



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Ciencias Biológicas

Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología

**Aislamiento y caracterización de bacteriófagos líticos
aislados de intestino de pollos y específicos de
Salmonella Infantis multidrogo-resistente**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Bióloga Microbióloga
Parasitóloga

AUTOR

Arlene Yamilet CUYUTUPA GUILLEN

ASESORES

Dr. Enrique MAMANI ZAPANA

Renzo Jonás PUNIL LUCIANO (coasesor)

Lima, Perú

2022



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Cuyutupa, A. (2022). *Aislamiento y caracterización de bacteriófagos líticos aislados de intestino de pollos y específicos de Salmonella Infantis multidrogo-resistente*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	Arlene Yamilet Cuyutupa Guillen
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	71997708
URL de ORCID	No aplica
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Enrique Walter Mamani Zapana
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	02414092
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0003-4127-1248
Datos de coasesor	
Nombres y apellidos	Renzo Jonás Punil Luciano
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	47987380
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0002-5881-0765
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	Miguel Angel Francisco Talledo Rivera
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	25625144
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	Priscila Rosse Mamani Zapana

Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	43058540
Miembro del jurado 2	
Nombres y apellidos	Augusto Fernando De la Cruz Calvo
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	10661898
Datos de investigación	
Línea de investigación	A.1.3.1. Salud Pública
Grupo de investigación	No aplica
Agencia de financiamiento	Sin financiamiento
Ubicación geográfica de la investigación	Edificio: Facultad de Ciencias Biológicas – Universidad Nacional Mayor de San Marcos País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Distrito: Cercado de Lima Latitud: -12.05900313440289 Longitud: -77.0823852901887
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2021
URL de disciplinas OCDE	Virología https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.02



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
(Universidad del Perú, Decana de América)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGA
MICROBIÓLOGA PARASITÓLOGA**

(MODALIDAD: SUSTENTACIÓN VIRTUAL DE TESIS)

Siendo a las 13:05 horas del 19 de agosto del 2022, en el Salón de Grados Virtual de la Facultad de Ciencias Biológicas cuya dirección electrónica fue <https://meet.google.com/inf-ugyf-vvg>, y en presencia del jurado formado por los profesores que suscriben, se dio inicio a la sesión para optar al **Título Profesional Bióloga Microbióloga Parasitóloga** de **ARLENE YAMILET CUYUTUPA GUILLEN**.

Luego de dar lectura y conformidad al expediente N° **UNMSM-20220003124**, la titulando expuso su tesis: **“AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIÓFAGOS LÍTICOS AISLADOS DE INTESTINO DE POLLOS Y ESPECÍFICOS DE *Salmonella* Infantis MULTIDROGO-RESISTENTE”**, y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota **19** calificado: **Aprobado con máximos honores**.

Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología, y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el **Título Profesional Bióloga Microbióloga Parasitóloga** de **ARLENE YAMILET CUYUTUPA GUILLEN** y se eleva lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo título conforme a ley.

Siendo las 14:40 horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 19 de agosto de 2022.

Mg. MIGUEL TALLEDO RIVERA
(PRESIDENTE)

Dr. ENRIQUE MAMANI ZAPANA
(ASESOR)

Mg. PRISCILA MAMANI ZAPANA
(MIEMBRO)

Blgo. AUGUSTO DE LA CRUZ CALVO
(MIEMBRO)



INFORME DE EVALUACIÓN DE ORIGINALIDAD

DIRECTOR E.P DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA	: Ph.D. Pedro Luis Castellanos Sánchez
OPERADOR DEL PROGRAMA INFORMÁTICO DE SIMILITUDES	: Dra. Liz Erika Cruz Pio
DOCUMENTO EVALUADO *	: "AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIOFAGOS LÍTICOS AISLADOS DE INTESTINO DE POLLOS Y ESPECÍFICOS DE <i>Salmonella Infantis</i> MULTIDROGO-RESISTENTE"
AUTOR (A) DEL DOCUMENTO **	: Bach. ARLENE YAMILET CUYUTUPA GUILLEN
FECHA DE RECEPCIÓN	: 28/04/22
FECHA APLICACIÓN DEL SISTEMA INFORMÁTICO	: 28/04/22
SOFTWARE UTILIZADO	: TURNITIN (X) ITHENTICATE () OTRO (especificar)
CONFIGURACIÓN DEL PROGRAMA DETECTOR DE SIMILITUDES	: Excluye textos encomillados (x) : Excluye bibliografía (x) : Excluye cadenas menores a 40 palabras (x) : Otro criterio (especificar)
PORCENTAJE DE SIMILITUDES ***	: Siete por ciento (7%)
FUENTES ORIGINALES DE LAS SIMILITUDES ENCONTRADAS	: www.hdl.handle.net (4%) www.cybertesis.unmsm.edu.pe (2%) www.scielo.cl (1%) Colom Comas, Joan, Universitat Autònoma de Barcelona. Departament de Genètica i de Microbiologia. "Studies of the molecular features of three Salmonella phages for use in phage therapy and of encapsulation methodologies to improve oral phage administration", [Bellaterra] : Universitat Autònoma de Barcelona,, 2016 (<1%) www.doi.org (<1%) www.ul.qucosa.de (<1%)
OBSERVACIONES: Segunda vez que se pasa por el programa.	
CALIFICACIÓN DE ORIGINALIDAD	- Documento cumple criterio de originalidad sin observaciones (X) - Documento cumple criterio de originalidad con observaciones () - Documento no cumple criterios de originalidad ()

Ciudad universitaria, 28 de abril del 2022

Dra. Liz Erika Cruz Pio
Evaluador

Ph.D. Pedro Luis Castellanos Sánchez
Director EPMP

DEDICATORIA

En memoria a mi hermanita Jocelyne, porque este logro también es suyo.

A mis padres, Lourdes Guillén Vivanco y Antonio Cuyutupa Capcha, por su amor incondicional. Sin ellos no lo hubiera logrado.

A mis hermanos Jorge y Joel.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme salud, por darme unos padres y hermanos maravillosos y por ponerme en el camino a personas que siempre me alientan a seguir adelante.

A mi asesor el Dr. Enrique Mamani por su gran disposición, consejos, conocimientos, paciencia, por facilitarme materiales y equipos necesarios para la realización de esta investigación; especialmente por su confianza desde el primer momento de mi llegada. ¡Muchas gracias por darme la oportunidad de cumplir esta meta!

A mi co-asesor el Blgo. Renzo Punil por su orientación, conocimientos y atención a todas mis consultas solicitadas.

A mis revisores, el Mg. Miguel Talledo, la MSc. Priscila Mamani y el Blgo. Augusto De la Cruz por sus útiles comentarios y sugerencias para la mejora de esta tesis.

Por su gentileza al permitirme el uso de la instalación y equipos del Laboratorio de Virología Clínica y Molecular para ejecutar la tesis, agradecida con la Dra. Egma Mayta.

A todos los docentes de la Facultad de Ciencias Biológicas que nos forman como profesionales, en especial a la Mg. Elena Quillama por su guía, conocimientos y consejos impartidos al iniciarme en la investigación.

A todos mis compañeros del laboratorio de Virología Clínica y Molecular por su generosidad y disposición a compartir conocimientos y experiencias a nivel profesional. En especial a Florencia Tapia por su tiempo y ayuda en la realización experimental de la tesis en tiempos de pandemia y a Gloria Flores por sus consejos.

A mis amigos Juan, Leonardo, Robin, Gian Carlos, Ingrid, Shandel, Esperanza y Freddy por su amistad y por las horas de estudio compartidas a lo largo de nuestra formación. A Meyling y Karen, por su amistad invaluable y por su apoyo incondicional en el momento más difícil de mi vida. Pero sobretodo, mi especial agradecimiento a Meyling por comprenderme y siempre estar alentándome en todas las circunstancias.

A todos los que, en cierto modo, me permitieron ejecutar este proyecto.

¡Muchas gracias a todos!

ABREVIATURAS

- ADN Ácido Dexosirribonucleico
- ARN Ácido Ribonucleico
- BLEE Betalactamasa de espectro extendido
- BLAST Basic Local Alignment Search Tool
- CDC Centro para el Control y Prevención de Enfermedades
- D.O Densidad óptica
- ECDC Centro Europeo para la Prevención y el Control de Enfermedades
- EFSA Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria
- ICTV Comité Internacional de Taxonomía de Virus
- INS Instituto Nacional de Salud
- MDR Multidrogo-resistente
- MOI Multiplicidad de infección
- TSA Agar Tripticasa soya
- TSB Caldo Tripticasa soya
- UFC Unidad Formadora de Colonia
- UFP Unidad Formadora de Placa
- XLD Xilosa Lisina Desoxicolato
- °C Grado Celsius
- nm Nanómetros
- µm Micrómetro
- µl Microlitros
- ml Mililitros

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS.....	VI
ÍNDICE DE TABLAS	VII
RESUMEN.....	VIII
ABSTRACT	IX
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	4
2.1 Bacteriófagos.....	4
2.1.1 Estructura y Clasificación	5
2.1.2 Ciclo de replicación viral.....	7
2.1.2.1 Ciclo lítico.....	7
2.1.2.2 Ciclo lisogénico	10
2.1.3 Curva de un paso de bacteriófagos líticos.....	12
2.1.4 Fagoterapia.....	13
2.1.4.1 Ventajas y desventajas de la fagoterapia	16
2.2 Características de <i>Salmonella</i> spp.....	17
2.2.1 Generalidades.....	17
2.2.2 Taxonomía y nomenclatura	18
2.2.3 Serotipos.....	20
2.2.4 Resistencia a antibióticos de <i>Salmonella</i> spp.....	21
2.2.5 <i>Salmonella</i> Infantis en Perú y resistencia a antibióticos	23
III. HIPÓTESIS.....	25
IV. OBJETIVOS	26
4.1 Objetivo general	26
4.2 Objetivos específicos.....	26
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
5.1 Material biológico.....	27
5.1.1 Bacterias o Cepas Bacterianas	27
5.1.2 <i>Gallus gallus domesticus</i>	27
5.2 Metodología.....	27
5.2.2 Reactivación de cepa huésped	27
5.2.3 Curva de crecimiento de <i>Salmonella</i> Infantis.....	28
5.2.4 Procesamiento de muestras, enriquecimiento, aislamiento, purificación y preparación de reserva de fagos	28

5.2.4.1	Procesamiento de muestras y enriquecimiento de bacteriófagos	28
5.2.4.2	Prueba del goteo	29
5.2.4.3	Técnica de la bicapa de agar y purificación de bacteriófagos.....	29
5.2.4.4	Preparación de la suspensión de trabajo	29
5.2.4.5	Determinación del título de bacteriófagos	30
5.2.5	Caracterización biológica del bacteriófago aislado con potencial uso biotecnológico.....	30
5.2.5.1	Determinación del rango de hospederos.....	30
5.2.5.2	Determinación de la Multiplicidad de Infección (MOI)	31
5.2.5.3	Curva de un paso	31
5.2.6	Caracterización fisicoquímica del bacteriófago aislado con potencial uso biotecnológico.....	32
5.2.6.1	Estabilidad térmica	32
5.2.6.2	Estabilidad a diferentes valores de pH.....	32
5.2.6.3	Sensibilidad al cloroformo	32
5.2.6.4	Temperatura de almacenamiento	33
5.2.7	Análisis estadístico.....	33
VI.	RESULTADOS	34
6.1	Reactivación de cepa huésped.....	34
6.2	Curva de crecimiento de <i>Salmonella</i> Infantis MDR	34
6.3	Aislamiento y purificación de bacteriófagos	36
6.4	Caracterización biológica del bacteriófago aislado con potencial uso biotecnológico	40
6.4.1	Rango de hospederos.....	40
6.4.2	Multiplicidad de Infección (MOI)	40
6.4.3	Curva de un paso.....	42
6.5	Caracterización fisicoquímica del bacteriófago aislado con potencial uso biotecnológico	42
6.5.1	Estabilidad térmica.....	42
6.5.2	Estabilidad a diferentes valores de pH	44
6.5.3	Sensibilidad al cloroformo	44
6.5.4	Temperatura de almacenamiento.....	45
VII.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	48
VIII.	CONCLUSIONES	56
IX.	RECOMENDACIONES	57
X.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura general de un bacteriófago con cola.	5
Figura 2. Morfología y ácido nucleico de los bacteriófagos..	7
Figura 3. Ciclo lítico de bacteriófagos	10
Figura 4. Ciclo lisogénico de bacteriófagos	11
Figura 5. Análisis de la curva de un paso de la infección por fago.	12
Figura 6. Colonias típicas de <i>Salmonella</i> en agar Xilosa Lisina Desoxicolato.....	34
Figura 7. Curva de crecimiento de <i>Salmonella</i> Infantis multidrogo-resistente.....	35
Figura 8. Absorbancia del cultivo bacteriano a 600 nm de longitud de onda versus el logaritmo neperiano de la concentración bacteriana (UFC/ml) de <i>Salmonella</i> Infantis MDR.....	36
Figura 9. Detección cualitativa de fagos en las muestras.....	37
Figura 10. Enfrentamientos fago-bacteria en proporción 1:1 a 1 hora de incubación .	38
Figura 11. Placas de lisis del fago 52 obtenidas por medio de la técnica de la bicapa de agar.....	39
Figura 12. Prueba del goteo del bacteriófago 52 luego de la purificación.....	39
Figura 13. Concentración final de bacteriófagos a diferentes MOI..	40
Figura 14. Curva de un paso del bacteriófago 52.....	42
Figura 15. Estabilidad del bacteriófago 52 a través del tiempo según la temperatura a la que se expuso.	43
Figura 16. Estabilidad del bacteriófago a diferentes temperaturas de exposición.....	43
Figura 17. Estabilidad a diferentes valores de pH del fago 52.....	44
Figura 18. Sensibilidad al cloroformo del fago 52.....	45
Figura 19. Concentración del fago en diferentes temperaturas de almacenamiento ..	46

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Productos comerciales de fagos para su uso en alimentos y productos animales.	15
Tabla 2. Nomenclatura de <i>Salmonella</i> spp.	20
Tabla 3. Propiedades de algunos fármacos y mecanismos de resistencia de <i>Salmonella</i> spp.	22
Tabla 4. Variación a través del tiempo respecto al aislamiento de serovares de <i>Salmonella</i> spp. en muestras de pacientes (H) y en muestras no humanas (Nh) y porcentaje total reportado. Laboratorio de Referencia Nacional de Enteropatógenos, INS, Perú.	24
Tabla 5. Relación de los bacteriófagos detectados por la técnica del goteo y el lugar de procedencia.	37
Tabla 6. Rango de hospederos de bacteriófagos aislados.	41
Tabla 7. Análisis BLAST del genoma completo del fago 52 utilizando la base de datos NCBI NT, longitud del genoma y % de G+C	47

RESUMEN

Una de las principales causas de enfermedades diarreicas provocadas por alimentos contaminados se debe a infecciones por cepas de *Salmonella enterica*, donde la serovariedad Infantis ha venido emergiendo en los últimos años respecto a la frecuencia en las infecciones humanas y no humanas, acrecentando el problema debido a la multidrogo-resistencia en cepas aisladas en diferentes partes del mundo y agotando, por lo tanto, la capacidad de los antibióticos ya existentes. Esto implica un gran impacto en la salud pública y animal que conlleva a grandes pérdidas económicas también.

En este escenario, los bacteriófagos son una alternativa prometedora que pueden usarse como complemento o como alternativa para el tratamiento con antibióticos y mitigar el problema de multidrogo-resistencia, pues estos virus de bacterias son agentes específicos que exhiben un mecanismo de acción diferente al de los antibióticos.

El objetivo del presente estudio fue aislar y caracterizar bacteriófagos líticos aislados de intestino de pollos de mercados de Lima, Perú específicos de *Salmonella* Infantis multidrogo-resistente. Se seleccionó el bacteriófago 52 para la caracterización biológica y físico-química. Los resultados obtenidos mostraron que este fago es específico de *S. Infantis* MDR, tiene una multiplicidad de infección óptima de 0,001, es estable a rangos de temperatura de 40 a 60 °C y a valores de pH de 3 a 10 durante 1 hora. Presentó resistencia a la exposición al cloroformo químicamente puro y tiene estabilidad al almacenamiento a temperaturas de 4 y -20 °C, con una reducción de 0,1 logaritmos para ambos casos luego de 4 meses de almacenamiento. La curva de un paso reveló que tiene un periodo de latencia de 10 minutos y un tamaño de explosión de 32,93 UFP/célula. Debido a su robusta estabilidad a diferentes condiciones, los resultados obtenidos sugieren que el bacteriófago 52 tiene un gran potencial para ser aplicado como agente controlador de cepas de *Salmonella* Infantis multidrogo-resistente.

Palabras clave: Bacteriófagos, Caracterización, *Salmonella* Infantis, Multidrogo-resistencia, Fagoterapia

ABSTRACT

One of the main causes of diarrheal diseases caused by contaminated food is due to infections by strains of *Salmonella enterica*, where the Infantis serovar has emerged in recent years with respect to the frequency of human and non-human infections, increasing the problem due to multidrug resistance in isolated strains in different parts of the world and therefore depleting the potential of existing antibiotics. This implies a great impact on public and animal health that leads to great economic losses as well.

In this scenario, bacteriophages are a promising alternative that can be used as a complement or as an alternative for treatment with antibiotics and mitigate the problem of multidrug resistance, since these bacterial viruses are specific agents that show a different mechanism of action from that of antibiotics.

The aims of this study were to isolate and characterize lytic bacteriophages isolated from the intestine of chickens from markets in Lima, Peru, specific for multidrug-resistant *Salmonella* Infantis. Bacteriophage 52 was selected for biological and physicochemical characterization. The results obtained showed that this phage is specific for *S. Infantis* MDR, has an optimal infection multiplicity of 0.001, is stable at temperature ranges from 40 to 60 ° C and at pH values from 3 to 10 for 1 hour. It showed resistance to exposure to chemically pure chloroform and has storage stability at temperatures of 4 and -20 ° C, with a reduction of 0.1 logarithms for both cases after 4 months of storage. The one-step curve revealed that it has a latency period of 10 minutes and a burst size of 32,93 PFU / cell. Due to its robust stability under different conditions, the results obtained suggest that bacteriophage 52 has great potential to be applied as a controlling agent for multidrug-resistant *Salmonella* Infantis strains.

Keywords: Bacteriophages, Characterization, *Salmonella* Infantis, Multidrug-resistance, Phage therapy

I. INTRODUCCIÓN

La salmonelosis es una infección provocada por bacterias pertenecientes al género *Salmonella*. La infección por cepas de *Salmonella enterica* son la causa más común de gastroenteritis y bacteriemia humana en todo el mundo, y se adquiere comúnmente a partir de alimentos contaminados (Hendriksen *et al.*, 2011). Siendo las aves y sus derivados las fuentes de infección más frecuentes (Rodríguez *et al.*, 2007). Los serotipos de *Salmonella enterica* no tifoidea (NTS) generalmente son los causantes de enfermedades diarreicas transmitidas por alimentos en humanos en todo el mundo, con un estimado de 80,3 millones de enfermedades transmitidas por alimentos y 155.000 muertes al año (Majowicz *et al.*, 2010). Este grupo de NTS, pueden provocar diarrea aguda febril o puede ser asintomática en personas sanas, pero con riesgos de formas graves y/o diseminadas en los lactantes, ancianos o pacientes inmunodeprimidos (Terrier y Martinez, 2006).

En la Unión Europea durante el año 2017 las serovariedades que se notificaron con más frecuencia en casos humanos fueron *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Typhimurium monofásico, *Salmonella* Infantis y *Salmonella* Newport en orden decreciente (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria [EFSA] y Centro Europeo para la Prevención y el Control de Enfermedades [ECDC], 2018). La serovariedad Infantis con resistencia a antibióticos ha emergido en los últimos años en países de todo el mundo como Italia (Busani *et al.*, 2004; Dionisi *et al.*, 2011; Franco *et al.*, 2015), Israel (Gal-Mor *et al.*, 2010), Irán (Ghoddusi *et al.*, 2015), Hungría (Nógrády *et al.*, 2007), Eslovenia (Mateja *et al.*, 2019), Suiza (Hindermann *et al.*, 2017), Japón (Noda *et al.*, 2010), Honduras (Liebana *et al.*, 2004) incluyendo Perú (Martínez-Puchol *et al.*, 2020; Quino *et al.*, 2020; Quino *et al.*, 2019 y Zamudio *et al.*, 2011), siendo el más frecuente en este último país desde el año 2013 (Quino *et al.*, 2020).

En esta coyuntura sanitaria universal debido al surgimiento y propagación de bacterias resistentes a antibióticos, se involucran particularmente bacterias resistentes a múltiples fármacos, bacterias extensivamente resistentes y bacterias resistentes a los fármacos (Guo *et al.*, 2020). Entonces, ante el creciente aumento de casos de bacterias resistentes a antibióticos, se está reconsiderando el uso de los bacteriófagos para tratar las infecciones provocadas por este tipo de bacterias, como una alternativa prometedora al uso de antibióticos. Es necesario mencionar que, el uso de los bacteriófagos o fagos como agentes terapéuticos para tratar infecciones bacterianas empezó 20 años antes del primer uso clínico de un fármaco antibiótico, pero, en la década de 1940 con la

introducción de antibióticos de amplio espectro, desplazó y eclipsó el desarrollo de la terapia con fagos en gran parte del mundo (Nikolich y Filippov, 2020).

Los bacteriófagos constituyen el grupo de entidades biológicas más abundantes en la tierra (Kutter y Sulakvelidze, 2004; Olszak *et al.*, 2017) y se encuentran en grandes cantidades en cualquier lugar en donde vivan sus huéspedes tales como en las aguas residuales y las heces, en el suelo, en respiraderos térmicos profundos y en cuerpos de agua naturales (Guttman *et al.*, 2005). Al igual que todos los virus, son parásitos absolutos puesto que no tienen maquinaria para generar energía ni ribosomas para producir proteínas, aunque cuentan con toda la información para dirigir su propia reproducción en el huésped adecuado (Guttman *et al.*, 2005). Tienen la capacidad de infectar a sus huéspedes bacterianos específicos y en el estilo de vida lítico o virulento, secuestran la maquinaria de la célula diana para replicarse y destruirla finalmente con el objetivo de producir simultáneamente la progenie (Nikolich y Filippov, 2020).

El uso de los fagos incluye: fines terapéuticos (reducción de patógenos en animales), fines de saneamiento (desinfección de superficies y equipos de contacto con alimentos), como agentes de biocontrol (reducción o eliminación de patógenos en alimentos) y como elementos de biorreconocimiento (detección de patógenos) (Oh y Park, 2017).

En el campo de la fagoterapia humana, los fagos líticos son los utilizados y preferidos para tratar o controlar infecciones bacterianas patógenas debido a su alta especificidad y efectividad en la lisis de bacterias patógenas específicas. En años recientes se han utilizado para tratar como última alternativa infecciones de *Acinetobacter baumannii* y *Mycobacterium abscessus* resistentes a medicamentos (Schooley *et al.*, 2017; Dedrick *et al.*, 2019) y un caso de prostatitis bacteriana crónica (Dedrick *et al.*, 2021). Pero existen aún, problemas relacionados con el uso de bacteriófagos para tratar infecciones que no se resuelven, siendo el motivo por el cual la Agencia Europea de Medicamentos o la Administración de Alimentos y Medicamentos no han autorizado ningún preparado para ser usado en humano (Principi *et al.*, 2019).

