

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

***Musca domestica* como potencial reservorio de bacteriófagos**

Isabella Ortega Hidrobo

Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de fin de carrera presentado como requisito
para la obtención del título de
Ingeniera en Biotecnología

Quito, 17 de mayo de 2024

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA

Musca domestica como potencial reservorio de bacteriófagos

Isabella Ortega Hidrobo

Nombre del profesor, Título académico

Sonia Zapata Mena, PhD

Quito, 17 de mayo de 2024

© 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.

Nombres y apellidos: Isabella Ortega Hidrobo

Código: 00212081

Cédula de identidad: 1719472399

Lugar y fecha: Quito, 17 de mayo de 2024

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UNPUBLISHED DOCUMENT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 capstone 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>.

RESUMEN

Musca domestica, un díptero cosmopolita, es conocido por ser un vector mecánico de diversos patógenos entéricos. Este insecto suele encontrarse en ambientes con alta carga bacteriana, como la materia orgánica en descomposición, especialmente los desechos animales y humanos. Esto lo convierte en una fuente de bacterias entéricas, como *Salmonella enterica* y *Escherichia coli*, así como de bacteriófagos. La técnica de aislamiento de bacteriófagos a partir de *M. domestica* es antigua y quedó en el olvido tras el descubrimiento de los antibióticos.

En este estudio se realizaron colectas entomológicas en tres sitios urbanos y dos rurales utilizando la técnica del listón engomado. Posteriormente, se procedió al aislamiento de bacteriófagos sin enriquecimiento con bacterias hospedadoras específicas. Se evaluó el rango de hospedador de los cócteles frente a 21 cepas de *S. enterica* pertenecientes a 9 serovares y una cepa de *E.coli*, observándose que los cocteles provenientes de dípteros de zonas rurales mostraron una mayor efectividad. Los títulos virales estuvieron en el orden de 10^2 a 10^5 UFP/ml. Estos resultados demuestran el potencial de *Musca domestica* como reservorio de bacteriófagos líticos para bacterias entéricas y posible uso en la fagoterapia.

Palabras clave: *Musca domestica*, bacteriófagos, *Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, multirresistencia, fagoterapia

ABSTRACT

Musca domestica, a cosmopolitan dipteran, is known for being a mechanical vector of various enteric pathogens. This insect is often found in environments with a high bacterial composition, such as decomposing organic matter, especially animal and human waste. This makes it a source of enteric bacteria, such as *Salmonella enterica* and *Escherichia coli*, as well as bacteriophages. The technique of isolating bacteriophages from *M. domestica* is an old one, which fell into obscurity after the discovery of antibiotics.

In this study, entomological collections were conducted in three urban sites and two rural sites using the sticky ribbon technique. Subsequently, bacteriophages were isolated without enrichment with a specific host bacterium. The host range of the cocktails was evaluated against 21 strains of *S. enterica* belonging to 9 serovars and one strain of *E. coli*, showing that cocktails from dipterans in rural areas exhibited greater effectiveness. Viral titers ranged from 10^2 to 10^5 PFU/ml. These results demonstrate the potential of *Musca domestica* as a reservoir of lytic bacteriophages for enteric bacteria and their possible use in phage therapy.

Key words: *Musca domestica*, bacteriophages, *Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, multidrug resistance, phage therapy

TABLA DE CONTENIDO

Introducción	10
Métodos	14
Resultados	17
Discusión.....	18
Conclusiones	22
Tablas.....	23
Referencias.....	27
Anexos.....	29

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Listado de las cepas bacterianas utilizadas en el estudio y su origen	23
Tabla 2. Evaluación de la actividad lítica de los bacteriófagos según Kutter (2009)	24
Tabla 3. Matriz del Ensayo de la Gota con los cocteles de los cinco distintos muestreos	25
Tabla 4. Título viral de los cinco cocteles obtenidos	26

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Sitios de colectas entomológicas	29
Anexo 2. Composición de los medios de enriquecimiento de bacteriófagos	30

INTRODUCCIÓN

Musca domestica es un díptero braquícero de la familia Muscidae y es la especie más común a nivel mundial (Issa, 2019). Este insecto puede habitar un amplio rango de nichos ecológicos y tolerar climas tropicales y templados. Se caracteriza por vivir en asociación cercana con los asentamientos humanos, tanto urbanos como rurales (Khamesipour et al., 2018). En estas áreas se aglomera en lugares con abundancia de nutrientes, para su alimentación y para el desarrollo de su prole (Khamesipour et al., 2018). Estos insectos tienen un tiempo de vida entre 15 y 30 días y su ciclo de vida se compone de 4 fases: huevo, larva, pupa y adulto. Las hembras pueden depositar hasta 150 huevos por puesta y esto se puede repetir entre 4 a 6 veces en la vida del díptero (Issa, 2019). A este insecto le toma aproximadamente 7 días atravesar las fases de su ciclo de vida y convertirse en un adulto sexualmente maduro.

