueros, denominados como: antiph115-1, antiph115-2 y antiph115-3. Se determinó la actividad neutralizante de estos antisueros frente a diferentes diluciones de fagos. Se observó neutralización completa desde la dilución 10^{-3} (1/1000) hasta 10^{-5} (1/100000) (Ilustración 4).

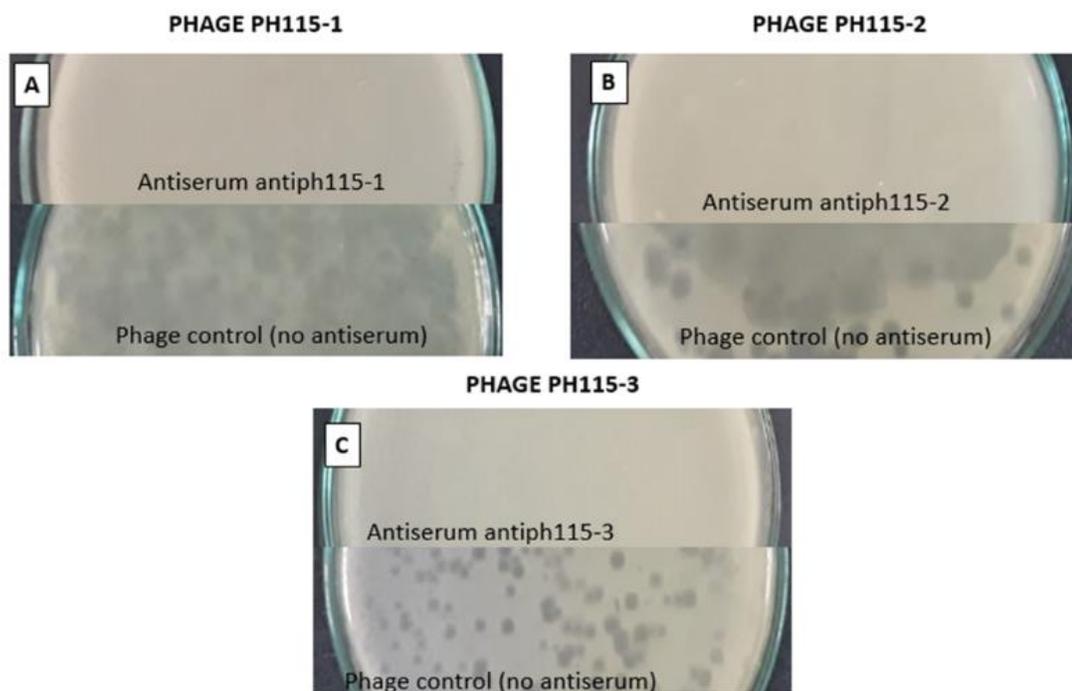


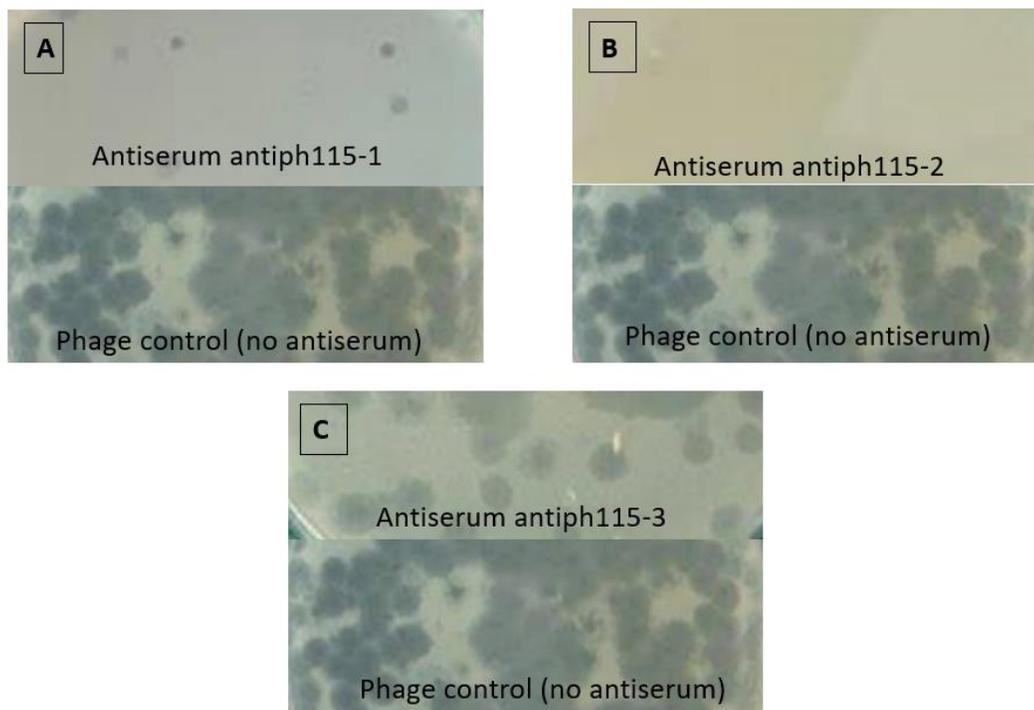
Ilustración 4: Resultados del ensayo de suero neutralización A) Neutralización del fago Ph115-1 diluido hasta 10^{-3} y 10^{-4} B) Neutralización del fago Ph115-2 diluido hasta 10^{-4} y 10^{-5} C) Neutralización del fago Ph115-3 diluido hasta 10^{-4} y 10^{-5} . Para los controles se utilizó una dilución 10^{-3} de cada fago sin ser incubado con antisuero.

Pudimos observar que todos los antisueros pudieron neutralizar a los fagos Ph115-1 y Ph115-2 por lo tanto fueron clasificados bajo un mismo grupo serológico denominado grupo I, el Fago M061-16 fue neutralizado únicamente por el antisuero antiph115-2, por lo tanto se colocó en el grupo serológico II, el fago Ph115-3 únicamente fue neutralizado por el antisuero antiph115-3 por lo tanto se fue clasificado bajo el grupo serológico III, y los fagos F3S1 Delta, F3S2 Alfa y M061-17 no fueron neutralizados por ningún antisuero por lo tanto se clasificaron bajo el grupo serológico IV (Tabla 5, Ilustraciones 5 y 6).

Tabla 5: Resultados del ensayo de suero neutralización, + indica neutralización, - indica no neutralización. Todos los fagos fueron usados a una dilución final de 1/1000. Los colores rojos más oscuros muestran las reacciones homologas del antisuero con su fago correspondiente y los rojos más claros muestran reacción con otros fagos no correspondientes.

Serological Group Phage Antiserum	I		II	III	III		
	Ph115-1	Ph115-2	M061-16	Ph115-3	F3S1 Delta	F3S2 Alfa	M061-17
antiph115-1	+	+	-	-	-	-	-
antiph115-2	+	+	+	-	-	-	-
antiph115-3	+	+	-	+	-	-	-