En la industria alimentaria, el tratamiento con fagos específicos puede prevenir la descomposición de los productos, la propagación de enfermedades bacterianas y eventualmente, promover entornos seguros para la producción, el procesamiento y la manipulación de alimentos para animales y producción de alimentos vegetales (Oh y Park, 2017).

Actualmente existe un creciente interés a nivel mundial por el aislamiento a partir de diferentes fuentes y la caracterización de bacteriófagos con la finalidad de controlar

patógenos importantes, como por ejemplo *Salmonella* spp., para ser aplicados en diferentes industrias. Tal es el caso en Irlanda (O'Flynn *et al.*, 2006), Estados Unidos (Callaway *et al.*, 2010; Akhtar *et al.*, 2014), China (Bao *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2018; Huang *et al.*, 2018; Tang *et al.*, 2018; Islam *et al.*, 2020), Malasia (Wong *et al.*, 2014), Corea (Jung *et al.*, 2017), entre otros trabajos. Mientras que en Perú solo 2 trabajos se encuentran disponibles hasta la fecha respecto a fagos de *Salmonella*. Miranda y Pizardi (2004) detectaron y enumeraron bacteriófagos F+ específicos de *Salmonella* Typhimurium como indicadores indirectos del patógeno en muestras de choro (*Aulacomya ater*) y Flores G. (2017) realizó la caracterización de fagos líticos de *Salmonella enterica* aislados de pollo. De igual manera, se ha realizado el aislamiento y caracterización de bacteriófagos contra otros patógenos importantes, tales como *Vibrio cholerae* (Talledo *et al.*, 1998), *Acinetobacter baumannii* (Meza, 2016), *Escherichia coli* (Punil, 2017), *Vibrio fluvialis* (Flores V., 2017), *Pseudomonas aeruginosa* resistente a antibióticos (García y Porras, 2018; Llanos, 2019) y *Listeria monocytogenes* (Alegre, 2019). Y en lo que respecta a fagoterapia, Tamariz y cols. (2014) trataron ratones infectados por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina.

Ante escasos estudios previos publicados sobre bacteriófagos específicos de *Salmonella* Infantis y ante la emergencia de la aparición e incremento de casos de infecciones por esta serovariedad multidrogo-resistente en Perú, surge la necesidad de buscar alternativas eficaces que faciliten su control, siendo los bacteriófagos una alternativa prometedora.

Los bacteriófagos aislados y caracterizados en el presente estudio podrían conducir al desarrollo de nuevos agentes terapéuticos. Por ello, previamente deben conocerse ciertas características, pues debido a su composición de ácidos nucleicos y proteínas pueden perder su actividad bajo las diferentes condiciones físico-químicas y fisiológicas que posteriormente deban enfrentar. Asimismo, para la producción del fago es crucial conocer la proporción de bacterias, la multiplicidad de infección, el tamaño de explosión y la tasa de adsorción (Jończyk-Matysiak *et al.*, 2019). Por lo tanto, conocer las características y la estabilidad de los bacteriófagos a diferentes condiciones permitirá seleccionar un fago apropiado y eficaz que pueda ser explotado en futuras investigaciones, garantizando su efectividad al momento de ser empleado.

De igual manera, los fagos terapéuticos pueden hallar una aceptación más fácil en entornos no clínicos, como en la agroindustria y medicina veterinaria; siendo su aplicación el mejoramiento de los productos alimenticios o reducir el uso de antibióticos en aves de corral (Kutter y Sulakvelidze, 2005).

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Bacteriófagos

A los elementos genéticos que no tienen la capacidad de replicarse independientemente de una célula viva, llamada célula hospedera, se les denominan virus. En consecuencia, deben introducirse en una célula viva adecuada para llevar a cabo su ciclo de replicación, lo que los convierte en parásitos intracelulares obligados. Pero, aun así, son independientes del genoma del hospedero ya que poseen su propia información genética (Madigan *et al.*, 2009).

Los bacteriófagos, también conocidos como fagos, son virus específicos de bacterias capaces de reconocer, infectar y de apoderarse de la maquinaria biosintética de su huésped para poder replicarse dentro de ellas, terminándolas por destruir o simplemente terminan integrando su material genético en el genoma de la célula bacteriana. Son omnipresentes, por lo que existen en todos los entornos como parte de un ecosistema microbiano complejo en un entorno de vida libre o microbiano, como el océano o dentro de un macroorganismo, respectivamente (Clokier *et al.*, 2011). Por lo tanto, constituyen el grupo de entidades biológicas más abundantes en la tierra (Kutter & Sulakvelidze, 2004; Olszak *et al.*, 2017) con un rango estimado de 10^{30} y 10^{32} en total y con un rol muy importante en la regulación del equilibrio microbiano en todos los ecosistemas explorados (Kutter y Sulakvelidze, 2004).

El hallazgo auténtico de los bacteriófagos se les atribuye a dos personas que los estudiaron independientemente. Uno de ellos, el inglés Frederick Twort, fue quien describió por primera vez la zona característica de lisis causada por una infección por fagos en el año 1915, anticipando la hipótesis de que pudo haber sido debido a un virus. Mientras que el franco-canadiense Félix d'Herelle, fue quien precisó los hechos ocurridos al identificar la fuente del fenómeno y fue quien acuñó el término "bacteriófago" en el año 1917 (Kropinski, 2006). Sin embargo, desde 1898 al 1918 otros personajes describieron lo que se cree el fenómeno bacteriófago (Golkar *et al.*, 2014).

2.1.1 Estructura y Clasificación

Los viriones pueden tener tamaños, formas y composición química muy diversas. La mayoría son más pequeños que las bacterias, con un tamaño que varía entre los 0,02 y 0,3 μm (20 – 300 nm) (Madigan *et al.*, 2009). Cada virión o partícula de fago está conformado por la cápside que consiste en una cubierta de proteína o lipoproteína y contiene dentro de ella el genoma de ácido nucleico (Kutter & Sulakvelidze, 2004). El material genético de los fagos puede ser ADN o ARN bicatenario o monocatenario. Además, las cápsides pueden presentar formas muy variadas, siendo las más simples pequeñas estructuras en 3D con forma de hexágono hasta filamentosos y otras que pueden ser más complejas ya que consisten en una cabeza y una cola (Elbreki *et al.*, 2014). La Figura 1 muestra la estructura general de un bacteriófago con cola.

De los fagos estudiados morfológicamente, más del 96% tienen cola y pertenecen a las familias Myoviridae, Siphoviridae y Podoviridae; mientras que sólo el 3 a 4% son fagos poliédricos, filamentosos y pleomórficos (Ackermann, 2007). Este primer grupo de familias, pertenecen al orden Caudovirales y se dividen según la longitud y complejidad de sus colas (Kropinski, 2006). Las colas de los fagos de este grupo pueden ser contráctiles, cola corta o cola larga y no contráctil, correspondiendo a la familia Myoviridae, Podoviridae y Siphoviridae, respectivamente.

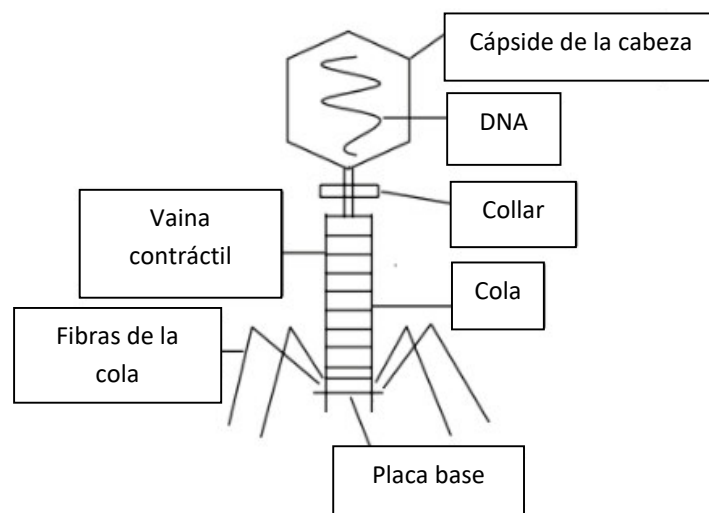


Figura 1. Estructura general de un bacteriófago con cola. Fuente: Modificado de Elbreki y cols. (2014).

El Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) ha clasificado a los fagos con cola en el orden Caudovirales, son ubicuos y contienen dsDNA dentro de una cabeza o cápside y una cola helicoidal y hueca constituida por subunidades con el propósito de transferir su genoma al interior de la bacteria (Ackermann, 2012). Uno de los fagos más estudiados es el T4, con estructuras complejas. Consiste en una cabeza icosaédrica alargada con una dimensión total de 85 x 110 nm. Esta cabeza lleva conectada una cola compleja formada por un tubo helicoidal de 25 x 110 nm con un “cuello” conector con “collar” y una placa basal compleja en la parte inferior, a la que se unen fibras basales largas (Madigan *et al.*, 2009).

Según la clasificación reciente del ICTV, hay otras siete familias de fagos filamentosos y pleomórficos incluidos en el grupo no asignado. Existen muchas diferencias entre las familias poliédricas, filamentosas y pleomórficas debido al contenido y la estructura del ácido nucleico. Esto trae como consecuencia que las familias estén compuestas a veces por un solo miembro, lo cual no representa un problema taxonómico (Ackermann, 2011).

Los fagos poliédricos comprenden un grupo de 7 familias y son los que tienen un cuerpo icosaedro o cuasi-icosaedro. Se les conoce también como de simetría cubica. Dentro de esta familia, los fagos contienen DNA o RNA de doble cadena o simple. La familia Corticoviridae (dsDNA) tiene una multicapa de proteínas como cápside y lípidos alternados. La familia Tectiviridae (dsDNA) tiene la cápside proteica rodeando a una vesícula con lípidos. La familia Microviridae (ssDNA) tienen cápside icosaedrica sin envoltura. La familia Leviviridae (ssRNA) carece de envoltura viral y, la familia Cystoviridae tiene 3 cadenas de dsRNA y rodeando a la cápside tiene una envoltura flexible con lípidos (Ackermann, 2012) (Figura 2).

Dentro del grupo de fagos filamentosos se encuentra la familia Inoviridae con un material genético de ssDNA. Incluyen fagos filamentosos largos o bastoncillos cortos, del género *Inovirus* y *Plectrovirus*, respectivamente. Los fagos pleomórficos, representados por la familia Plasmaviridae, tienen dsDNA desnudo y una envoltura de lipoproteínas (Ackermann, 2012).

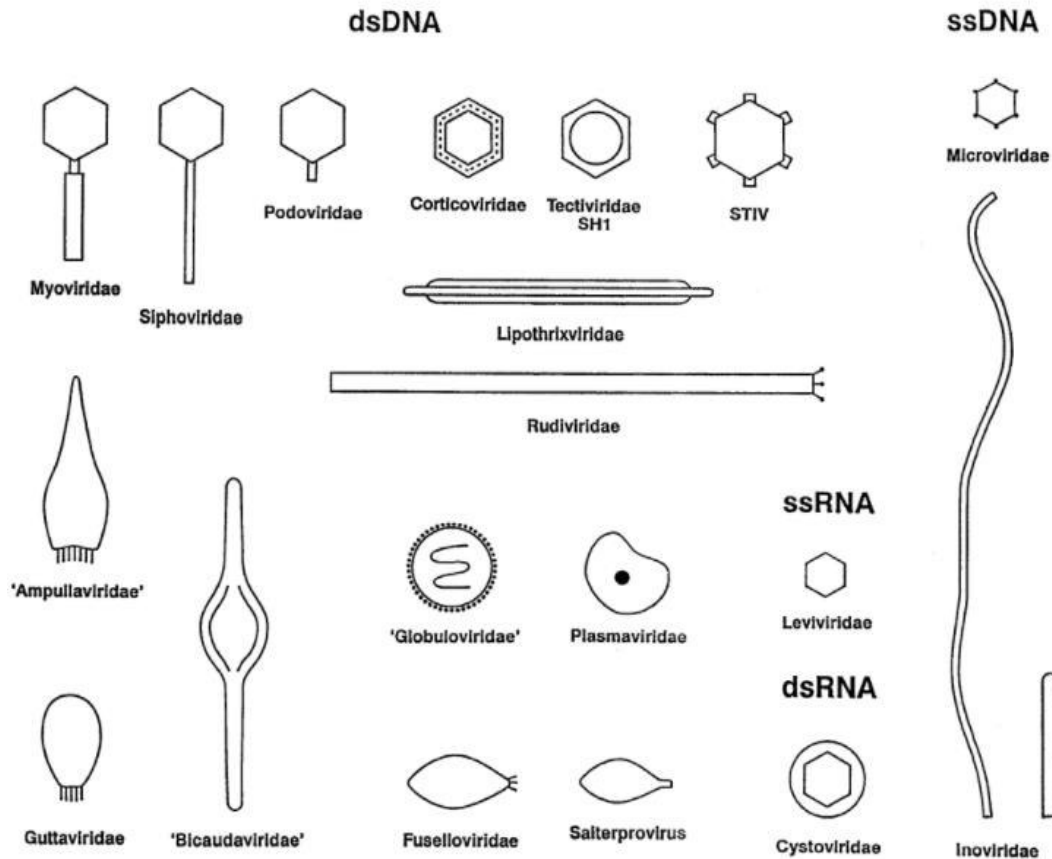


Figura 2. Morfología y ácido nucleico de los bacteriófagos. Fuente: Ackermann, 2007.

2.1.2 Ciclo de replicación viral

Los bacteriófagos no pueden ser capaces de reproducirse apropiadamente en un huésped apropiado a pesar de que contienen toda la información necesaria para dirigirla, esto es debido a que no poseen de una maquinaria biosintética para generar energía ni ribosomas para producir proteínas (Kutter & Sulakvelidze, 2004). Esta característica los convierte en parásitos intracelulares obligados de las bacterias. Para poder lograrlo primero debe haber una interacción entre el fago y su huésped a través de receptores específicos presentes en su superficie celular. Posterior a ello, inyectan su material genético para seguir con uno de los dos ciclos replicativos diferentes. Los ciclos de vida de los bacteriófagos se dividen en ciclo productivo o virulento (lítico) y ciclo templado o lisogénico (Ackermann, 2012).

2.1.2.1 Ciclo lítico

Este ciclo básicamente implica la generación de nuevos viriones y la posterior destrucción o lisis de la célula bacteriana huésped (Ackermann, 2012). Los fagos son capaces de infectar y de apoderarse de la maquinaria biosintética del huésped para

poder replicarse y posteriormente liberar a una nueva progenie de fagos mediante la destrucción de la bacteria. Todo esto se lleva a cabo en una secuencia de etapas:

- **Adsorción**

Como primer paso para que el fago pueda infectar a la célula huésped es necesario la existencia de receptores específicos que permitan su reconocimiento e interacción. El fago es capaz de reconocer a la célula hospedera mediante receptores específicos presentes en la superficie bacteriana tales como ácidos teicoicos, lipopolisacáridos (LPS), proteínas de membrana externa, pili y/o flagelos (Lindberg, 1973; Rakhuba *et al.*, 2010). Esta especificidad existente entre el fago y la bacteria, determinan el rango del huésped que posee el fago ya que puede infectar sólo a aquellas bacterias que presentan receptores que permitan su unión. De hecho, debido a la naturaleza de los receptores que difieren entre los diversos grupos taxonómicos, así como la localización de proteínas receptoras en la superficie bacteriana, cantidad y densidad del mismo, podrá asegurar la especificidad en la adsorción (Rakhuba *et al.*, 2010). Además de ello, es de importancia la velocidad de la adsorción ya que depende no solo de los reactivos sino también del entorno iónico, la temperatura, el pH y los cofactores orgánicos (Lindberg, 1973).

Si la etapa de adsorción no se llega a dar, entonces el huésped bacteriano continuará multiplicándose como si no estuviera presente el fago (Adams, 1959). Solo una adsorción exitosa permitirá la penetración del material genético viral dentro de la célula bacteriana y, por consiguiente, la continuación del ciclo de replicación.

- **Penetración del ácido nucleico**

Esta etapa acontece luego de realizarse una unión irreversible, dando lugar a la transferencia del genoma hacia la célula huésped. La cola del fago está involucrada en este proceso ya que permite el paso del material genético y, además, gracias a un mecanismo enzimático permite penetrar la capa de peptidoglucano y la membrana interna a fin de que se libere el ADN vírico (Guttman *et al.*, 2005).

- **Síntesis intracelular de componentes del virus**

La producción de nuevas copias del material genético viral y la síntesis de proteínas específicas son indispensables para la replicación del fago. Solo después de producir mRNA se sintetizan proteínas tempranas necesarias para la replicación y transcripción del genoma viral que son básicamente enzimas y; proteínas tardías que intervienen en la síntesis de proteínas de la cubierta viral y de la cola (Madigan *et al.*, 2009).

- **Ensamblaje de viriones**

El ensamblaje de la cabeza y de la cola son dos procesos independientes y, comienza luego de haberse producido las proteínas necesarias que participan en su formación.

Por lo general, la constitución de un complejo de anillo de 12 moléculas denominadas proteínas portal, da inicio al ensamblaje de la cabeza; complejo que sirve a su vez, como un sitio de acoplamiento para el complejo enzimático involucrado en el empaquetamiento del DNA. Además, este complejo, llega a formar 1 de los 12 vértices de la cabeza icosaédrica final provocando un desajuste de simetría que permite una rotación más fácil del portal durante el empaquetamiento del DNA (Kutter *et al.*, 2005).

Durante el empaquetamiento del DNA, no se corta en una secuencia específica, en otras palabras, se realizan cortes de segmentos del DNA del concatémero lo bastante largo para llenar la cabeza de un fago (Madigan *et al.*, 2009). Generalmente, a partir de este concatémero largo y lineal, empieza el empaquetamiento del DNA y finaliza en el momento en que se detectan secuencias específicas o una vez que la cabeza se llena (Kutter *et al.*, 2005).

Las colas de los fagos del Orden Caudovirales son diferentes y, por lo tanto, sus ensamblajes también difieren. Los Siphoviridae (los más estudiados) presentan colas de tubos extensos y flexibles originados por una gran cantidad de réplicas de una proteína principal de la cola que se construyen sobre un complejo iniciador al que se le pueden unir una o más fibras. Los Podoviridae disponen de placas base y puntas de la cola que se adhieren directamente por debajo de la cabeza sin ensamblarse primero en una cola separada. Las colas contráctiles de los Myoviridae presentan muchos elementos que se ensamblan sistemáticamente, en donde, la placa base similar a una cúpula se establece por la unión de 6 espigas alrededor de un cubo (Kutter *et al.*, 2005).

- **Lisis de la célula bacteriana y liberación del fago**

En esta etapa se necesita de la acción de dos enzimas que se encarguen de liberar la nueva progenie viral ya que todo el proceso de replicación y ensamblaje se realizó dentro de la bacteria. Todos los fagos con cola usan dos componentes para la lisis: una lisina y una holina (Guttman *et al.* 2005). Durante el período de síntesis tardía de proteínas se acumula la endolisina que no tiene efectos sobre la integridad de la célula bacteriana hasta que algo interrumpe el potencial eléctrico a través de la membrana; punto donde las moléculas de holina se ensamblan y forman estructuras transmembranas a fin de permitir el paso de la endolisina para romper rápidamente la

capa de peptidoglicano y liberar el fago, interrumpiendo simultáneamente la respiración y la fuerza protón motriz asociada (Kutter *et al.*, 2005).

Completado este ciclo, los viriones ya están listos para infectar nuevas células bacterianas y seguir con su replicación (Figura 3).

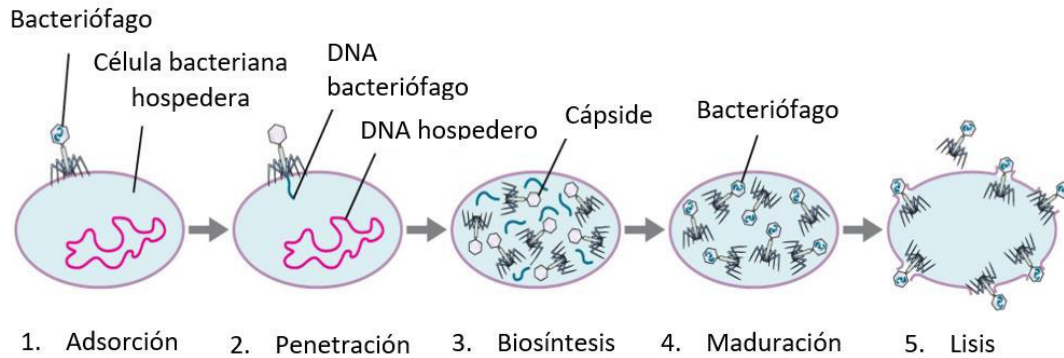


Figura 3. Ciclo lítico de bacteriófagos. En este ciclo el fago se replica y lisa a la célula.

Fuente: adaptado de "The Viral Life Cycle" por Parker y cols., *Microbiology*, 2016, OpenStax. Recuperado de: <https://openstax.org/books/microbiology/pages/6-2-the-viral-life-cycle>

2.1.2.2 Ciclo lisogénico

Durante este ciclo, el fago capaz de entrar en estado de lisogenia (llamado virus atemperado) no existe como una partícula vírica en el interior de la célula. El genoma del fago se integra en el cromosoma bacteriano o existe en el citoplasma en forma de plásmido. Para ambos casos, el genoma viral se replica simultáneamente con la del huésped (formación no lítica conocida como profagos) previa activación de los genes que eviten la activación de la vía lítica; gen que codifica la proteína represora (Madigan *et al.*, 2009). El evento crítico en el establecimiento de la lisogenia es la regulación de los genes del fago (Guttman *et al.*, 2005). De esta manera se transmite sucesivamente el genoma del fago junto con la del hospedero al resto de la progenie de la célula.

Cuando se inactiva o se impide la síntesis del represor del fago, determinados por estímulos ambientales, se induce el profago de modo que se producen nuevos viriones provocando la lisis del hospedero (Madigan *et al.*, 2009), dando por finalizado el ciclo lisogénico. (Figura 4).

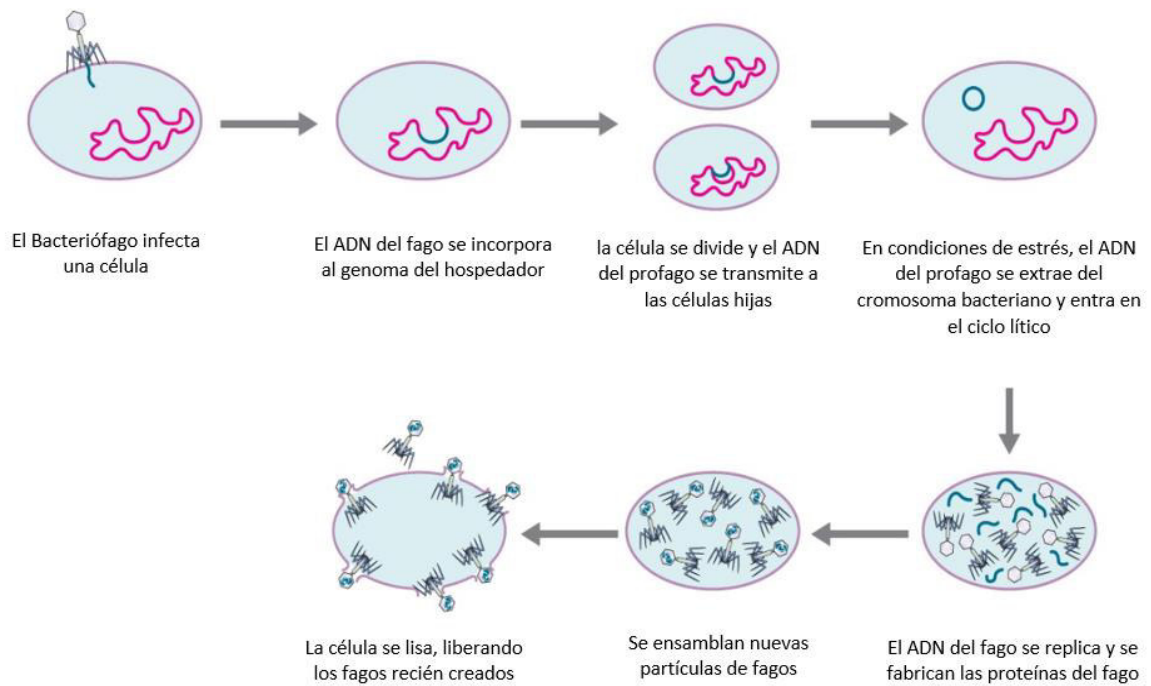


Figura 4. Ciclo lisogénico de bacteriófagos. el ADN del fago se incorpora al genoma del huésped, formando un profago, que se transmite a las siguientes generaciones de células hasta que ciertas condiciones de estrés provoquen la entrada al ciclo lítico.

