



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

**Universidad del Perú. Decana de América**

**Facultad de Ciencias Biológicas**

**Escuela Profesional de Genética y Biotecnología**

**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

**AUTOR**

Renzo Jonás PUNIL LUCIANO

**ASESOR**

Miguel Ángel Francisco TALLEDO RIVERA

Lima, Perú

2017



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

---

Punil R. Caracterización de un bacteriófago específico de *Escherichia coli* aislado de aguas residuales de “La Taboada” [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela Profesional de Genética y Biotecnología; 2017.

---

1487

4(R)

74



**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  
BIÓLOGO GENETISTA BIOTECNÓLOGO  
(MODALIDAD: SUSTENTACIÓN DE TESIS)**


Siendo las 10:10 horas del 15 de diciembre de 2017, en el Salón de Grados de la Facultad de Ciencias Biológicas y en presencia del jurado formado por los profesores que suscriben, se dio inicio a la sesión para optar al **Título Profesional de Biólogo Genetista Biotecnólogo de RENZO JONÁS PUNIL LUCIANO.**

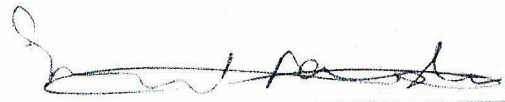
Luego de dar lectura y conformidad al expediente N° 008-EPGB-2017, el titulado expuso su tesis: **CARACTERIZACIÓN DE UN BACTERIOFAGO ESPECÍFICO DE *Escherichia coli* AISLADO DE AGUAS RESIDUALES DE "LA TABOADA"** y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota B..., calificativo: Aprobado... con... mención honorosa.


Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Profesional de Genética y Biotecnología, y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el **Título Profesional de Biólogo Genetista Biotecnólogo** a **RENZO JONÁS PUNIL LUCIANO** se eleve lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo título, conforme a ley.


Siendo las 11:40 horas se levantó la sesión.

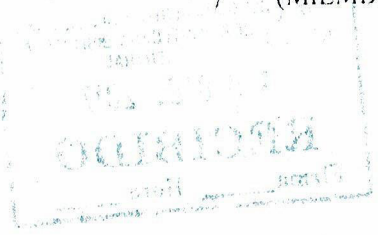
Ciudad Universitaria, 15 de diciembre de 2017.

  
Dra. SUSANA GUTIERREZ MORENO  
(PRESIDENTA)

  
Blgo. MIGUEL TALLEDO RIVERA  
(ASESOR)

  
Dr. ENRIQUE MAMANI ZAPANA  
(MIEMBRO)

  
Dr. JAIME SANCHEZ VENEGAS  
(MIEMBRO)



*A mi madre y hermana.*

*Por todo su apoyo y ser mi mayor motivación.*

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi madre, por haberme apoyado y estar siempre presente en los momentos difíciles y de felicidad, por sus consejos y los valores que me inculcó. Y que sin duda, fue mi mayor motivación para realizar la tesis. A mi hermana, por su apoyo y porque en ella vi un ejemplo de perseverancia, admiro mucho su ambición por ser cada vez mejor.

A mi padre, por sus palabras de motivación y siempre creer en mí, a mis primos: Eddy, Lizardo, Frank, Steven y Jeffrey; y a mis amigos Apo y Álvaro, por estar siempre presente en esos momentos de alegría y también en los momentos difíciles. A mi familia entera.

A mi asesor el profesor Miguel; por su paciencia, asesoría y los consejos a lo largo de la tesis, especialmente cuando las cosas no salen como uno espera. A la profesora Susana, por sus consejos y equipos de su laboratorio, que sin duda fueron invaluable.

A mis revisores, por su tiempo y dedicación para mejorar esta tesis.

A Gloria; por su ayuda invaluable, su apoyo incondicional y creer siempre en mí, por estar a mi lado en los momentos difíciles y compartir los momentos de alegría, y por acompañarme en este camino lleno de desafíos.

A la gente del laboratorio: Katty, Katy, Mayra, Wendy, Eduardo, Carlos y Alicia por su ayuda, tanto en la realización de la tesis como en los trámites de la misma; y por todos esos momentos inolvidable llenos de bromas y risas.

A toda la base 11 de Genética y Biotecnología; por su amistad, las anécdotas vividas y por ser la mejor base de todas.

Al Dr. Maurilio por su ayuda y asesoramiento en la toma de microfotografías con el MET.

