

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**Propagación de un coctel de fagos líticos para *Salmonella enterica*
con aplicación en un galpón de una granja avícola**

Heydi Liliana Tonguino Chasipanta

Ingeniería en Biotecnología

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

Quito, 21 de diciembre de 2020

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA

**Propagación de un coctel de fagos líticos para *Salmonella enterica* con
aplicación en un galpón de una granja avícola**

Heydi Liliana Tonguino Chasipanta

Nombre del profesor, Título académico

Sonia Zapata, PhD.

Quito, 21 de diciembre de 2020

© 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: Heydi Liliana Tonguino Chasipanta

Código: 00131506

Cédula de identidad: 172589012-1

Lugar y fecha: Quito, 21 de diciembre de 2020

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UNPUBLISHED DOCUMENT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>.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por guiarme en este camino. A mi familia, especialmente a mis padres: Roque y Norma por todo el amor, apoyo y esfuerzo que han hecho de mí la persona que soy ahora, por ayudarme a cumplir todas mis metas y sueños. A mi hermana: Milena por acompañarme, inspirarme, ser mi sustento y siempre darme ánimos con todo el amor del mundo. A mis abuelos: Angelita, Antonio y Mercedes por todo el cariño y cuidados hacía mí. A mis bisabuelos: Laura y Antonio por las bendiciones y detalles cada día; y a mi tía: Carolina por el constante afecto y ayuda para mi crecimiento personal y profesional.

A mis mentoras, Sonia Zapata y Teresa Guerrero quienes con su apoyo y contribución permitieron la culminación de mi proyecto de titulación. Gracias Teresita por compartirme todos sus conocimientos por siempre estar dispuesta a ayudarme, apoyarme y enseñarme con paciencia. Gracias Soñita por guiarme en la realización de este proyecto, por los conocimientos impartidos y la paciencia al enseñarme. Mi cariño, respeto y gratitud hacia ustedes es infinita.

Al Instituto de Microbiología de la Universidad San Francisco de Quito, al Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales por brindarme todas las herramientas para poder aprender y culminar con mis estudios; por ser mi segundo hogar.

Finalmente, a mis amigos: Kevin, Camila, Silene y Gislayne quienes formaron parte de este arduo camino y porque siempre encontré apoyo en ustedes. Adrián quien con su inmenso cariño, paciencia y aliento supo apoyarme, acompañarme durante todo este trayecto y me ayudo a cumplir mis sueños y metas.

RESUMEN

Salmonella enterica tiene como principal reservorio a las aves de corral y la presencia de este patógeno en alimentos derivados de animales de crianza ha hecho que se use de manera indiscriminada antibióticos, provocando el aumento de la resistencia a antimicrobianos. Una alternativa para el control de *Salmonella* es el uso de bacteriófagos (virus que infectan específicamente bacterias), en la industria avícola y alimentaria. El objetivo de este estudio fue propagar un coctel de bacteriófagos con máxima actividad lítica para *Salmonella entérica*. Los bacteriófagos fueron aislados del Río Machángara. Para esto, se evaluó la actividad lítica de 10 cocteles y el que mostró mayor lisis bacteriana fue propagado a un volumen final de 2000 mL y presentó un título viral de 5×10^7 UFP/mL. Este coctel se diluyó a un título final de 10^4 UFP/mL para ser aplicado en un galpón de pollos mediante dos vías de administración (oral y aspersión). La ausencia de *Salmonella* en los ciegos de los pollos que recibieron el tratamiento demostró 100% de efectividad de la fagoterapia.

Palabras claves: *Salmonella*, fagos líticos, propagación, título viral, fago terapia.

ABSTRACT

Salmonella enterica has poultry as its main reservoir and the presence of this pathogen in food derived from farm animals has driven the indiscriminate use of antibiotics, provoking the increase in antimicrobial resistance. An alternative for *Salmonella* control is the use of bacteriophages (viruses that infect specifically bacteria) in the food and poultry industries. The aim of this study was to propagate a bacteriophage cocktail with maximum lytic activity for *Salmonella enterica*. The bacteriophages were isolated from the Machángara river. For this, we evaluated the lytic activity of 10 cocktails and one that showed the most bacterial lysis was propagated in a final volume of 2000 mL and presented a viral titer of 5×10^7 PFU/mL. This cocktail was diluted to a final titer of 10^4 PFU/mL to be administered in a chicken shed by to different ways (oral and aspersion). The absence of *Salmonella* in the chicken's ceca that received the treatment demonstrated a phage therapy of 100% effectivity.

Keywords: *Salmonella*, lytic phages, spread, viral titer, phage therapy.

TABLA DE CONTENIDOS

INTRODUCCIÓN	11
MÉTODOS	15
Cepas de <i>Salmonella enterica</i>	15
Fagos líticos para <i>S. enterica</i>	15
Revitalización de cepas de <i>Salmonella enterica</i>	15
Ensayo de actividad lítica, técnica <i>spot test</i>	15
Propagación del coctel de fagos líticos	16
Evaluación del título del coctel de fagos.....	17
Aplicación de fagos en un galpón de una granja avícola	18
RESULTADOS.....	19
DISCUSIÓN	20
CONCLUSIONES	25
TABLAS	26
FIGURAS	28
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30
ANEXOS	35
ANEXO A. CRONOGRAMA PROPAGACIÓN DE COCTEL M-U4117H7.	35
ANEXO B. SPOT TEST VOLÚMENES PARCIALES DE PROPAGACIÓN COCTEL M-U4117H7.	36
ANEXO C. SPOT TEST EVALUACIÓN LÍTICA COCTELES.	37
ANEXO D. EQUIPO DE FILTRACIÓN	38

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Composición medio DSPB	26
Tabla 2 Spot test de cócteles frente a cepas de <i>Salmonella enterica</i>	26
Tabla 3 Ensayo doble capa de 2000 mL coctel M-U4117H7	27
Tabla 4 Título viral del coctel propagado M-U4117H7	27
Tabla 5 Aplicación de fagos en granja avícola	27

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama Spot test grupo de 10 cócteles frente a <i>Salmonella entérica</i>	28
Figura 2. Escala de calificación actividad lítica para cocteles de fagos (Huang, et. al., 2018)	28
Figura 3 Diagrama Doble capa coctel propagado M-U4117H7	29