Para un desarrollo adecuado de los huevos y las larvas, las hembras suelen alimentarse de sustratos ricos en proteína como lo son el excremento, la sangre y secreciones corporales, tanto de animales como de humanos. Estos desechos suelen tener una alta cantidad de microorganismos, entre los cuales se pueden encontrar patógenos (Issa, 2019). Cuando el insecto se posa sobre materia contaminada con patógenos o la consume, se convierte en un vector para la transmisión mecánica de estos patógenos. Los microorganismos que se encuentran en *M. domestica* no se replican, por lo que no se lo puede considerar un vector biológico (Khamesipour et al., 2018). Sin embargo, al posarse sobre superficies asépticas, pueden transferir los patógenos de su superficie de forma directa o indirecta mediante la regurgitación y defecación (Nayduch et al., 2023).

Se han realizado varios estudios en los que se identifican distintos patógenos transmitidos por *M. domestica*. Según la revisión realizada por Khamesipour et al. (2018), se

han aislado bacterias, hongos, parásitos e incluso algunos virus de la superficie y del intestino de estos insectos. Las bacterias patogénicas han sido los microorganismos aislados de *M. domestica* más reportados, con una mayor carga bacteriana en el tracto digestivo del insecto que en su exterior. Por la naturaleza ubicua de estos dípteros, los patógenos bacterianos pueden diseminarse entre lugares que no tendrían contacto de no ser por estos vectores. Se ha reportado la presencia de Enterobacterias en *M. domestica* capturadas en cocinas cercanas a granjas ganaderas. Adicionalmente, en estas granjas ganaderas se ha detectado la presencia de patógenos entéricos como *Escherichia coli* O157:H7 y *Salmonella enterica* en estos dípteros, siendo estos los responsables de la diseminación de estas bacterias entre el ganado (Barreiro et al., 2013). En relación con enfermedades humanas, se ha reportado un aumento en los casos de diarrea en sitios con abundancia de *M. domestica* (Khamesipour et al., 2018).

La asociación de estos insectos a sitios con una alta carga microbiana conlleva a que se encuentren expuestos a los agentes biológicos relacionados con estas bacterias (Addablah et al., 2021). A pesar de los numerosos estudios que demuestran la presencia de patógenos bacterianos en *M. domestica*, son limitadas las investigaciones realizadas sobre la presencia de bacteriófagos en ellas. Los bacteriófagos son virus que infectan a bacterias y utilizan sus mecanismos celulares para poder replicarse. Estos virus son las entidades biológicas más abundantes en el planeta, presentes en todos los ecosistemas (Sharma et al., 2016). Por su necesidad de la maquinaria celular bacteriana para replicarse, se encuentran en mayor cantidad dónde existen las bacterias que pueden infectar (Addablah et al., 2021).

El aislamiento de bacteriófagos a partir de *Musca domestica* es una práctica antigua y en gran parte ha sido descontinuada. En sus inicios, Shope (1927) indica que se trituraba a los vectores en conjunto con solución salina y se filtraba para obtener una solución libre de tejidos y bacterias, únicamente con bacteriófagos. Después, el filtrado se inoculaba en un medio de

cultivo líquido, donde previamente se habían cultivado bacterias. Se monitoreaba la turbidez del medio por 24 horas y, al comparar con un control sin el filtrado, se evaluaba la actividad lítica de los bacteriófagos. Estos estudios surgieron tras observar que las bacterias patogénicas presentes en *M. domestica* se eliminaban en distintos periodos de tiempo. Se buscaba identificar el compuesto o agente con actividad bactericida, capaz de eliminar a las bacterias presentes (Shope, 1927).

Los bacteriófagos fueron inicialmente descritos a inicios del siglo XX, por Felix d'Herelle y Frederick Twort en estudios independientes. Sin embargo, d'Herelle fue quien continuó con su investigación y desarrolló protocolos para el tratamiento de infecciones bacterianas mediante cocteles de bacteriófagos, conocido como fagoterapia (Summers, 2017). Los bacteriófagos realizan su ciclo lítico para la multiplicación de partículas virales, las cuales concluyen con la lisis celular de los patógenos que utilizaron como hospederos. Para realizar la fagoterapia era necesario el aislamiento de bacteriófagos con afinidad hacia las bacterias patogénicas que causaban la enfermedad. A estas partículas virales se las encuentra en los mismos reservorios que albergan las bacterias patogénicas. A pesar de la perspectiva prometedora de este tipo de tratamiento, el descubrimiento de los antibióticos truncó su desarrollo (García-Cruz et al., 2023). Las bacterias patogénicas podían ser eliminadas con un tratamiento con antibióticos, por lo que el aislamiento de bacteriófagos de distintas fuentes se volvió obsoleto, incluyendo el aislamiento a partir de *Musca domestica*. Sin embargo, la aparición de bacterias con resistencia antimicrobiana en años recientes ha dirigido nuevos estudios para encontrar una solución a este problema.