1. PHAGE M061-16



2. PHAGE M061-17

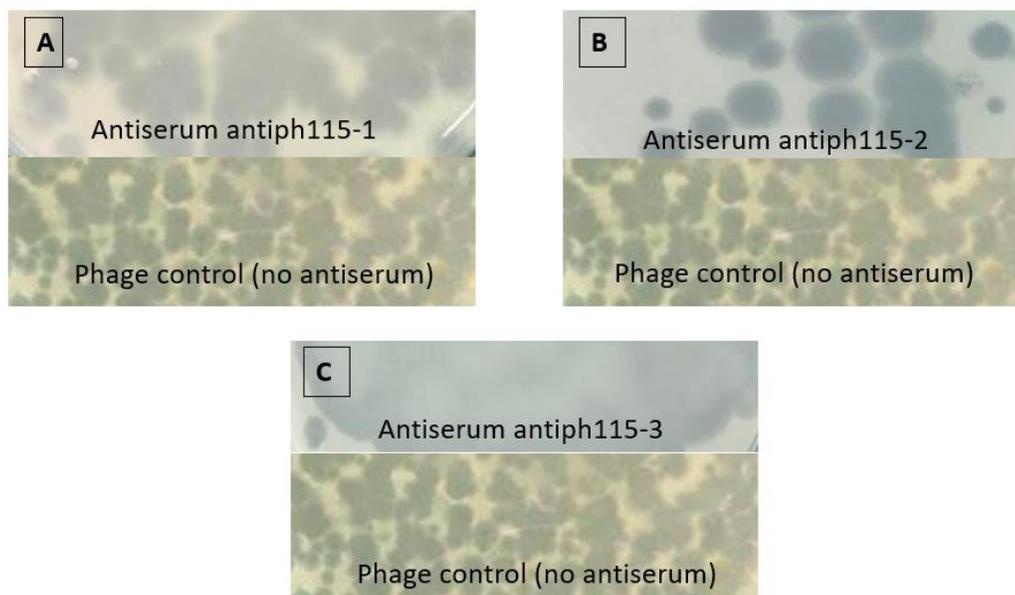
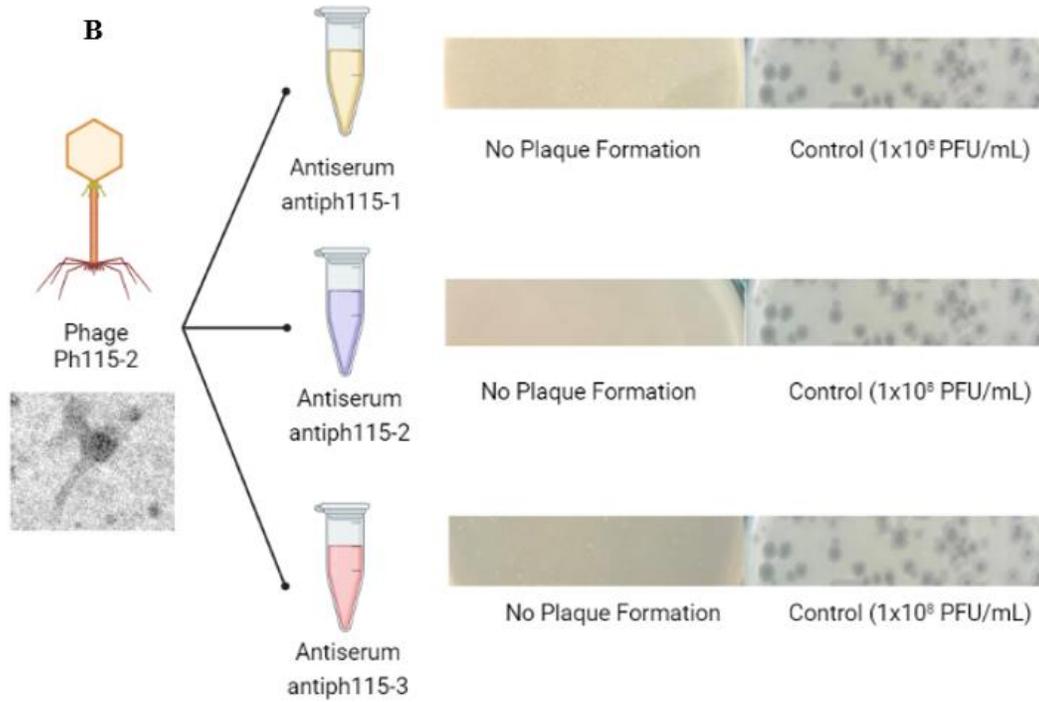
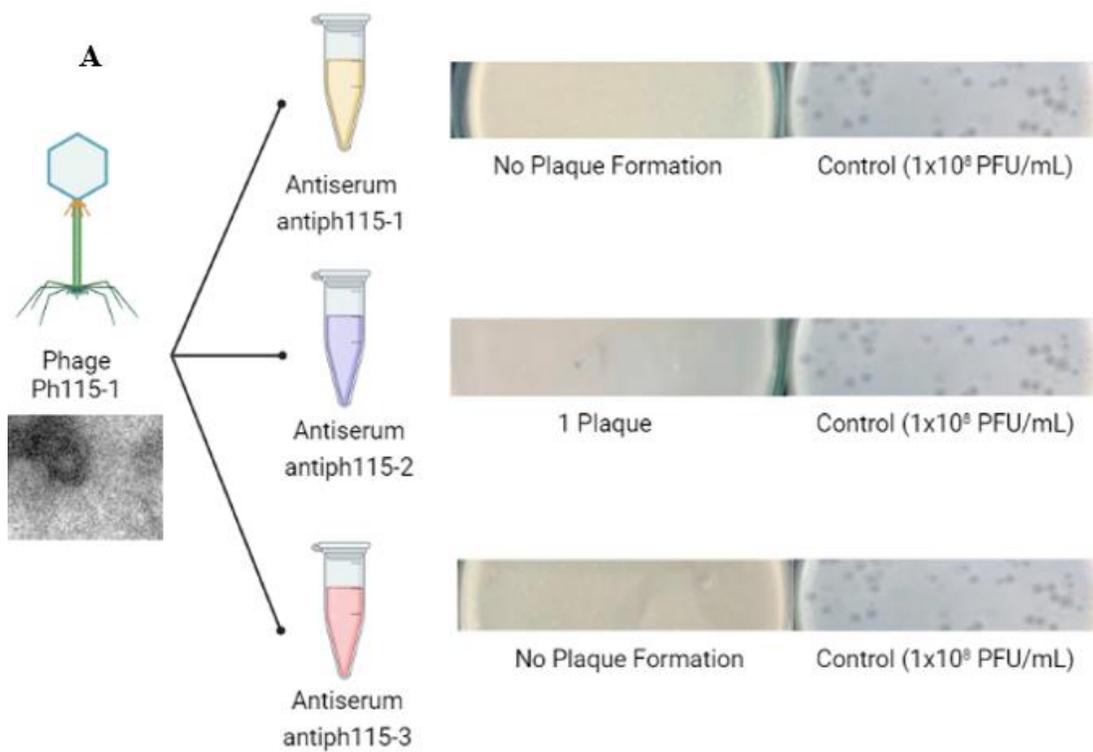
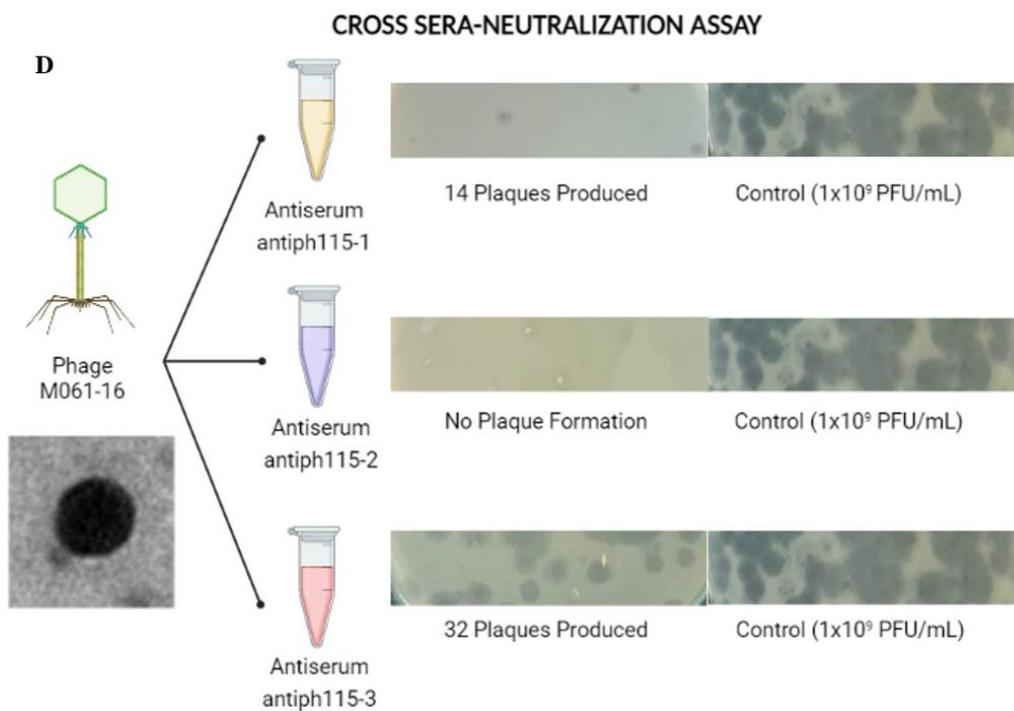
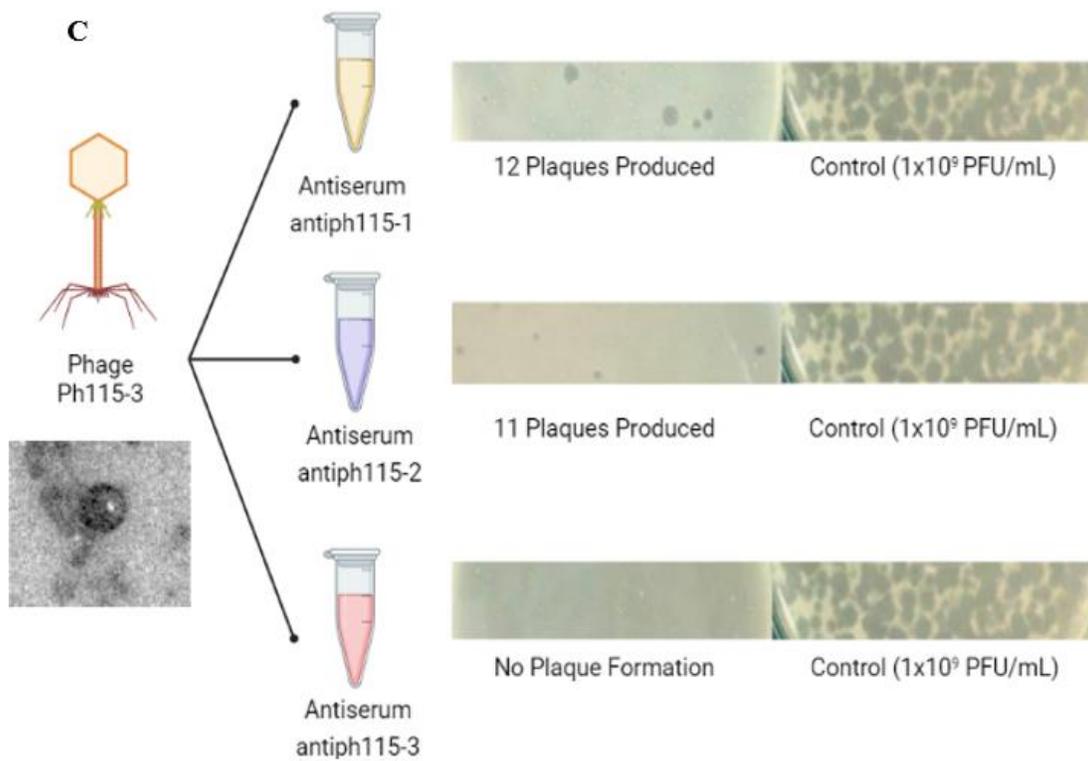


Ilustración 5: Ensayo de sueroneutralización de los fagos 1) M061-16 y 2) M061-17 frente A) antiph115-1 B) antiph115-2, C) antiph115-3. La dilución usada para cada fago fue de 1/1000.