INTRODUCCIÓN

Salmonella enterica es un bacilo flagelado Gram negativo, que se divide en 6 subespecies: *S. enterica sub. enterica*, *S. enterica sub. arizonae*, *S. enterica sub. salamae*, *S. enterica sub. houtenae*, *S. enterica sub. diarizonae*, *S. enterica sub. indica* y se ha descrito más de 2600 serotipos (Grimont & Weill, 2007). *S. enterica* es un microorganismo patógeno zoonótico que provoca enfermedades de transmisión alimentaria o ETAs en el ser humano (Flores, 2017). Su virulencia, resistencia, prevalencia y capacidad infectiva le han hecho el centro de interés de varias investigaciones (Lamas et al., 2018). *S. enterica* infecta el tracto intestinal principalmente de animales de sangre caliente y humanos, y hay serotipos que pueden infectar a ciertos animales de manera asintomática, convirtiéndolos en reservorio; este es el caso de animales destinados al consumo humano como gallinas, pollos, patos, entre otros (Lamas et al., 2018).

Las aves de corral son una de las principales y más importantes fuentes de propagación de *Salmonella enterica*; y por lo general se encuentra altas prevalencias alrededor de un 15.9% en galpones de granjas avícolas de pollos de engorde en la provincia de Pichincha- Ecuador (Vinueza-Burgos et al., 2016; Wang et al., 2020). La carne de pollo, gallina, pato, derivados de estos como huevos, entre otros productos provenientes de granjas avícolas, se han asociado frecuentemente con brotes de gastroenteritis por salmonelosis, que, aunque generalmente es autolimitada, podría presentar cuadros severos (Lamas et al., 2018).

En aves, la transmisión de *Salmonella enterica* se puede dar de manera horizontal o vertical. La transmisión vertical se da por medio de la infección transovárica, cuando el ave de corral se encuentra infectada y transmite la infección al huevo. Por otro lado, la transmisión horizontal da por medio de aerógenos y contaminación fecal-oral ya sea en agua, alimentos o también por contacto directo con animales infectados, en el caso de las personas que trabajan en granjas avícolas (Wibisono et al., 2020).

La presencia de *S. enterica* en animales de crianza y la contaminación de los alimentos derivados de estos ha llevado a la utilización indiscriminada de antibióticos en el sector ganadero, avícola, acuícola, etc. para poder precautelar la salud de los consumidores (Wang et al., 2020). Sin embargo, esto ha causado el incremento de la resistencia a antibióticos habiéndose reportados inclusive aislados MDR (Multirresistentes) de *S. enterica* así como, resistencia a un amplio rango de antibióticos como penicilina, fluoroquinolonas, cefalosporinas, sulfonamidas, aminoglucósidos y tetraciclinas (Jajere, 2019; Quiroz et al., 2016).

Los antibióticos son usados como método de crianza intensiva de ganado, aves de corral, peces, etc. a su vez se aplican con fines terapéuticos para la prevención y el tratamiento de enfermedades causadas por bacterias (Jajere, 2019). Asimismo, como promotores de crecimiento para efectivizar el tiempo de desarrollo de estos animales (Wibisono et al., 2020).

Una alternativa para el tratamiento de microorganismos resistentes a antimicrobianos es el uso de bacteriófagos, que son virus que infectan específicamente a bacterias (D. I. Kurtböke, 2012). Se los encuentra ampliamente distribuidos en la biosfera, por lo que se los considera las entidades más abundantes dentro de la Tierra (Fons, 2011).

Los fagos se clasifican dependiendo el tipo de infección que realicen, lítica o lisogénica (D. I. Kurtböke, 2012). En la infección lítica el fago inserta su material genético en la bacteria y utiliza el material celular de la hospedadora para poder replicarse y producir viriones que al ser liberados provocan lisis celular de la bacteria hospedadora (Fons, 2011). Por otro lado, en el ciclo lisogénico el material genético que inserta el fago en la célula se integra al genoma bacteriano, por lo que las siguientes generaciones heredarán el ADN bacteriano en el cual se encuentra integrado el genoma viral (D. I. Kurtböke, 2012).

Las propiedades antimicrobianas, capacidad lítica, rango específico de hospedador, distribución ubicua hace de los fagos candidatos seguros para tratar bacterias multirresistentes (Moye et al., 2018). Por lo que se los ha utilizado como controles biológicos para inhibir el crecimiento de microorganismos como *Salmonella* (Chen et al., 2018). Esto con el fin de mejorar la seguridad de los alimentos y prevenir infecciones futuras (Dallal et al., 2019). Se ha demostrado la eficacia del uso de bacteriófagos para tratar infecciones bacterianas en animales (Flores, 2017).

Siendo una alternativa para el tratamiento e inhibición de *S. enterica* se plantea el uso de bacteriófagos dentro de la industria avícola y alimentaria (Quiroz et al., 2016). Se ha caracterizado la actividad lítica de varios fagos contra *S. enterica* mostrando una disminución de los contajes de esta bacteria en superficies o directamente en alimentos (Kosznik-Kwaśnicka et al., 2020). Los bacteriófagos para *S. enterica* caracterizados pertenecen al orden de Caudovirales, familias *Siphoviridae*, *Myoviridae* y *Podoviridae* (Moreno Switt et al., 2015). La gran mayoría de bacteriófagos se restringen a cepas y serovares específicos, por lo que la aplicación de mezclas de fagos con capacidad lítica es necesaria para un ampliar el rango de hospedadores (Kosznik-Kwaśnicka et al., 2020).

Actualmente existen fagos y cocteles de fagos para *Salmonella enterica* que han sido ya comercializados. Este es el caso de SalmoFreshTM un coctel de fagos diseñado para su aplicación en alimentos contaminados por *Salmonella*, como carne de pollo. Este producto contiene 6 fagos líticos para varios serovares de *Salmonella* entre los que se encuentran Enteritidis, Hadar, Typhimurium, Infantis, Heidelberg, Newport y Agona (Intralytix, n.d.). Otro producto comercial que contiene fagos de *Salmonella* es SalmonexTM usado como biocontrol en carne y vegetales (Sailema & Calero, 2020).