La resistencia antimicrobiana que presentan algunos patógenos bacterianos se ha convertido en una problemática mundial; se prevé que en el año 2050 diez millones de muertes anuales serán causadas por infecciones bacterianas (Tang, Millar & Moore, 2023). La

evolución de bacterias a presentar este tipo de resistencia se dio por la presión selectiva ejercida por el uso de antibióticos para tratar infecciones. Dentro de la medicina y de la agricultura se empezó a utilizar estos compuestos de forma desmedida para la prevención de infecciones y de forma irregular (Tang, Millar & Moore, 2023). El sobreuso de antibióticos llevó al desarrollo de genes y sistemas de resistencia en los microorganismos patogénicos. Debido al crecimiento exponencial de los casos de resistencia antimicrobiana, se están implementando medidas de control para reducir su expansión y se están buscando formas de combatir a las bacterias multirresistentes.

Entre las alternativas para combatir bacterias con multirresistencia a antibióticos se encuentra la fagoterapia. La ventaja de este tratamiento es la especificidad que se tiene en contra de la bacteria patogénica y el poco riesgo que presenta contra los animales y humanos (Niode et al., 2022). Por esta razón, este proyecto pretende aislar bacteriófagos líticos para cepas multirresistentes de *Salmonella enterica* en *Musca domestica* colectadas en zonas rurales y urbanas.

MÉTODOS

Colección entomológica

Se realizaron cinco colectas en una zona urbana del Distrito Metropolitano de Quito (DMQ) y una zona rural de la provincia de Cotopaxi entre los meses de octubre 2023 y enero 2024; los sitios de muestreo se detallan en la **Anexo 1**. Para cada muestreo se utilizó trampas de listones engomados que contienen aceite mineral de colofonia y caucho como producto adhesivo (*H-E-B*, s.f.), las cuales se colocaron cerca de lugares donde se registró previamente una gran afluencia de moscas y se retiró luego de 8 horas. En cada muestreo se obtuvo entre 20 a 60 moscas aproximadamente. Se realizó 2 colectas en mercados y tiendas de venta de carnes expuestas sin refrigeración, para lo cual se solicitó autorización a los propietarios para colocar las trampas cerca de las carnes. También se colocó una trampa en un almacén agrícola, donde se vendían aves de corral. Los dos muestreos restantes se realizaron en una parroquia rural del cantón Latacunga. Esta zona está en el campo, rodeada de vegetación, animales de cría y una granja avícola a 5 kilómetros de distancia. Finalmente, al retirar de trampas, se utilizó una pinza entomológica para desprender a los vectores para guardarlos en frascos estériles a 4°C para su posterior procesamiento en el laboratorio de Parasitología de la USFQ.

Aislamiento de fagos

Para el aislamiento de fagos se siguió el protocolo descrito por Brown & Smith (2016). Inicialmente se prepararon los medios *Phage Growth Medium* y *Phage Lysing Medium* (**Anexo 2**). Para esto se tomaron aproximadamente 20 individuos y se los trituró en un mortero estéril, luego se resuspendió en 50 ml de *Phage Growth Medium*, se colocó en un frasco estéril y se incubó a 37°C por 42 horas. Al concluir la primera incubación, se agregó 50 ml de *Phage Lysing Medium* y se realizó una segunda incubación a 37°C por 6 horas con agitación. Posteriormente, se centrifugó a la mezcla por 30 minutos a 4000 rpm, se recuperó el

sobrenadante y se eliminó el sedimento. Finalmente, el sobrenadante se filtró a través de una membrana de 0.45 μm en condiciones estériles. El filtrado se lo almacenó en un frasco estéril a 4°C.

Cepas bacterianas

Para evaluar la capacidad lítica de los 5 cocteles obtenidos se utilizaron 22 cepas bacterianas descritas en la **Tabla 1**, las cuales se encontraban congeladas a -20°C. Cada cepa fue activada en medio de cultivo TSA e incubada por 24 horas a 37°C.

Evaluación del rango de hospedador

Se realizó el Ensayo de la Gota con las 22 cepas bacterianas para evaluar el rango de hospedador de cada coctel de bacteriófagos. Primero, se inoculó la bacteria hospedadora en 5 ml de medio TSB y se incubó en agitación por 4 horas. Luego se agregó 300 μl del cultivo bacteriano a un tubo con 5 ml de medio semisólido TSB (0.9% agar y 0.2% MgSO_4), conservado a 50°C para mantenerlo fundido. Se homogeneizó, se lo vertió sobre una caja Petri con medio TSA sólido (1.5% agar y 0.2% MgSO_4) y se lo dejó solidificar. Una vez solidificado, se agregó 10 μl de cada uno de los cinco filtrados en posiciones etiquetadas previamente. Se dejó a la caja Petri reposar durante 2 horas para que absorbiera el líquido en sus posiciones asignadas y se incubó a 37°C por 24 horas. Luego del periodo de incubación se observó las calvas formadas por los bacteriófagos presentes en los cocteles.

Para la evaluación de la formación de calvas se utilizó la escala descrita por Kutter (2009) en el libro *Bacteriophages Methods and Protocols, Volume 1: Isolation, Characterization and Interactions*, como se describe en la **Tabla 2**.