Ensayo Control: Fago sin antisuero.





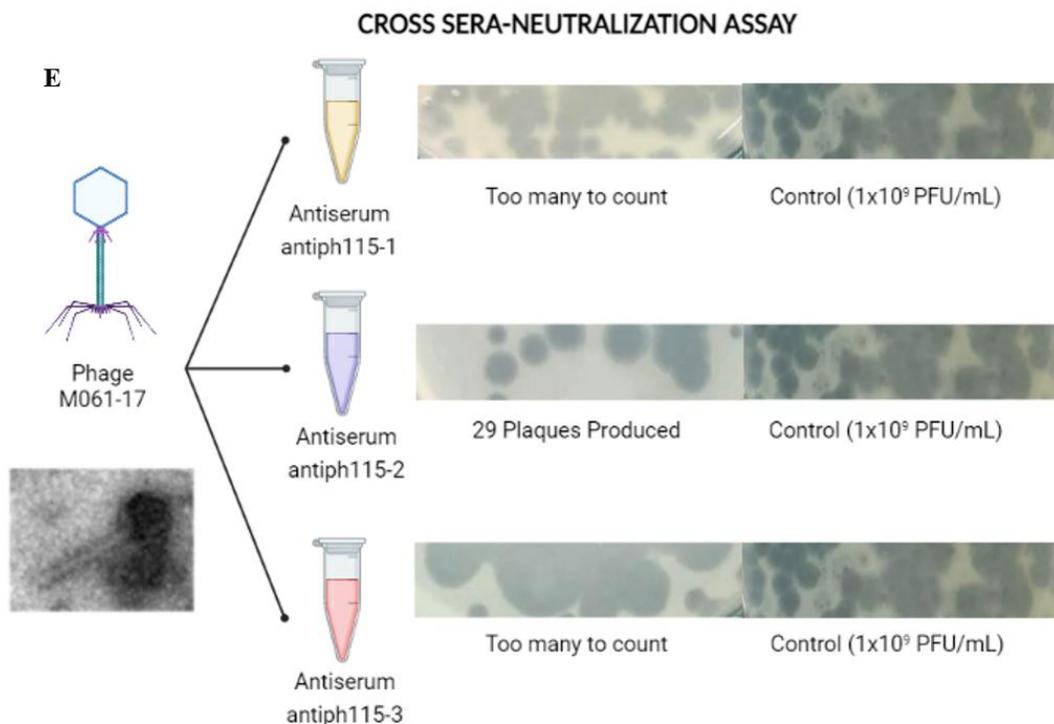


Ilustración 6: Resultados de ensayos de sueroneutralización cruzada para A) Fago Ph115-1 B) Fago Ph115-2 C) Fago Ph115-3 D) Fago M061-16 E) Fago M061-17. La dilución usada para todos los fagos fue de 10^{-3} .

Se pudo aislar dos nuevos fagos denominados F3s2 α y F3s1 δ . El fago F3S1 Delta tiene una morfología de calvas pequeñas y separadas, el fago no es neutralizado por ningún antisuero producido, mostrando la misma morfología de calvas con todos los antisueros (Ilustración 7). El Fago F3s2 α produce calvas ligeramente más grandes que F3s1 δ y al igual que este no es neutralizado por ningún antisuero, es más el Fago F3s2 α produce lisis confluyente al enfrentarse a antiPh115-2 y produce calvas de lisis aisladas al enfrentarse a antiPh115-1 y antiPh115-3 (Ilustración 8).

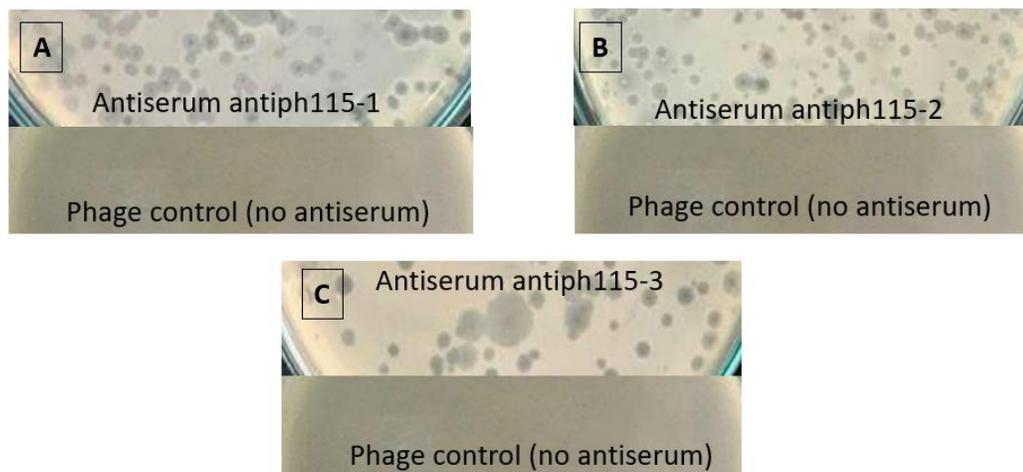
PHAGE F3S1 Delta

Ilustración 7: Ensayo de sueroneutralización del fago F3s1 δ frente a: A) antiph115-1 B) antiph115-2 C) antiph115-3. La dilución usada para el fago fue de 1/1000. Ensayo Control: Fago sin antisuero

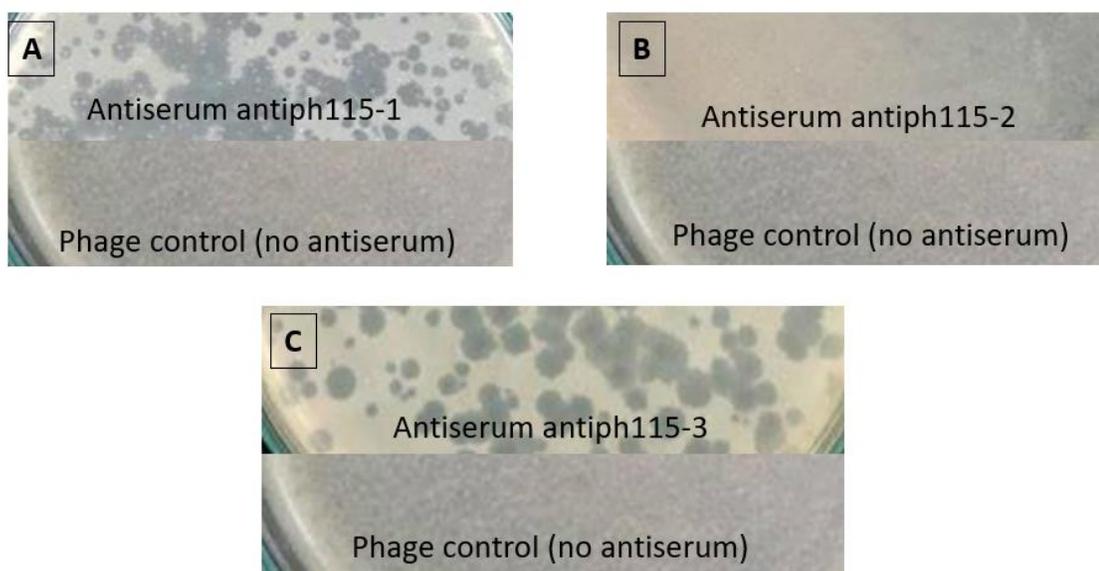
PHAGE F3S2 Alfa

Ilustración 8: Ensayo de sueroneutralización del fago F3s2 α frente A) antiph115-1 B) antiph115-2, C) antiph115-3. La dilución usada para el fago fue de 1/1000. Ensayo Control: Fago sin antisuero.

La microscopía electrónica indica que el fago F3s2 α tiene una cabeza icosaédrica de 93,3 nm y una cola larga no contráctil de 104,1 nm sugiriendo que pertenece a la familia *Siphoviridae*. Mientras que el fago F3s1 δ tiene una cápside icosaédrica de 73,4 nm y una cola corta no contráctil de 13,8 nm indicando que pertenece a la familia *Podoviridae* (Ilustración 9).