En Ecuador se conoce poco sobre proyectos relacionados con fagoterapia. Sin embargo, con los años esto se ha incrementado y se ha llevado a cabo proyectos de aislamiento de bacteriófagos para industrias avícolas, esto por la creciente demanda de consumo de carne de pollo. En 2016, se reporta un estudio llevado a cabo en la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE donde se aislaron cocteles de fagos líticos para *S. enterica* provenientes de plantas de procesamiento de aves de corral en Ecuador el cual demostró ser un tratamiento eficaz para la disminución del crecimiento de *S. enterica* (Quiroz et al., 2016).

Por otro lado, en la Universidad Técnica de Ambato se asilaron 26 fagos para *Salmonella* a partir de aguas residuales de ríos de las provincias de Tungurahua y Cotopaxi los cuales demostraron actividad lítica para 5 serovares de *Salmonella*: Enteritidis, Infantis, Kentucky, Typhimurium y Pullorum (Sailema & Calero, 2020).

Con estos antecedentes, el objetivo de este estudio fue propagar un coctel de bacteriófagos aislados del Río Machángara, con máxima actividad lítica frente *S. enterica* y la aplicación en un galpón de pollos en una granja avícola.

MÉTODOS

Cepas de *Salmonella enterica*

Se emplearon 10 cepas de *Salmonella enterica* (U3859H9, U4117H7, U4132H2, U4135H6, U4232R1, U4234R2, U4236R3, U4239R4, U4279H3, U4283H8) aisladas del entorno de granjas avícolas.

Fagos líticos para *S. enterica*

Los cocteles de fagos fueron previamente aislados en el Instituto de Microbiología de la Universidad San Francisco de Quito. Se evaluó la actividad lítica de 10 cocteles de bacteriófagos (M-U3859H9, M-U4117H7, M-U4132H2, M-U4135H6, M-U4232R1, M-U4234R2, M-U4236R3, M-U4239R4, M-U4279H3, M-U4283H8) aislados a partir de agua del río Machángara.

Revitalización de cepas de *Salmonella enterica*

Las cepas de *S. enterica* utilizadas se encontraban congeladas en medio *skim milk* con 10% de glicerol a -80 °C. Para revitalizar cada cepa, se raspó suavemente con un hisopo estéril la superficie del cultivo congelado en el criovial, se agitó por 10 segundos el hisopo en 5 mL de medio de cultivo líquido TSB (Tryptic Soy Broth) y se incubó a 37 °C por 18 horas.

Ensayo de actividad lítica, técnica *spot test*

En la base de cajas Petri con Agar Nutritivo suplementado con 0.2% de MgCl₂ se dibujó una cuadrícula con 12 espacios, para 10 cocteles, 1 control positivo y un control negativo (Figura 1). De cada cultivo se tomó un inóculo con un hisopo estéril y se sembró “en césped” sobre la superficie del medio Agar Nutritivo con MgCl₂. Luego, en cada espacio se colocó 2 µL de cada coctel de bacteriófagos (10 cocteles) y 2 µL del control positivo, que es un coctel cuya actividad lítica había sido probada previamente. En el último espacio no se colocó fagos, correspondiendo al control negativo. Se dejó que se adsorbiera por 30 minutos el *spot* de

bacteriófagos y se llevó a incubación (las cajas invertidas) durante 24 horas a 37 °C. Este procedimiento se repitió para cada una de las 10 cepas de *S. enterica*.

Para evaluar la actividad lítica de los cocteles de fagos se empleó una escala de puntuación (Huang et al., 2018) en la cual se asigna 4 a una zona de lisis completamente clara, 3 a una zona de lisis despejada, pero que presenta un fondo borroso, 2 cuando se presenta turbidez en la zona de lisis, 1 cuando se presentan pocas y pequeñas zonas de lisis individuales, y 0 cuando no se presenta una zona de lisis (Figura 2).

Propagación del coctel de fagos líticos

Se selecciono el coctel que mejor actividad lítica presentaba, que fue el coctel M-U4117H7 para enriquecer y propagar (aumentar el volumen y número de bacteriófago). Para esto, se utilizó el método de Benson (1980) para el enriquecimiento de fagos en el medio de cultivo DSPB (Decca Strength Phage Broth), cuya composición se presenta en la Tabla 1.

Se realizó la propagación a 2000 mL de coctel M-U4117H7, en cuatro días sucesivos, obteniéndose 10, 100, 1000 y 2000 mL de coctel en los días 1, 2, 3 y 4, respectivamente. Para la propagación se partió de 1mL de cóctel M-U4117H7 y se calculó los volúmenes necesarios de agua destilada, cultivo de *Salmonella enterica* U4117H7 y medio de cultivo DSPB para cada día de propagación hasta obtener el volumen final de 2000 mL de coctel, como se muestra en el anexo A. Se realizó el ensayo *spot test* a los volúmenes parciales del coctel para verificar su actividad lítica.

Al volumen final de 2000 mL se lo dividió en dos, en recipientes de 1000 mL y se llevó a centrifugación a 6000 rpm durante 30 minutos. Para cada volumen de 1000 mL se aplicó un tipo de filtración: al uno filtración simple y al otro, doble. La primera se llevó acabo por medio de una membrana Milipore Merck con un poro de 0.45 µm, y en la segunda se utilizó una

membrana Milipore Merck con un poro de 0.45 μm en la primera filtración y una membrana con un poro de 0.22 μm en la segunda.

Evaluación del título del coctel de fagos

Para determinar el título de los cocteles se realizó el ensayo de doble capa, para lo que se preparó agar nutritivo sólido (1.5% agar) y semisólido (0.7% agar) suplementados con 0.2% de MgCl_2 . En la base de las cajas Petri se dibujó una cuadrícula y al medio semisólido se mantuvo en baño maría a 50 °C para conservarlo en forma líquida.

El primer paso para el ensayo fue la preparación de diluciones seriadas del coctel M-U4117H7 (10^{-1} a 10^{-8}), para lo cual se tomó 10 μL de coctel original y se mezcló con 90 μL de agua destilada estéril (dilución 10^{-1}), luego, 10 μL de esta se mezcló con 90 μL de agua y así sucesivamente hasta la dilución 10^{-8} ; se utilizó un vórtex para homogeneizar las diluciones.