Cálculo del título viral

Se realizó el título viral para los cocteles que mostraron capacidad de lisis para las cepas bacterianas ensayadas. Para esto, se prepararon diluciones en base diez de los cocteles hasta la dilución 10^{-6} . Se realizó el Ensayo de la Gota con cada dilución para cada bacteria hospedadora. Para el cálculo del título viral se empleó la siguiente ecuación:

$$\text{Título viral (UFP/ml)} = \frac{\text{UFP}}{\text{Volumen inoculado (ml)} \times \text{Dilución}}$$

Como ejemplo está el título viral del coctel Rural 1 para *S. enterica* 6:

$$\text{Título viral (UFP/ml)} = \frac{40 \text{ UFP}}{(0.01 \text{ ml}) \times 10^{-2}} = 4 \times 10^5 \text{ UFP/ml}$$

UFP son las unidades formadoras de placas que se obtienen al contar el número de placas en el inóculo de la dilución más baja donde se observó la lisis bacteriana. El volumen inoculado se expresa en mililitros y la dilución no tiene unidades. El título viral se expresa en unidades de UFP/ml.

RESULTADOS

Se obtuvieron 5 cocteles de bacteriófagos: 3 de zona urbana y 2 de zona rural. Los resultados del rango de hospedador frente a 22 cepas bacterianas se detallan en la **Tabla 3**. En esta se observa que los cocteles rurales obtuvieron el mayor rango de hospedador, en comparación con los cocteles urbanos. El coctel Rural 1 mostró actividad lítica para 7 de las 22 cepas ensayadas, correspondiendo a una efectividad del 31.8%. De las bacterias ante las cuales se observó actividad lítica, tres eran cepas ATCC, tres eran cepas aisladas de una granja avícola y una era una cepa aislada de carne de pollo. El coctel Rural 2 demostró ser lítico para dos cepas de *S. enterica* ATCC: *S. Typhimurium* 14028 y *S. Enteritidis* 13076, lo que se traduce en una efectividad del 9%. En contraste, los cocteles urbanos no mostraron actividad lítica frente a las cepas bacterianas evaluadas, excepto el coctel Urbano 2. Este coctel exhibió especificidad hacia la cepa *S. Infantis* ATCC 51741, alcanzando una efectividad del 4.5%. Cabe destacar que esta cepa de *S. enterica* no fue susceptible a la actividad lítica de los cocteles de origen rural.

Los resultados del título viral de los cocteles líticos se encuentran resumidos en la **Tabla 4**. El coctel Rural 1 presentó un mayor título viral en comparación con los demás cocteles. En este caso, el título viral para las cepas de *S. enterica* varían entre 1×10^2 UFP/ml y 4×10^5 UFP/ml, mientras que para *E. coli* ATCC 11303 fue de 1×10^6 UFP/ml. Por otra parte, los cocteles Rural 2 y Urbano 2 tuvieron títulos virales similares, con un rango entre 10 UFP/ml a 1×10^2 UFP/ml.

DISCUSIÓN

En general, los mecanismos antimicrobianos de *M. domestica* han sido de interés desde la primera descripción del aislamiento de bacteriófagos presentes en estos insectos. En ese estudio se identificó que la presencia de bacteriófagos en estos dípteros era un mecanismo antimicrobiano significativo (Shope, 1927). En este estudio se logró aislar bacteriófagos líticos para *S. enterica* y *E. coli* a partir de *M. domestica* colectada en zonas rurales y urbanas.

Varios estudios han analizado el microbioma asociado a *M. domestica* colectada alrededor de zonas rurales y urbanas. Estos muestran la presencia de bacterias que no influyen en el desarrollo de los insectos, pero son patogénicas, tanto para humanos como para animales (Junquera et al., 2017). Principalmente se aíslan bacterias entéricas en dípteros provenientes de zonas rurales, donde existen granjas avícolas, porcinas y bovinas. Entre estas bacterias se destacan las cepas con multirresistencia a antibióticos, debido al uso de estos compuestos en la zona agrícola (Tang, Millar & Moore, 2023). En estos sitios, se han aislado distintas cepas de *Salmonella enterica* y *E. coli* presentes en *Musca domestica* (Cervelin et al., 2018; Bahrndorff et al., 2017; Bertelloni et al., 2023). En las zonas urbanas también se ha reportado la presencia de patógenos bacterianos en *Musca domestica* en lugares cercanos a la venta de alimentos, basureros y hospitales; incluso, en los hospitales se reporta la presencia de cepas multirresistentes (Khamesipour et al., 2018). La asociación de *M. domestica* a ambientes con una alta carga bacteriana conlleva a que estén igualmente asociadas a los bacteriófagos antagonistas a estas bacterias, los cuales se encuentran en los mismos ambientes que sus hospedadoras (Addablah et al., 2021).