Al Programa Nacional de Innovación para la Competitividad y Productividad (Innovate Perú) del Ministerio de la Producción por el financiamiento en materiales y equipos para desarrollar la tesis, a través del Convenio No. 160-PNICP-PIAP-2015.

## ABREVIATURAS

- ✓ UFC: Unidades formadoras de colonia
- ✓ UFP: Unidades formadoras de placa
- ✓ TSA: Agar tripticasa soya
- ✓ BHI: Caldo cerebro corazón
- ✓ A/A: Ácido/Ácido
- ✓ K/K: Alcalino/Alcalino
- ✓ MOI: Multiplicidad de infección
- ✓ MET: Microscopio electrónico de transmisión

## ÍNDICE GENERAL

	Pág.
ÍNDICE DE FIGURAS.....	I
ÍNDICE DE TABLAS.....	II
RESUMEN.....	III
ABSTRACT.....	IV
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. MARCO TEÓRICO.....	4
2.1 BACTERIÓFAGOS.....	4
2.2 ESTRUCTURA DE LOS BACTERIÓFAGOS.....	5
2.3 REPLICACIÓN VIRAL.....	7
2.4 FAGOTERAPIA.....	14
2.5 VISIÓN GENERAL DE <i>Escherichia coli</i> .....	18
2.6 <i>Escherichia coli</i> COMO ARMA BIOLÓGICA.....	22
2.7 RESISTENCIA MICROBIANA EN <i>Escherichia coli</i> .....	24
III. HIPÓTESIS.....	26
IV. OBJETIVOS.....	27
4.1 OBJETIVO GENERAL.....	27
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
5.1 MATERIAL BIOLÓGICO.....	28
5.2 METODOLOGÍA.....	28
5.2.1 Aislamiento de <i>Escherichia coli</i> ambientales.....	28
5.2.2 Aislamiento de un bacteriófago que infecta <i>Escherichia coli</i> .....	29
5.2.3 Purificación y preparación de la suspensión de trabajo.....	30
5.2.4 Curva de crecimiento de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.....	31
5.2.5 Termoestabilidad.....	31
5.2.6 Resistencia a la acidez y la alcalinidad.....	32
5.2.7 Sensibilidad al cloroformo.....	32
5.2.8 Temperatura de almacenamiento.....	33
5.2.9 Rango de hospedero.....	33
5.2.10 Multiplicidad de infección.....	34
5.2.11 Curva de crecimiento de un paso.....	34
5.2.12 Microscopía electrónica.....	35



5.3 ESQUEMA DE LA METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN.....	36
VI. RESULTADOS.....	37
6.1 Aislamiento de <i>Escherichia coli</i> ambientales .....	37
6.2 Aislamiento y purificación de los bacteriófagos .....	38
6.3 Curva de crecimiento de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.....	39
6.4 Termoestabilidad .....	41
6.5 Resistencia a la acidez y la alcalinidad.....	43
6.6 Sensibilidad al cloroformo .....	44
6.7 Temperatura de almacenamiento .....	45
6.8 Rango de hospedero.....	46
6.9 Multiplicidad de infección.....	48
6.10 Curva de crecimiento de un paso .....	49
6.11 Microscopía electrónica.....	50
VII. DISCUSIÓN .....	53
VIII. CONCLUSIONES .....	61
IX. RECOMENDACIONES .....	62
X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	63