A 4 mL del medio semisólido se añadió 200 μL de cultivo de *Salmonella enterica* U4117H7, se agitó cuidadosamente, se vertió esta mezcla sobre el medio sólido y se dejó solidificar. Una vez solidificado se añadió 2 μL de cada una de las 8 diluciones del coctel M-U4117H7 sobre el cultivo en doble capa, se dejó en reposo para su absorción durante 1 hora a temperatura ambiente (22 °C) y se incubó a 37 °C durante 24 horas.

Para el cálculo del título del coctel de fagos se tomó en cuenta la última dilución en la cual se observó lisis celular, y se empleó la fórmula:

$$\frac{UFP}{\text{mL}} = \frac{\# \text{ Calvas}}{\text{Volumen inoculado} \times \text{Dilución(última donde hubo lisis)}}$$

Para lo cual se contabiliza el número de calvas (zonas de lisis) presentes, a este número se lo divide al producto del volumen inoculado en mL por la última dilución en la cual se presentó lisis celular. Con lo que se obtiene el número de Unidades formadoras de placa por mililitro.

Aplicación de fagos en un galpón de una granja avícola

La aplicación de fagos se realizó en un galpón de pollos de una granja. Las vías de aplicación fueron: por vía oral con la administración del coctel de fagos en el agua de bebida de los pollos y por aspersión en el galpón por medio de una bomba manual en la cual se encontraba el coctel de fagos diluido en agua. El día 1 se realizaron dos aplicaciones una por vía oral y otra por aspersión. Los días 2 y 3 los fagos fueron aplicados por aspersión. Para las dos aplicaciones el coctel fue diluido en agua previo a la administración en pollos.

Para evaluar la efectividad del coctel de fagos se realizó un muestreo e investigación de *Salmonella* antes y después de la aplicación de bacteriófagos. El muestreo previo a la aplicación fue tomada mediante zapatones, técnica de muestreo ambiental en donde se utiliza calzas. Estos son recubrimientos estériles de material absorbente que se coloca en las botas del operador y toma muestras mientras se camina por el galpón de pollos de 29 días de edad. Por otro lado, el muestreo posterior a la aplicación de los fagos se realizó en los ciegos de 25 pollos de 41 días de edad luego del faenamiento.

RESULTADOS

Los resultados del Spot test para los 10 cócteles de fagos mostraron que, el único cóctel que presentó lisis completa fue M-U4117H7 el cual provenía del Río Machángara y la cepa propagadora fue aislada de una granja avícola. El cual mostró una clasificación de 4 en la escala de evaluación lítica utilizada en este trabajo (Tabla 2).

Durante el proceso de propagación se obtuvo volúmenes parciales de 10, 100, 1000 y 2000 mL en todos ellos se observó la presencia de lisis completa y se asignó una calificación de 4 en la escala de actividad lítica, ninguno de ellos mostró contaminación (Anexo B).

En el ensayo doble capa se obtuvo lisis bacteriana hasta la dilución 10^{-4} tanto para la filtración doble como simple como se muestra en la Tabla 3. Con este dato se pudo calcular el título viral del coctel propagado el cual fue de 5×10^7 unidades formadoras de placa por mililitro (UFP/mL) (Tabla 4).

El título final administrado a los pollos tanto por vía oral y aspersion fue de 10^4 unidades formadoras de placa por mililitro (UFP/mL), esto debido a que los 2 litros de coctel propagado fueron diluidos en 2000 litros de agua para la administración en el galpón por vía oral y aspersion.

Como resultado de la aplicación del coctel M-U4117H7 en una granja avícola se observó la eliminación total de *Salmonella* spp., puesto que en el muestreo inicial el análisis dio resultado positivo para *S. enterica*, mientras que 25 muestras de ciegos de pollos faenados fueron negativas luego de la aplicación del coctel con actividad lítica (Tabla 5).

DISCUSIÓN

En el presente estudio se evaluó el ensayo spot test para determinar la actividad lítica de 10 cocteles de fagos aislados del Río Machángara en Quito, provincia de Pichincha. Este ensayo fue adecuado para determinar la actividad lítica de los cocteles. Ya que mostró el coctel con máxima actividad lítica con una zona de lisis completamente clara. El spot test sirve para realizar una búsqueda o evaluación de las cepas sensibles a un determinado grupo de bacteriófagos se las utiliza para determinar el rango de hospedadores. La ventaja que presenta esta técnica es que se trata de un ensayo rápido con el cual se obtiene información de la sensibilidad que las cepas bacterianas poseen (Tomat, 2013).

Con el fin de obtener un alto porcentaje de infección de la bacteria *target* para que el tratamiento con fagos sea eficaz se necesita un elevado título viral (Borie et al., 2005). Según la bibliografía, un buen título para un coctel de fagos contra *S. enterica* está dentro de un rango de 10^6 - 10^{10} UFP/mL. Con el protocolo empleado en este estudio se obtuvo un título de 5×10^7 UFP/mL, lo cual constituye un buen título para ser empleado en el control del *Salmonella* en la crianza de pollos (Sklar & Joerger, 2001; Fiorentin et al., 2010; Bardina et al., 2011; Spricigo, 2012).

En comparación con otros estudios de asilamiento de fagos de *Salmonella* llevados a cabo en Ecuador, el título de fagos obtenido se encuentra en el rango requerido para la aplicación en aves de corral, y específicamente dentro del país se ha encontrado títulos de fagos elevados en un rango de 10^7 - 10^9 UFP/mL (Quiroz et al., 2016; Sailema & Calero, 2020). La importancia de obtener un título elevado de fagos es lograr una reducción máxima de *Salmonella*, ya que se debe mantener una cantidad de bacteriófago constante en función de la bacteria hospedera (Sailema & Calero, 2020). Existen varios factores que hacen que un porcentaje de fagos no sean adsorbidos por las bacterias hospederas, lo que se conoce como una resistencia de adsorción, haciendo que se reduzca la interacción fago-bacteria

(Hyman & Abedon, 2010). Esto hace que el porcentaje de infección disminuya y por consiguiente la eficacia del tratamiento para la inhibición de *Salmonella* (Borie et al., 2005).