A partir de los resultados obtenidos se identificó un mayor rango de hospedador en el coctel de bacteriófagos obtenido de los vectores colectados en la zona rural en comparación con la zona urbana. La zona rural donde se hizo la colecta de los ejemplares de *M. domestica*

fue una parroquia rural del cantón Latacunga, Cotopaxi. Esta zona se caracteriza por su producción agropecuaria; los reportes indican que el 13,94% de la tierra es utilizada para producción bovina extensiva e intensiva. Además, se estima que 64 hectáreas se destinan a la producción avícola y 5 hectáreas a la producción porcina (Ministerio de Agricultura y Ganadería & Consorcio TRACASA/NIPSA, 2014). Estas estadísticas demuestran la abundancia de granjas ganaderas en la zona y, por lo tanto, mayor abundancia de materia orgánica y desechos de animales a la intemperie. Este tipo de desechos son una gran fuente de bacterias entéricas, entre las cuales se encuentran *S. enterica* y *E. coli* (Bahrndorff et al., 2017).

Aunque la colecta de *M. domestica* en la zona rural no se realizó al interior de las granjas ganaderas, su capacidad de vuelo le permite ser un vector mecánico de los microorganismos en la zona. Se ha caracterizado que este díptero puede volar hasta 7 kilómetros independientemente, pero se han registrado instancias en las que llega a volar 32 kilómetros con la asistencia de corrientes de aire y automóviles (Nayduch et al., 2023). Esta característica permite a *M. domestica* moverse entre las distintas fuentes de bacterias entéricas en esta zona y ser un vector de una gran diversidad de patógenos. A pesar de que los resultados de esta investigación indican que hay un mayor rango de hospedador de bacteriófagos efectivos contra bacterias entéricas en la zona rural, se debe destacar que los muestreos fueron limitados, por lo que no se puede asegurar que los dípteros colectados en la zona rural son una mayor fuente de bacteriófagos.

En los resultados obtenidos del rango de hospedador destaca la efectividad que presentan los cocteles de bacteriófagos, tanto rurales como urbanos, por las cepas ATCC. Estas cepas son bacterias ampliamente caracterizadas; se las cultiva en laboratorios para mantener una línea celular estable y poder comercializarlas (Berns et al., 1996). Al mantenerse en cultivos axénicos, estas cepas no desarrollan sus mecanismos de defensa frente a infecciones

virales. Según Labrie, Samson, & Moineau (2010), las bacterias contienen mecanismos que les permiten evitar infecciones virales de forma innata, como los sistemas de restricción-modificación. Sin embargo, hay sistemas más eficientes que las bacterias desarrollan debido a su exposición a los bacteriófagos, como la adquisición de profagos y el sistema CRISPR-Cas. Los profagos provienen de bacteriófagos lisogénicos y expresan proteínas que evitan el ingreso de ADN viral a las células de su hospedador mediante el sistema de exclusión a la superinfección (Sie). El sistema CRISPR-Cas consiste en un ARN guía, el cual se adquirió de una infección viral previa, que dirige a una endonucleasa hacia el ADN viral y lo corta, evitando una infección (Labrie, Samson, & Moineau, 2010). Las cepas aisladas de granjas avícolas y de carne de pollo están expuestas a agentes virales que pueden contribuir al desarrollo de estos sistemas. Las cepas ATCC no tienen esta exposición, por lo que carecen de estos mecanismos de defensa.

El aislamiento de bacteriófagos antagonistas para distintas cepas de *Salmonella enterica* multirresistentes presenta una herramienta útil para poder eliminar estas bacterias. La eliminación de cepas de *S. enterica* multirresistentes utilizando cocteles de bacteriófagos es una técnica que está siendo estudiada como alternativa a los antibióticos (Aguilera et al., 2023). Además, se ha descrito como el uso de bacteriófagos para combatir a cepas multirresistentes reduce la resistencia de este tipo de bacterias. Como mecanismo de defensa contra infecciones virales, las bacterias pueden modificar los receptores membranales para evitar la adherencia de bacteriófagos. En algunos casos, los receptores suelen ser las bombas de eflujo que permiten a la célula bacteriana eliminar compuestos como los antibióticos. Al ser modificados, hay una reducción en su función y se recupera la susceptibilidad a los antibióticos que eran eliminados por este mecanismo (García-Cruz et al., 2023).

Sin embargo, los bacteriófagos pueden tener aplicaciones más allá de la fagoterapia, ya que son agentes importantes dentro de las comunidades microbianas. Se ha estudiado su impacto para la modulación de microbiomas, su uso como desinfectante y como herramienta para el control de plagas (García-Cruz et al., 2023). Este último uso es relevante por su aplicación en *M. domestica*. Recientemente se ha identificado un incremento en la resistencia hacia insecticidas en este díptero, lo cual es un problema al considerar que *M. domestica* es un vector mecánico de distintos patógenos. Los bacteriófagos pueden ser utilizados para atacar a bacterias esenciales de la microbiota de las larvas de este insecto, cambiando su composición y truncando su desarrollo (Zhang et al., 2021).