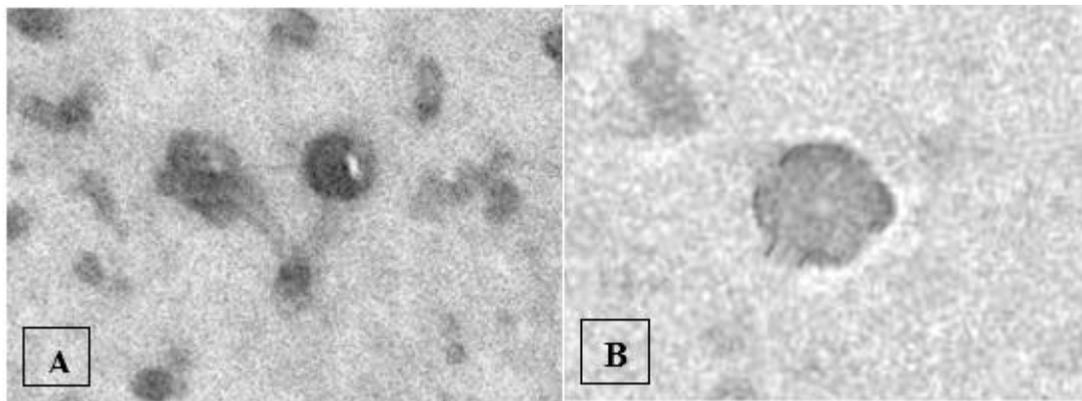


Ilustración 9: Micrografías tomadas mediante TEM, A) F3s2 α B) F3s1 δ , escala 500 nm

Finalmente se determinó el rango de hospedador de los dos nuevos fagos aislados y de los fagos aislados previamente frente a 4 cepas de *Salmonella* Infantis (Tabla 6). Estas cepas se escogieron debido a que son representativas de cepas altamente resistentes (U4232 R1 y U4239 R4) o altamente sensibles (U4417 H7 y U4279 H3) a la actividad lítica de fagos aislados en estudios previos. Todos los fagos aislados en este estudio tuvieron una fuerte actividad lítica frente a las cepas U4417 H7 y U4279 H3, pero solo el fago F3s1 δ pudo lisar a las cepas más resistentes U4232 R1 y U4239 R4.

Strain Phage	U4417 H7 Infantis	U4279 H3 Infantis	U4232 R1 Infantis	U4239 R4 Infantis
Ph115-1	4	4	0	0
Ph115-2	4	4	0	0
Ph115-3	4	4	0	0
F3s1 δ	4	4	2	2
F3s2 α	4	4	0	0

Tabla 6: Rango de Hospedador de Fagos aislados frente a 4 cepas de *Salmonella* Infantis, se utilizó un sistema de puntuación de actividad lítica que indica 4: aclaramiento completo, 3: aclaramiento con colonias puntiformes en las calvas, 2: aclaramiento con turbidez en la zona despejada y 0: no existe aclaramiento. (Huang et al. 2018).

Microscopia electrónica

El fago Ph115-1 muestra una cápside icosaédrica de 98,88 nm (± 1 nm) y una cola contráctil de 79,50 nm (± 1), esto sugiere que pertenece a la familia *Myoviridae*. El fago Ph115-2 muestra una cápside icosaédrica de 124 nm (± 1 nm) y una cola contráctil de 95 nm (± 1), sugiriendo que forma parte de la familia *Myoviridae*. El fago Ph115-3 tiene una cabeza icosaédrica de 87,21 nm (± 1 nm) y una cola corta no contráctil de 31,54 nm, indicando que este fago posiblemente pertenece a la familia *Podoviridae* (Ilustración 10).

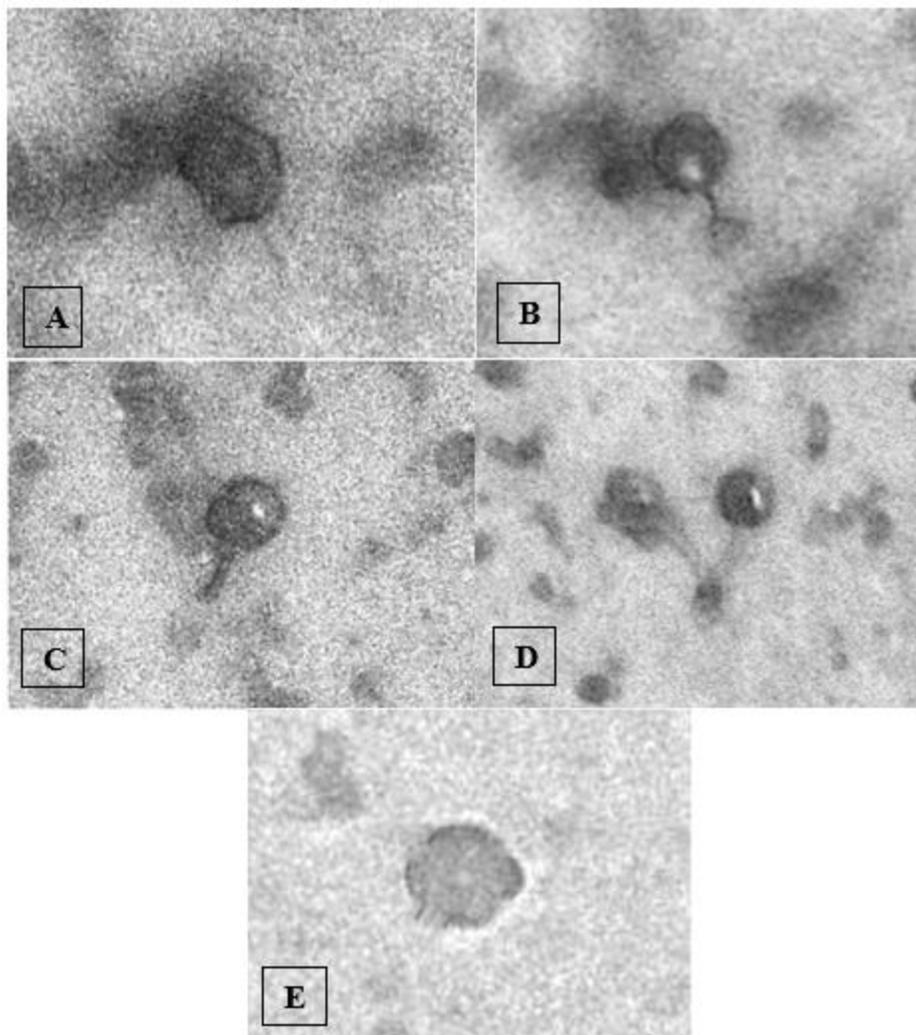


Ilustración 10: Micrografías de los fagos aislados tomadas mediante TEM, A) Fago Ph115-1, B) Ph115-2 C) Ph115-3 D) F3s2 α E) F3s1 δ . Escala 500 nm

DISCUSIÓN

La caracterización de bacteriófagos es de vital importancia previo a la aplicación de fagos como terapia para reducir la colonización bacteriana. La habilidad del sistema inmunitario para inducir anticuerpos específicos contra los fagos fue una de las primeras propiedades usadas para su clasificación y de acuerdo con Duff & Wyss (1961). Los estudios cinéticos de la neutralización de los fagos mediante antisueros indican que los fagos pertenecientes a un mismo grupo serológico son idénticos o estrechamente relacionados. En nuestro estudio, clasificamos a los fagos aislados en cuatro grupos serológicos.

Observamos que los fagos Ph115-1 y Ph115-2, al tener el mismo grupo serológico, posiblemente pueden considerarse como un mismo fago y poseen las mismas proteínas estructurales. Según la microscopia electrónica, estos dos fagos probablemente pertenecen a la familia *Myoviridae*. De acuerdo con Switt, et al (2015) el fago de *Salmonella* SPN3US que también pertenece a la familia *Myoviridae*, es uno de los pocos fagos que utiliza el flagelo bacteriano como receptor para iniciar la infección viral. En nuestro estudio observamos que los fagos Ph115-1 y Ph115-2 se encontraron cerca de estructuras flagelares (Anexo A y B) indicando que posiblemente están relacionados con el fago SPN3US. Según Dabrowska, et al. (2014), la mayoría de los fagos *Myoviridae* poseen proteínas esenciales de la cápside, gp23* y gp24* y dos proteínas no esenciales Hoc y Soc, siendo las proteínas gp23* y Hoc las más inmunogénicas. Majewska, et al. (2019), en un estudio sobre la inmunogenicidad de diferentes proteínas de la cápside de bacteriófagos T4, indican un aumento en la respuesta de anticuerpos IgG específicos frente a las proteínas estructurales Mcp y TmpH, proteínas estructurales de la cabeza y de la cola respectivamente, además se observó un alto número de copia de estas dos proteínas en el genoma de los viriones. Según la microscopia electrónica, los fagos Ph115-1 y Ph115-2 son similares a tipo T4 y es posible

que tengan un mayor número de copias de las proteínas esenciales de la cápside gp23*, proteínas MCP o proteínas de la cola TmpH y esta sea la razón por la que fueron reconocidos fácilmente por todos los antisueros.

Observamos que el fago M061-16 solo fue neutralizado por el antisuero antiph115-2, esto indica que el antisuero producido por el fago Ph115-2 contiene anticuerpos neutralizantes que reaccionan con antígenos presentes en los fagos Ph115-1, Ph115-2 y M061-16, indicando que estos fagos tienen estructuras antigénicas en común. Según Buangsuwon (1966), diversas respuestas serológicas son causadas por propiedades antigénicas en los fagos, dando la posibilidad de asumir que los fagos están relacionados estructuralmente. Esto pudimos comprobarlo con los fagos Ph115-1 y Ph115-2 que pertenecen a la familia *Myoviridae*, pero no con el fago M061-16 que pertenece a la familia *Podoviridae*, indicando que no siempre los grupos serológicos nos indican similitud morfológica.