En la propagación del coctel se ensayó dos metodologías de filtración al volumen final obtenido (dos volúmenes de 1000 mL). A uno de los volúmenes se le aplicó una filtración simple y al otro, doble; la primera con una membrana de poro 0.45 μm y la segunda con la misma membrana de poro de 0.45 μm seguida por poro de 0.22 μm para prevenir contaminación bacteriana. Para el aislamiento de bacteriófagos de muestras ambientales como muestras de río por lo general se utiliza una membrana con un poro de 0.45 μm para la filtración (Atterbury et al., 2007; Rahaman et al., 2014). Sin embargo, otras investigaciones utilizan membranas con poros de 0.22 μm en una única filtración como es el caso del estudio de (Chen et al., 2018; Sailema & Calero, 2020). En el presente estudio se obtuvieron iguales resultados del título viral al aplicar la filtración simple y doble, confirmando que el uso de la membrana de 0.45 μm es suficiente para garantizar esterilidad bacteriana al filtrado.

El estudio de Quiroz (Quiroz et al., 2016) para el aislamiento de fagos a partir de aguas residuales de una planta de procesamiento de aves de corral lo realizaron con una filtración doble con una membrana poro de 0.45 μm seguida de una con 0.20 μm , una metodología similar se utilizó para el presente estudio realizado. Con el objetivo de reducir la contaminación bacteriana ya que, el propósito de las membranas es que únicamente se aislen los fagos que son las únicas entidades capaces de traspasar la membrana por el tamaño que poseen (Atterbury et al., 2007).

El enriquecimiento de bacteriófagos para su propagación se realizó con el protocolo tomado de Benson (1980) en el cual utiliza el medio DSPB (Decca Strength Phage Broth. Este, al igual que otros medios de enriquecimiento de fagos como lo es MSAs (Modified Scholten's Agar) es utilizado en muestras de agua, sedimentos y lodos; ambos comparten en su fórmula

ingredientes similares como la peptona y extracto de levadura, este último es una fuente de vitaminas y otros cofactores que promueven el crecimiento de *Salmonella* por ende de los fagos que la infectan (Pachón, 2009). Este protocolo fue adecuado para el enriquecimiento y propagación del coctel de fagos, pues se obtuvo un buen título viral de 5×10^7 UFP/mL.

El título del coctel que se utilizó para el tratamiento del galpón de pollos fue 10^4 UFP/mL el cual fue aplicado por vía oral y por aspersión, según la bibliografía este título se encuentra dentro del rango para el tratamiento efectivo de *Salmonella entérica* (Sklar & Joerger, 2001; Fiorentin et al., 2010; Bardina et al., 2011; Spricigo, 2012). Por lo que se demuestra en el resultado obtenido de eliminación de *Salmonella* en pollos de una granja avícola.

La principal vía de administración de fagos a los pollos en granjas avícolas es la vía oral (Fiorentin et al., 2010). Otra forma es por aspersión (Borie et al., 2005). En los dos casos es de vital importancia que la suspensión de fagos no se encuentre contaminada por agente microbianos externos como otras bacterias ya que podría alterar el resultado y la actividad lítica de los fagos administrados (Ardiles, 2009), por ello fue importante en este estudio definir el método de filtración que garantice la esterilidad bacteriológica de la suspensión. La eliminación de las bacterias con las cuales se propagaban los fagos es de importancia ya que restos celulares podrían provocar reacciones indeseadas como una reinfección en los pollos por *Salmonella* a los cuales se les está tratando y luego presenten una resistencia a los fagos administrados (García & López, 2002).

En el presente estudio se logró la eliminación de *Salmonella* de un galpón de pollos luego de la aplicación de un coctel de fagos, lo que evidencia la capacidad de estos como control biológico de microorganismos patógenos que pueden causar enfermedad como es el

caso de *Salmonella* (Atterbury et al., 2007; Bardina et al., 2011; Borie et al., 2005; Fiorentin et al., 2010; Henriques et al., 2013; Kosznik-Kwaśnicka et al., 2020).

Los fagos que podrían estar presentes posiblemente pertenecen al orden Caudovirales a las familias: *Myoviridae* cuya morfología se basa en una cola, *Siphoviridae* con una cola larga y contráctil y por último *Podoviridae* los cuales se representan con colas cortas (Moreno Switt et al., 2015; Flores, 2017). Ya que, el porcentaje de bacteriófagos caracterizados para la especie de *Salmonella enterica* corresponden al 24%, 62% y 14% respectivamente (Moreno Switt et al., 2015; Flores, 2017).

Para la identificación de fagos se utilizan dos metodologías una computacional y otra experimental. En el área experimental, es decir *in vitro*, se lo realiza mediante microcopia electrónica, cristalografía de rayos X, resonancia magnética nuclear, también mediante la caracterización fisicoquímica de estos (Orlova, 2012). Por otro lado, en cuanto a metodologías computacionales por la facilidad de secuenciar genomas se da la identificación de fagos usando datos de secuencias genómicas en varios programas o servidores web como Phage Finder o PHAST (Zhou et al., 2011).

El rango del hospedador se conoce como aquellas bacterias que un bacteriófago puede infectar de manera productiva (Hyman & Abedon, 2010). En este caso las 10 cepas de *Salmonella enterica* aisladas de granjas avícolas fueron utilizadas para evaluar el coctel con mejor actividad lítica, con lo que se obtuvo un amplio rango de hospedadores ya que el coctel M-U4117H7 tuvo un efecto lítico en todas las cepas de *Salmonella enterica* utilizadas en este estudio. Como muestran otros estudios relacionados los fagos que infectan *Salmonella* muestran tener un amplio rango de hospedadores incluyendo varios serotipos (Rahaman et al., 2014).

Al ser las entidades más abundantes del planeta, los fagos se encuentran ampliamente distribuidos en todos los ambientes posibles como: suelo, agua, mares, etc. (Rahaman et al., 2014). Gracias a esta característica se los puede aislar de varias fuentes naturales como: aguas residuales, granjas avícolas (Moreno Switt et al., 2015). Los cocteles de fagos con actividad lítica provienen del Río Machángara ubicado en la ciudad de Quito.