Los distintos usos de los bacteriófagos demuestran su versatilidad y la importancia de continuar con la búsqueda de nuevas fuentes de estos agentes biológicos. El aislamiento de bacteriófagos a partir de *Musca domestica* es una técnica prometedora. Para poder ampliar el rango de hospedador de los bacteriófagos aislados de este díptero se debe realizar un mayor número de colectas, en especial en las zonas rurales cercanas a granjas ganaderas. Aunque se identificó un mayor rango de hospedador en los cocteles obtenidos de las colectas de esta zona, no se debe descartar la posibilidad de colectar estos insectos en espacios cercanos a hospitales, donde hay la presencia de bacterias multirresistentes. Además, se deben realizar ensayos con más bacterias hospedadoras, no únicamente con bacterias entéricas como *S. enterica* y *E. coli*, ya que se ha reportado el aislamiento de distintos patógenos presentes en *M. domestica*.

CONCLUSIONES

Musca domestica es un reconocido vector mecánico de patógenos entéricos bacterianos. Debido a sus hábitos, suele encontrarse en ambientes con alta carga bacteriana, que incluyen una amplia variedad de patógenos y sus bacteriófagos asociados. En esta investigación, se logró aislar bacteriófagos líticos específicos para cepas multirresistentes de *Salmonella enterica* a partir de dípteros colectados en zonas urbanas y rurales.

Los cocteles obtenidos de los dípteros colectados en la zona rural presentaron un mayor rango de hospedador y un título viral entre 1×10^2 UFP/ml y 4×10^5 UFP/ml. Además, se observó que las cepas ATCC fueron las más susceptibles ante la actividad lítica de los cocteles por su falta de mecanismos de defensa.

Con el actual aumento de la multirresistencia bacteriana, es crucial encontrar mecanismos para eliminar estos patógenos. *Musca domestica* representa un potencial reservorio de bacteriófagos líticos para patógenos entéricos, lo que la convierte en una prometedora opción para la fagoterapia.

TABLAS

Tabla 1. Listado de las cepas bacterianas utilizadas en el estudio y su origen.

<i>Granja Avícola*</i>	<i>ATCC</i>	<i>Carne de Pollo*</i>
<i>S. enterica</i> 1	<i>S. Typhimurium</i> 14028	<i>S. Branderburg</i> A
<i>S. enterica</i> 2	<i>S. Infantis</i> 51741	<i>S. Infantis</i> B
<i>S. enterica</i> 3	<i>S. Enteritidis</i> 13076	<i>S. Typhimurium</i> D
<i>S. enterica</i> 4	<i>E. coli</i> 11303	<i>S. Heilderberg</i> E
<i>S. enterica</i> 5		<i>S. Dublin</i> H
<i>S. enterica</i> 6		<i>S. Stanley</i> B
<i>S. enterica</i> 7		<i>S. Infantis</i> C
<i>S. Albany</i> Z1		
<i>S. Infantis</i> Z2		
<i>S. Infantis</i> Z3		
<i>S. Amsterdam</i> H1		

*Indica la resistencia de las cepas a más de 2 antimicrobianos.

Tabla 2. Evaluación de la actividad lítica de los bacteriófagos según Kutter (2009).




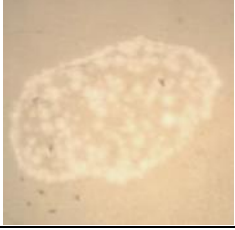

Puntuación asignada	Criterio
+4	Lisis completa 
+3	Lisis completa, pero con turbidez en el fondo 
+2	Turbidez sustancial en la zona de lisis 
+1	Formación de placas individuales 
0	No hay lisis, solo la gota del inóculo o el lugar donde la pipeta tocó el medio al inocular 

Tabla 3. Matriz del Ensayo de la Gota con los cocteles de los cinco distintos muestreos frente a 22 cepas. Se asignó una puntuación de acuerdo con la lisis realizada por los bacteriófagos.

CEPAS	COCTELES				
	Rural 1	Rural 2	Urbano 1	Urbano 2	Urbano 3
<i>GRANJA AVÍCOLA</i>					
<i>S. enterica</i> 1	0	0	0	0	0
<i>S. enterica</i> 2	0	0	0	0	0
<i>S. enterica</i> 3	0	0	0	0	0
<i>S. enterica</i> 4	0	0	0	0	0
<i>S. enterica</i> 5	0	0	0	0	0
<i>S. enterica</i> 6	3	0	0	0	0
<i>S. enterica</i> 7	0	0	0	0	0
<i>S. Albany</i> Z1	2	0	0	0	0
<i>S. Infantis</i> Z2	0	0	0	0	0
<i>S. Infantis</i> Z3	0	0	0	0	0
<i>S. Amsterdam</i> H1	1	0	0	0	0
<i>ATCC</i>					
<i>S. Typhimurium</i> 14028	1	2	0	0	0
<i>S. Infantis</i> 51741	0	0	0	1	0
<i>S. Enteritidis</i> 13076	3	2	0	0	0
<i>E. coli</i> ATCC 11303	4	0	0	0	0
<i>CARNE DE POLLO</i>					
<i>S. Branderburg</i> A	0	0	0	0	0
<i>S. Infantis</i> B	0	0	0	0	0
<i>S. Typhimurium</i> D	1	0	0	0	0
<i>S. Heilderberg</i> E	0	0	0	0	0
<i>S. Dublin</i> H	0	0	0	0	0
<i>S. Stanley</i> B	0	0	0	0	0
<i>S. Infantis</i> C	0	0	0	0	0

Tabla 4. Título viral de los cinco cocteles obtenidos.