El fago Ph115-3, que pertenece al grupo serológico III, no pudo ser neutralizado por 2 de los antisueros usados (antiph115-1 y antiph115-2) y por lo tanto debe poseer estructuras inmunogénicas diferentes. La microscopia electrónica mostró que el fago Ph115-3 posiblemente pertenece a la familia *Podoviridae* y tiene similitudes morfológicas con los fagos tipo P22 que infectan al serotipo Typhimurium (Butler & Chamberlin, 1982; Islam, Hu, Mizan, Yan, & Nime, 2020). Es conocido que el fago P22 presenta un ciclo lisogénico, pero Zino et al (2014) muestran una fuerte actividad lítica de P22 frente a 12 cepas de *Salmonella* spp. Es posible que el fago Ph115-3 sea una variante de este fago, pero con actividad lítica frente a *S. Infantis*; los fagos P22 tienen la habilidad de empezar el proceso de infección uniéndose al antígeno O de *Salmonella enterica* (Switt, y otros, 2015), es posible que el fago Ph115-3 posea esta misma habilidad y por ello no fue neutralizado por los antisueros producidos.

Según Buangsuwon (1966), los fagos que comparten antígenos generan respuestas serológicas similares, en nuestro estudio observamos que los fagos M061-17, F3s1 δ y F3s2 α no fueron neutralizados por ningún antisuero producido, esto da la posibilidad que los fagos son diferentes antigénicamente y no comparten estructuras con los fagos Ph115-1, 2 y 3.

La microscopia mostró que el fago F3s2 α , que pertenece a la familia *Siphoviridae*, se localizaba cerca de varias estructuras flagelares (Anexo C), esto sugiere la idea de que el fago utiliza receptores localizados en el flagelo para iniciar la infección viral. Según Switt, et al (2015), el fago X (Chi), que es un representante de la familia *Siphoviridae*, ataca únicamente a cepas motiles de *Salmonella enterica* y lo hace uniéndose al filamento del flagelo bacteriano mediante fibras de su cola, esto sugiere que el fago F3s2 α podría estar relacionado con el fago X. Por el contrario, la morfología del fago F3s1 δ nos indica que pertenece a la familia *Podoviridae* y su fuerte actividad lítica nos sugiere que podría estar relacionado con los fagos tipo T7 o tipo Sp6, que son conocidos como los fagos más virulentos de la familia *Podoviridae* y que infectan a los serotipos *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis* respectivamente (Buttler, 1982).

Como se ha visto en otros biomas estudiados, el viroma de aguas residuales está dominado por bacteriófagos. En el estudio de Cantalupo et al, (2011) se tomaron muestras de aguas residuales y de estas se obtuvieron 46408 lecturas de alta calidad que coincidían con secuencias de virus, el 81% de las secuencias obtenidas se relacionaban a bacteriófagos. En las muestras de aguas residuales predominaron secuencias de fagos de cinco familias: *Microviridae* (37%), *Siphoviridae* (24%), *Myoviridae* (17%), *Podoviridae* (14%) e *Inoviridae* (3%). Estas familias de fagos se asociaron a 24 especies bacterianas pero la mitad de las lecturas se relacionaron a fagos que infectan a enterobacterias (Cantalupo, Calgua, Zhao, & Hundesa, 2011). Sin embargo, la diversidad de fagos encontrada en aguas residuales generalmente es menor a la diversidad

encontrada en ambientes marinos, en heces humanas y en suelos, también se estima una carga viral en aguas residuales de 10^8 viriones de fagos por mL (Runa, Wenk, Bengtsson, & Jones, 2021). En nuestro estudio pudimos aislar bacteriófagos pertenecientes a las familias *Myoviridae*, *Siphoviridae* y *Podoviridae*, como otros autores lo han mencionado (Cantalupo, Calgua, Zhao, & Hundesa, 2011), estos fagos fueron líticos contra enterobacterias, específicamente contra *Salmonella enterica* serotipo Infantis. Indicando la posibilidad de que, en nuestro país, las aguas residuales contienen una gran cantidad de viriones líticos contra enterobacterias, pero con una baja diversidad en sus familias.

De acuerdo con Zhang, et al (2010) los cocteles aislados de aguas residuales enfrentados a *S. enterica* serotipos Infantis, Enteritidis y Typhimurium generalmente se componen de fagos con cola, del orden *Caudovirales*. Estos fagos tienen colas cortas y contráctiles (Familia *Myoviridae* o *Podoviridae*) o largas y no contráctiles (Familia *Siphoviridae*) (Ackermann & DuBow, 1987). De igual forma, diversos análisis genómicos, clasifican a los fagos de *Salmonella* en 5 grupos: tipo P27, tipo P2, lambdaoideos, tipo P22 y tipo T7 (Switt, et al, 2014). De acuerdo con Korf, et al. (2020) un criterio importante para la composición de fagos dentro de un coctel es el rango de hospedador de cada fago individual; generalmente se espera que los rangos sean parcialmente superpuestos y complementarios, esto lo pudimos observar en nuestro estudio, los 5 fagos aislados compartieron serotipos de *Salmonella enterica* en su rango de hospedador.

El rango de hospedador nos permitió determinar la actividad lítica de los fagos aislados frente a cepas sensibles y resistentes de *Salmonella* Infantis aisladas de granjas de pollos, se observó que solo el fago F3s1δ pudo lisar las cepas bacterianas resistentes U4232 R1 y U4239 R4. Como lo mencionamos anteriormente, el fago F3S1 Delta posiblemente pertenece a la familia *Podoviridae* y está relacionado con el fago tipo Sp6, este fago puede infectar los serotipos

Typhimurium y Newport mediante reconocimiento de receptores presentes en el antígeno O de la membrana, pero recientemente Gebhart, et al. (2017) encontraron que este fago puede codificar una segunda proteína de la cola que le permite aumentar su rango de hospedador, esto nos explicaría porque el fago F3S1 Delta pudo lisar un mayor número de serotipos de *Salmonella* que el resto de los fagos aislados, pero se recomienda realizar estudios genómicos para comprobar las similitudes entre el fago F3S2 Delta y el fago SP6.

La adsorción de fagos hacia sus hospedadores bacterias es el primer paso para la infección, este paso es complicado para el fago puesto que requiere reconocer componentes celulares específicos en su hospedador, es por ello por lo que diversas bacterias han evolucionado diversas barreras para evitar la adsorción del fago (Labrie, Samson, & Moineau, 2010). En *Salmonella* Typhimurium se han identificado 3 tipos de receptores, flagelares (reconocidos por 11 tipos de fagos), la proteína BtuB de la membrana externa captadora de vitamina B12 (reconocida por 7 fagos) y el antígeno O relacionado a lipopolisacárido (reconocido por 7 fagos) (Shin, y otros, 2012). Es posible que las cepas resistentes U4232 R1 y U4239 R4 tengan mutaciones en estos receptores, impidiendo la actividad lítica de los fagos aislados, siendo la única excepción el fago F3S1 Delta que si pudo lisar a estas cepas resistentes.

CONCLUSIONES

Los ensayos serológicos son una herramienta eficiente que se suma al resto de técnicas utilizadas para la caracterización de bacteriófagos. En nuestro estudio encontramos que el ensayo de sueroneutralización muestra resultados prometedores a la hora de aislar y caracterizar fagos de acuerdo con sus propiedades serológicas, el cual junto a la microscopia electrónica puede dar información preliminar sobre un fago aislado.

Las aguas residuales muestran ser una fuente constante de bacteriófagos frente a diversos serotipos de *Salmonella enterica*. En nuestro estudio aislamos bacteriófagos contra *Salmonella* spp. que pertenecían a las familias *Myoviridae*, *Siphoviridae* y *Podoviridae*. Estas familias de fagos han sido reportadas, en varios estudios, como comunes en aguas residuales. Esto nos muestra que la biodiversidad de fagos presente en aguas residuales es menor de la que se pensaba anteriormente y la búsqueda de fagos contra *Salmonella* spp. debería realizarse en más nichos ecológicos.

La búsqueda y caracterización de nuevos bacteriófagos es de suma importancia antes de la utilización de estos en terapias para reducir la colonización por *Salmonella* en aves de corral, especialmente frente a los serotipos multirresistentes que están siendo seleccionados por el uso indiscriminado de antibióticos en la industria. Una preocupación que se da para el uso de los fagos como terapia es el apareamiento de cepas bacterianas resistentes a la actividad lítica de estos y la solución a este problema es el uso de cocteles de diferentes fagos con grandes rangos de hospedador, aquí la caracterización es crítica, puesto que se debe garantizar la seguridad de cada fago que forma parte del coctel, y el uso de varias herramientas para la caracterización, como el ensayo de sueroneutralización, nos será de gran ayuda en el biocontrol de *Salmonella*.