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
<b>Figura 1.</b> Clasificación de las familias de bacteriófagos que infectan a bacterias y arqueas. ....	6
<b>Figura 2.</b> Ciclo Lítico de los bacteriófagos. ....	11
<b>Figura 3.</b> Ciclo Lisogénico de los bacteriófagos. ....	12
<b>Figura 4.</b> Aclaramiento en caldo BHI y placas de lisis del fago $\Phi$ GF1.....	38
<b>Figura 5.</b> Curva de crecimiento de <i>E. coli</i> ATCC 25922 correlacionando la densidad óptica (D.O) versus el tiempo de crecimiento (horas).....	39
<b>Figura 6.</b> Curva de crecimiento de <i>E. coli</i> ATCC 25922 correlacionando la concentración (UFC/mL) versus el tiempo de crecimiento (horas).....	40
<b>Figura 7.</b> Densidad óptica versus el logaritmo neperiano de las UFC/mL de la curva de crecimiento.....	40
<b>Figura 8.</b> Variación de la concentración del fago en el tiempo según la temperatura a la que fue expuesta. ....	42
<b>Figura 9.</b> Diferentes temperaturas de exposición durante 5 minutos. ....	42
<b>Figura 10.</b> Diferentes temperaturas de exposición durante 15 minutos.....	43
<b>Figura 11.</b> Variación de la concentración del fago expuesto a diferentes pH. ....	44
<b>Figura 12.</b> Concentración de bacteriófagos expuesta al cloroformo.....	45
<b>Figura 13.</b> Concentración de bacteriófagos en función a la temperatura de almacenamiento. ....	46
<b>Figura 14.</b> Resultado de la técnica del “spot test” del fago $\Phi$ GF1. ....	48
<b>Figura 15.</b> Concentración final de bacteriófagos a diferentes MOI.....	49
<b>Figura 16.</b> Curva de crecimiento de un paso del fago $\Phi$ GF1. ....	50
<b>Figura 17.</b> Microfotografía obtenida por MET del fago $\Phi$ GF1.....	51
<b>Figura 18.</b> Microfotografía de 2 fagos con morfotipo C3. ....	51
<b>Figura 19.</b> Microfotografías del fago $\Phi$ GF1 en diferentes campos. ....	52

## ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
<b>Tabla 1.</b> Comparación de propiedades entre distintos tratamientos para el control de bacterias patógenas.....	17
<b>Tabla 2.</b> Características de los patotipos de <i>Escherichia coli</i> .....	23
<b>Tabla 3.</b> Mecanismos de resistencia en <i>Escherichia coli</i> .....	25
<b>Tabla 4.</b> Características bioquímicas de las cepas de <i>Escherichia coli</i> .....	37
<b>Tabla 5.</b> Relación de cepas bacterianas empleadas para evaluar el rango de hospedero. ....	47

## RESUMEN

Los bacteriófagos son virus que infectan a bacterias, incluyendo bacterias patógenas, como *Escherichia coli*, una bacteria ubicua que podemos encontrar en la flora natural de los humanos, pero que también puede presentarse como la principal causa de diarreas en humanos, principalmente en niños. Este patógeno causa enfermedades que se transmiten por los alimentos (ETA) amenazando la salud pública, pero no solo es un problema clínico: al ser transmitida por alimentos, también es un problema en la industria alimentaria, generando grandes pérdidas por contaminación con este patógeno. Los bacteriófagos son una alternativa para la reducción o eliminación de este patógeno que en muchos casos ya es resistente a diferentes antibióticos (MDR).

En el presente estudio se aisló un bacteriófago que infecta a *Escherichia coli* denominado  $\Phi$ GF1, y se caracterizó de manera físico-química y microbiológica. El bacteriófago  $\Phi$ GF1 es resistente al cloroformo, estable hasta la temperatura de 50 °C y en los rangos de pH 5-8, además muestra un amplio rango de hospedero infectando también a *Shigella sonnei* que es una bacteria estrechamente relacionada a *Escherichia coli*. Al realizar la curva de crecimiento de un paso se observó un periodo de latencia de 15 minutos y un tamaño de explosión aproximado de 85 fagos. Este bacteriófago presenta un morfotipo C3 que es extremadamente raro, y pertenece a la familia *Podoviridae*. Por las características mostradas este bacteriófago es un buen candidato para futuras aplicaciones en reducción o eliminación de *Escherichia coli*.

**Palabras clave:** *Escherichia coli*, bacteriófago, amplio rango de hospedero, morfotipo C3, *Podoviridae*.

## ABSTRACT

Bacteriophages are viruses that infect bacteria, including pathogenic bacteria, such as *Escherichia coli*, a ubiquitous bacterium that can be found in the natural flora of humans, but can also be the main cause of diarrhea in humans, especially in kids. This pathogen causes diseases that are transmitted by food (ETA) threatening public health, but it is not only a clinical problem: when it is transmitted by food, it is also a problem in the food industry, generating large losses by contamination with this pathogen. Bacteriophages are an alternative for the reduction or elimination of this pathogen that in many cases is already resistant to different antibiotics (MDR).