Fuente: adaptado de "The Viral Life Cycle" por Parker y cols., *Microbiology*, 2016, OpenStax. Recuperado de: <https://openstax.org/books/microbiology/pages/6-2-the-viral-life-cycle>

2.1.3 Curva de un paso de bacteriófagos líticos

Las interacciones entre el fago y el huésped se han estudiado y sistematizado originalmente por Ellis y Delbrück (1939) mediante el uso de la curva de un paso. El proceso infeccioso de los fagos implica una serie de pasos bien programados (Figura 5). Inmediatamente después de la infección, el virus sufre lo que se conoce como “eclipse” debido a que en esta etapa las partículas infecciosas no se detectan en el medio de cultivo. Dicha etapa empieza tan pronto como las partículas virales desaparecen del entorno por adsorción a las células dianas. Luego de adsorberse, los viriones ya no están disponibles para infectar a las otras células (Madigan *et al.*, 2009). Después de unos minutos para la adsorción, las células infectadas se diluyen para evitar la unión de los fagos libres a las células no infectadas, y las muestras se siembran en varios momentos para determinar los centros infecciosos, definidos como una sola partícula de fago o una célula que estalla para producir una sola placa de lisis (Guttman *et al.*, 2005). La “maduración” empieza cuando se empaquetan en las cápsides las nuevas moléculas de ácido nucleico recién sintetizados y en el punto en que el título de viriones activos dentro de las células aumentan dramáticamente. Estos viriones no pueden detectarse a no ser que se induzca artificialmente su liberación (Madigan *et al.*, 2009). Por ejemplo, exponerlas al cloroformo antes de plaquear.

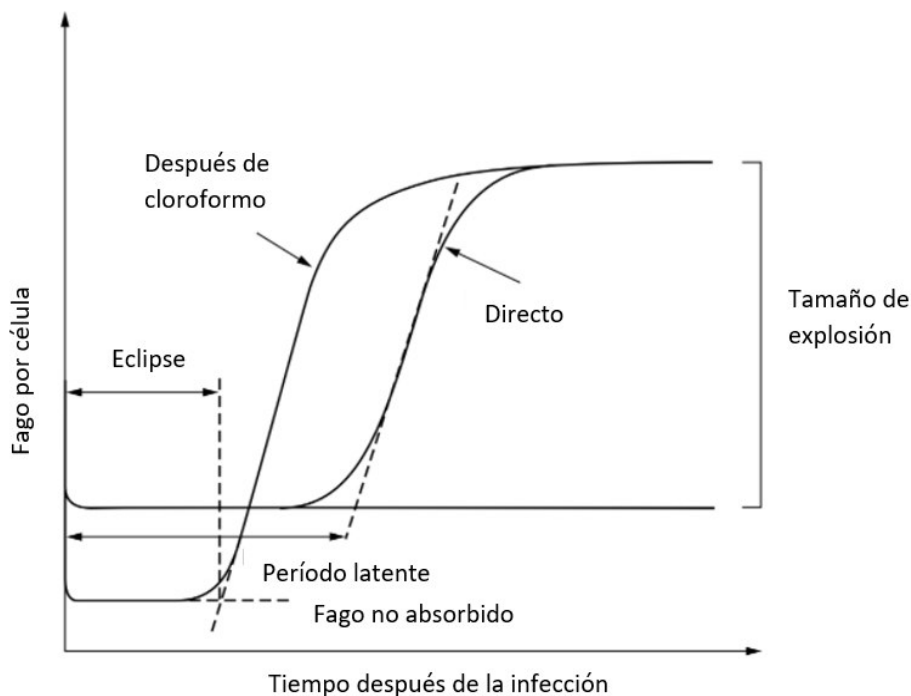


Figura 5. Análisis de la curva de un paso de la infección por fago.

Fuente: Modificado de Kutter E. y Sulakvelidze A. (2005).

Los periodos de eclipse y de maduración constituyen en conjunto el período de latencia puesto que los nuevos viriones aún no se encuentran en el exterior celular (Madigan *et al.*, 2009). Generalmente, durante el período de latencia el número de placas permanece constante en el número de células infectadas durante un periodo de tiempo distintivo y luego aumenta bruscamente. La relación entre el número de placas de lisis obtenidas antes y después de la lisis se denomina tamaño de explosión (Guttman *et al.*, 2005).

2.1.4 Fagoterapia

Debido a la naturaleza de los bacteriófagos, son buenos candidatos para la terapia antibacteriana puesto que afectan solo a la bacteria diana, es decir, son específicos, y no se ha demostrado toxicidad para los animales y plantas. Además, no tienen la capacidad de afectar a las células eucariotas y pueden replicarse siempre que estén presentes las bacterias hospederas correspondientes (Azeredo y Sutherland, 2008).

Evidentemente la capacidad de lisis o matar a las bacterias fue algo muy llamativo cuando aún no se sabía específicamente la causa del fenómeno. Félix d'Herelle no solo propuso el nombre bacteriófago; sino también, fue quien concibió la idea de utilizar a los bacteriófagos como agentes terapéuticos al tratar 4 casos de disentería bacteriana en el Hôpital des Enfants-Malades de París bajo la supervisión clínica del jefe de pediatría del hospital Victor-Henri Hutinel en el año 1919; siendo probablemente el primer intento de usar fagos terapéuticamente. Sin embargo, los resultados de este tratamiento donde los niños se recuperaron completamente, no fueron publicados inmediatamente, siendo por lo tanto Richard Bruynoghe y Joseph Maisin en el año 1921 los responsables de la primera aplicación informada de bacteriófagos para atender infecciones cutáneas causados por estafilococos (Chanishvili, 2012).

Con diversos resultados alentadores, d'Herelle y otros continuaron los estudios sobre el uso de bacteriófagos como terapia (Chanishvili, 2012). Y debido a ello, diversas empresas iniciaron la producción comercial activa de fagos contra diferentes patógenos bacterianos (Sulakvelidze *et al.*, 2001). Desde luego, la idea de usar bacteriófagos para combatir infecciones bacterianas progresaba. Pero fue con el advenimiento de los antibióticos a mediados del siglo XX en donde empezó a mermar su importancia y por lo tanto su producción, sobre todo en los países occidentales. Sin embargo, los estudios continuaron en Europa del Este y en la ex Unión Soviética, incluso varios países participaron activamente en la investigación y en la producción de fagos terapéuticos como en el Instituto Eliava de Bacteriófagos, Microbiología y Virología (EIBMV) de la

Academia de Ciencias de Georgia, Tbilisi, Georgia, y en el Instituto de Inmunología Hirsfeld y Terapia Experimental (HIET) de la Academia de Ciencias de Polonia, Wroclaw, Polonia (Sulakvelidze *et al.*, 2001).

El descubrimiento de los antibióticos trajo consigo su uso indiscriminado no solo en los humanos sino también en los animales. En el año 1928 se descubrió la penicilina por Alexander Fleming y fue el primer antibiótico comercializado, pero desde ese momento también se ha descubierto y reconocido la resistencia antimicrobiana junto con el descubrimiento de nuevos antibióticos (CDC, 2020). Según la Organización Panamericana de la Salud (PAHO), a través del tiempo ocurre la resistencia natural a los antimicrobianos, ocasionados generalmente por cambios genéticos. Sin embargo, el uso indebido y excesivo está acelerando el proceso.

Actualmente, la crisis mundial y la falta de creación de nuevos antibióticos efectivos conllevan a la búsqueda de nuevas formas de controlar las infecciones. Esto trajo consigo el redescubrimiento de la fagoterapia. Diversos estudios se están enfocando en tratar infecciones mediante el uso de cócteles de fagos, es decir, múltiples tipos de fagos en ratones (Oechslin *et al.*, 2017; Regeimbal *et al.*, 2016) o con fagos únicos (Tang *et al.*, 2018). Así mismo, también hay reportes de pacientes humanos tratados con fagos en años recientes; Schooley y cols. (2017) desarrollaron y aplicaron exitosamente cócteles de bacteriófagos terapéuticos personalizados para rescatar a un paciente diabético de 68 años con una infección por *Acinetobacter baumannii* resistente. Dedrick y cols. (2019) trataron una infección diseminada por *Mycobacterium abscessus* resistente a medicamentos en un paciente de 15 años con fibrosis quística con bacteriófagos desarrollados con ingeniería genómica y genética avanzada obteniendo como resultado una mejoría clínica objetiva. Johri y cols. (2021) reportaron un caso de prostatitis bacteriana crónica en un hombre de 33 años tratado con preparaciones de bacteriófagos obteniendo luego una mejora significativa de los síntomas y una dinámica positiva en los títulos bacterianos y los controles de ultrasonido después de la terapia con fagos.

La fagoterapia en Perú aún está en sus inicios, Tamariz y cols. (2014) estimaron la capacidad de tratar infecciones localizadas y sistémicas provocadas por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina al emplear bacteriófagos nativos en ratones con resultados positivos para prevenir y controlar infecciones localizadas. No obstante, se han realizado la caracterización de diversos fagos nativos que infectan patógenos importantes tales como *Vibrio cholerae* (Talledo *et al.*, 1998), *Acinetobacter baumannii* (Meza, 2016), *Escherichia coli* (Punil, 2017), *Vibrio fluvialis* (Flores V., 2017), *Salmonella enterica*

(Flores G. 2017), *Pseudomonas aeruginosa* resistente a antibióticos (García y Porras, 2018; Llanos, 2019) y *Listeria monocytogenes* (Alegre, 2019), lo que demuestra la importancia creciente respecto al tema de bacteriófagos en el Perú, para sus potenciales aplicaciones en diferentes campos.

Tabla 1. Productos comerciales de fagos para su uso en alimentos y productos animales.

Producto	Aplicación	Descripción	Empresa	País
AgriPhage	Comida (tomate)	Se enfoca en manchas bacterianas o motas bacterianas en cultivos contra <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> o <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	Omnilytics, Inc.	USA
EcoShield	Comida	Se enfoca en la contaminación por <i>Escherichia coli</i> O157: H7 en alimentos e instalaciones de procesamiento de alimentos	Intralytix, Inc.	USA
ListShield	Comida	Se enfoca en la contaminación por <i>Listeria monocytogenes</i> en alimentos e instalaciones de procesamiento de alimentos	Intralytix, Inc.	USA
SalmoShield	Comida	Se enfoca en la contaminación por serotipos de <i>Salmonella</i> altamente patógenos seleccionados en alimentos e instalaciones de procesamiento de alimentos	Intralytix, Inc.	USA
ShigaShield	Comida	Se enfoca en la contaminación por <i>Shigella</i> spp. en alimentos e instalaciones de procesamiento de alimentos	Intralytix, Inc.	USA
Listex P100	Comida	Se enfoca en la contaminación por <i>L. monocytogenes</i> en productos alimenticios	Micreos	Países bajos
Ecolicide	Alimentación animal	Se dirige a la contaminación por <i>Escherichia coli</i> O157: H7 en las pieles de animales vivos antes del sacrificio	Intralytix, Inc.	USA
SalmoLyse	Alimentación animal	Se enfoca en la contaminación por <i>Salmonella</i> en los alimentos para mascotas	Intralytix, Inc.	USA
BioTector	Alimentación animal	Pienso para el control de <i>Salmonella</i> en aves de corral	CheilJedang Co.	Corea
SalmoFresh	Comida	Se dirige a <i>Salmonella enterica</i> en varios alimentos.	Intralytix, Inc.	USA

Fuente: Modificado de Oh y Park (2017).

El campo de la fagoterapia en humanos cuenta con ciertas limitaciones pues existen varios problemas relacionados en el tratamiento de infecciones que aún no se resuelven y es la razón por la cual no existe aún ningún preparado comercial para uso humano autorizado por la Agencia Europea de Medicamentos o por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) (Principi *et al.*, 2019). Por lo tanto, el uso de fagos en el campo de la medicina humana se encuentra aún en desarrollo. Sin embargo, existen fagos disponibles comercialmente para ser usados en alimentos (Tabla 1).

2.1.4.1 Ventajas y desventajas de la fagoterapia

Una de las principales diferencias entre los fagos y los antibióticos es su rango objetivo. La ventaja es que los bacteriófagos son altamente específicos con sus huéspedes (Golkar *et al.*, 2014; Elbreki *et al.*, 2014; Azeredo *et al.*, 2008 y Sulakvelidze y kutter, 2005) y esta característica tiene como resultado que son incapaces o es muy poco probable que afecten a la microbiota deseable (Elbreki *et al.*, 2014 y Sulakvelidze y kutter, 2005).

Los bacteriófagos pueden autorreplicarse en el lugar de infección, es decir, donde se encuentran los patógenos correspondientes (Golkar *et al.*, 2014 y Azeredo *et al.*, 2008); y una vez que las células bacterianas huéspedes se destruyen, los fagos dejan de funcionar dispersándose sin causar daño (Elbreki *et al.*, 2014).

Así como las bacterias pueden adquirir resistencia a los antibióticos también pueden hacerlo frente a los fagos. Sin embargo, esta última no es tan preocupante. Los fagos también tienen la capacidad de mutar cuando surgen bacterias resistentes a ellos, es decir, pueden superar la resistencia evolucionando al mismo ritmo que la bacteria diana (Elbreki *et al.*, 2014). Además, esta resistencia se puede prevenir mediante el uso de preparaciones que contiene múltiples tipos de fagos (cócteles) y/o junto con antibióticos (Golkar *et al.*, 2014; Regeimbal *et al.*, 2016; Oechslin *et al.*, 2017). Cabe señalar que debido a que los fagos pueden dirigirse a receptores en la superficie bacteriana involucrados en la patogénesis, las bacterias mutan, pero a la vez se atenúa su virulencia (Azeredo *et al.*, 2008; Regeimbal *et al.*, 2016). Finalmente, la producción de fagos tiene como ventaja los bajos costos y su simplicidad (Elbreki *et al.*, 2014 y Azeredo *et al.*, 2008).

Como desventajas existentes es que no todos los fagos son buenos agentes terapéuticos ya que en el caso de usar fagos atemperados cabe la posibilidad de

presentarse inmunidad a la infección y la codificación de factores de virulencia y toxinas bacterianas. Para evitar esto, los bacteriófagos deben ser estrictamente líticos, estables en condiciones y temperaturas de almacenamiento típicas y, además, es ideal que estén completamente secuenciados para confirmar la ausencia de genes indeseables tales como las toxinas. El rango estrecho de hospederos también es otro problema en la fagoterapia puesto que limita en un mínimo el tratamiento presuntivo. Sin embargo, los fagos pueden emplearse con frecuencia en combinación con antibacterianos e incluso con otros fagos (cócteles de fagos) a fin de ampliar el espectro lítico (Loc-Carrillo y Abedon, 2011).

2.2 Características de *Salmonella* spp.

2.2.1 Generalidades

De acuerdo al Manual de Bergey (Brenner *et al.*, 2005), *Salmonella* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, son bacilos Gram negativos de 0,7-1,5 x 2,0-5,0 µm, anaerobios facultativos, suelen ser móviles por flagelos peritricos. Reducen nitratos a nitritos, gas generalmente producido a partir de la D-glucosa, indol negativo, citrato utilizado generalmente como única fuente de carbono. Reacciones positivas para la lisina y ornitina descarboxilasa. No tienen la enzima ureasa. La fenilalanina y el triptófano no se desaminan oxidativamente. La mayoría producen sulfuro de hidrógeno, pero algunos serovares no lo producen.

Tienen una temperatura óptima de crecimiento de 37 °C. Pueden vivir en medio acuoso, pero resisten el frío y la desecación, se destruyen por medio de calor y ácidos (Terrier & Matinez, 2006). Se ha informado que la temperatura más baja de crecimiento está entre 5,3 y 6,2 °C para *Salmonella* Heidelberg y *Salmonella* Typhimurium, respectivamente; mientras que el límite superior esta alrededor de 45 °C. El pH de crecimiento óptimo esta alrededor de la neutralidad, siendo bactericida los valores por encima de 9,0 e inferiores a 4,0. El efecto del valor de pH mínimo va depender del tipo de ácido utilizado para reducir el pH (Jay *et al.*, 2005).

Las cepas de *Salmonella* se distribuyen ampliamente en la naturaleza, siendo los humanos y los animales sus principales reservorios. Además, tienen como hábitat principal el tracto intestinal (Jay *et al.*, 2005).

2.2.2 Taxonomía y nomenclatura

Según las normas en el Código Internacional de Nomenclatura Bacteriana, establece que, para conferirle una denominación internacional a las especies, deben nominarse mediante dos vocablos en el cual, el primero hace referencia al género y se compone por una letra inicial mayúscula, seguido por el vocablo que define a la especie y se escribe con minúscula (Delgado, 2015).

Sin embargo, la nomenclatura actual de *Salmonella* es compleja y los científicos utilizan diferentes sistemas para referirse y comunicarse sobre este género. Desafortunadamente, se combina varios sistemas de nomenclatura que dividen de manera inconsistente el género en especies, subespecies, subgéneros, grupos, subgrupos y serotipos (serovares), lo cual causa confusión (Brenner *et al.*, 2000).

El género fue nombrado *Salmonella* por Lignieres en el año 1900 en honor a D. E. Salmon, quien aisló la bacteria creyendo que era el agente etiológico del cólera porcino (refutado posteriormente) (Nwabor *et al.*, 2015).

La nomenclatura para el género *Salmonella* ha progresado a través de una sucesión de características taxonómicas, serológicas y sobre los principios de la taxonomía numérica y la homología del ADN (Tindall *et al.*, 2005). En el inicio, se basaban en lo propuesto por Kauffmann en el año 1966 sobre la base de la identificación serológica de los antígenos O (somáticos) y H (flagelares), donde cada serotipo era considerado una especie separada; concepto que, al día de hoy, daría lugar a 2.463 especies de *Salmonella* (Brenner *et al.*, 2000). También se utilizaron reacciones bioquímicas para separarlas en subgrupos como parte del esquema taxonómico inicial (Nwabor *et al.*, 2015).

Los hechos acontecidos desde los primeros intentos de clasificar sistemáticamente *Salmonella* fueron muy confusos y dinámicos para la comunidad científica. Abarcaron consideraciones de tratar a cada serovar como especie individual, propuestas de dividir el género en 3 especies, propuesta de que estaba constituida por una especie única, desacuerdos en la designación de la especie que abarque todas las serovariedades, las subespecies en las que se dividen, así también problemas en la designación de la especie tipo.

Fue en el año 1973 cuando ocurrió un cambio definitivo en la taxonomía; Crosa y cols. demostraron mediante hibridación de ADN-ADN que los serotipos y subgéneros I, II y IV de *Salmonella* y todos los serotipos de “*Arizona*” estaban relacionados a nivel de especie y por lo tanto el grupo pertenecía a una sola especie (Brenner *et al.*, 2000;

Nwabor *et al.*, 2015). La excepción fue *Salmonella bongori*, anteriormente era la subespecie V, pero se demostró en el año 1989 que tenía una secuenciación de nucleótidos distinta (Reeves *et al.* 1989) por lo tanto, se le elevó a especie.

Actualmente, el género *Salmonella* consta de dos especies: *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori*. Seis subespecies constituyen la especie *Salmonella enterica*: *S. enterica* subsp. *enterica* (I), *S. enterica* subsp. *salamae* (II), *S. enterica* subsp. *arizonae* (IIIa), *S. enterica* subsp. *diarizonae* (IIIb), *S. enterica* subsp. *houtenae* (IV) y *S. enterica* subsp. *indica* (VI) (Popoff y Le Minor, 2005). A su vez, cada especie está dividida en múltiples serotipos que se enumeran según el esquema de Kauffmann-White (Tabla 2).

Antes del año 1966, todos los serotipos de todas las subespecies recibieron nombres a excepción de las subespecies IIIa y IIIb. Y fue en el año 1966 cuando el Centro Colaborador de la OMS decidieron nombrar solo a los serotipos en la subespecie I y se eliminó los nombres de serotipos existentes en las subespecies II, IV, VI y *S. bongori* del esquema Kauffmann-White (Brenner *et al.*, 2000). Los serovares en la mayoría de las especies bacterianas no reciben nombres, esto porque son designados según su fórmula antigénica, como por ejemplo con *Escherichia coli* O104:H4. Sin embargo, la excepción con la subespecie I se debe al error de nombrarlos anteriormente por Kauffmann (Agbaje *et al.*, 2011).

Finalmente, con los cambios taxonómicos actuales que provocaron modificaciones importantes en la nomenclatura, como conservar las denominaciones para cada serovar perteneciente a la subespecie *enterica*, se estableció que para destacar que estos nombres no corresponden a especies, no deben escribirse en cursiva (itálica), además, sus nombres deben empezar con mayúscula. Como ejemplo de este argumento y en base a lo pautado actualmente, la denominación correcta sería *Salmonella* Typhi, de forma abreviada, y *Salmonella enterica* subespecie *enterica* serovariedad Typhi, para la nomenclatura más extensa del mismo microorganismo (Delgado, 2015).

Respecto a los términos "serovares" y "serotipos", se consideran generalmente sinónimos. La Organización Mundial de la Salud (OMS) / Instituto Pasteur utilizan el término "serovar", mientras que los Centros para el Control de Enfermedades (CDC) y la Sociedad Estadounidense de Microbiología (ASM) pasaron de usar la palabra "serotipo" a "serovar" para mantener la coherencia internacional (Ryan *et al.*, 2017).

Tabla 2. Nomenclatura de *Salmonella* spp.

Posición taxonómica (formato de escritura) y nomenclatura				N° de
Género (en mayúscula, cursiva)	Especie (cursiva)	Subespecie (cursiva)	Serotipos (o serovares) (en mayúscula, no cursiva) *	serotipos en cada especie o subespecie
<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>enterica</i> (o subespecies I)	Choleraesuis, Enteritidis, Paratyphi, Typhimurium	1504
		<i>salamae</i> (o subespecies II)	9,46:z:z39	502
		<i>arizonae</i> (o subespecies IIIa)	43:z29:-	95
		<i>diarizonae</i> (o subespecies IIIb)	6,7:1,v:1,5,7	333
		<i>houtenae</i> (o subespecies IV)	21:m,t:-	72
		<i>indica</i> (o subespecies V)	59:z36:-	13
	<i>bongori</i>	subespecies V	13,22:z39:-	22

*Algunos serotipos (serovares) se enumeran como ejemplos. Fuente: Modificado de Su y Chiu (2007).