REFERENCIAS

- Ackermann, H. (2009). Basic Phage Electron Microscopy. In M. Clokie, & A. Kropinski, *Bacteriophages: Methods and Protocols, Volume 1: Isolation, Characterization, and Interactions* (pp. DOI 10.1007/978-1-60327-164-6 24). Hatfield, Hertfordshire: Springer Science Humana Press.
- Ackermann, H., & DuBow, M. (1987). *Viruses of Prokaryotes*. Boca Raton: CRC Press.
- Ács, N., & Gambino, M. (2020). Bacteriophage Enumeration and Detection Methods. *Front Microbiol*, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7644846/>.
- Adrien, C., Effantin, G., & Vivés, C. (2017). Bacteriophage T5 tail tube structure suggests a trigger mechanism for Siphoviridae DNA ejection. *Nature Communications*, <https://www.nature.com/articles/s41467-017-02049-3>.
- Ajmera, A., & Shabbir, N. (2021). Salmonella. In S. N. Ajmera A, *StatPearls [Internet]* (p. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555892/>). Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.
- Atterbury, R. (2009). Bacteriophage biocontrol in animals and meat products. *Microb Biotechnol*, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21255295/>.
- Atterbury, R., Bergen, M., & Ortiz, F. (2007). Bacteriophage therapy to reduce salmonella colonization of broiler chickens. *Appl Environ Microbiol*, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17526794/>.
- Barylski, J. (2019). Analysis of Spounaviruses as a case study for the overdue reclassification of tailed phages. *Syst. Biol*, <https://academic.oup.com/sysbio/article/69/1/110/5498714>.

- Bertozzi, J., Storms, Z., & Sauvageau, D. (2016). Host receptors for bacteriophage adsorption. *FEMS Microbiology Letters*, <https://academic.oup.com/femsle/article/363/4/fnw002/1845417>.
- Brenner, F., & Villar, R. (2000). Salmonella nomenclature. *J Clin Microbiol*, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10878026/>.
- Brown, A., & Brown, E. (2006). *Benson Microbiological Applications Laboratory Manual*. McGraw-Hill Higher Education.
- Buangsuwon, P. (1966, June). *Host Range, Serological and Electron Microscopy studies of Phages of Agrobacterium Tumefaciens*. Oregon: Oregon State University.
- Butler, E., & Chamberlin, M. (1982). Bacteriophage SP6-specific RNA polymerase. I. Isolation and characterization of the enzyme. *J Biol Chem*, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7040372/>.
- Caldentey, J., Hänninen, A., & Bamford, D. (1994). Gene XV of bacteriophage PRD1 encodes a lytic enzyme with muramidase activity. *Eur J Biochem*, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7925454/>.
- Canosi, U., Luder, G., & T, T. (1982). SPP1-mediated plasmid transduction. *Journal of Virology*, 44:431–436.
- Cantalupo, P., Calgua, B., Zhao, G., & Hundesa, A. (2011). Raw Sewage Harbors Diverse Viral Populations. *AMS Journals*, <https://journals.asm.org/doi/10.1128/mBio.00180-11>.
- Clavijo, V., Baquero, D., & Hernandez, S. (2019). Phage cocktail SalmoFREE® reduces Salmonella on a commercial broiler farm. *Microbiology and Food Safety*, <https://doi.org/10.3382/ps/pez251>.

- Conave. (2020, Diciembre). *Estadísticas del Sector Avícola*. Retrieved from Información del Sector Avícola: <https://www.conave.org/informacion-sector-avicola-publico/>
- Crump, J., & Kretsinger, K. (2008). Clinical response and outcome of infection with *Salmonella enterica* serotype Typhi with decreased susceptibility to fluoroquinolones: a United States foodnet multicenter retrospective cohort study. *Antimicrob Agents Chemother*, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18212096/>.
- Dabrowska, K., Miernikiewicz, P., & Piotrowicz, A. (2014). Immunogenicity studies of proteins forming the T4 phage head surface. *J Virol*, <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JVI.02043-14>.
- Darby, J., & Sheorey, H. (2008). Searching for *Salmonella*. *Aust Fam Physician*, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19002298/>.
- Devoto, A., & Santini, J. (2019). Megaphages infect *Prevotella* and variants are widespread in gut microbiomes. *Nature Microbiology*, <https://www.nature.com/articles/s41564-018-0338-9>.
- Dion, M., Oeschlin, F., & Moineau, S. (2020). Phage diversity, genomics and phylogeny. *Nature Reviews Microbiology*, doi:10.1038/s41579-019-0311-5 .
- Duff, J., & Wyss, O. (1961). Isolation and classification of a new series of *Azotobacter* bacteriophages. *J Gen Microbiol*, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13724784/>.
- EFSA; ECDC. (2020). The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2017/2018. *EFSA Journal*, <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.6007>.
- Garcia, P., & Rodriguez, A. (2019, Febrero 1). *Poultry World*. Retrieved from Pros and cons of using phages: <https://www.poultryworld.net/Health/Articles/2019/2/Pros-and-cons-of-using-phages-388607E/>

- Gaviria, G., González, M., & Castaño, J. (2012). Técnica para aislamiento de bacteriófagos específicos para E.coli DH5 α a partir de aguas residuales. *MVZ*, <https://doi.org/10.21897/rmvz.253>.
- GBD. (2019). The global burden of non-typhoidal salmonella invasive disease: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *The Lancet*, [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(19\)30418-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(19)30418-9).
- Gebhart, D., Williams, S., & Scholl, D. (2017). Bacteriophage SP6 encodes a second tailspike protein that recognizes Salmonella enterica serogroups C2 and C3. *Virology*, <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0042682217300739>.
- Green, M., & Sambrook, J. (2012). Picking Bacteriophage Lambda Plaques. In *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Guerrero, T., Bayas-Rea, R., Erazo, E., & Zapata Mena, S. (2021). Systematic Review: Nontyphoidal Salmonella in Food from Latin America. *Foodborne Pathogens and Disease*, <https://doi.org/10.1089/fpd.2020.2925>.
- Gutiérrez, D., Rodríguez, L., Fernández, L., Martínez, B., Rodríguez, A., & García, P. (2017). Applicability of commercial phage-based products against Listeria monocytogenes for improvement of food safety in Spanish dry-cured ham and food contact surfaces. *Food Control*, <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0956713516306223>.
- Helmy, M., Awad, M., & Mosa, K. (2016). Limited resources of genome sequencing in developing countries: Challenges and solutions. *Applied & Translational Genomics*, <https://doi.org/10.1016/j.atg.2016.03.003>.

- Hsu, F., Shieh, C., & Sobsey, M. (2002). Enteric bacteriophages as potential fecal indicators in ground beef and poultry meat. *J Food Prot*, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11811158/>.
- Huang, C., Shi, J., Ma, W., Li, Z., Wang, J., Li, J., & Wang, X. (2018). Isolation, characterization, and application of a novel specific Salmonella bacteriophage in different food matrices. *Food Res Int*, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30007727/>.
- Islam, S., Hu, Y., Mizan, F., Yan, T., & Nime, I. (2020). Characterization of Salmonella Phage LPST153 That Effectively Targets Most Prevalent Salmonella Serovars. *Microorganisms*, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7409278/>.
- Jamal, M., Andleeb, S., & Ali, M. (2018). Bacteriophages: an overview of the control strategies against multiple bacterial infections in different fields. *Journal of Basic Microbiology*, 10.1002/jobm.201800412.
- Kennedy, J., Wei, C., & Oblinger, J. (1986). Distribution of Coliphages in Various Foods. *J Food Prot*, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30965462/>.
- Kimura, A., Reddy, V., & Marcus, R. (2004). Chicken consumption is a newly identified risk factor for sporadic Salmonella enterica serotype Enteritidis infections in the United States: a case-control study in FoodNet sites. *Clin Infect Dis*, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15095196/>.
- Korf, I., & Kittler, S. (2020). In Vitro Evaluation of a Phage Cocktail Controlling Infections with Escherichia coli. *Viruses*, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7768485/>.
- Kropinski, A., Mazzocco, A., & Waddell, T. (2009). Enumeration of Bacteriophages by Double Agar Overlay. In M. Clokie, & A. Kropinski, *Bacteriophages: Methods and Protocols, Volume 1: Isolation, Characterization, and Interactions* (pp. 69-76). Humana Press.

- Ksiazek, T., & Erdman, D. (2003). A Novel Coronavirus Associated with Severe Acute Respiratory Syndrome. *The New England Journal of Medicine*, <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa030781>.
- Kutter, E., & Sulakvelidze, A. (2004). *Bacteriophages: Biology and Applications*. Boca Raton: CRC Press.
- Labrie, S., Samson, J., & Moineau, S. (2010). Bacteriophage resistance mechanisms. *Nature Reviews Microbiology*, <https://www.nature.com/articles/nrmicro2315>.
- Mahon, B., & Fields, P. (2016). Invasive Infections with Nontyphoidal Salmonella in Sub-Saharan Africa. *Microbiol Spectr*, 10.1128/microbiolspec.EI10-0015-2016.
- Majewska, J., Kazmierczak, Z., Lahutta, K., Lecion, D., Szymczak, A., Miernikiewicz, P., & Dąbrowska, K. (2019). Induction of Phage-Specific Antibodies by Two Therapeutic Staphylococcal Bacteriophages Administered per os. *Front. Immunol*, <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2019.02607/full>.
- Majowicz, S., Musto, J., Scallan, E., Angulo, F., Kirk, M., & O'brien, S. (2010). The Global Burden of Nontyphoidal Salmonella Gastroenteritis. *Clinical Infectious Diseases*, <https://doi.org/10.1086/650733>.
- Marchello, C., Fiorino, F., & Pettini, E. (2021). Incidence of non-typhoidal Salmonella invasive disease: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Infection*, <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2021.06.029>.
- Mavrigh, T., & Hatfull, G. (2019). Evolution of Superinfection Immunity in Cluster A Mycobacteriophages. *ASM Journal*, <https://journals.asm.org/doi/10.1128/mBio.00971-19>.