CEPAS	TÍTULO VIRAL (UFP/ml)				
	Rural 1	Rural 2	Urbano 1	Urbano 2	Urbano 3
<i>GRANJA AVÍCOLA</i>					
<i>S. enterica</i> 6	4 x 10 ⁵	-	-	-	-
<i>S. Albany</i> Z1	1 x 10 ²	-	-	-	-
<i>S. Amsterdam</i> H1	1 x 10 ²	-	-	-	-
<i>ATCC</i>					
<i>S. Typhimurium</i> 14028	2 x 10 ⁴	1 x 10 ²	-	-	-
<i>S. Infantis</i> 51741	-	-	-	1 x 10 ²	-
<i>S. Enteritidis</i> 13076	1 x 10 ²	10	-	-	-
<i>E. coli</i> 11303	1 x 10 ⁶	-	-	-	-
<i>CARNE DE POLLO</i>					
<i>S. Typhimurium</i> D	3 x 10 ³	-	-	-	-

REFERENCIAS

- Addablah, A. Y. A., Kakou-Ngazona, S., Akpa, E. E., M'Bourou Ndombi, F., Adioumani, E., Koudou, A., Coulibaly N'Golo, D., Kouame Sina, M., Kouassi, S. K., Aoussi, S., & Dosso, M. (2021). Investigation of Phages Infecting *Escherichia coli* Strains B and C, and *Enterobacter cloacae* in Sewage and Ebrié Lagoon, Côte d'Ivoire. *PHAGE (New Rochelle, N.Y.)*, 2(3), 104–111. <https://doi.org/10.1089/phage.2020.0047>
- Aguilera, M., Tobar-Calfucoy, E., Rojas-Martínez, V., Norambuena, R., Serrano, M. J., Cifuentes, O., Zamudio, M. S., San Martín, D., Lara, P., Sabag, A., Zabner, M., Tichy, D., Camejo, P., León, L., Pino, M., Ulloa, S., Rojas, F., Pieringer, C., Muster, C., Castillo, D., Ferreira, N., Avendaño, C., Canaval, M., Pieringer, H., Cifuentes, P., & Cifuentes Muñoz, N. (2023). Development and characterization of a bacteriophage cocktail with high lytic efficacy against field-isolated *Salmonella enterica*. *Poultry Science*, 102(12), 103125. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2023.103125>.
- Bahrndorff, S., de Jonge, N., Skovgård, H. & Nielsen, J. L. (2017) Bacterial Communities Associated with Houseflies (*Musca domestica* L.) Sampled within and between Farms. *PLoS ONE*, 12(1): e0169753. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169753>
- Barreiro, C., Albano, H., Silva, J., & Teixeira, P. (2013). Role of flies as vectors of foodborne pathogens in rural areas. *ISRN microbiology*, 2013, 718780. <https://doi.org/10.1155/2013/718780>
- Berns, K. I., Bond, E. C., & Manning, F. J. (1996). *Resource Sharing in Biomedical Research*. National Academy Press. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK209078/pdf/Bookshelf_NBK209078.pdf
- Bertelloni, F., Bresciani, F., Cagnoli, G., Scotti, B., Lazzerini, L., Marcucci, M., Colombani, G., Bilei, S., Bossù, T., De Marchis, M. L., & Ebani, V. V. (2023). House Flies (*Musca domestica*) from Swine and Poultry Farms Carrying Antimicrobial Resistant Enterobacteriaceae and Salmonella. *Veterinary sciences*, 10(2), 118. <https://doi.org/10.3390/vetsci10020118>
- Brown, A. E. & Smith H. R. (2016). *Benson's Microbiological Applications: Laboratory manual in general microbiology complete version* (14th ed). New York: McGraw-Hill.
- Cervelin, V., Fongaro, G., Pastore, J. B., Engel, F., Reimers, M. A., & Viancelli, A. (2018). Enterobacteria associated with houseflies (*Musca domestica*) as an infection risk indicator in swine production farms. *Acta Tropica*, 185, 13 – 17. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.04.024>.
- García-Cruz, J. C., Huelgas-Méndez, D., Jiménez-Zúñiga, J. S., Rebollar-Juárez, X., Hernández-Garnica, M., Fernández-Presas, A. M., Husain, F. M., Alenazy, R., Alqasmi, M., Albalawi, T., Alam, P., & García-Contreras, R. (2023). Myriad applications of bacteriophages beyond phage therapy. *PeerJ*, 11, e15272. <https://doi.org/10.7717/peerj.15272>
- H-E-B*. (s. f.). Pic Fly Ribbon. <https://www.heb.com/product-detail/pic-fly-ribbon/577196>
- Issa, R. (2019). *Musca domestica* acts as transport vector hosts. *Bulletin of the National Research Center*, 43(73). <https://doi.org/10.1186/s42269-019-0111-0>
- Junqueira, A. C. M., Ratan, A., Acerbi, E., Drautz-Moses, D. I., Premkrishnan, B. N. V., Costea, P. I., Linz, B., Purbojati, R. W., Paulo, D. F., Gaultier, N. E., Subramanian, P., Hasan, N. A., Colwell, R. R., Bork, P., Azeredo-Espin, A. M. L., Bryant, D. A. & Schuster, S. C. (2017). The microbiomes of blowflies and houseflies as bacterial