2.2.3 Serotipos

Para realizar la serotipificación se debe determinar de forma completa los diferentes antígenos presentes, ya sean antígenos somáticos (O), flagelares (H) y capsulares (Vi), cuyo objetivo es determinar la fórmula antigénica completa del aislado individual de *Salmonella* (Nwabor *et al.*, 2015). De acuerdo a las similitudes presentadas en cuanto al contenido de uno o más antígenos O, se colocan en grupos designados como A, B, C, etc. (Jay *et al.*, 2005). Los antígenos flagelares son proteínas termolábiles asociadas a los flagelos peritricos y se pueden expresar en una de dos fases; la fase 1 está asociado con la identidad inmunológica de los serovares particulares debido a que son específicos, mientras que la fase 2 son inespecíficos ya que contienen diferentes subunidades de proteínas antigénicas con posibilidad de ser compartidas por muchos otro serovares (Nwabor *et al.*, 2015).

Luego de realizar la serotipificación completa del cultivo de *Salmonella*, se puede determinar mediante el esquema de Kauffmann-White el nombre del serotipo (Nwabor *et al.*, 2015). la mayoría de los serovares de *Salmonella* conocidos al día de hoy

pertenecen a *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (*S. enterica* subsp. I) y los serogrupos de antígeno O más comunes son A, B, C1, C2, D y E (Agbaje *et al.*, 2011; Brenner *et al.*, 2000).

2.2.4 Resistencia a antibióticos de *Salmonella* spp.

La resistencia a los antibióticos es un problema de preocupación mundial, pues, amenaza la capacidad para tratar las infecciones comunes. A medida que se propaga mundialmente la resistencia, los antibióticos se vuelven cada vez más ineficaces lo cual provocan costos significativos en las economías nacionales junto a sus sistemas de salud (Organización Mundial de la Salud [WHO], 2021). Esto se debe a que los microorganismos han desarrollado una multitud de mecanismos para evadir la acción de los fármacos y así poder sobrevivir (Jyoti *et al.*, 2014).

La multidrogo resistencia (MDR) se define como la no susceptibilidad a al menos un agente en tres o más categorías de antimicrobianos (Magiorakos *et al.*, 2012). Este problema ha sido reportado en diversas partes del mundo para distintas serovariedades de *Salmonella* spp. Con respecto a la serovariedad Infantis, el incremento de la resistencia a múltiples antibióticos se ha visto reflejado tanto en aves y sus productos derivados, así como en casos de infecciones humanas.

A las cepas *Salmonella* spp. se les puede atribuir la resistencia a múltiples fármacos debido a una serie de mecanismos tales como la alteración y/o modificación del sitio de destino, degradación del antibiótico por hidrólisis o por modificación del fármaco a una forma inactiva y la reducción de la concentración intracelular eficaz de los agentes antimicrobianos a fin de evitar el ingreso de los fármacos a su objetivo (Martins *et al.*, 2011). La Tabla 3 muestra las propiedades de algunos fármacos y los mecanismos de resistencia presentados en *Salmonella* spp.

Tabla 3. Propiedades de algunos fármacos y mecanismos de resistencia de *Salmonella* spp.

Grupo de antibióticos	Miembros	Mecanismo de acción	Mecanismos de resistencia
β- lactámicos	Penicilina (s), amoxicilina, Imipenem, Cefalosporina (1ra, 2da y 3ra generación)	Inhibición de la síntesis de la pared celular	β-lactamasas, BLEE, modificación de la porina (<i>ompF</i>), Eflujo de β-lactámicos (<i>ompC</i>)
Aminoglucósidos	Neomicina, Kanamicina, Amikacina, Tobramicina, Gentamicina, Estreptomina	Inhibir la síntesis de proteínas	Modificación enzimática e inactivación de aminoglucósidos
Tetraciclinas	Oxitetraciclina, Clortetraciclina, Doxiciclina etc.	Inhibir la síntesis de proteínas	Bombas de eflujo, Modificación del objetivo de ARNr, Inactivación del compuesto
Quinolonas y fluoroquinolonas	Ciprofloxacino, Norfloxacino, ácido nalidíxico, etc.	Inhibe la ADN girasa y la topoisomerasa II, bloqueando así la replicación del ADN	Mutación en la región determinante de la resistencia a quinolonas (QRDR) <i>GryA</i> , <i>GyrB</i> , <i>parC</i> , <i>pare</i>
Sulfonamidas	Sulfametoxazol, sulfanilamida, sulfisoxazol, etc	Inhibe la síntesis de ácido fólico al competir con ácido para-aminobenzoico (PABA)	Inhibición de la dihidropteroato sintasa

Fuente: Modificado de Akinyemi y Ajoseh (2017).

2.2.5 *Salmonella* Infantis en Perú y resistencia a antibióticos

Arias y Meza (2004) evaluaron cepas de *Salmonella* spp. confirmadas por el Instituto Nacional de Salud (INS), Perú, entre los años 1997-2002, y encontraron que la resistencia aún es baja para antibióticos como el cloramfenicol, ampicilina y cotrimoxazol. En el año 2010, a través de la vigilancia de laboratorio por el INS, Zamudio y cols. identificaron aislamientos de *S. Infantis* en 24 casos de origen clínico y 9 de alimentos. Se reportó como la tercera serovariedad más frecuente y como bacteria asociada al consumo de alimentos contaminados como huevos y productos cárnicos avícolas. Además, dos aislamientos de productos cárnicos avícolas y uno de hemocultivo presentaron resistencia al ácido nalidíxico, ciprofloxacina, tetraciclina, cotrimoxazol y nitrofurantoína. Martínez-Puchol y cols. (2020) identificaron cepas de *S. Infantis* de carnes para consumo humano del año 2012 en 13 muestras de pollo, 1 en ternera y 1 en cerdos y, además, presentaron resistencia a nitrofuranos. Mientras que, en otro estudio, Quino y cols. (2020) estudiaron cepas de *Salmonella enterica* enviadas al Laboratorio de Referencia Nacional de Enteropatógenos (LRNE) del INS durante los años 2012-2015 donde obtuvieron que la frecuencia de resistencia en muestras de pacientes fue: “nitrofurantoína (74%), ácido nalidíxico (64%), ciprofloxacina (63%), tetraciclina (63%), ampicilina (56%), cotrimoxazol (56%), cefotaxima (53%) y cloramfenicol (50%)” (p.397); para las muestras biológicas no humanas fue: “ácido nalidíxico (55%), ciprofloxacina (45%), cotrimoxazol, nitrofurantoína y tetraciclina (40%)” (p.397). Además, se resalta que *Salmonella* Infantis fue relegando a otros serovares al transcurrir el tiempo, puesto que en el año 2010 se situaba como el tercero de mayor frecuencia, en el 2012 se posicionó en el segundo puesto y desde el año 2013 ya era el serovar más frecuente seguido de *Salmonella* Enteritidis y *Salmonella* Typhimurium. Así mismo, Quino y cols. (2019) describieron que el 74,1% de las cepas de *S. Infantis* corresponden a un perfil multidrogorresistente con resistencia a más de 5 antimicrobianos y presencia de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE).

A pesar de que a nivel mundial *Salmonella* Infantis se ubica como el cuarto serovar más prevalente en Europa (EFSA y ECDC, 2018), en el Perú existe variación entre los serotipos de más frecuencia donde se evidencia que esta serovariedad se ha posicionado como el más frecuente desde el año 2013, problema que se agudiza por el hecho de ser multidrogo-resistente. La Tabla 4 muestra la variación a través del tiempo respecto al aislamiento de serovares de *Salmonella* spp. en muestras de pacientes (H) y en muestras no humanas (Nh) y porcentaje total reportado (Quino *et al.*, 2020).

Tabla 4. Variación a través del tiempo respecto al aislamiento de serovares de *Salmonella* spp. en muestras de pacientes (H) y en muestras no humanas (Nh) y porcentaje total reportado. Laboratorio de Referencia Nacional de Enteropatógenos, INS, Perú.

Serotipo	2012		2013		2014		2015		Total H		Total Nh	
	H	Nh	H	Nh	H	Nh	H	Nh	n	%	n	%
<i>Salmonella</i> Infantis	43	7	109	2	86	0	58	0	296	57	9	45
<i>Salmonella</i> Enteritidis	66	1	36	0	15	0	23	1	140	27	2	10
<i>Salmonella</i> Typhimurium	11	4	3	4	3	0	12	0	29	6	8	40
<i>Salmonella</i> Choleraesuis	2	0	0	0	0	0	1	0	3	1	0	0
<i>Salmonella</i> Blegdan	8	0	0	0	0	0	0	0	8	2	0	0
<i>Salmonella</i> Paratyphi B	0	0	1	0	1	0	3	0	5	1	0	0
<i>Salmonella</i> Gallinarum	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	5
<i>Salmonella</i> Agona	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0
<i>Salmonella</i> Anatum	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
<i>Salmonella</i> Corvallis	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0
<i>Salmonella</i> Derby	0	0	1	0	0	0	2	0	3	1	0	0
<i>Salmonella</i> Dublin	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
<i>Salmonella</i> Moscow	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
<i>Salmonella</i> Reinickendorf	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
<i>Salmonella</i> Rostock	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0
<i>Salmonella</i> spp.	0	0	26	0	1	0	0	0	27	5	0	0
<i>Salmonella</i> Typhi	1	0	1	0	0	0	0	0	2	0	0	0
Total	132	13	178	6	108	0	102	1	520	100	20	100

Fuente: Tomado de Quino y cols. (2020).

III. HIPÓTESIS

H₁: Existen bacteriófagos líticos y estables de *Salmonella* Infantis multidrogo-resistente en intestinos de pollos de mercados de Lima, Perú.

H₀: No Existen bacteriófagos líticos y estables de *Salmonella* Infantis multidrogo-resistente en intestinos de pollos de mercados de Lima, Perú.

IV. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Aislar y caracterizar bacteriófagos líticos a partir de intestino de pollos de mercados de Lima, Perú específicos de *Salmonella* Infantis multidrogo-resistente.

4.2 Objetivos específicos

- Aislar bacteriófagos líticos de *Salmonella* Infantis multidrogo-resistente a partir de muestras de intestinos de pollos
- Determinar las características biológicas del bacteriófago aislado con potencial uso biotecnológico
- Determinar las características fisicoquímicas del bacteriófago aislado con potencial uso biotecnológico

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Material biológico

5.1.1 Bacterias o Cepas Bacterianas

Salmonella enterica subsp. *enterica* serotipo Infantis con características multidrogoresistentes (MDR)

Enterobacter aerogenes ATCC 13048, *Enterobacter cloacae* ATCC 13047, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Klebsiella oxytoca* ATCC 13182, *Serratia marcescens* ATCC 43862, *Enterococcus faecium* ATCC 35667, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Streptococcus bovis* ATCC 33317, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, *Escherichia coli* ATCC 13706, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella* Typhimurium (n = 3), *Salmonella* Corvallis, *Salmonella* Tennessee, *Salmonella* Heidelberg (n = 4)

5.1.2 *Gallus gallus domesticus*

Intestino de pollos recolectadas de 100 mercados diferentes de Lima - Perú

5.2 Metodología

5.2.1 Reactivación de cepa huésped

La cepa huésped empleada fue *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotipo Infantis con características multidrogoresistentes (MDR) productora de betalactamasas de espectro extenso. Esta cepa fue aislada y caracterizada por Quino y cols. (2019) en el Laboratorio de Referencia Nacional de Enteropatógenos del INS.

La cepa caracterizada se reactivó en el Laboratorio de Virología Clínica y Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas, UNMSM como se describe a continuación:

Se cultivó durante toda la noche a 37 °C en Caldo Tripticasa Soya (TSB; Himedia) y se estrió en Agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD Agar; Himedia) para verificar la pureza de la misma, mediante su comportamiento cultural.

Del cultivo anterior se inoculó 100 µl del cultivo en un nuevo caldo y se incubó a 37 °C para desarrollar cultivo en fase exponencial.

La cepa se mantuvo en Caldo Tripticasa Soya (TSB; MERCK) con glicerol al 20% y se mantuvo a -20 °C hasta su uso (Modificado de Bao *et al.*, 2011).

5.2.2 Curva de crecimiento de *Salmonella* Infantis

La curva de crecimiento bacteriano se realizó de acuerdo con el método de conteo en placa (UFC/ml) por la técnica de incorporación y por densidad óptica (D.O) a una longitud de onda de 600 nm.

Se realizó el protocolo de Flores G. (2017) modificado. Para ello, se inoculó 10 µl de un cultivo de *Salmonella* Infantis MDR de toda la noche en un matraz con 100 ml de TSB y se incubó a 37 °C hasta cumplir 9 horas. Se recolectaron muestras de 1 ml al iniciar el experimento y hora tras hora para medir la densidad óptica ($D.O_{600\text{ nm}}$) y a la vez, se calculó el número de unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml). Se empleó un espectrofotómetro DENOVI-DS11 para medir la D.O y para la técnica por incorporación se emplearon diluciones seriadas para cada muestra y se sembró cada dilución en una placa de Petri con Agar Trypticase Soya (ATS; Himedia) a una temperatura de 45 °C. Se calculó la relación entre la D.O de *Salmonella* Infantis MDR y la concentración de bacterias presentes por mililitro (UFC/ml). La toma de muestra para este ensayo se realizó por duplicado tanto para la D.O como para el número de UFC/ml.

5.2.3 Procesamiento de muestras, enriquecimiento, aislamiento, purificación y preparación de reserva de fagos

5.2.3.1 Procesamiento de muestras y enriquecimiento de bacteriófagos

Se aislaron fagos de *Salmonella* Infantis de intestino de pollos recolectados de 100 mercados diferentes de Lima- Perú. Según la metodología estandarizada en el laboratorio, cada muestra se abrió cuidadosamente desde el ciego hasta la cloaca y se colectó el contenido interno en recipientes que contenían 100 ml de agua destilada. Se homogenizó y se transfirió 15 ml en tubos de centrifuga. Posteriormente, cada muestra se centrifugó a 7197 x g durante 20 minutos para separar las células bacterianas y los desechos. Todo el sobrenadante se pasó a través de filtros de 0,45 µm y se volvió a centrifugar a 7197 x g durante 60 minutos para asegurar la eliminación de desechos.

Para el enriquecimiento de fagos, se mezcló cada sobrenadante de muestra filtrada (15 ml) con 100 µl de *Salmonella* Infantis en fase exponencial y 5 ml de TSB a una concentración de 4X y se incubó a 37 °C durante 24 horas. Los fagos multiplicados se aislaron mediante centrifugación a 8000 x g durante 15 minutos y filtraron con filtro estéril de 0,22 µm (Huang *et al.*, 2018). A continuación, alícuotas de 2 ml de este sobrenadante final se almacenó a 4 °C como muestra enriquecida en fagos.

5.2.3.2 Prueba del goteo

Se utilizó la prueba del goteo realizado por Bao y cols. (2011) con modificaciones para examinar cada muestra enriquecida y detectar la presencia de fagos en el sobrenadante. Para ello, se colocó 10 µl del sobrenadante de cada muestra enriquecida sobre placas con Agar Tripticasa Soya (ATS), sembrado con 100 µl de *Salmonella* Infantis en fase logarítmica. Posteriormente, las placas se incubaron a 37 °C durante 24 horas. Después de la incubación, se examinaron todas las placas para determinar la formación de zonas de aclaramiento e indicar la presencia de fagos que infectan *Salmonella* Infantis MDR presentes en cada muestra.

5.2.3.3 Técnica de la bicapa de agar y purificación de bacteriófagos

Se utilizó la técnica de la bicapa de agar descrita por Adams (1959) para aislar y purificar fagos de las muestras positivas. Se realizaron diluciones seriadas de cada muestra positiva en proporción 1:10. Luego, se combinó un volumen de 1 ml de cada dilución con 1 ml del cultivo de la cepa huésped en tubos estériles vacíos y se incubó a 37 °C durante 10 minutos. Posteriormente, se le agregó a cada tubo 8 ml de Agar Tripticasa Soya blando al 0,7% (p/v) a una temperatura de 45 °C, se homogenizaron y se superpusieron sobre placas de ATS al 1,5% (p/v). Se dejaron solidificar durante 15 minutos y se incubó a 37 °C durante 24 horas para la formación de placas de lisis.

Para purificar los fagos, se examinaron las placas de lisis obtenidas por la técnica de la bicapa y se seleccionaron aquellas que formaron placas translúcidas. Se realizaron cortes de las placas de lisis usando una punta de micropipeta y se suspendieron en solución salina estéril (0,85% p/v). Luego, posterior a la centrifugación se filtró cada sobrenadante usando filtros estériles de 0,22 µm de porosidad. Este proceso de purificación a partir de una placa individual se repitió durante 4 pases consecutivos para asegurar una reserva de fagos únicos (Akhtar *et al.*, 2014).

5.2.3.4 Preparación de la suspensión de trabajo

Luego de obtener el bacteriófago purificado, se enfrentó el bacteriófago con su hospedero respectivo para incrementar el número de fagos y así obtener el lisado de trabajo. Se realizó el método ejecutado por Fortier y Moineau (2009). Se agregó en 10 ml de TSB, volúmenes iguales a 1 ml del filtrado puro del bacteriófago y del cultivo bacteriano en fase logarítmica y se incubó a 37 °C por 24 horas. Transcurrido el tiempo se observó un aclaramiento del caldo producto de la actividad lítica de los fagos. Para evidenciar la diferencia, se contó con un tubo control de crecimiento bacteriano que solo contenía el caldo y la bacteria. Después de realizar la lectura, se procedió a remover los restos bacterianos por medio de centrifugación a 4595 x g durante 10 minutos a 4 °C,

se filtró con membrana de 0,22 µm y se conservó a 4 °C para los diferentes experimentos del estudio.

5.2.3.5 Determinación del título de bacteriófagos

Luego de efectuar la técnica de la doble capa, se procedió a determinar el título con la siguiente formula (Pelzek *et al.*, 2013):

$$\frac{UFP}{ml} = \frac{(Número\ de\ placas\ de\ lisis) \times (Factor\ de\ dilución)}{Volumen\ de\ la\ alícuota}$$

UFP: Unidades Formadoras de Placas

Factor de dilución: Inversa de la dilución

5.1.4 Caracterización biológica del bacteriófago aislado con potencial uso biotecnológico

5.1.4.1 Determinación del rango de hospederos

Las cepas bacterianas que integran la colección del Laboratorio de Virología Clínica y Molecular utilizadas para esta prueba se mantuvieron en Caldo Trypticase Soya (TSB; MERCK) con glicerol al 20 % a – 20 °C y al momento de utilizarlas se reactivaron sembrando en TSB a 37 °C durante 24 a 48 horas. Se verificó la viabilidad y pureza a cada cepa, para ello, se estriaron en placas con TSA y se incubaron a 37 °C durante 24 a 48 horas. Se seleccionaron las colonias con morfología típica y se procedió con lo explicado anteriormente con *Salmonella* Infantis para obtener cultivos en fase exponencial. Para los otros serovares de *Salmonella* se realizó el mismo procedimiento, pero utilizando Agar XLD.

Las cepas bacterianas utilizadas fueron *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, *Enterobacter cloacae* ATCC 13047, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Klebsiella oxytoca* ATCC 13182, *Serratia marcescens* ATCC 43862, *Enterococcus faecium* ATCC 35667, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Streptococcus bovis* ATCC 33317 , *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, *Escherichia coli* ATCC 13706, *Escherichia coli* ATCC 25922 y los serotipos de *Salmonella* utilizados fueron *Salmonella* Typhimurium (n = 3), *Salmonella* Corvallis, *Salmonella* Tennessee, *Salmonella* Heidelberg (n = 4) y *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotipo Infantis MDR. Se prepararon los céspedes bacterianos diseminando 100 µl de cultivo de cada bacteria en fase exponencial sobre placas de ATS. Para determinar el rango de hospederos, se colocó 10 µl de suspensión

de fagos ($\approx 1 \times 10^8$ UFP/ml) sobre cada placa con el césped bacteriano a evaluar. Se dejaron absorber las gotas, se invirtieron las placas y se incubaron a 37 °C por 24 horas. Todas las zonas con aclaramiento limpio se consideraron positivos luego de la incubación (Bao *et al.*, 2011).

5.2.4.2 Determinación de la Multiplicidad de Infección (MOI)

Se evaluó la capacidad lítica del bacteriófago aislado a diferentes multiplicidades de infección (MOI) que va desde 0,001; 0,01 y 0,1. Para ello se realizaron modificaciones en el protocolo de Jung y cols. (2017); se enfrentó 1 ml de cultivo de *Salmonella* Infantis MDR a una concentración de 1×10^8 UFC/ml ($D_{600} = 0.56$) con 1 ml de filtrado de fago a concentraciones de 10^5 ; 10^6 y 10^7 UFP/ml en 8 ml de TSB. Luego todos los enfrentamientos se incubaron a 37 °C durante 4 horas. Posterior a la incubación, se centrifugaron a 7353 x g por 10 minutos, se filtró el sobrenadante con membranas de 0,22 μ m y se determinó el título de cada enfrentamiento con la técnica de la bicapa de Adams (1959). La MOI con la concentración más alta, obtenido del promedio de 3 repeticiones, se consideró como la óptima Multiplicidad de infección.

5.2.4.3 Curva de un paso

Se realizó lo pautado por Huang y cols. (2018) e Islam y cols. (2020) con modificaciones. A partir de un cultivo de toda la noche de la bacteria huésped, se transfirió 100 μ l a un nuevo tubo con TSB y se incubó a 37 °C hasta alcanzar la fase exponencial ($D_{600nm} = 0.56$). Se mezcló 1 ml de este cultivo bacteriano con 1 ml de lisado de fago puro hasta obtener una multiplicidad de infección (MOI) de 0,01, se homogenizó y se dejó absorber durante 10 min a 37 °C. A continuación, la mezcla se centrifugó a 7353 x g durante 3 minutos, se descartó el sobrenadante cuidadosamente y el sedimento fago-bacteria se resuspendió en 1 ml de TSB. Se homogenizó y se transfirió 100 μ l de esta suspensión a 100 ml de TSB precalentado y se incubó a 37 °C durante 1 hora. Se retiraron dos alícuotas de 100 μ l en intervalos de 10 minutos para determinar el título de fagos mediante el método de la bicapa de agar de Adams (1959) para obtener una curva de crecimiento de un solo paso, incubando las placas a 37 °C durante 24 horas. El periodo de latencia se definió como el intervalo de tiempo entre la adsorción (sin incluir la pre incubación de 10 min) y el comienzo de la explosión (Bao *et al.*, 2011). El tamaño de la explosión se obtuvo mediante la relación entre el número final y el número inicial de unidades formadoras de placas (Middelboe *et al.*, 2010).

5.2.5 Caracterización fisicoquímica del bacteriófago aislado con potencial uso biotecnológico

5.2.5.1 Estabilidad térmica

Para evaluar la estabilidad a diversas temperaturas se realizó el método empleado por Huang y cols. (2018) y Jung y cols. (2017), con modificaciones. Se colocaron 1,2 ml del stock puro de bacteriófago ($3,6 \times 10^9$ UFP/ml) en tubos de microcentrifuga por duplicado y se colocaron en un baño de agua a la temperatura correspondiente (40, 50, 60, 70 y 80 °C). Luego se tomaron muestras cada 10 minutos durante 1 hora. Después del tratamiento térmico, se procedió inmediatamente con la determinación de los fagos viables usando *Salmonella* Infantis multidrogo-resistente como hospedero con la técnica de la bicapa de agar de Adams (1959). Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 horas y se determinó el título de fagos.