- McDermott, P., & Zhao, S. T. (2021). Antimicrobial Resistance in Nontyphoidal Salmonella. *Microbiology Spectrum*, <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/microbiolspec.ARBA-0014-2017>.
- McGrath, S., Fitzgerald, G., & Sinderen, D. (2004). The impact of bacteriophage genomics. *Science Direct*, DOI 10.1016/j.copbio.2004.01.007.
- Mejia, L., Medina, L., Bayas, R., Satan, C., & Zapata, S. (2020). Genomic Epidemiology of Salmonella Infantis in Ecuador: From Poultry Farms to Human Infections. *Front. Vet. Sci*, <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.547891>.
- Mercado, M., Avila, J., & Rey, M. (2012). Brotes por Salmonella spp., Staphylococcus aureus y Listeria monocytogenes asociados al consumo de pollo. *Biomedica*, <https://doi.org/10.7705/biomedica.v32i3.697>.
- Monak, D., Mueller, A., & Falkow, S. (2004). Persistent bacterial infections: the interface of the pathogen and the host immune system. *Nat Rev Microbiol*, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15372085/>.
- Monk, A., Rees, C., & Barrow, P. (2010). Bacteriophage applications: where are we now? *Lett Appl Microbiol*, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20796209/>.
- Nutter, R., Bullas, L., & R, S. (1970). Some properties of five new Salmonella bacteriophages. *Journal of Virology*, 5: 754–764.
- Olia, A., Prevelige, P., & Johnson, J. (2011). Three-dimensional structure of a viral genome-delivery portal vertex. *Nat Struct Mol Biol*, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21499245/>.
- OMS. (2018, Febrero 20). *Newsroom*. Retrieved from Salmonella (non-typhoidal): [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-\(non-typhoidal\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-(non-typhoidal))

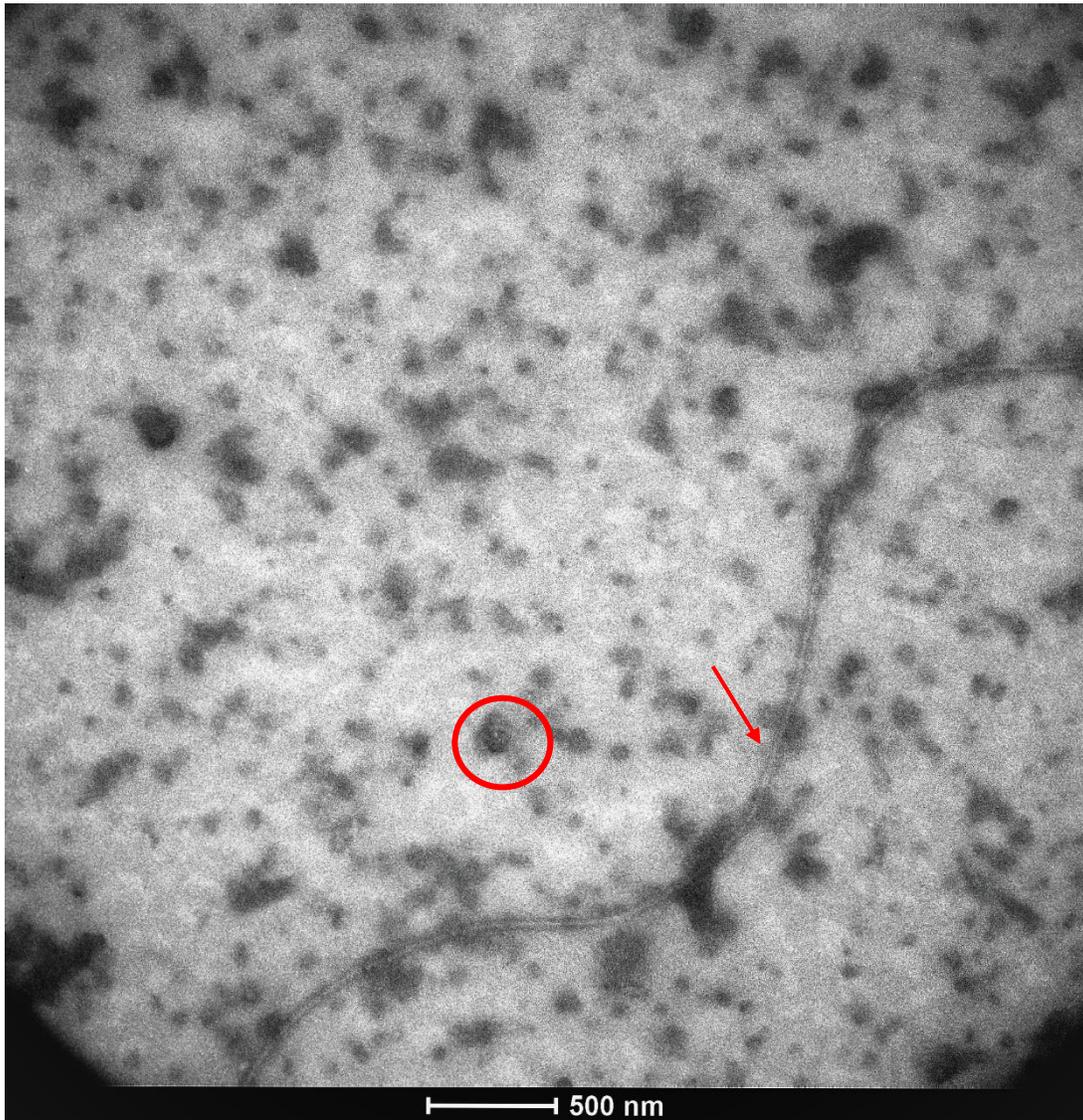
- Payne, S. (2017). Chapter 4 - Methods to Study Viruses. In *Viruses: From Understanding to Investigation* (pp. 37-52). Academic Press.
- Peñañiel, M. (2019, Mayo). *Ecotec*. Retrieved from Material 2019: https://www.ecotec.edu.ec/material/material_2019F1_BIO101_01_130956.pdf
- Prada, C., Holguín, A., González, A., & Vives, M. (2015). Fagoterapia, alternativa para el control de las infecciones bacterianas. Perspectivas en Colombia. *Universitas Scientiarum*, doi: 10.11144/Javeriana.SC20-1.faci.
- Rakhuba, D., & Kolomiets, E. (2010). Bacteriophage receptors, mechanisms of phage adsorption and penetration into host cell. *Pol J Microbiol*, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21033576/>.
- Rao, S. (2016). *MicroRao*. Retrieved Noviembre 15, 2021, from Bacteriophage: <https://www.microrao.com/micronotes/bacteriophage.pdf>
- Ravnum, S., & Anderson, D. (2003). Vitamin B12 repression of the *btuB* gene in *Salmonella typhimurium* is mediated via a translational control which requires leader and coding sequences. *Molecular Biology*, <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1365-2958.1997.1761543.x>.
- Reeves, M., & Evins, G. (1989). Clonal nature of *Salmonella typhi* and its genetic relatedness to other salmonellae as shown by multilocus enzyme electrophoresis, and proposal of *Salmonella bongori* comb. nov. *J Clin Microbiol.*, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC267299/>.
- Runa, V., Wenk, J., Bengtsson, S., & Jones, B. L. (2021). Bacteriophages in Biological Wastewater Treatment Systems: Occurrence, Characterization, and Function. *Front. Microbiol.*, <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2021.730071/full>.

- Sadeghalvad, M., & Rezaei, N. (2021). Introduction on Laboratory Tests for Diagnosis of Infectious Diseases and Immunological Disorders. *Reference Module in Biomedical Sciences*, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818731-9.00087-2>.
- Scallan, E., & Hoekstra, R. (2011). Foodborne Illness Acquired in the United States—Major Pathogens. *Emerg Infect Dis*, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3375761/>.
- Sharma, C., Dhakal, J., & Nannapaneni, R. (2015). Efficacy of Lytic Bacteriophage Preparation in Reducing Salmonella In Vitro, on Turkey Breast Cutlets, and on Ground Turkey. *J Food Prot*, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26197288/>.
- Shin, H., Lee, J., Kim, H., Choi, Y., Heu, S., & Ryu, S. (2012). Receptor Diversity and Host Interaction of Bacteriophages Infecting Salmonella enterica Serovar Typhimurium. *PLoS One*, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3424200/>.
- Switt, A., Sulakvelidze, A., Wiedmann, M., Kropinski, A., Wishart, D., Poppe, C., & Liang, Y. (2015). Salmonella Phages and Prophages: Genomics, Taxonomy, and Applied Aspects. In H. Schatten, & A. Eisenstark, *Salmonella: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology* (pp. DOI 10.1007/978-1-4939-1625-2_15). Springer Science.
- Takaya, A., & Suzuki, M. (2003). Lon, a stress-induced ATP-dependent protease, is critically important for systemic Salmonella enterica serovar typhimurium infection of mice. *Infect Immun*, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12540547/>.
- Vikram, A., Woolston, J., & Sulakvelidze, A. (2021). Phage Biocontrol Applications in Food Production and Processing. *Curr. Issues Mol. Biol*, <https://www.mdpi.com/1467-3045/40/1/9>.