- transmission reservoirs. *Scientific Reports*, 7(16324). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16353-x>
- Khamesipour, F., Lankarani, K.B., Honarvar, B., & Kwenti, T. E. (2018). A systematic review of human pathogens carried by the housefly (*Musca domestica* L.). *BMC Public Health*, 18(1049). <https://doi.org/10.1186/s12889-018-5934-3>
- Kutter, E. (2009). Phage Host Range and Efficiency of Plating. En M. R. J. Clokie & A. M. Kropinski (Eds.), *Bacteriophages Methods and Protocols, Volume 1: Isolation, Characterization, and Interactions* (pp. 141–149). Humana Press. DOI 10.1007/978-1-60327-164-6.
- Labrie, S. J., Samson, J. E., & Moineau, S. (2010). Bacteriophage resistance mechanisms. *Nature Reviews Microbiology*, 8(5), 317–327. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2315>
- Ministerio de Agricultura y Ganadería & Consorcio TRACASA/NIPSA. (2014). *Cobertura y uso de la tierra, Sistemas productivos, Zonas homogéneas de cultivo*. http://metadatos.sigtierras.gob.ec/pdf/Memoria_tecnica_Coberturas_LATACUNGA_20150306.pdf
- Naydich, D., Neupane, S., Pickens, V., Purvis, T., & Olds, C. (2023). House Flies Are Underappreciated Yet Important Reservoirs and Vectors of Microbial Threats to Animal and Human Health. *Microorganisms*, 11(3), 583. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11030583>
- Niode, N. J., Mahono, C. K., Lolong, F. M., Matheos, M. P., Johnson Kepel, B., & Ekawati Tallei, T. (2022). A Review of the Antimicrobial Potential of *Musca domestica* as a Natural Approach with Promising Prospects to Countermeasure Antibiotic Resistance. *Veterinary Medicine International*, 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/9346791>.
- Sharma, S., Chatterjee, S., Datta, S., Prasad, R., Dubey, D., Prasad, R. K., & Vairale, M. G. (2016). Bacteriophages and its applications: an overview. *Folia Microbiologica*, 62(1), 17–55. doi:10.1007/s12223-016-0471-x
- Shope R. E. (1927). Bacteriophage isolated from the common house fly (*Musca domestica*). *The Journal of experimental medicine*, 45(6), 1037–1044. <https://doi.org/10.1084/jem.45.6.1037>
- Summers W. C. (2017). Félix Hubert d'Herelle (1873-1949): History of a scientific mind. *Bacteriophage*, 6(4), e1270090. <https://doi.org/10.1080/21597081.2016.1270090>
- Tang, K. W. K., Millar, B. C., & Moore, J. E. (2023). Antimicrobial Resistance (AMR). *British journal of biomedical science*, 80, 11387. <https://doi.org/10.3389/bjbs.2023.11387>
- Zhang, X., Wang, S., Li, T., Zhang, Q., Zhang, R., & Zhang, Z. (2021). Bacteriophage: A Useful Tool for Studying Gut Bacteria Function of Housefly Larvae, *Musca domestica*. *Microbiology Spectrum*, 9(1), e0059921. <https://doi.org/10.1128/spectrum.00599-21>

ANEXOS

Anexo 1. Sitios de colectas entomológicas.

Ubicación	Descripción	Código de muestra
Cantón Latacunga	Parroquia rural, a 2 kilómetros de distancia de una avícola	Rural 1
		Rural 2
Distrito Metropolitano de Quito	Mercados y tiendas de venta de carnes expuestas sin refrigeración	Urbano 1
		Urbano 2
	Almacén agrícola con venta de aves de corral	Urbano 3

Anexo 2. Composición de los medios de enriquecimiento de bacteriófagos.

<i>Phage Growth Medium</i>	
KH ₂ PO ₄	1.5 g/L
Na ₂ HPO ₄	3.0 g/L
NH ₄ Cl	1.0 g/L
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.2 g/L
Agua peptonada (fuente de triptófano)	0.01 g/L
Glicerol	10 g/L
Caseína hidrolizada	5 g/L
Gelatina	0.02 g/L
Tween - 80	0.2 g/L
<i>Phage Lysing Medium</i>	
<i>Phage Growth Medium</i>	1 L
NaCN	0.98 g/L *

*Corresponde a una molaridad de 0.02 M