5.2.5.2 Estabilidad a diferentes valores de pH

De acuerdo con Huang y colaboradores (2018), para determinar la estabilidad a pH se mezclaron en proporción 1:10 el lisado puro de bacteriófago (10^9 UFP/ml) con solución salina estéril (NaCl 0,9 % p/v) a diferentes valores de pH (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11) ajustados con NaOH 1M o HCl 1,5M y se incubaron a 37 °C durante 1 hora. Como control negativo se mezcló el lisado de bacteriófago con solución salina sin variar el pH. Luego de la incubación, se restituyeron a pH 7 todas las muestras evaluadas y se determinó el título del fago usando la cepa diana como hospedero con la técnica de la bicapa de agar de Adams (1959). El ensayo se realizó por duplicado.

5.2.5.3 Sensibilidad al cloroformo

La evaluación de la sensibilidad al cloroformo se realizó de acuerdo a lo pautado por Chénard y cols. (2015). En un tubo de microcentrifuga con 500 µl de cloroformo químicamente puro, se agregó 500 µl de suspensión puro del bacteriófago (10^9 UFP/ml) y se agitó por inversión durante 1 hora a temperatura ambiente. Para remover el cloroformo se procedió a centrifugar a 4100 x g por 5 minutos a fin de recuperar la fase acuosa en un tubo estéril de microcentrifuga. Posteriormente, se mantuvo esta fase dentro de una cabina de bioseguridad tipo A2 durante 6 horas para eliminar residuos de cloroformo. Se utilizaron 2 controles mezclando 500 µl de suspensión del bacteriófago con 500 µl de solución salina (0,85 % p/v) y se aplicó el procedimiento descrito anteriormente. El ensayo se realizó por triplicado y se determinó la concentración de fagos mediante la técnica de la bicapa de agar de Adams (1959).

5.2.5.4 Temperatura de almacenamiento

Para precisar una temperatura que permita reservar la suspensión del bacteriófago en un transcurso de tiempo determinado, se realizó la metodología de Wong (2014) con algunas modificaciones. Se racionó la suspensión del fago de una concentración de $7,6 \times 10^8$ UFP/ml en 3 tubos estériles de microcentrifuga y se determinó el título inicial. Luego, cada tubo se almacenó a 25, 4 y -20 °C, respectivamente. El almacenamiento duró 4 meses y una vez cumplido el tiempo, se atemperaron los tubos y se determinó el título final de la suspensión del fago mediante la técnica de la bicapa de agar de Adams (1959). Cada ensayo se realizó por duplicado.

5.2.6 Análisis estadístico

Se utilizó el Software Microsoft Excel para el desarrollo de las tablas y de las gráficas que expliquen la curva de un paso, la termoestabilidad, la resistencia a la acidez, resistencia al cloroformo y cálculo de la MOI.

VI. RESULTADOS

6.1 Reactivación de cepa huésped

Se reactivó una cepa clínica de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotipo Infantis Multidrogo-resistente almacenada en el Laboratorio de Virología clínica y Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas (Figura 6); 13 cepas de referencia de los géneros *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas* y *Escherichia*; y 4 serovariedades diferentes del género *Salmonella*.



Figura 6. Colonias típicas de *Salmonella* en Agar Xilosa Lisina Desoxicolato.

6.2 Curva de crecimiento de *Salmonella* Infantis MDR

En la Figura 7 se presenta la curva de crecimiento de *Salmonella* Infantis MDR donde se correlaciona la absorbancia a 600 nm y el logaritmo neperiano (Ln) de las Unidades Formadoras de Colonia por mililitro (UFC/ml) versus el tiempo en horas. Las flechas indican los puntos donde se encuentra en fase logarítmica, siendo entre las 3 y 7 horas posterior al inicio del experimento; y siendo en 8 horas el punto donde alcanza la fase estacionaria. Al mismo tiempo, observando la correlación de la D.O versus el tiempo

(horas), la fase logarítmica comienza a las 5 horas y termina a las 8 horas, a partir de la cual entra en fase estacionaria ya que conserva la D.O a las 9 y 10 horas.

Utilizando los puntos donde se encuentra en la fase logarítmica, donde la concentración es de aproximadamente de 10^8 UFC/ml entre las 3 y 7 horas; se corrigieron los valores de las D.O y del Ln de las concentraciones (UFC/ml) como referencia para la realización de los experimentos (Figura 8).

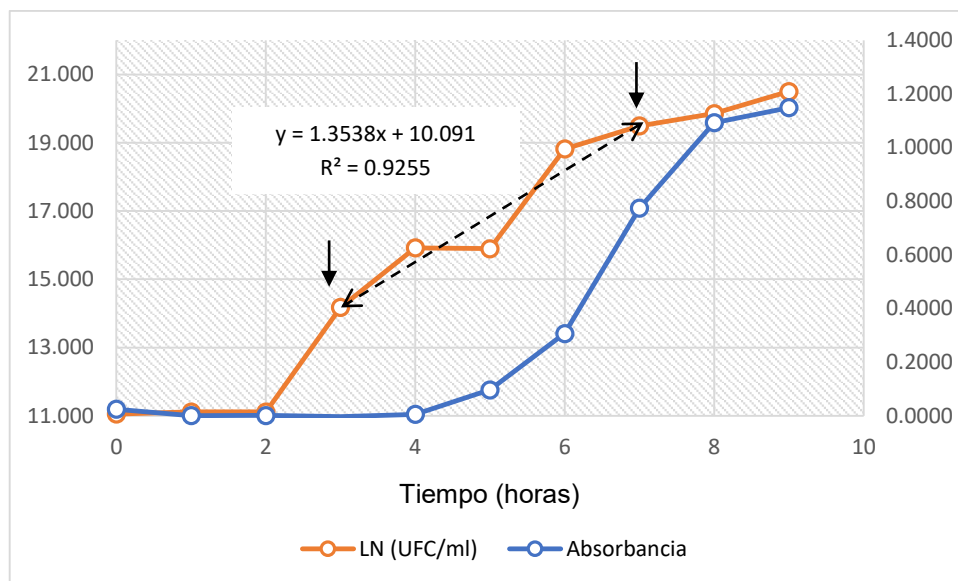


Figura 7. Curva de crecimiento de *Salmonella Infantis* Multidrogo-resistente. Se muestran los datos para la concentración bacteriana en Ln UFC/ml (naranja) como de la absorbancia a 600 nm (azul). Las flechas indican el inicio y el final de la fase logarítmica.

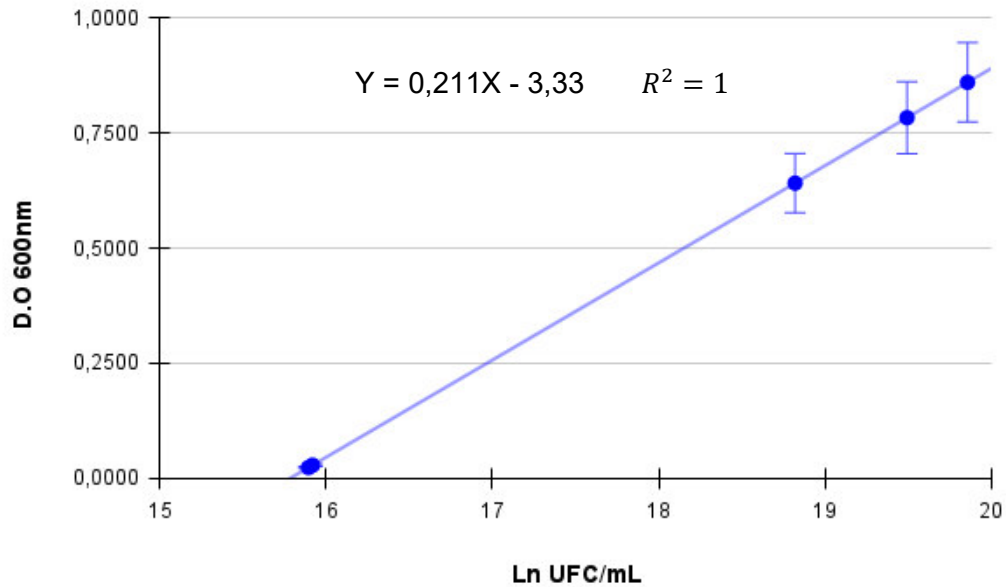


Figura 8. Absorbancia del cultivo bacteriano a 600 nm de longitud de onda versus el logaritmo neperiano de la concentración bacteriana (UFC/ml) de *Salmonella* Infantis MDR.

6.3 Aislamiento y purificación de bacteriófagos

De un total de 100 muestras, en 87 de ellas se detectaron la presencia bacteriófagos debido a la formación de aclaramientos turbios o limpios y en 13 muestras no se detectó presencia de fagos capaces de infectar a *Salmonella* Infantis MDR. La Tabla 5 muestra la relación entre los bacteriófagos detectados por la técnica del goteo y el lugar de procedencia.

Además, la prueba del goteo permitió detectar la presencia de bacteriófagos en las diferentes muestras luego del enriquecimiento. En la Figura 9 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 5. Relación de los bacteriófagos detectados por la técnica del goteo y el lugar de procedencia.

DISTRITO	Presencia de bacteriófagos en muestras	
	Positivos	Negativos
Ancón	10	0
Puente Piedra	14	0
Comas	13	2
Carabaylo	7	1
Los Olivos	5	2
San Martín de Porres	10	1
Ventanilla	10	1
Villa El Salvador	14	2
San Juan de Lurigancho	4	1
San Juan de Miraflores	0	3
TOTAL	87	13

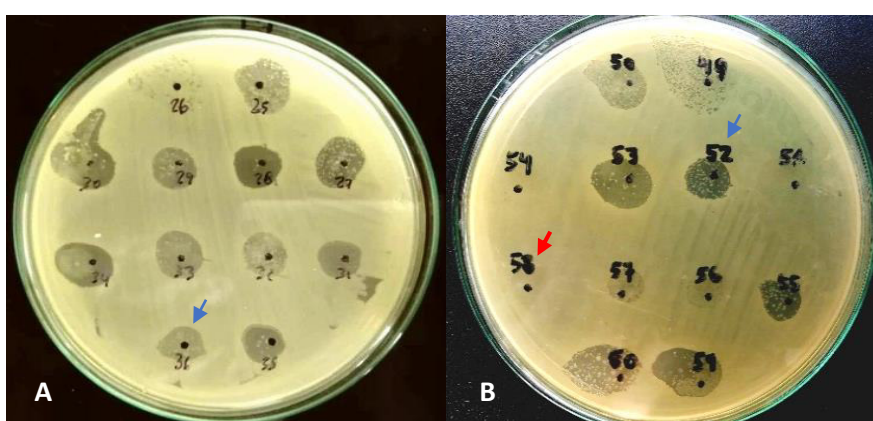


Figura 9. Detección cualitativa de fagos en las muestras. Las flechas indican: A) manchas con aclaramientos turbios B) Azul: manchas con aclaramientos limpios, rojo: mancha sin ningún aclaramiento (muestra negativa).

La muestra 52 (Ventanilla), 21 (San Juan de Lurigancho) y 33 (Puente Piedra) no formaron aclaramientos turbios en la prueba del goteo. Además, en la Figura 10 se observan los resultados obtenidos de la actividad litica en caldo (visualizado por medio de la turbidez) de algunas muestras que contienen fagos frente a la cepa diana.

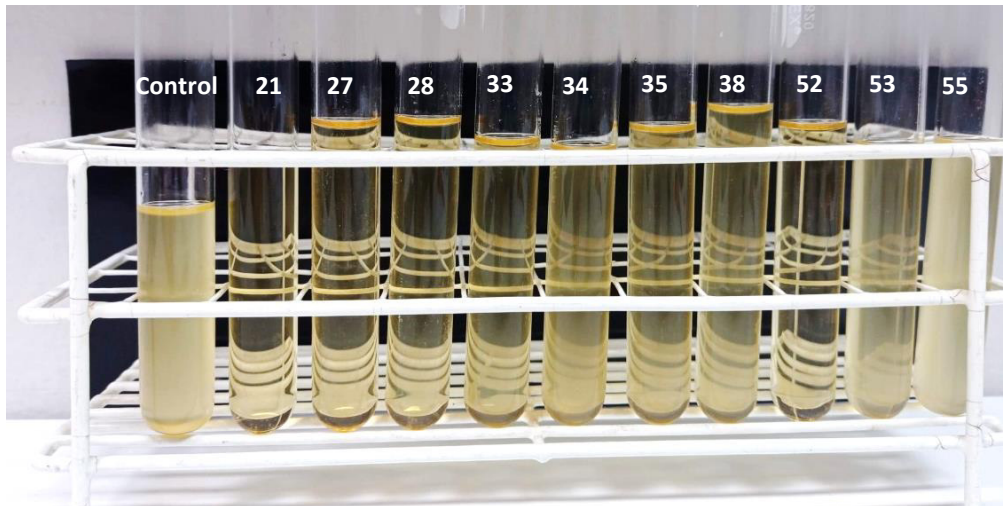


Figura 10. Enfrentamientos fago-bacteria en proporción 1:1 a 1 hora de incubación. Se observa el impedimento del crecimiento de la bacteria debido a la presencia de bacteriófagos en comparación con el tubo control. Las muestras están sin purificar.

La Figura 11 muestra el resultado de la purificación luego de 4 pases consecutivos para asegurar un fago único. Posteriormente, se aumentó la concentración del bacteriófago 52 como reserva para la siguientes pruebas y se conservó a 4 °C. Las placas de lisis observadas tienen en promedio un diametro de 4 milímetros (mm) y con formación de halos turbios. La Figura 12 muestra la prueba del goteo de la suspensión purificada del fago 52 donde se puede observar un aclaramiento limpio del césped bacteriano.

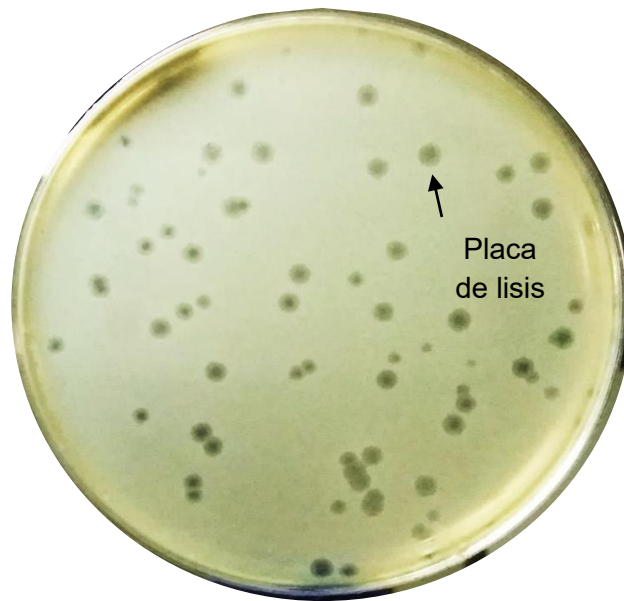


Figura 11. Placas de lisis del fago 52 obtenidas por medio de la técnica de la bicapa de agar.

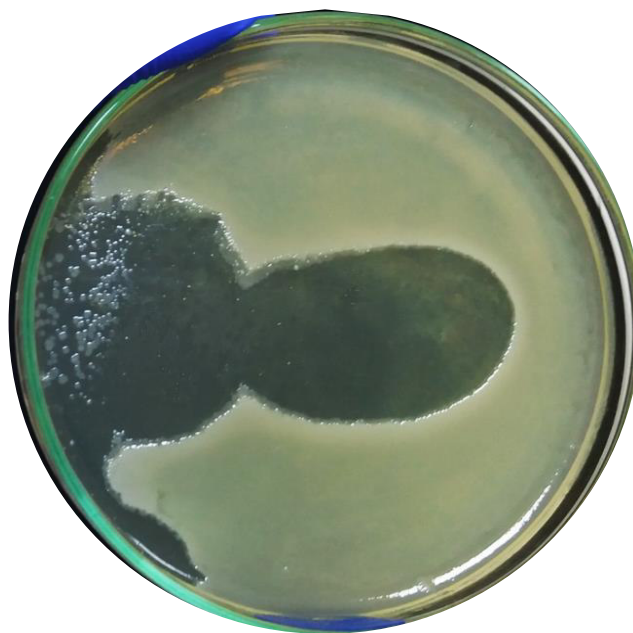


Figura 12. Prueba del goteo del bacteriófago 52 luego de la purificación. Se observa un aclaramiento limpio del césped bacteriano.

6.4 Caracterización biológica del bacteriófago aislado con potencial uso biotecnológico

6.4.1 Rango de hospederos

El rango de hospederos de los 3 bacteriófagos se determinó mediante la técnica del goteo usando varias serovariedades de *Salmonella*, así como también otras cepas bacterianas ya mencionadas en la metodología. Los 3 bacteriófagos aislados (21, 33 y 52) fueron capaces de lisar específicamente a su bacteria hospedera, *Salmonella* Infantis MDR, ya que formaron placas claras. Ninguno pudo infectar otras serovariedades de *Salmonella*. (Tabla 6).

6.4.2 Multiplicidad de Infección (MOI)

Después de incubar durante 4 horas, el título del bacteriófago 52 resultó en $1,38 \times 10^9$, $2,02 \times 10^9$ y $4,73 \times 10^9$ UFP/ml para una MOI de 0,1; 0,01 y 0,001 respectivamente (Figura 13). Por lo tanto, la multiplicidad óptima de infección del bacteriófago 52 fue de 0,001. Sin embargo, no hubo diferencia significativa entre los 3 valores de MOI ya que se encuentran en la misma escala logarítmica.

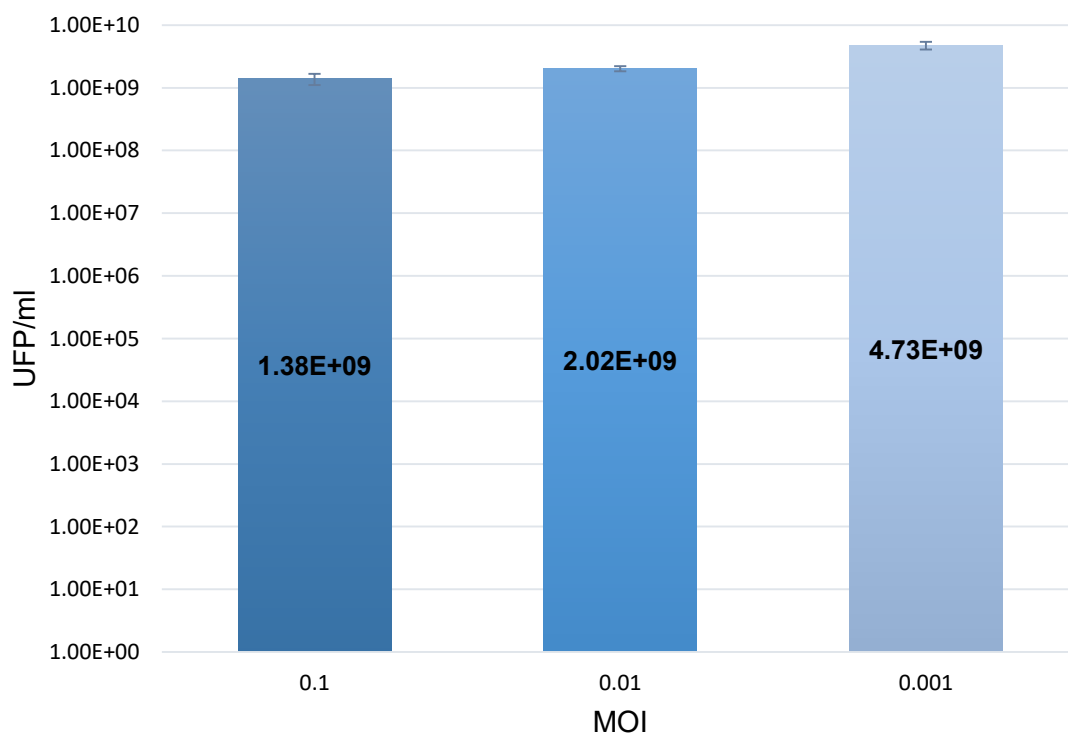


Figura 13. Concentración final de bacteriófagos a diferentes MOI. El valor de MOI óptima fue de 0,001. Los resultados mostrados son el promedio de 3 repeticiones \pm la desviación estándar.

Tabla 6. Rango de hospederos de bacteriófagos aislados.

Bacteria hospedera	Bacteriófagos aislados		
	21	33	52
<i>Salmonella</i> Infantis MDR	+	+	+
<i>Salmonella</i> Corvallis	-	-	-
<i>Salmonella</i> Typhimurium	-	-	-
<i>Salmonella</i> Typhimurium	-	-	-
<i>Salmonella</i> Typhimurium	-	-	-
<i>Salmonella</i> Tennessee	-	-	-
<i>Salmonella</i> Heidelberg	-	-	-
<i>Salmonella</i> Heidelberg	-	-	-
<i>Salmonella</i> Heidelberg	-	-	-
<i>Salmonella</i> Heidelberg	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	-	-	-
<i>Klebsiella oxytoca</i> ATCC 13182	-	-	-
<i>Enterococcus faecium</i> ATCC 35667	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	-	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 10145	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 13706	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-	-	-
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	-	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 13047	-	-	-
<i>Serratia marcescens</i> ATCC 43862	-	-	-
<i>Streptococcus bovis</i> ATCC 33317	-	-	-

(+): Mancha clara en el área inoculada; (-): sin formación de placa

ATCC = American Type Culture Collection; MDR = Multidrogo-resistente

6.4.3 Curva de un paso

La curva de crecimiento de un paso del bacteriófago 52 con *Salmonella* Infantis MDR como hospedero y con una MOI de 0,01; mostró un periodo de latencia de 10 minutos, a partir del cual empieza la fase de elevación y termina a los 30 minutos. El tamaño de explosión se determinó mediante la relación del título de fagos al final y al inicio, siendo de aproximadamente 32,93 UFP/célula (Figura 14).

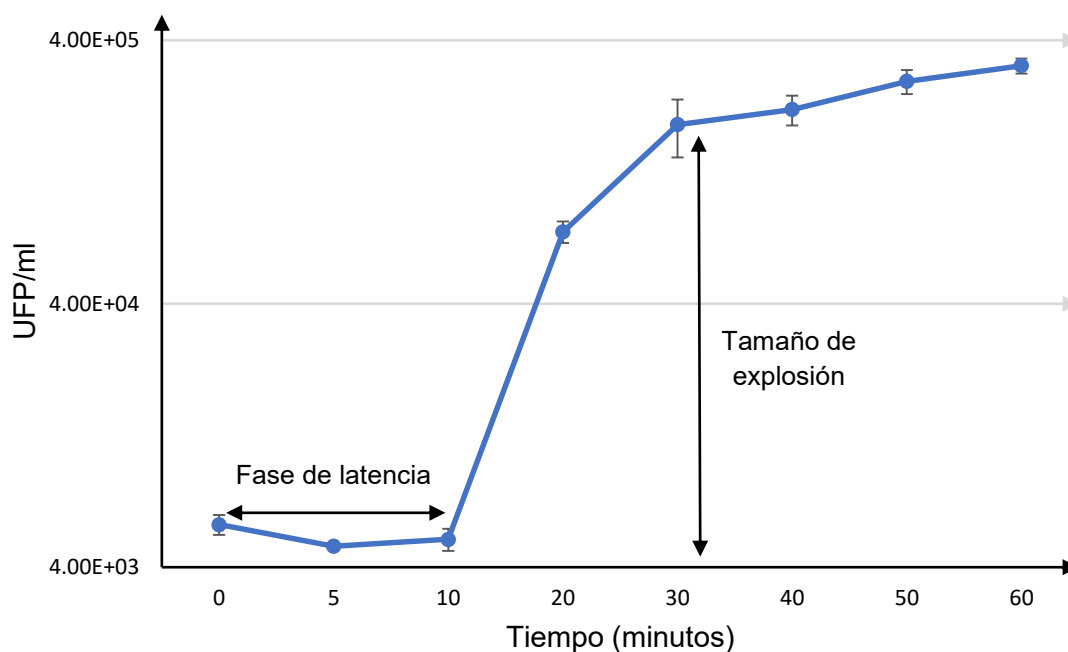


Figura 14. Curva de un paso del bacteriófago 52. Se muestra el promedio de dos repeticiones realizadas \pm la desviación estándar.