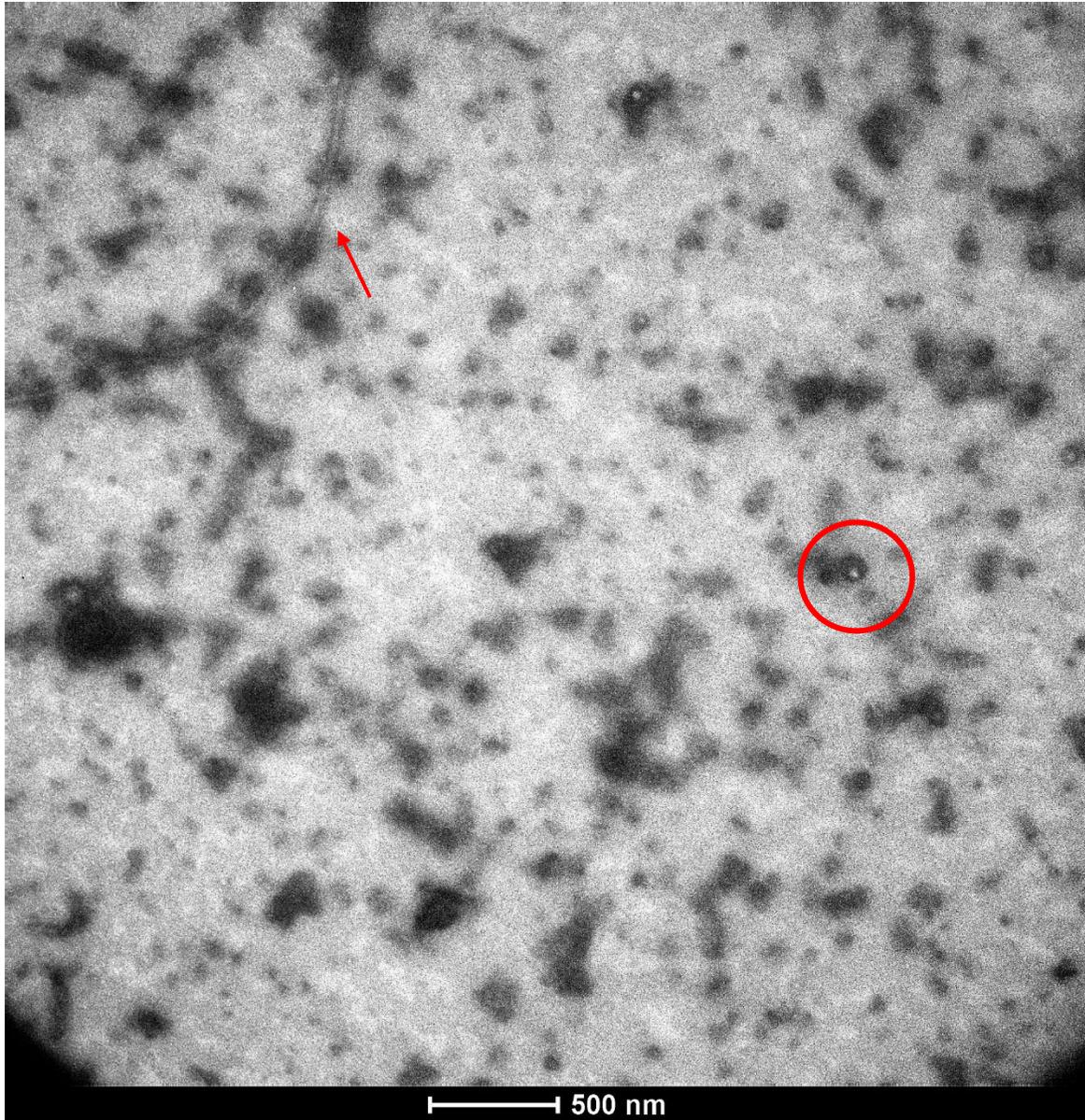
- Vinueza-Burgos, C., Cevallos, M., Ron-Garrido, L., & Bertrand, S. (2016). Prevalence and Diversity of Salmonella Serotypes in Ecuadorian Broilers at Slaughter Age. *PLOS ONE*, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159567>.
- Waddell, T., Franklin, K., Mazzocco, A., & Johnson, R. (2009). Preparation and Characterization of Anti-phage Serum. In M. Clokie, & A. Kropinski, *Bacteriophages: Methods and Protocols, Volume 1: Isolation, Characterization, and Interactions* (pp. DOI 10.1007/978-1-60327-164-6 24). Hatfield, Hertfordshire: Humana Press.
- Wang, C., Tu, J., & Liu, J. (2019). Structural dynamics of bacteriophage P22 infection initiation revealed by cryo-electron tomography. *Nat Microbiol*, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30886360/>.
- Zino, P., Devirgiliis, C., Ercolini, E., Ongeng, D., & Mauriello, G. (2014). Bacteriophage P22 to challenge Salmonella in foods. *International Journal of Food Microbiology*, <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.08.037>.

ÍNDICE DE ANEXOS

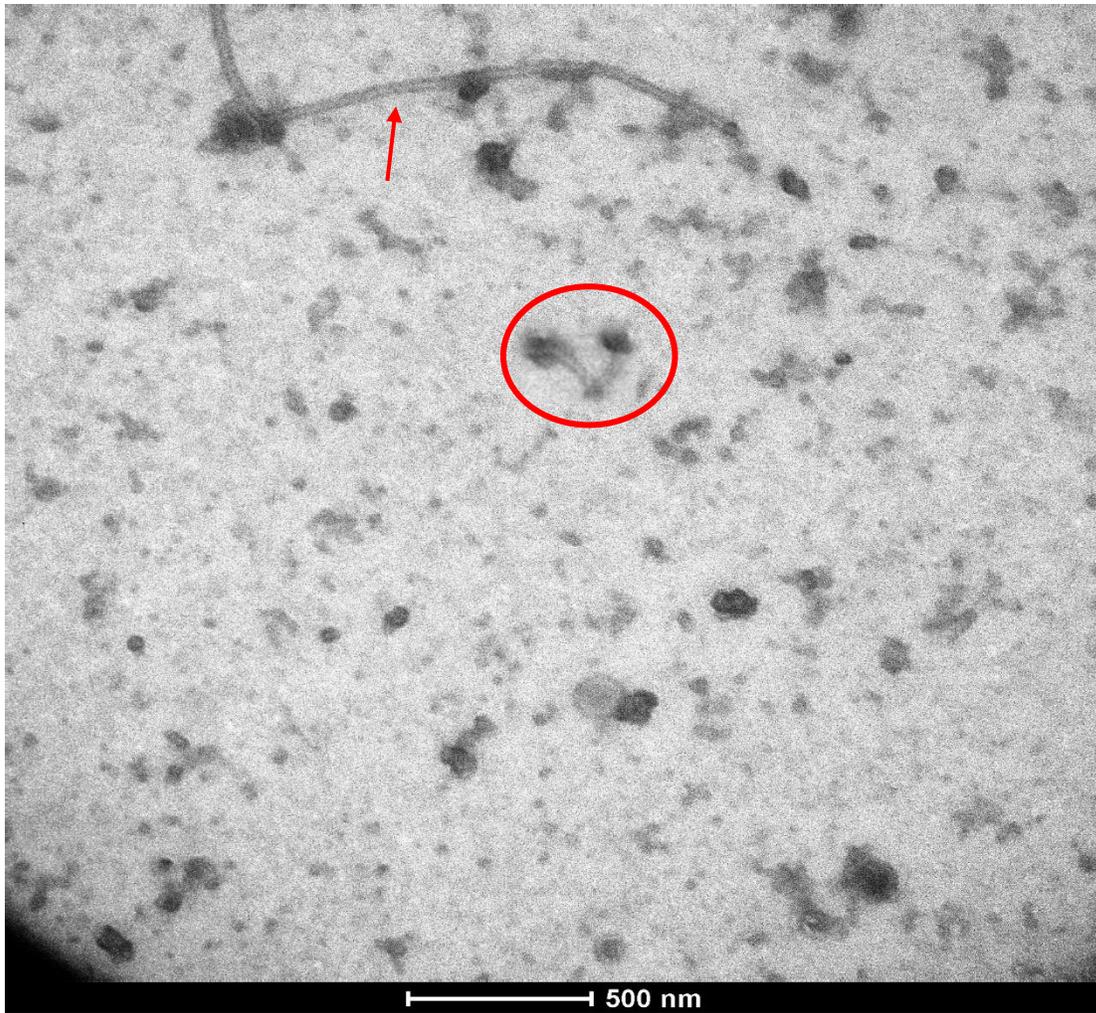
ANEXO A.	64.
ANEXO B.	65.
ANEXO C.	66.



Anexo A: Micrografía del ambiente donde fue encontrado el fago Ph15-1 (círculo rojo), se observa cerca de estructuras flagelares (Flecha roja)



Anexo B: Micrografía del ambiente donde fue encontrado el fago Ph115-2 (círculo rojo), este fago se encontró cerca de estructuras flagelares bacterianas (flecha roja).



Anexo C: Micrografía del ambiente donde fue encontrado el fago F3s2 α (círculo rojo), este fago se encontró cerca de estructuras flagelares bacterianas (flecha roja)