Este río presenta una gran contaminación debido a los efectos antropogénicos, ya que este cruza las zonas más pobladas de Quito y recibe grandes descargas de aguas residuales de origen doméstico e industrial (Campaña et al., 2017). Las aguas residuales se componen de un efluente líquido y sólido por lo que albergan grandes cantidades de microorganismos patógenos que incluyen protozoos, bacterias, helmintos y virus incluyendo a bacteriófagos (Campaña et al., 2017). La presencia de fagos en aguas residuales se explica con la abundancia que estos poseen ya que es de 10 a 20 veces mayor que la célula hospedadora (Gaviria et al., 2012). Por tanto, por la contaminación que presentan estas aguas hace que se encuentre una alta diversidad de especies bacterianas por consiguiente se encontrara una alta riqueza de fagos. Por lo que este tipo de efluentes es una fuente natural para poder aislar fagos de diferentes especies bacterianas debido a la contaminación que presenta (Gaviria et al., 2012).

El protocolo empleado fue adecuado y eficaz en la erradicación de *Salmonella* en un galpón de pollos. Estudios similares reportan una eliminación del 83-90% de *Salmonella enterica* (Atterbury et al., 2007). Las limitaciones se presentan en la realización de una única aplicación del coctel de fagos en un galón de pollos, lo que no puede asegurar la completa eliminación de este patógeno en granjas avícolas. Ya que se necesitaría más ensayos similares para poder asegurar la erradicación de este patógeno.

CONCLUSIONES

1. Se logró la erradicación de *Salmonella enterica* en un galpón de pollos de una granja avícola por medio de la administración por vía oral y aspersión de un coctel de fagos líticos con un título final de 10^4 UFP/mL.
2. No se encontró diferencia entre los cocteles sometidos a filtración simple y doble, por lo que se podría concluir que una sola filtración del coctel por el filtro de $0.45\ \mu\text{m}$ es suficiente para eliminar cualquier contaminación bacteriana.
3. El ensayo Spot test para evaluación lítica resultó ser un método efectivo y rápido para la determinación del coctel que producía mayor zona lítica lo que mostró de igual manera la sensibilidad de las cepas de *Salmonella* frente a los fagos.

TABLAS

Tabla 1 Composición medio DSPB. Decca Strength Phage Broth.

Peptona	100 gramos
Extracto de levadura	50 gramos
Fosfato (K₂HPO₄)	80 gramos
Agua destilada	1000 mL
pH	7.6

Tabla 2 Spot test de cócteles frente a cepas de *Salmonella enterica*. En la escala de calificación de actividad lítica del 1 al 4; 4 corresponde a lisis completa y 0 a ausencia de lisis.

Coctel	Origen	Código	Cepa propagadora	Spot test	Calificación
27	Río Machángara	M-U3859H9	U3859 H9	Lisis incompleta	3
28	Río Machángara	M-U4117H7	U4117 H7	Lisis completa	4
29	Río Machángara	M-U4132H2	U4132 H2	No lisis	0
30	Río Machángara	M-U4135 H6	U4135 H6	Lisis incompleta	1
31	Río Machángara	M-U4232R1	U4232 R1	Lisis incompleta	1
32	Río Machángara	M-U4234R2	U4234 R2	No lisis	0
33	Río Machángara	M-U4236R3	U4236 R3	No lisis	0
34	Río Machángara	M-U4239R4	U4239 R4	Lisis incompleta	2
35	Río Machángara	M-U4279H3	U4279 H3	Lisis incompleta	1
36	Río Machángara	M-U4283 H8	U4283 H8	Contaminado	0

Tabla 3 Ensayo doble capa de 2000 mL coctel M-U4117H7. Diluciones seriadas con filtraciones simple y doble, lisis completa hasta $1:10^4$

M-U4117H7 Dilución	Filtración Simple	Filtración Doble	Actividad lítica
1:10¹	Lisis completa	Lisis completa	4
1:10²	Lisis completa	Lisis completa	4
1:10³	Lisis completa	Lisis completa	4
1:10⁴	Lisis completa	Lisis completa	4
1:10⁵	No Lisis	No Lisis	0
1:10⁶	No Lisis	No Lisis	0
1:10⁷	No Lisis	No Lisis	0
1:10⁸	No Lisis	No Lisis	0

Tabla 4 Título viral del coctel propagado M-U4117H7. Ausencia de contaminación (-)

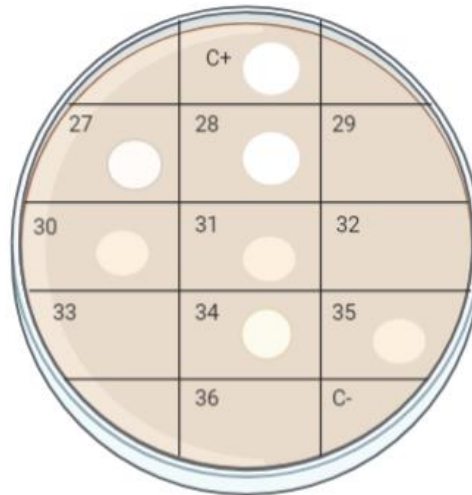
UFP/mL (Unidades formadores de placa sobre mililitro)

M-U4117H7	Título 1era medición (UFP/mL)	Título 2da medición (UFP/mL)	Contaminación
Filtración Simple	5×10^7	5×10^7	-
Filtración Doble	5×10^7	5×10^7	-

Tabla 5 Aplicación de fagos en granja avícola. Ausencia de *Salmonella spp.* (-), presencia de *Salmonella spp.* (+).

Tiempo de muestreo	Edad pollos (Días)	Tipo de muestra	Presencia de <i>Salmonella spp.</i>
Previo a la aplicación de fagos	29	Zapatones	Positiva
Posterior a la aplicación de fagos	41	Ciego (n=25)	Negativa

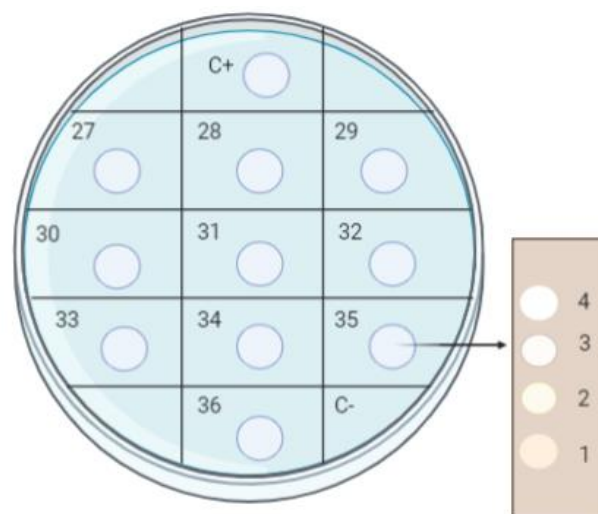
FIGURAS



Created with BioRender.com

Figura 1. Diagrama Spot test grupo de 10 cócteles frente a *Salmonella entérica*.