6.5 Caracterización fisicoquímica del bacteriófago aislado con potencial uso biotecnológico

6.5.1 Estabilidad térmica

Para la prueba de estabilidad térmica, el título inicial de fagos se ajustó a $3,6 \times 10^9$ UFP/ml. El título del bacteriófago se mantuvo estable a 40 °C, 50 °C y 60 °C a través del tiempo durante 60 minutos. Cuando se expuso a 70 °C, hubo una reducción de 1.93 logaritmos a los 10 min, mientras que a los 30 y 60 min se redujo 5.12 y 6.77 escalas logarítmicas, respectivamente. A la temperatura de 80 °C, el título del fago se redujo a cero a los 10 min de incubación (Figura 15).

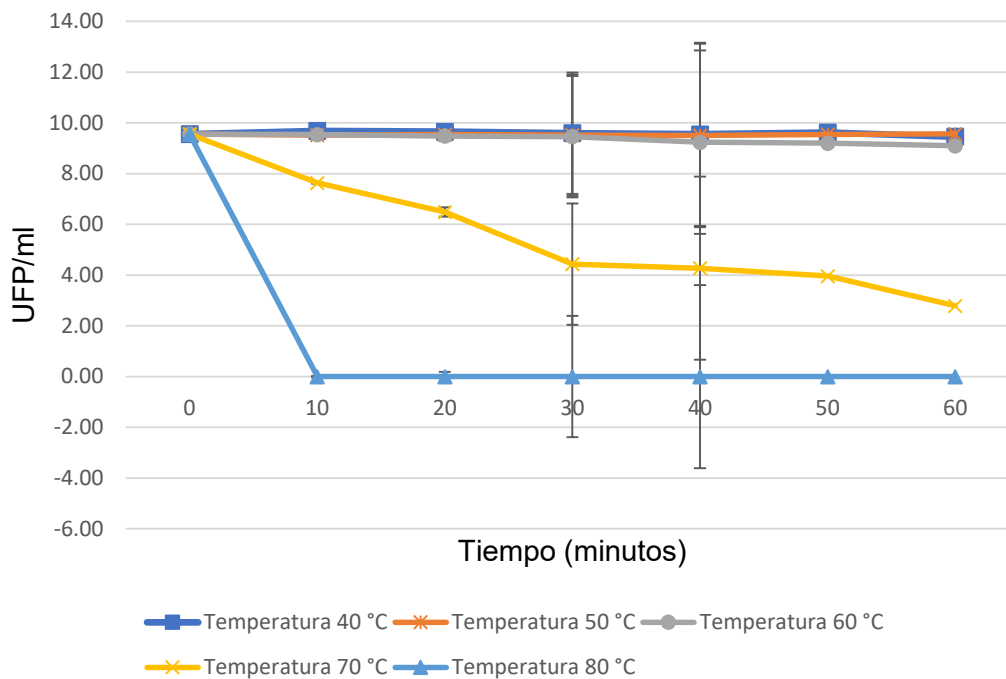


Figura 15. Estabilidad del bacteriófago 52 a través del tiempo según la temperatura a la que se expuso. Valor medio de 2 repeticiones \pm la desviación estándar.

La Figura 16 muestra que el bacteriófago es estable a la temperatura de 40 °C y 50 °C. A 60 °C tuvo solo una pequeña reducción, siendo $1,25 \times 10^9$ UFP/ml el título final. Se observó una disminución de 6.77 escalas logarítmica cuando se incubó a 70 °C durante 60 minutos con un título final de $6,14 \times 10^2$ UFP/ml. Mientras que a 80 °C hubo una inactivación total de las partículas virales cuando se incubó por el mismo tiempo.

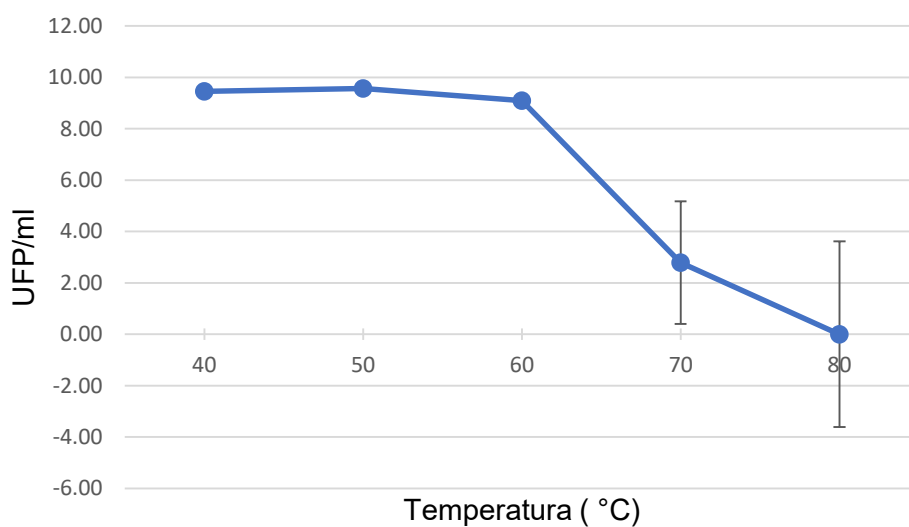


Figura 16. Estabilidad del bacteriófago a diferentes temperaturas de exposición. Se observa una reducción del título a 70 °C y una inactivación total del fago a 80 °C.

6.5.2 Estabilidad a diferentes valores de pH

Se expuso el bacteriófago 52 a diferentes valores de pH y así poder conocer qué valores pueden afectar su infectividad. Luego de 1 hora de incubación, se observa que no se afecta la concentración del fago a los pH de 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10.

A un pH mucho más ácido como 2 y a un pH mucho más alcalino como 11, se observa una reducción de 6 y 3 escalas logarítmicas, respectivamente. Siendo la concentración final de $1,7 \times 10^3$ UFP/ml y de $6,05 \times 10^6$ UFP/ml para la exposición a pH 2 y 11, respectivamente (Figura 17).

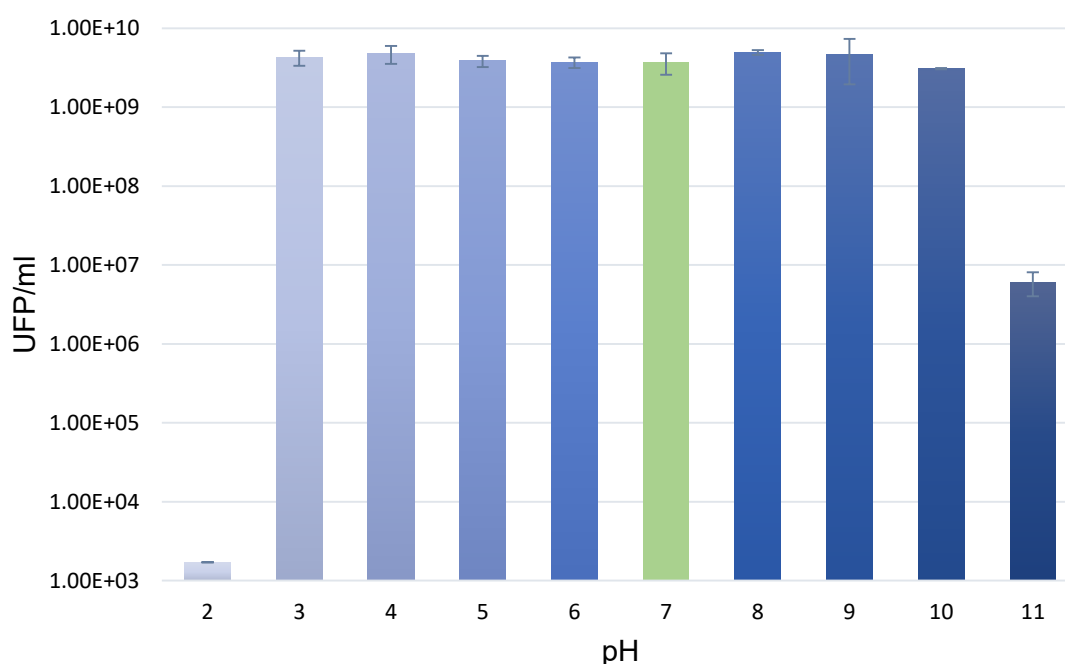


Figura 17. Estabilidad a diferentes valores de pH del fago 52. En verde son los resultados de la muestra control (pH 7). Los datos mostrados son el promedio de dos repeticiones \pm la desviación estándar.

6.5.3 Sensibilidad al cloroformo

La suspensión del bacteriófago 52 no fue afectado por el cloroformo químicamente puro tras exponerlas durante 1 hora. En la figura 18 se observa que el título de fagos luego de exponerlos al cloroformo (azules) se mantiene a comparación de los controles (verde). Para hallar el valor real de la muestra control, se multiplicó por 2 al título final debido a que estaba expuesto con solución salina (solución hidrofílica) razón por la cual la muestra se diluyó a la mitad. Para las muestras con cloroformo, estas no estaban diluidas pues es un químico hidrofóbico y por lo tanto el título final de fagos era el real.

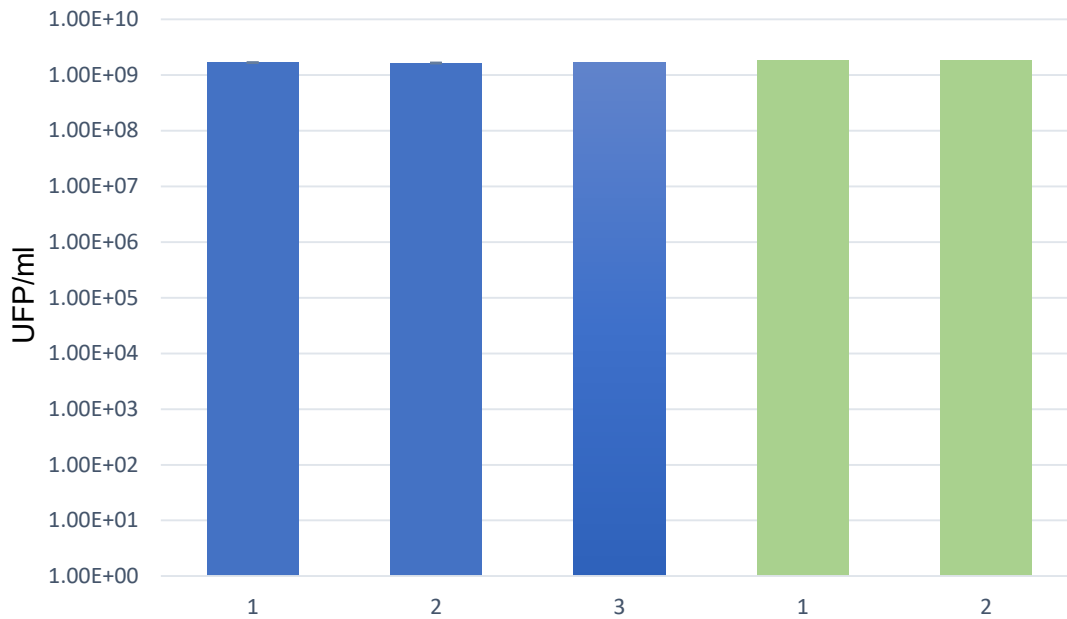


Figura 18. Sensibilidad al cloroformo del fago 52. Las barras azules muestran que se mantiene la concentración de fagos luego de exponerlas al cloroformo, al igual que las muestras controles en verde. Los números indican la repetición del ensayo de sensibilidad.

6.5.4 Temperatura de almacenamiento

Transcurrido los 4 meses almacenados a las temperaturas de 25, 4 y – 20 °C se halló que hubo una reducción de hasta 77,37% para el fago 52. La Figura 19 muestra que siendo el título inicial de $7,6 \times 10^8$ UFP/ml, a la temperatura de 4 y – 20 °C no hubo mucha diferencia en la reducción, siendo el título final de $5,4 \times 10^8$ UFP/ml y $5,6 \times 10^8$ UFP/ml, respectivamente. Y, por lo tanto, ambas temperaturas de almacenamiento son donde las suspensiones de fagos permanecen más estables en el tiempo. Mientras que a 25 °C el título cayó hasta $1,72 \times 10^8$ UFP/ml. El porcentaje de reducción de las 3 temperaturas de almacenamiento fue de 77,37%, 28,95% y 26,32% para 25, 4 y – 20 °C, respectivamente.

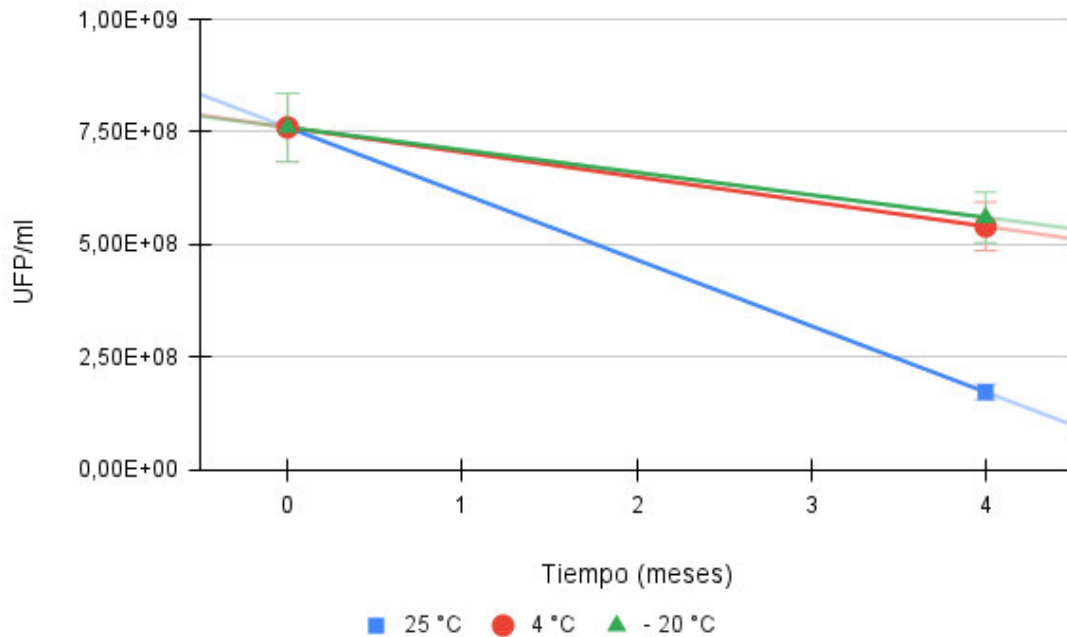


Figura 19. Concentración del fago en diferentes temperaturas de almacenamiento. En la temperatura de 25 °C se percibe la mayor disminución en la concentración del título del fago.

Como parte de los resultados preliminares de la secuenciación del fago 52 perteneciente al proyecto “Búsqueda y caracterización biológica de virus para la utilización en terapia fágica contra *Salmonella* spp. multidrogo-resistentes y causantes de infecciones intrahospitalarias como una alternativa al tratamiento antibiótico”, hallaron que el fago 52 es de ADN con un tamaño de genoma de 38.942 pb, con un contenido promedio de G+C del 48,67 % y que, además, presenta similitud de secuencia de genoma completo con otros fagos de *Salmonella*: *Salmonella* phage BP12A, *Salmonella* phage vB_SalM-LPST153 y *Salmonella* phage LPST144; con números de acceso KM366096.1, MK907285.1 y MN252582.1, respectivamente. Todos pertenecientes al orden Caudovirales y a la familia *Autographiviridae*.

La Tabla 7 muestran los resultados obtenidos utilizando el paquete NCBI Nucleotide BLAST para hallar similitudes de secuencias de genoma completo con otros bacteriófagos, incluyéndose, además, la longitud del genoma completo y el % de G+C.

Tabla 7. Análisis BLAST del genoma completo del fago 52 utilizando la base de datos NCBI NT, longitud del genoma y % de G+C.

Nombre científico	Salmonella phage BP12A	Salmonella phage vB_SalM-LPST153	Salmonella phage LPST144
Max Score	12857	12767	12761
Total Score	41446	40157	39993
Query Cover	83%	82%	82%
E-value	0,0	0,0	0,0
% Identidad	88,18	87,95	87,94
N° de Acceso	KM366096.1	MK907285.1	MN252582.1
Longitud del genoma (pb)	39.696	39.176	39.050
% G+C	-	49,1	49,08

- : No hay registro a la fecha

VII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Se estima que *Salmonella* no tifoidea es uno de los patógenos transmitidos por alimentos que ocasiona 93.757.000 casos de gastroenteritis y 155.000 muertes anualmente (Majowicz *et al.*, 2010). Dentro del grupo de *Salmonella* no tifoideas se encuentra la serovariedad Infantis y se ha podido aislar tanto en animales como en humanos.

Salmonella Infantis ha sido reportada como el cuarto serovar más prevalente en infecciones humanas por *Salmonella* no tifoideas en Europa (EFSA y ECDC, 2018) mientras que en el Perú se ubica como la serovariedad más frecuente (Quino *et al.*, 2020). Sumando a ello, la multidrogo-resistencia de *Salmonella* Infantis ya ha sido reportado en diversas partes del mundo (Busani *et al.*, 2004; Liebana *et al.*, 2004; Nógrády *et al.*, 2007; Gal-Mor *et al.*, 2010; Noda *et al.*, 2010; Dionisi *et al.*, 2011; Franco *et al.*, 2015; Ghoddusi *et al.*, 2015; Hindermann *et al.*, 2017; Mateja *et al.*, 2019) incluyendo en el Perú (Martínez-Puchol *et al.*, 2020; Quino *et al.*, 2020; Quino *et al.*, 2019 y Zamudio *et al.*, 2011).

La presencia de *Salmonella* Infantis en parvadas y carne de pollos de engorde se reporta frecuentemente en Europa, representando el 46.5% y 50.6%, respectivamente (EFSA y ECDC, 2018). Mientras que en los Estados Unidos se monitoreó un brote multiestatal de infecciones por *Salmonella* Infantis vinculado a productos de pollo crudo (Center for Disease Control and Prevention [CDC], 2019) lo cual, deja en evidencia que la cepa se ha extendido en la industria avícola y ha causado infecciones en los humanos, representando una grave amenaza a la salud.

Se sabe que la presencia de bacteriófagos se relaciona estrechamente con su huésped natural (Akhtar *et al.*, 2014) y debido a la problemática ya mencionada, en este estudio se aislaron 3 bacteriófagos de *Salmonella* Infantis MDR a partir de muestras de intestino de pollos, ya que la bacteria huésped es un habitante natural del tracto gastrointestinal de los animales.

Se analizaron 100 muestras de intestino de pollo procedentes de diferentes mercados de Lima y se encontró que en 87 muestras se detectaron bacteriófagos específicos de *Salmonella* Infantis MDR mediante la prueba del goteo debido a la formación de manchas turbias o claras sobre el césped bacteriano. Luego, se seleccionaron las muestras que formaban manchas más claras, se observó en caldo qué tanto impedía el crecimiento bacteriano por turbidez y se seleccionaron 3 muestras para purificar los

bacteriófagos líticos. Luego de la purificación de las 3 muestras, se aislaron 3 fagos líticos cuyas placas de lisis eran claras y diferentes en diámetro, pero todas con un rango estrecho de hospedero, ya que sólo infectaron la cepa de *Salmonella* Infantis MDR. Estos resultados concuerdan con varios estudios donde demuestran que los bacteriófagos de *Salmonella* se pueden aislar de diferentes fuentes y su capacidad de infectar otras serovariedades, así como a otros géneros bacterianos, pueden variar. Ibrahim (1969), reportó que las muestras fecales son la fuente menos diversa, pues solo portaban fagos de *Salmonella* Typhimurium y además no mostraron una amplia gama de huéspedes. Además, en el estudio de Callaway y cols. (2010) encontraron que fagos activos contra *Salmonella* Typhimurium, aislados de heces de granjas porcinas comerciales, tenían un espectro de actividad muy estrecho sin poder infectar a otros serotipos. En el estudio realizado por Jung y cols. (2017) encontraron especificidad en 6 bacteriófagos, pero solo una mostró mayor actividad lítica contra 3 cepas de *Salmonella* Typhimurium incluyendo una cepa resistente inducida por ciprofloxacino y no especificidad frente a un aislado clínico resistente a antibióticos. Por el contrario, en muestras fecales de diversas fuentes, O'Flynn y cols. (2006) reportaron que un fago tenía el más amplio rango de hospederos en 6 serovariedades de *Salmonella* a diferencia de los otros dos fagos aislados que infectaron al menos 3 serovariedades. Por otro lado, Akhtar y cols. (2014) halló que los fagos más diversos y de amplia gama de hospedadores se encontraron en las aguas residuales.

Los receptores en la superficie celular involucrados en la especificidad de unión de los bacteriófagos en la célula huésped, son los pilis bacterianos, flagelos, capa mucosa, polisacáridos capsulares, lipopolisacáridos y proteínas de la membrana externa (Rakhuba *et al.*, 2010). Aún no se comprende completamente los detalles moleculares de las interacciones entre los bacteriófagos y los receptores del hospedador que son los responsables de la especificidad (Shin *et al.*, 2012). Sin embargo, se sabe que una cepa de bacteriófago específico tiene la capacidad de infectar un número reducido de huéspedes bacterianos, una especie o una cepa en concreto (Rakhuba *et al.*, 2010).

Se puede inferir que la especificidad de los fagos 21, 33 y 52 tiene como ventaja la incapacidad de afectar a la microbiota natural del huésped, y a la vez puede representar un problema para controlar patógenos eficazmente. Sin embargo, una posible solución que ayude a superar este problema sería aplicarlos mediante cocteles de fagos y aumentar de esta manera el rango de actividad lítica.

Una característica distintiva del fago 52, es la presencia de halos turbios en los bordes de las placas de lisis; resultado que concuerda con el bacteriófago de *Salmonella* spp.

aislado por Islam y cols. (2020), los fagos de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina aislado por Dakheel y cols. (2019) y el fago de *Klebsiella pneumoniae* resistente a múltiples fármacos aislado por Wu y cols. (2019). Dichos halos indican la difusión de las moléculas enzimáticas del fago y que podrían ser eficaces para dispersar las biopelículas bacterianas (Dakheel *et al.*, 2019). Los fagos tienen la capacidad de degradar la matriz de los polisacáridos extracelulares (EPS) de las biopelículas debido a la producción de polisacáridos despolimerasas (Donlan R. 2009) siendo una característica de mucho interés en el área de la biotecnología. Debido a ello se seleccionó sólo al fago 52 para la caracterización biológica biológica y fisicoquímica.

Un dato importante a conocer antes de hablar de la concentración de bacterias a infectar y la multiplicidad de infección (MOI) es conocer la cinética de crecimiento de la bacteria huésped ya que permite determinar la fase de crecimiento exponencial o etapa donde se realizan las infecciones (Muñoz *et al.*, 1979). Asimismo, conocer la relación entre la densidad celular y la densidad óptica del huésped bacteriano, además de conocer el título de la suspensión de fagos, permitirá limitar la interacción entre fago-bacteria a un solo ciclo de infección en la curva de un paso (Middelboe *et al.*, 2010). Con el recuento de Unidades Formadoras de Colonia por ml (UFC/ml), se observó que la fase exponencial está entre las 3 y 7 horas; mientras que con la densidad óptica se detectó entre las 5 y 8 horas. Por ello, se halló la correlación entre las UFC/ml y la D.O, obteniendo que a una densidad óptica de 0,56 en caldo Tripticasa soya a una longitud de onda de 600 nm es equivalente a una concentración de $1,02 \times 10^8$ UFC/ml. Resultados que se asemejan a lo reportado por Huang y cols. (2018) para una cepa de *Salmonella* Enteritidis y Bao y cols. (2011) para una cepa de *Salmonella* Pullorum con una $D_{600nm} = 0,5$.

Estos datos permitieron conocer el momento en que las bacterias deben ser infectadas y con qué concentración de bacteriófagos. De hecho, la multiplicidad de infección se entiende como la relación entre el número de fagos (UFP/mL) y el número de bacterias huéspedes (UFC/mL). Al enfrentar fago-bacterias a diferentes MOI dio como resultado, variaciones en la concentración final de fagos luego de la incubación. Estas resultaron en $1,38 \times 10^9$; $2,02 \times 10^9$ y $4,73 \times 10^9$ UFP/ml para una MOI de 0,1; 0,01 y 0,001, respectivamente. En efecto, las diferentes MOI varían la capacidad que poseen los bacteriófagos de lisar bacterias (Jeon y Ahn, 2021). Las tres MOI realizadas aumentaron la concentración inicial de fagos en 2, 3 y 4 órdenes de magnitud, respectivamente; razón por la cual la MOI óptima para el fago 52 es de 0,001. Esto significa que el fago 52 necesita de menos fagos por bacteria para poder multiplicarse en mayor proporción. En el área de producción y comercialización a gran escala de productos de fagos es

muy ventajoso una proporción baja de MOI ya que se reduciría los costos relacionados a la preparación, purificación y aplicación del producto de fagos (Wong *et al.*, 2014).

Por lo general, para realizar la curva de crecimiento de un paso, se utiliza la MOI óptima hallada. Esta prueba permite caracterizar el ciclo de vida de los fagos debido a que su diseño permite que se dé un único ciclo de infección, es decir, que no se producirán reinfecciones por los fagos originados durante el experimento (Middelboe *et al.*, 2010). Por ello, se debe utilizar multiplicidades menores que 1 ya que evitan, por ejemplo, la adsorción múltiple, la lisis desde afuera y otros medios de interferencia relacionados con la posterior adsorción de fagos (Hyman y Abedon; 2008). De acuerdo con Middelboe y cols. (2010), se sugiere realizar la infección a valores de MOI baja entre 0,1 y 0,01, pues a mayor MOI, las células hospederas podrían ser infectadas por más de un fago con más probabilidad.

Se escogió una MOI de 0,01 para determinar el período de latencia y el tamaño de explosión del fago 52 mediante la curva de crecimiento de un paso. El periodo de latencia hallado es de 10 minutos y el tamaño de explosión es de 32,93 partículas por célula infectada. El corto período de latencia muestra que el virus se replica rápidamente dentro del huésped y que luego de 10 minutos una nueva generación se propagará. Estos resultados se asemejan a algunos fagos de bacterias multidrogo-resistentes. Por ejemplo, el fago SaFB14 tiene un tiempo de latencia de 10 minutos y un tamaño de explosión de 23 partículas por célula infectada de *Salmonella* Multidrogo-resistente (Tang *et al.*, 2018). Por otra parte, los fagos UPMK_1 y UPMK_2 de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina tienen un periodo de latencia ligeramente más extenso, siendo de 20 y 15 minutos; y con un tamaño de explosión de 32 y 67 partículas por célula infectada, respectivamente (Dakheel *et al.*, 2019). Sin embargo, en estudios anteriores para fagos de *Salmonella*, se han reportado diferentes periodos de latencia y tamaño de explosión. Los fagos LPST153 (Islam *et al.*, 2020) y S6 (Flores G., 2017) tienen el mismo tiempo de latencia de 10 min que el fago 52, pero difieren en el tamaño de explosión con 113 y 131 partículas, respectivamente. Los fagos PSPu-95 y PSPu-4-116 tienen 20 min de fase de latencia y un tamaño de explosión promedio de 77,5 y 86 UFP/célula, respectivamente (Bao *et al.*, 2011). De igual manera, el fago LPSE1 con 20 min de fase de latencia y 94 UFP/célula (Huang *et al.*, 2018). Por otra parte, Φ st1 con tiempo de latencia de 40 minutos liberó 22 partículas por centro infeccioso (Wong *et al.*, 2014). Los fagos CSP01, PHB06 y PHB07 presentaron tiempo de latencia de 30, 50 y 20 minutos; y un tamaño de explosión de 131, 147 y 489 partículas fágicas por célula infectada, respectivamente (Chen *et al.*, 2018).

Estas diferencias entre el período de latencia y el tamaño de explosión, se debe a los diferentes fagos y hospederos utilizados, así como también a las condiciones de crecimiento del mismo (Middelboe *et al.*, 2010). Así pues, se espera que el tamaño de explosión aumente cuando la célula huésped esté en fase exponencial y se encuentre con abundantes nutrientes en el medio, mientras que en condiciones pobres de nutrientes se espera lo contrario (Middelboe *et al.*, 2010).

La prueba de la estabilidad a la temperatura es un parámetro muy importante ya que permite anticipar la eficacia en su aplicación. Se sometió el bacteriófago a temperaturas de 40 °C, 50 °C, 60 °C, 70 °C y 80 °C durante 1 hora. Se obtuvo que el bacteriófago 52 tiene una moderada resistencia al calor ya que se mantiene estable a 40 °C, 50 °C y 60 °C. La estabilidad del fago disminuyó significativamente a 70 °C, resultado que se asemejan a los de Jung y cols. (2017), Huang y cols. (2018) e Islam y cols. (2020). En contraste, Bao y cols. (2011) expusieron 2 fagos a 70 °C durante 60 min y solo hubo una reducción de 0.15 logaritmos. Para la temperatura de 80 °C luego de 30 minutos de incubación, los resultados también coinciden con los estudios anteriores de fagos de *Salmonella* al no haber detección de partículas virales (Islam *et al.*, 2020; Jung *et al.*, 2017 y Bao *et al.*, 2011).

El fago 52 también mostró estabilidad robusta a valores de pH desde 3 a 10 con títulos bastante similares a los tubos control. Siendo susceptible a pH 2 y a pH 11, con una reducción de 6 y 3 escalas logarítmicas, respectivamente. Por lo general, los bacteriófagos mantienen su capacidad infectiva a valores de pH de 4 a 12. Tal es el caso de los bacteriófagos aislados por Huang y cols. (2018) donde el fago tenía resistencia a pH de 4 a 12 durante 2 horas; Bao y cols. (2011) con 2 fagos relativamente estables a pH de 6 a 9 durante 2 horas; Jung y cols. (2017) con 4 fagos estables a pH de 4 a 11 expuestos por 30 minutos; Islam y cols. (2020) estables de pH de 4 a 12 durante 1 hora y con caídas no significativas a condiciones extremadamente ácidas o alcalinas. No obstante, la resistencia a pH 3 del bacteriófago 52, se asemeja al fago PHB07 aislado por Chen y cols. (2018), donde mostró una alta tolerancia al pH ácido ya que disminuyó en 2.5 logaritmos después de 1 hora de tratamiento. El fago 52 no presentó resistencia a pH 2 lo cual concuerda con los estudios mencionados anteriormente, pero sí mostró más resistencia al pH en comparación de otros fagos de *Salmonella*. En tal sentido, el fago 52 no podría ser activo contra *Salmonella* Infantis a un pH 2 de condiciones ácidas extremas. Los bacteriófagos están presentes en ambientes relacionados con sus huéspedes, por lo tanto, serán estables a las temperaturas próximas en la que subsiste su huésped, así como a la acidez del entorno. Según Guttman y cols. (2005), la estabilidad de los fagos puede estar en rangos de pH

de 5 a 8 o incluso son estables hasta un pH de 3 o 4 y debido a ello, cada fago debe caracterizarse específicamente.

Es necesario resaltar que todas las posibles aplicaciones que pueda tener el bacteriófago van depender de su resistencia al pH. Es por ello que en el campo de la fagoterapia se han realizado estudios que permitan darle una tolerancia mejorada a las condiciones ácidas extremas y que posteriormente puedan ser aplicados oralmente. En ese mismo contexto, Dini y cols. (2011) desarrollaron matrices de biopolímeros para aumentar la resistencia de los bacteriófagos a la acidez y proteasas del tracto digestivo animal y, Nobrega y cols. (2016) manipularon fagos por ingeniería genética para conferirle resistencia a las condiciones del tracto gastrointestinal por medio de la exhibición de fosfolípidos en la superficie de los fagos.

Por consiguiente, el fago 52 tiene altas probabilidades de mantener su actividad infectiva en las condiciones probadas. Tiene una robustez amplia tanto para temperatura y pH, pudiendo ser de gran interés para diferentes aplicaciones prácticas, así como posibles usos terapéuticos.

El cloroformo es una sustancia química sumamente empleada para lisar la bacteria huésped y liberar la reserva de fagos, así como para evitar la contaminación microbiana durante la preservación de fagos. Es también utilizado para determinar el período de eclipse o el período de adsorción (Hyman y Abedon, 2008). Además, la exposición al cloroformo puede proporcionar información de si el fago contiene una capa lipídica (Pelzek *et al.*, 2013). Razón por la cual, su uso debe limitarse en fagos que tienen lípidos en su estructura. El fago 52 presenta resistencia al cloroformo ya que luego de ser expuesto durante 1 hora a este químico, no hubo reducción en la concentración. A la fecha no se ha encontrado resultados de esta prueba para otros fagos de *Salmonella*, pero, el resultado del presente estudio coincide con el fago Φ GF1 de *Escherichia coli* aislado por Punil R. (2017). Esto podría indicar la inexistencia de lípidos en la estructura del fago 52. En contraste a lo obtenido, el fago ASCF1 de *Listeria monocytogenes* (Alegre, 2019) y el fago S6 de *Salmonella enterica* (Flores G., 2017) resultaron afectados por el cloroformo luego de ser expuestas durante 1 hora.

Un factor importante que establece la actividad de los bacteriófagos es la temperatura de almacenamiento (Jończyk *et al.*, 2011). Y como un requisito importante para la aplicación exitosa de fagos es su estabilidad, el cual depende del fago en particular (Jończyk *et al.*, 2019). Mientras que en algunos fagos su título no disminuye significativamente durante unos días y en otros se conservan durante años; son considerados estables (Weber-Dąbrowska *et al.*, 2016). Para lograrlo, los métodos de

conservación utilizados en diferentes laboratorios para almacenar lisado de fagos crudos o purificados incluyen temperaturas de 4 °C, la congelación y el almacenamiento a -80 °C o en nitrógeno líquido, y el almacenamiento de fagos secos o liofilizados (Golec *et al.*, 2011). Frecuentemente, se considera el enfriamiento como la mejor forma de almacenarlos, siendo posible incorporar sustancias que ayuden a mejorar la estabilidad de los fagos en suspensión acuosa, conservar mediante liofilización, secado por aspersión o encapsulación (Weber-Dąbrowska *et al.*, 2016).

En los resultados obtenidos luego de almacenar durante 4 meses el fago en 3 temperaturas diferentes (25, 4 y -20 °C), se observaron reducciones en la concentración de fagos. Sin embargo, en ninguna temperatura se redujo en 1 orden de magnitud. El almacenamiento a temperatura ambiente (25 °C) produjo la mayor reducción de concentración viral con 77,37% de disminución o de 0,6 logaritmos. Resultado que concuerda con González-Menéndez y cols. (2018), donde muestras de fagos de *Staphylococcus* sp. almacenadas a 20 °C / 25 °C perdieron viabilidad después de 6 meses con una reducción de hasta 4,4 unidades logarítmicas. De la misma manera, el fago CA933P de *E. coli* sufrió una reducción de 0,38 logaritmos en los primeros 100 días de almacenamiento a temperatura ambiente (Dini, 2011). Además, con el análisis de la estabilidad a largo plazo de dicho fago, demuestran que es muy riesgoso mantener los lisados de fagos sin controlar la temperatura ya que pueden llevar a la pérdida total del lisado, tal como lo comprueban con el stock mantenido a temperatura ambiente por 2 años (Dini, 2011). A una temperatura fría de 4 °C y de congelamiento a -20 °C, la disminución del fago 52 fue de 28,95 y de 26,32 %, respectivamente o de 0,1 logaritmos para ambos casos. Estos resultados coinciden con el fago KFS-ST de *Salmonella* Typhimurium que tuvo una disminución de 0,25 y 0,28 logaritmos luego de almacenarlas durante 12 semanas (Choi *et al.*, 2020).

El fago ΦGF1 también fue evaluado a 25, 4 y -20 °C por un período de 4 meses y tuvo una reducción menor a 1 orden de magnitud al igual que en el presente estudio, pero, con porcentajes de reducción más altas, siendo de 84, 57 y 49 %, respectivamente para cada temperatura (Punil, 2017).

La tendencia del aumento de la estabilidad de los fagos va asociado a bajas temperaturas de almacenamiento, tal como se observan en los diferentes resultados mostrados. Esto demuestra que almacenar a temperatura ambiente no sería una buena opción y menos aún si es por tiempo prolongado.

Finalmente, el fago que pueda propagarse fácilmente tanto en condiciones industriales como de laboratorio y se caracterice por tener estabilidad en las condiciones de

almacenamiento, será un buen candidato para la fagoterapia (Weber-Dąbrowska *et al.*, 2016).

VIII. CONCLUSIONES

- Se aislaron 3 bacteriófagos que infectan *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotipo Infantis con características multidrogo-resistentes (MDR), aislados de muestras de intestinos de pollos procedentes de diferentes mercados de Lima.
- El fago 52 tiene un rango estrecho y específico de hospedero, una MOI óptima de 0,001, un período de latencia de 10 minutos y un tamaño de explosión promedio de 32,93 partículas virales por célula infectada; siendo ventajoso el corto período para producir una nueva progenie viral.
- El bacteriófago 52 presenta estabilidad robusta a temperaturas desde 40 a 60 °C y a valores de pH desde 3 a 10; características que lo convierten en buen candidato para la fagoterapia.
- La resistencia al cloroformo del fago 52, indica la ausencia de lípidos en la estructura viral.
- Las temperaturas de almacenamiento de 4 y -20 °C permiten preservar una mayor concentración de fagos por al menos 4 meses.
- Se confirmó por análisis genómico que el fago 52 pertenece al orden Caudovirales y a la familia *Autographiviridae*.

IX. RECOMENDACIONES

- Se sugiere la evaluación de susceptibilidad al bacteriófago aislado entre la cepa bacteriana multidrogo-resistente y una cepa sensible a antibióticos.
- La visualización por medio de Microscopía Electrónica de Transmisión permitirá demostrar la morfología del fago.
- La evaluación de la curva de un paso con valores de MOI más bajo permitirá la verificación del aumento de la producción de fagos por célula infectada.
- Se recomienda la secuenciación genómica del fago aislado para verificar presencia o ausencia de genes de lisogenia y de genes que codifican toxinas.
- Para tener mayor información de la estabilidad a diferentes temperaturas se sugiere evaluar el almacenamiento a largo plazo.
- Las características biológicas y fisicoquímicas del bacteriófago 52 indican su posible aplicación como alternativa terapéutica en el control de *Salmonella* Infantis MDR.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ackermann H.W. (2007). 5500 Phages examined in the electron microscope. *Archives of Virology*, 152(2), 227-243. 10.1007/s00705-006-0849-1
- Ackermann H.W. (2011). Bacteriophage Taxonomy. *Microbiology Australia*, 32(2), 90-94. https://health.uni-hohenheim.de/fileadmin/einrichtungen/gesundheitswissenschaften/Downloads/Bacteriophages_Taxonomy_2011-Ackermann.pdf
- Ackermann H. W. (2012). Bacteriophage electron microscopy. *Advances in virus research*, 82, 1–32. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394621-8.00017-0>
- Adams, M. (1959). Bacteriophages. Interscience Publishers, INC. New York.
- Agbaje, M., Begum, R. H., Oyekunle, M. A., Ojo, O. E., & Adenubi, O. T. (2011). Evolution of Salmonella nomenclature: a critical note. *Folia microbiologica*, 56(6), 497–503. <https://doi.org/10.1007/s12223-011-0075-4>
- Akinyemi K.O. & Ajoseh S.O. (2017). Factors contributing to the emergence and spread of antibiotics resistance in Salmonella species. En Current topics in Salmonella y Salmonellosis (Ed.). 10.5772/67701
- Akhtar, M., Viazis, S. & Diez-Gonzalez F. (2014). Isolation, identification and characterization of lytic, wide host range bacteriophages from waste effluents against *Salmonella* enterica serovars. *Food Control*, 38, 67-74. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.09.064>
- Alegre, A. (2019). Aislamiento y caracterización de un bacteriófago lítico de *Listeria monocytogenes*. Tesis para el título profesional de Biólogo Microbiólogo Parasitólogo. Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.
- Arias B, Isabel, & Meza L, Ana. (2004). Resistencia antimicrobiana de Salmonella, Shigella y Vibrio cholerae: Perú 1997-2002. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 21(4), 273-275. Recuperado en 07 de diciembre de 2021, de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342004000400011&lng=es&tlng=es.

- Azeredo, J., & Sutherland, I. W. (2008). The use of phages for the removal of infectious biofilms. *Current pharmaceutical biotechnology*, 9(4), 261–266. <https://doi.org/10.2174/138920108785161604>
- Bao, H., Zhang, H. & Wang, R. (2011). Isolation and characterization of bacteriophages of *Salmonella enterica* serovar Pullorum. *Poultry Science*, 90, 2370–2377. [10.3382/ps.2011-01496](https://doi.org/10.3382/ps.2011-01496)
- Brenner, F. W., Villar, R. G., Angulo, F. J., Tauxe, R., & Swaminathan, B. (2000). Salmonella nomenclature. *Journal of clinical microbiology*, 38(7), 2465–2467. <https://doi.org/10.1128/JCM.38.7.2465-2467.2000>
- Brenner, D. J., Krieg, N. R. & Staley, J. T. (2005). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. (2^a ed., vol.2). New York: Springer.
- Busani, L., Graziani, C., Battisti, A., Franco, A., Ricci, A., Vio, D., Digiannatale E., Paterlini F., D’Incau M., Owczarek S., Caprioli A. & Luzzi, I. (2004). Antibiotic resistance in *Salmonella enterica* serotypes Typhimurium, Enteritidis and Infantis from human infections, foodstuffs and farm animals in Italy. *Epidemiology and Infection*, 132(2), 245-251. [doi:10.1017/S0950268803001936](https://doi.org/10.1017/S0950268803001936)
- Callaway T.R., Edrington T.S., Brabban A., Kutter E., Karriker L., Stahl C., Wagstrom E., Anderson R.C., Genovese K., McCreynolds J., Harvey R. & Nisbet D.J. (2010). Occurrence of Salmonella-Specific Bacteriophages in Swine Feces Collected from Commercial Farms. *Foodborne Pathogens and Disease*, 7(7). <https://doi.org/10.1089/fpd.2009.0512>
- Center For Disease Control And Prevention (CDC). (21 de febrero de 2019). Outbreak of Multidrug-Resistant *Salmonella* Infections Linked to Raw Chicken Products. <https://www.cdc.gov/salmonella/infantis-10-18/index-esp.html>
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (13 de marzo de 2020). Antibiotic / Antimicrobial Resistance (AR / AMR). <https://www.cdc.gov/drugresistance/about.html>
- Chanishvili, N. (2012). Phage Therapy - History from Twort and d’Herelle Through Soviet Experience to Current Approaches. *Advances in Virus Research*. Vol 83, pp. 3-40. DOI: [10.1016/B978-0-12-394438-2.00001-3](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394438-2.00001-3)
- Chen Y., Sun E., Song J., Tong Y. & Wu B. (2018). Three *Salmonella enterica* serovar Enteritidis bacteriophages from the Siphoviridae family are promising candidates

- for phage therapy. *Canadian Journal of Microbiology*, 64(11).
<https://doi.org/10.1139/cjm-2017-0740>
- Chénard, C., Chan, A., Vincent, W. & Suttle C. (2015). Polar freshwater cyanophage S-EIV1 represents a new widespread evolutionary lineage of phages. *The International Society of Microbial Ecology Journal*, 9, 2046–2058.
<https://doi.org/10.1038/ismej.2015.24>
- Choi, I. Y., Park, D. H., Chin, B. A., Lee, C., Lee, J., & Park, M. K. (2020). Exploring the feasibility of *Salmonella* Typhimurium-specific phage as a novel bio-receptor. *Journal of animal science and technology*, 62(5), 668–681.
<https://doi.org/10.5187/jast.2020.62.5.668>
- Clokie M.R.J., Millard A.D., Letarov A.V. & Heaphy S. (2011) Phages in nature, *Bacteriophage*, 1:1, 31-45. <https://doi.org/10.4161/bact.1.1.14942>
- Crosa, J. H., Brenner, D. J., Ewing, W. H., & Falkow, S. (1973). Molecular relationships among the Salmonelleae. *Journal of bacteriology*, 115(1), 307–315.
<https://doi.org/10.1128/jb.115.1.307-315.1973>
- Dakheel, K.H., Rahim, R.A., Neela, V.K., Al-Obaidi J.R., Hun T.G., Mat M.N. & Yusoff K. (2019). Genomic analyses of two novel biofilm-degrading methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* phages. *BMC Microbiol*, 19(114).
<https://doi.org/10.1186/s12866-019-1484-9>
- Dedrick, R.M., Guerrero-Bustamante, C.A., Garland, R.A., Russell D.A, Ford K., Harris K., Gilmour K.C., Soothill J., Jacobs-Sera D., Schooley R.T., Hatfull G.F. & Spencer H. (2019). Engineered bacteriophages for treatment of a patient with a disseminated drug-resistant *Mycobacterium abscessus*. *Nature Medicine*, 25, 730–733. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0437-z>
- Delgado R. (2015). Peculiaridad de la clasificación taxonómica y nomenclatura del género *Salmonella*. *Acta Médica del Centro*, 9(4), 73-75.
<http://www.revactamedicacentro.sld.cu>
- Dionisi, A. M., Lucarelli, C., Benedetti, I., Owczarek, S., & Luzzi, I. (2011). Molecular characterisation of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Infantis from humans, animals and the environment in Italy. *International journal of antimicrobial agents*, 38(5), 384–389.
<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2011.07.001>