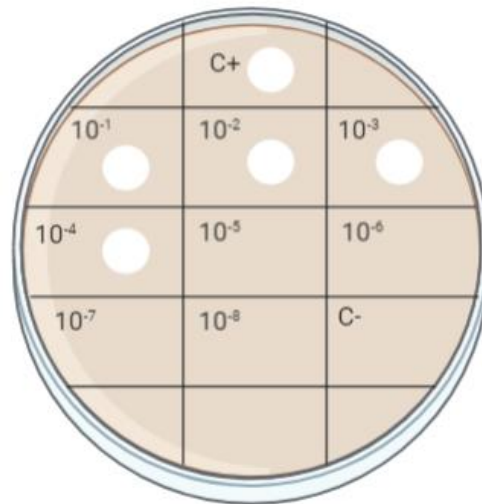
27-36 corresponde a los cócteles, M-115 es el control positivo y C- es el control negativo. Control positivo y cóctel 28 presentan lisis completa. Cóctel 27, 30, 31, 34, y 35 lisis parcial. Cóctel 29, 32, 33 lisis incompleta.



Created with BioRender.com

Figura 2. Escala de calificación actividad lítica para cócteles de fagos (Huang, y otros, 2018).

El número 4 representa a una zona de lisis completamente clara, 3 a una zona de lisis despejada, pero que presenta un fondo borroso, 2 cuando se presenta turbidez en la zona de lisis, 1 cuando se presentan pocas y pequeñas zonas de lisis individuales, y 0 cuando no se presenta una zona de lisis.



Created with BioRender.com

Figura 3 Diagrama Doble capa coctel propagado M-U4117H7.

Diluciones seriadas hasta 10^{-8} la última dilución que mostró lisis completa fue 10^{-4} .

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ardiles, J. Q. (2009). *FAGOTERAPIA PREVENTIVA COMO BIOCONTROL DE Salmonella Enteritidis EN GALLINAS DE POSTURA EXPERIMENTALMENTE INFECTADAS*.
- Atterbury, R. J., Van Bergen, M. A. P., Ortiz, F., Lovell, M. A., Harris, J. A., De Boer, A., Wagenaar, J. A., Allen, V. M., & Barrow, P. A. (2007). Bacteriophage therapy to reduce Salmonella colonization of broiler chickens. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(14), 4543–4549. <https://doi.org/10.1128/AEM.00049-07>
- Bardina, C., Spricigo, D., Cortes, P., & Llagostera, M. (2011). *Estudios sobre terapia fágica contra Tesis Doctoral*.
- Benson, Harold. (1980). Microbiological applications a laboratory manual in general microbiology, 3rd. Ed. Iowa: Wm. C. Brown Company Publishers.
- Borie, C., Zurita, P., Rojas, V., Santander, J., & Robeson, J. (2005). *Prevención de la infección por Salmonella enterica subespecie enterica serotipo Prevention of Salmonella enterica subespecie enterica serotype Enteritidis (Salmonella Enteritidis) infection in chickens using a bacteriophage. 201, 197–201.*
- Campaña, A., Gualoto, E., & Chiluisa-Utreras, V. (2017). Physic chemical and microbiological assessment of water quality in Machángara and Monjas rivers from Quito's metropolitan district | Evaluación físico-química y microbiológica de la calidad del agua de los ríos Machángara y Monjas de la red hídrica del di. *Revista Bionatura*, 2(2), 305–310.
- Chen, Y., Sun, E., Song, J., Tong, Y., & Wu, B. (2018). Downloaded from www.nrcresearchpress.com by TUFTS UNIV LIBRARY on 07/12/18 Can. In *J.*

Microbiol. Downloaded from www.nrcresearchpress.com by TUFTS UNIV LIBRARY.

www.nrcresearchpress.com

Fiorentin, L., Vieira, N. D., Jr, W. B., Fiorentin, L., Vieira, N. D., & Jr, W. B. (2010). *Oral treatment with bacteriophages reduces the concentration of Salmonella Enteritidis PT4 in caecal contents of broilers Oral treatment with bacteriophages reduces the concentration of Salmonella Enteritidis PT4 in caecal contents of broilers.* 9457.

<https://doi.org/10.1080/01445340500112157>

Flores, I. (2017). *UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS.*

García, E., & López, R. (2002). Los bacteriófagos y sus productos genicos como agentes antimicrobianos. *Revista Espanola de Quimioterapia*, 15(4), 306–312.

Gaviria, G. A., González, M. S., & Castaño, J. O. (2012). Técnica para aislamiento de bacteriófagos específicos para E.coli DH5 α a partir de aguas residuales. *Revista MVZ Cordoba*, 17(1), 2852–2860. <https://doi.org/10.21897/rmvz.253>

Henriques, A., Sereno, R., & Almeida, A. (2013). Reducing Salmonella horizontal transmission during egg incubation by phage therapy. *Foodborne Pathogens and Disease*, 10(8), 718–722. <https://doi.org/10.1089/fpd.2012.1363>

Huang, C., Virk, S. M., Shi, J., Zhou, Y., Willias, S. P., Morsy, M. K., Abdelnabby, H. E., Liu, J., Wang, X., & Li, J. (2018). Isolation, characterization, and application of Bacteriophage LPSE1 against Salmonella enterica in Ready to Eat (RTE) Foods. *Frontiers in Microbiology*, 9(MAY). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01046>

Hyman, P., & Abedon, S. T. (2010). Bacteriophage host range and bacterial resistance. In *Advances in applied microbiology* (1st ed., Vol. 70, Issue 10). Elsevier Inc.