- Dini, Cecilia. (2011). Aislamiento y caracterización molecular de bacteriófagos de bacterias enteropatógenas para biocontrol de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA). Tesis 65 Doctoral. Universidad Nacional de la Plata, Facultad de Ciencias Exactas, La Plata.
- Dini, C., Islan, G. A., De Urraza, P. J., & Castro, G. R. (2012). Novel biopolymer matrices for microencapsulation of phages: enhanced protection against acidity and protease activity. *Macromolecular bioscience*, 12(9), 1200–1208. <https://doi.org/10.1002/mabi.201200109>
- Donlan R. M. (2009). Preventing biofilms of clinically relevant organisms using bacteriophage. *Trends in microbiology*, 17(2), 66–72. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.11.002>
- European Food Safety Authority & European Centre For Disease Prevention And Control (EFSA & ECDC) (2018). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. *Journal. European Food Safety Authority*, 16(12). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5500>
- Elbreki M., Ross R. P., Hill C., O'Mahony J., McAuliffe O., Coffey A. (2014). Bacteriophages and Their Derivatives as Biotherapeutic Agents in Disease Prevention and Treatment. *Journal of Viruses*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/382539>
- Ellis E.L. & Delbrück Max. (1939). The growth of bacteriophage. *Journal of General Physiology*, 22(3), 365–384. <https://doi.org/10.1085/jgp.22.3.365>
- Flores, V. (2017). Aislamiento y caracterización de un bacteriófago con actividad lítica para *Vibrio fluvialis*. Tesis Para optar el Grado Académico de Magíster en Microbiología. Unidad de Posgrado, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú
- Flores, G. (2017). Caracterización de bacteriófagos líticos de *Salmonella enterica* aislados de muestras de pollos. Tesis para optar el título profesional de Bióloga Microbióloga Parasitóloga. Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

- Fortier, L. & Moineau, S. (2009). Phage production and maintenance of stocks, including expected stock lifetimes. En CLOKIE Martha, KROPINSKI Andrew (edit.). Bacteriophages: Methods and Protocols. Reino Unido: Humana Press, 203-219.
- Franco A., Leekitcharoenphon P., Feltrin F., Alba P., Cordaro G., Iurescia M., Tolli R., D'Incau M., Staffolani M., Di Giannatale E., Hendriksen R. & Battisti A. (2015) Emergence of a Clonal Lineage of Multidrug-Resistant ESBL-Producing *Salmonella* Infantis Transmitted from Broilers and Broiler Meat to Humans in Italy between 2011 and 2014. *PLoS ONE*, 10(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144802>
- Gal-Mor, O., Valinsky, L., Weinberger, M., Guy, S., Jaffe, J., Schorr, Y. I., Raisfeld, A., Agmon, V., & Nissan, I. (2010). Multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Infantis, Israel. *Emerging infectious diseases*, 16(11), 1754–1757. <https://doi.org/10.3201/eid1611.100100>
- García, I. & Porras, M., 2018. Aislamiento de bacteriófagos de *Pseudomonas aeruginosa* multidrogo – resistente en aguas de tres ríos de la Provincia de Lima-Perú. Tesis Para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico. Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.
- Ghoddusi, A., Nayeri Fasaei, B., Karimi, V., Ashrafi Tamai, I., Moulana, Z., & Zahraei Salehi, T. (2015). Molecular identification of *Salmonella* Infantis isolated from backyard chickens and detection of their resistance genes by PCR. *Iranian journal of veterinary research*, 16(3), 293–297.
- Golec, P., Dąbrowski, K., Hejnowicz, M. S., Gozdek, A., Loś, J. M., Węgrzyn, G., Lobočka, M. B., & Loś, M. (2011). A reliable method for storage of tailed phages. *Journal of microbiological methods*, 84(3), 486–489. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2011.01.007>
- Golkar, Z., Bagasra, O., & Pace, D. G. (2014). Bacteriophage therapy: a potential solution for the antibiotic resistance crisis. *Journal of infection in developing countries*, 8(2), 129–136. <https://doi.org/10.3855/jidc.3573>
- González-Menéndez, E., Fernández, L., Gutiérrez, D., Rodríguez, A., Martínez, B., & García, P. (2018). Comparative analysis of different preservation techniques for the storage of *Staphylococcus* phages aimed for the industrial development of

- phage-based antimicrobial products. *PloS one*, 13(10), e0205728.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205728>
- Guo, Z., Lin, H., Ji, X., Yan, G., Lei, L., Han, W., Gu, J., & Huang, J. (2020). Therapeutic applications of lytic phages in human medicine. *Microbial pathogenesis*, 142, 104048. Advance online publication.
<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104048>
- Guttman B., Raya R. & Kutter E. (2005). Basic Phage Biology. En: Kutter E., Sulakvelidze A., (edit.) *Bacteriophages - Biology and Applications*. Washington, D.C: CRC Press, 2005
- Hendriksen, R. S., Vieira, A. R., Karlsmose, S., Lo Fo Wong, D. M., Jensen, A. B., Wegener, H. C., & Aarestrup, F. M. (2011). Global monitoring of Salmonella serovar distribution from the World Health Organization Global Foodborne Infections Network Country Data Bank: results of quality assured laboratories from 2001 to 2007. *Foodborne pathogens and disease*, 8(8), 887–900.
<https://doi.org/10.1089/fpd.2010.0787>
- 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. [10.3389/fmicb.2018.01046](https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01046)
- Hindermann D., Gopinath G., Chase H., Negrete F., Althaus D., Zurfluh K., Tall B.D., Stephan R. & Nüesch-Inderbinnen M. (2017). *Salmonella enterica* serovar Infantis from Food and Human Infections, Switzerland, 2010–2015: Poultry-Related Multidrug Resistant Clones and an Emerging ESBL Producing Clonal Lineage. *Frontiers in Microbiology*, 8(1322). [10.3389/fmicb.2017.01322](https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01322)
- Hyman P. & Abedon S.T. (2008). Practical methods for determining phage growth parameters. In: Clokie MR, Kropinoski AM, eds. *Bacteriophages: methods, and protocols*. 1. New York: Springer, 175–202.
- Ibrahim A. A. (1969). Bacteriophage typing of Salmonella. I. Isolation and host range study of bacteriophages. *Applied microbiology*, 18(3), 444–447.
<https://doi.org/10.1128/am.18.3.444-447.1969>
- Islam, M. S., Hu, Y., Mizan, M., Yan, T., Nime, I., Zhou, Y., & Li, J. (2020). Characterization of *Salmonella* Phage LPST153 That Effectively Targets Most

Prevalent *Salmonella* Serovars. *Microorganisms*, 8(7), 1089.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms8071089>

Jay J., Loessner M., Golden A. (2005). Foodborne Gastroenteritis Caused by *Salmonella* and *Shigella*. En *Modern Food Microbiology*. (7th ed., pp. 619-636). Springer Science. USA.
https://www.academia.edu/37575774/James_M_Jay_Martin_J_Loessner_David_A_Golden_Modern_Food_Microbiology_7th_Edition_Food_Science_Texts_Series_20_pdf

Jeon G. & Ahn J. (2021). Evaluation of phage adsorption to *Salmonella* Typhimurium exposed to different levels of pH and antibiotic. *Microbial Pathogenesis*, 150, 104726. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104726>.

Johri, A. V., Johri, P., Hoyle, N., Pipia, L., Nadareishvili, L., & Nizharadze, D. (2021). Case Report: Chronic Bacterial Prostatitis Treated With Phage Therapy After Multiple Failed Antibiotic Treatments. *Frontiers in pharmacology*, 12, 692614. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.692614>

Jończyk, E., Kłak, M., Międzybrodzki, R., & Górski, A. (2011). The influence of external factors on bacteriophages--review. *Folia microbiologica*, 56(3), 191–200. <https://doi.org/10.1007/s12223-011-0039-8>

Jończyk-Matysiak, E., Łodej, N., Kula, D., Owczarek, B., Orwat, F., Międzybrodzki, R., Neuberg, J., Bagińska, N., Weber-Dąbrowska, B., & Górski, A. (2019). Factors determining phage stability/activity: challenges in practical phage application. *Expert review of anti-infective therapy*, 17(8), 583–606. <https://doi.org/10.1080/14787210.2019.1646126>

Jung, L. S., Ding, T., & Ahn, J. (2017). Evaluation of lytic bacteriophages for control of multidrug-resistant *Salmonella* Typhimurium. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, 16(1), 1-9. <https://doi.org/10.1186/s12941-017-0237-6>

Jyoti T., Shrayanee D., Zeeshan F. & Saif H. (2014). Multidrug Resistance: An Emerging Crisis. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/541340>

Kutter E. & Sulakvelidze A. (2005). Bacteriophages - Biology and Applications. Washington, D.C: CRC Press, 2005

- Kutter E., Raya R. & Carlson K. (2005). Molecular Mechanisms of Phage Infection. En: Kutter E., Sulakvelidze A., (edit.) *Bacteriophages- Biology and Applications*. Washington, D.C: CRC Press, 2005
- Kropinski A. M. (2006). Phage Therapy - Everything Old is New Again. *The Canadian journal of infectious diseases & medical microbiology = Journal canadien des maladies infectieuses et de la microbiologie medicale*, 17(5), 297–306. <https://doi.org/10.1155/2006/329465>
- Llanos, C., 2019. Caracterización de bacteriófagos nativos candidatos a fagoterapia en infecciones causadas por *Pseudomonas aeruginosa* resistente a antibióticos y productoras de biopelícula. Tesis para optar el título profesional de Biólogo Microbiólogo Parasitólogo. Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.
- Liebana, E., Batchelor, M., Torres, C., Briñas, L., Lagos, L. A., Abdalhamid, B., Hanson, N. D., & Martinez-Urtaza, J. (2004). Pediatric infection due to multiresistant *Salmonella enterica* serotype Infantis in Honduras. *Journal of clinical microbiology*, 42(10), 4885–4888. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.10.4885-4888.2004>
- Lindberg A. A. (1973). Bacteriophage Receptors. *Annual Review of Microbiology*, 27, 205-241. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.27.100173.001225>
- Loc-Carrillo, C., & Abedon, S. T. (2011). Pros and cons of phage therapy. *Bacteriophage*, 1(2), 111–114. <https://doi.org/10.4161/bact.1.2.14590>
- Madigan M., Martinko J., Dunlap P. & Clark D. (2009). Brock Biology Of Microorganisms. (12th Edition). Pearson Education
- Majowicz, S. E., Musto, J., Scallan, E., Angulo, F. J., Kirk, M., O'brien, S. J., Jones, T. F., Fazil, A., Hoekstra, R. M., & International Collaboration on Enteric Disease 'Burden of Illness' Studies (2010). The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 50(6), 882–889. <https://doi.org/10.1086/650733>
- Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., Harbarth, S., Hindler, J. F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D. L., Rice, L. B., Stelling, J., Struelens, M. J., Vatopoulos, A., Weber, J. T., & Monnet, D. L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and

pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 18(3), 268–281. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>

Mateja P., Jasna M., Majda G., Lene Karine V., Matjaž O. (2019). *Salmonella* Infantis in Broiler Flocks in Slovenia: The Prevalence of Multidrug Resistant Strains with High Genetic Homogeneity and Low Biofilm-Forming Ability. *BioMed Research International*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/4981463>

Martínez-Puchol, Sandra, Pons, María J., Ruiz-Roldán, Lidia, Laureano-Adame, Laura, Corujo, Alfredo, Ochoa, Theresa J., & Ruiz, Joaquim. (2020). Resistencia a nitrofuranos en *Salmonella* enterica aisladas de carne para consumo humano. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 37(1), 99-103. <https://dx.doi.org/10.17843/rpmesp.2020.371.4745>

Martins M., McCusker M., Amaral L. & Fanning S. (2011). Mechanisms of Antibiotic Resistance in *Salmonella*: Efflux Pumps, Genetics, Quorum Sensing and Biofilm Formation. *Letters in Drug Design & Discovery*, 8(2). <https://doi.org/10.2174/157018011794183770>

Meza, A. (2016). Aislamiento y caracterización de bacteriófagos para cepas nosocomiales de *Acinetobacter baumannii* de Lima e Iquitos, Perú 2014 – 2015. Tesis para obtener el Título Profesional de Ingeniero en Biotecnología. Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica, Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, Universidad Católica de Santa María, Arequipa, Perú

Middelboe, M., Chan, A. & Bertelsen, S. (2010). Isolation and life-cycle characterization of lytic viruses infecting heterotrophic bacteria and cyanobacteria. *Manual of Aquatic Viral Ecology*. 118-133. DOI [10.4319/mave.2010.978-0-9845591-0-7.118](https://doi.org/10.4319/mave.2010.978-0-9845591-0-7.118)

Miranda M. & Pizardi C., 2004. Detección y enumeración de bacteriófagos F+ específicos como indicadores de enterovirus en el choro (*Aulacomya ater*). *Revista ECIPerú*, Vol. 1, no.1, pp.46-48. DOI <https://doi.org/10.33017/RevECIPeru2004.0014/>

- Muñoz V., Garces F. & Dávila C.A. (1979). Estudio del rendimiento en fagos para los procesos de lisis bacteriana [archivo PDF]. Madrid. Recuperado de https://inis.iaea.org/collection/NCLCollectionStore/_Public/39/046/39046975.pdf
- Nikolich, M. P., & Filippov, A. A. (2020). Bacteriophage Therapy: Developments and Directions. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 9(3), 135. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9030135>
- Noda, T., Murakami, K., Ishiguro, Y., & Asai, T. (2010). Chicken meat is an infection source of *Salmonella* serovar Infantis for humans in Japan. *Foodborne pathogens and disease*, 7(6), 727–735. <https://doi.org/10.1089/fpd.2009.0438>
- Nobrega, F., Costa, A., Santos, J., Siliakus M., Van Lent J., Kengen S., Azeredo J. & Kluskens L. (2016). Genetically manipulated phages with improved pH resistance for oral administration in veterinary medicine. *Scientific Reports*. 6, 39235. <https://doi.org/10.1038/srep39235>
- Nógrády, N., Tóth, A., Kostyák, A., Pászti, J., & Nagy, B. (2007). Emergence of multidrug-resistant clones of *Salmonella* Infantis in broiler chickens and humans in Hungary. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 60(3), 645–648. <https://doi.org/10.1093/jac/dkm249>
- Nwabor O.F., Dickson I.D. & Ajibo Q.C. (2015). Epidemiology of *Salmonella* and *Salmonellosis*. *International Letters of Natural Sciences*, 47, 54-73. <https://doi.org/10.18052/www.scipress.com/ILNS.47.54>
- Oechslin, F., Piccardi, P., Mancini, S., Gabard, J., Moreillon, P., Entenza, J. M., Resch, G., & Que, Y. A. (2017). Synergistic Interaction Between Phage Therapy and Antibiotics Clears *Pseudomonas Aeruginosa* Infection in Endocarditis and Reduces Virulence. *The Journal of infectious diseases*, 215(5), 703–712. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw632>
- O'flynn, G., Coffey, A., Fitzgerald, G. F., & Ross, R. P. (2006). The newly isolated lytic bacteriophages st104a and st104b are highly virulent against *Salmonella enterica*. *Journal of applied microbiology*, 101(1), 251–259. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02792.x>
- Oh, J. H., & Park, M. K. (2017). Recent Trends in *Salmonella* Outbreaks and Emerging Technology for Biocontrol of *Salmonella* Using Phages in Foods: A Review. *Journal of microbiology and biotechnology*, 27(12), 2075–2088. <https://doi.org/10.4014/jmb.1710.10049>

- Olszak, T., Latka, A., Roszniowski, B., Valvano, M. A., & Drulis-Kawa, Z. (2017). Phage Life Cycles Behind Bacterial Biodiversity. *Current medicinal chemistry*, 24(36), 3987–4001. <https://doi.org/10.2174/0929867324666170413100136>
- Organización Panamericana de la Salud (PAHO). <https://www.paho.org/en/topics/antimicrobial-resistance>
- Parker, N., Schneegurt, M., Thi Tu, A.-H., Lister, P., & Forster, B. M. [Imagen] (2016). *The Viral Life Cycle*, Microbiology. Houston, Texas. OpenStax. <https://openstax.org/books/microbiology/pages/6-2-the-viral-life-cycle>
- Pelzek, A.J., Schuch, R., Schmitz, J.E. & Fischetti, V.A. (2013), Isolation, Culture, and Characterization of Bacteriophages in Current Protocols Essential Laboratory Techniques, *Wiley Online Library*, 7, 4.4.1-4.4.33. <https://doi.org/10.1002/9780470089941.et0404s07>
- Popoff, M. Y. and Le Minor, L. (2005). Salmonella. En Brenner, D. J., Kreig, N. R. & Staley, J. T. (Eds). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. (2ª ed.), Springer, New York, USA; pp:764-799
- Principi N., Silvestri E. & Esposito S. (2019). Advantages and Limitations of Bacteriophages for the Treatment of Bacterial Infections. *Frontiers in Pharmacology*, 10:513. 10.3389/fphar.2019.00513
- Punil, R.J. (2017). Caracterización de un bacteriófago específico de *Escherichia coli* aislado de aguas residuales de “La Taboada”, Tesis para optar el título profesional de Biólogo Genetista Biotecnólogo. Escuela Académico Profesional de Genética y Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.
- Quino, W., Hurtado, C.V., Escalante-Maldonado, O., Flores-León, D., Mestanza, O., Vences-Rosales, F., Zamudio, M.L. & Gavilán R.G. (2019). Multidrogorresistencia de *Salmonella* Infantis en Perú: un estudio mediante secuenciamiento de nueva generación. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*. 36(1), 37-45. [10.17843/rpmesp.2019.361.3934](https://doi.org/10.17843/rpmesp.2019.361.3934)
- Quino, Willi, Hurtado, Carmen V., Meza, Ana María, Zamudio, María Luz, & Gavilan, Ronnie G. (2020). Patrones de resistencia a los antimicrobianos en serovares de *Salmonella enterica* en Perú, 2012-2015. *Revista chilena de infectología*, 37(4), 395-401. <https://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182020000400395>

- Rakhuba D.V., Kolomiets E.I., Dey E.S. & Novik G.I. (2010). Bacteriophage receptors, mechanisms of phage adsorption and penetration into host cell. *Polish Journal of Microbiology*. 59(3):145–55.
- Ryan M.P., O'Dwyer J. & Adley C.C. (2017). Evaluation of the Complex Nomenclature of the Clinically and Veterinary Significant Pathogen *Salmonella*. *BioMed Research International*. 2017, 6pp. <https://doi.org/10.1155/2017/3782182>
- Regeimbal J.M., Jacobs A.C., Corey B.W., Henry M.S., Thompson M.G., Pavlicek R.L., Quinones J., Hannah R.M., Ghebremedhin M., Crane N.J., Zurawski D.V., Teneza-Mora N.C., Biswas B., Hall E.R. (2016). Personalized therapeutic cocktail of wild environmental phages rescues mice from *Acinetobacter baumannii* wound infections. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 60, 5806 –5816. [10.1128/AAC.02877-15](https://doi.org/10.1128/AAC.02877-15).
- Reeves, M. W., Evins, G. M., Heiba, A. A., Plikaytis, B. D., & Farmer, J. J., 3rd (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. *Journal of clinical microbiology*, 27(2), 313–320. <https://doi.org/10.1128/jcm.27.2.313-320.1989>
- Rodríguez C.H., de Mier C., Bogdanowicz E., Caffer M.I., García S., Lasala M.B., Vay C. & Famiglietti A. (2007). Salmonellosis extraintestinal: clínica, epidemiología y resistencia antimicrobiana. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 41(3), 379-383.
- Schooley, R. T., Biswas, B., Gill, J. J., Hernandez-Morales, A., Lancaster, J., Lessor, L., Barr, J. J., Reed, S. L., Rohwer, F., Benler, S., Segall, A. M., Taplitz, R., Smith, D. M., Kerr, K., Kumaraswamy, M., Nizet, V., Lin, L., McCauley, M. D., Strathdee, S. A., Benson, C. A., ... Hamilton, T. (2017). Development and Use of Personalized Bacteriophage-Based Therapeutic Cocktails To Treat a Patient with a Disseminated Resistant *Acinetobacter baumannii* Infection. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 61(10), e00954-17. <https://doi.org/10.1128/AAC.00954-17>
- Shin H, Lee J-H, Kim H, Choi Y, Heu S. & Ryu S. (2012). Receptor Diversity and Host Interaction of Bacteriophages Infecting *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *PLoS ONE*, 7(8): e43392. [10.1371/journal.pone.0043392](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043392)

- Sulakvelidze, A., Alavidze, Z., & Morris, J. G., Jr (2001). Bacteriophage therapy. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 45(3), 649–659. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.3.649-659.2001>
- Sulakvelidze A. & Kutter E. (2005). Bacteriophage Therapy in Humans. En: Kutter E., Sulakvelidze A., (edit.) *Bacteriophages - Biology and Applications*. Washington, D.C: CRC Press, 2005.
- Su, L. H., & Chiu, C. H. (2007). Salmonella: clinical importance and evolution of nomenclature. *Chang Gung medical journal*, 30(3), 210–219.
- Talledo, M., Gutiérrez, S., Merino, F. & Rojas, N., 1998. Detección, cuantificación y caracterización morfológica de bacteriófagos indicadores de *Vibrio cholerae*. *Revista Peruana de Biología*, 5 (2), 090-097. <https://doi.org/10.15381/rpb.v5i2.8324>
- Tang F., Zhang P., Zhang Q., Xue F., Ren J., Sun J., Qu Z., Zhuge X., Li D., Wang J., Jiang M. & Dai J. (2018). Isolation and characterization of a broad-spectrum phage of multiple drug resistant *Salmonella* and its therapeutic utility in mice. *Microbial Pathogenesis*. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.10.042>.
- Tamariz, Jesús H, Lezameta, Lizet, & Guerra, Humberto. (2014). Fagoterapia frente a infecciones por *Staphylococcus aureus* meticilino resistente en ratones. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 31(1), 69-77. Recuperado en 07 de diciembre de 2021, de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342014000100010&lng=es&tlng=es.
- Terrier B. & Martinez V. (2006). Salmonellosis. *Tratado de Medicina*, 10. 1-6. [https://doi.org/10.1016/S1636-5410\(06\)70402-0](https://doi.org/10.1016/S1636-5410(06)70402-0).
- Tindall, B. J., Grimont, P., Garrity, G. M., & Euzéby, J. P. (2005). Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 55(Pt 1), 521–524. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63580-0>
- Weber-Dąbrowska, B., Jończyk-Matysiak, E., Żaczek, M., Łobocka, M., Łusiak-Szelachowska, M., & Górski, A. (2016). Bacteriophage Procurement for Therapeutic Purposes. *Frontiers in microbiology*, 7, 1177. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01177>

- Wong, C. L., Sieo, C. C., Tan, W. S., Abdullah, N., Hair-Bejo, M., Abu, J., & Ho, Y. W. (2014). Evaluation of a lytic bacteriophage, Φ st1, for biocontrol of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in chickens. *International Journal of Food Microbiology*, 172, 92–101. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.11.034>
- World Health Organization (WHO) (17/11/2021). Antimicrobial resistance. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
- Wu Y., Wang R., Xu M., Liu Y., Zhu X., Qiu J., Liu Q., He P. & Li Q. (2019). A Novel Polysaccharide Depolymerase Encoded by the Phage SH-KP152226 Confers Specific Activity Against Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* via Biofilm Degradation. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2768. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02768>
- Zamudio, M. L., Meza, A., Bailón, H., Martínez-Urtaza, J. & Campos, J. (2011). Experiencias en la vigilancia epidemiológica de agentes patógenos transmitidos por alimentos a través de electroforesis en campo pulsado (PFGE) en el Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 28(1), 128-135.