[https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(10\)70007-1](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(10)70007-1)

Intralytix. (n.d.). *SalmoFresh*.

Jajere, S. M. (2019). A review of *Salmonella enterica* with particular focus on the pathogenicity and virulence factors, host specificity and adaptation and antimicrobial resistance including multidrug resistance. In *Veterinary World* (Vol. 12, Issue 4, pp. 504–521). Veterinary World. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2019.504-521>

Kosznik-Kwaśnicka, K., Ciemińska, K., Grabski, M., Grabowski, Ł., Górniak, M., Jurczak-Kurek, A., Węgrzyn, G., & Węgrzyn, A. (2020). Characteristics of a series of three bacteriophages infecting *salmonella enterica* strains. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(17), 1–26. <https://doi.org/10.3390/ijms21176152>

Moreno Switt, A. I., Sulakvelidze, A., Wiedmann, M., Kropinski, A. M., Wishart, D. S., Poppe, C., & Liang, Y. (2015). *Salmonella* phages and prophages: Genomics, taxonomy, and applied aspects. *Methods in Molecular Biology*, 1225, 237–287. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1625-2_15

Orlova, E. . (2012). *Bacteriophages and Their Structural Organisation*. INTECH Open Access Publisher.

Pachón, D. (2009). Aislamiento, identificación y serotipificación de enterobacterias del género *Salmonella* en una población de *Crocodylus intermedius* y testudinos mantenidos en cautiverio en la estación de biología tropical Roberto Franco E.B.T.R.B de la facultad de ciencia. *Universidad Nacional De Colombia En Villavicencio – Meta*, 198, 115. <https://javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis198.pdf>

Quiroz, E., Recalde, J., Arias, M. T., Seqqat, R., Vinueza, C., & Ayala, L. (2016). Isolation of lytic bacteriophages for Nanobiocontrol of pathogenic and antibiotic resistant

Salmonella present in poultry in Ecuador. *Biology and Medicine*, 8(3).

<https://doi.org/10.4172/0974-8369.1000287>

Rahaman, M. T., Rahman, M., Rahman, M. B., Khan, M. F. R., Hossen, M. L., & Ahmed, S.

(2014). POULTRY SALMONELLA SPECIFIC BACTERIOPHAGE ISOLATION AND CHARACTERIZATION. In *Vet. Med* (Vol. 12, Issue 2). Online.

Sailema, V., & Calero, W. (2020). *Evaluación de la presencia de determinantes de resistencia a antibióticos emergentes en aguas de riego y superficiales del Ecuador, años 2018-2019*. 21(1), 1–9.

Sklar, I. B., & Joerger, R. D. (2001). Attempts to utilize bacteriophage to combat salmonella enterica serovar enteritidis infection in chickens. *Journal of Food Safety*, 21(1), 15–29.

<https://doi.org/10.1111/j.1745-4565.2001.tb00305.x>

Spricigo, D. (2012). *La Desinfección basada en bacteriófagos como herramienta de biocontrol de Salmonella en alimentos*. 181. <https://ddd.uab.cat/record/101072>

Tomat, D. (2013). "Desarrollo de un cóctel de fagos para el biocontrol de virotipos de *Escherichia coli* en la industria alimenticia regional" (Issue 3).

Vinueza-Burgos, C., Cevallos, M., Ron-Garrido, L., Bertrand, S., & De Zutter, L. (2016).

Prevalence and diversity of Salmonella serotypes in ecuadorian broilers at slaughter age.

PLoS ONE, 11(7), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159567>

Wang, J., Li, J., Liu, F., Cheng, Y., & Su, J. (2020). Characterization of Salmonella enterica isolates from diseased poultry in northern China between 2014 and 2018. *Pathogens*,

9(2). <https://doi.org/10.3390/pathogens9020095>

Zhou, Y., Liang, Y., Lynch, K. H., Dennis, J. J., & Wishart, D. S. (2011). PHAST: A Fast Phage Search Tool. *Nucleic Acids Research*, 39(SUPPL. 2), 347–352.

<https://doi.org/10.1093/nar/gkr485>

ANEXOS

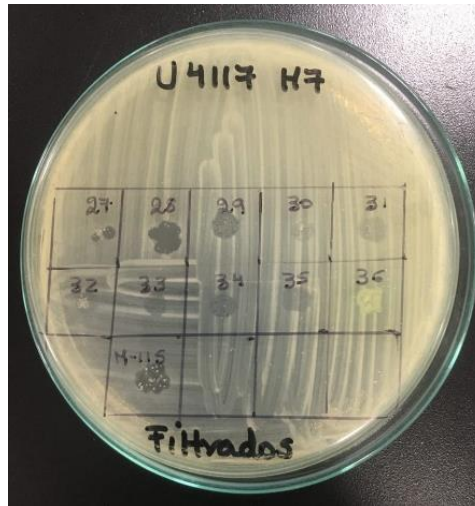
ANEXO A. CRONOGRAMA PROPAGACIÓN DE COCTEL M-U4117H7.

Día 1	Día 2	Día 3	Día 4
Enriquecimiento a partir 1mL cóctel	Enriquecimiento a partir 10mL cóctel	Enriquecimiento a partir 100mL cóctel	2do Enriquecimiento a partir 100mL cóctel
1mL cóctel	10mL cóctel	100mL cóctel	100mL cóctel
8mL agua destilada	80mL agua destilada	800mL agua destilada	800mL agua destilada
1mL cultivo*	10mL cultivo*	100mL cultivo*	100mL cultivo*
1mL DSPB	10mL DSPB	100mL DSPB	100mL DSPB
Volumen de coctel obtenido			
10mL	100mL	1000mL	2000mL

* *Salmonella enterica*

ANEXO B. SPOT TEST VOLÚMENES PARCIALES DE PROPAGACIÓN COCTEL**M-U4117H7.**

Volumen propagado (mL)	Spot test	Calificación
10	Lisis completa	4
100	Lisis completa	4
1000	Lisis completa	4
2000	Lisis completa	4

ANEXO C. SPOT TEST EVALUACIÓN LÍTICA COCTELES.

ANEXO D. EQUIPO DE FILTRACIÓN.