In this research a bacteriophage infecting *Escherichia coli* designated  $\Phi$ GF1 was isolated, and it was characterized in a physicochemical and microbiological manner. The bacteriophage  $\Phi$ GF1 is resistant to chloroform, stable to the temperature of 50 ° C and in the ranges of pH 5-8, in addition it shows a wide range of host also infecting to *Shigella sonnei* that is closely related to *Escherichia coli*. When performing the one-step growth curve, a latency period of 15 minutes and an approximate explosion size of 85 phages was observed. This bacteriophage has a C3 morphotype that is extremely rare and belongs to the *Podoviridae* family. By the characteristics shown this bacteriophage is a good candidate for future applications in reduction or elimination of *Escherichia coli*.

**Keywords:** *Escherichia coli*, bacteriophage, wide host range, C3 morphotype, *Podoviridae*.

## I. INTRODUCCIÓN

Los bacteriófagos o fagos son virus que infectan células bacterianas pudiendo interrumpir el metabolismo bacteriano, proliferar dentro de ellas y ocasionar lisis de las células bacterianas (Sulakvelidze, 2001). Los bacteriófagos son los agentes biológicos más abundantes en la Tierra, estimados en un total de  $10^{30}$  a  $10^{32}$  partículas en todo el planeta, y tienen un papel importante en la determinación del balance de los ecosistemas bacterianos (Goyal, 2006, Kutter y Sulakvelidze, 2004). Aunque el descubrimiento original de los bacteriófagos es dudoso, en 1896 el bacteriólogo británico Ernest Hankin reportó la presencia en aguas de los ríos Ganges y Jamuna en la India de una sustancia que pasaba a través de los filtros de la porcelana fina y que era termolábil con actividad antibacteriana contra *Vibrio cholerae* (Hankin, 1896) y dos años después el bacteriólogo ruso Gamaleya reportó también actividad antibacteriana en la tierra contra *Bacillus subtilis* (Sulakvelidze, 2001). Sin embargo, ninguno de estos investigadores estudió más a fondo sus hallazgos, por lo que se considera como descubridores independientes a Frederick W. Twort y Felix d'Hérelle en 1915 y 1917 respectivamente.

Las bacterias causantes de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) son una amenaza a la salud pública en todo el mundo. En los últimos años varias cepas patógenas se han vuelto más agresivas y resistentes a los antibióticos (Blackburn y McClure, 2009). Se conoce que alrededor de 40 patógenos alimentarios causan enfermedades en los seres humanos (Rodríguez-Lázaro y Hernandez, 2006) y de estos más del 90 % de casos reportados han sido atribuidos a bacterias (Hakovirta, 2008). Y entre las bacterias patógenas más comunes se encuentran *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella* spp., *Bacillus cereus*, y *Campylobacter jejuni* (Flores y Herrera, 2005). Algunas cepas de *Escherichia coli* además de producir citotoxinas también pueden producir otros factores virulentos como intimina y hemolisina (Fagan *et al.*, 1999), es por esto que

*Escherichia coli* es considerado un patógeno capaz de causar casos aislados o brotes de diarrea, síndrome urémico hemolítico, colitis hemorrágica y cuadros de disentería, principalmente en niños (Rodríguez-Angeles, 2002) y muchas de estas enfermedades son transmitidas por alimentos.

El uso directo de fagos en terapia requiere muchas aprobaciones y su desarrollo es a largo plazo en el marco regulatorio occidental. Es por esto que muchas empresas han optado por trabajar en otros campos para la aplicación de estos fagos, entre ellos el campo de la seguridad alimentaria (Lu y Koeris, 2011). En la industria alimentaria se buscan alternativas no térmicas para el proceso de reducción o eliminación de la carga bacteriana en los alimentos, sin que esto afecte sus características organolépticas (Somolinos *et al.*, 2008). Los bacteriófagos son virus que infectan y se multiplican específicamente en bacterias (Adams, 1966) y han sido propuestos, al igual que las proteínas derivadas de ellas (endolisinas), para el biocontrol de bacterias patógenas en los alimentos, sin que estos alteren sus propiedades organolépticas (García *et al.*, 2010). Los fagos ya han sido utilizados para reducir o eliminar la carga bacteriana en diferentes alimentos y para diferentes especies de bacterias patógenas. Para la selección de los bacteriófagos a emplearse para estos fines hay que seleccionar fagos líticos, evitando el uso de fagos propensos a la lisogenia y de ser posible que sean termoestables y que toleren los cambios de pH. He ahí la importancia de la caracterización microbiológica y físico-química de estos bacteriófagos antes de su aplicación (Gonçalves *et al.*, 2015).

Diversos estudios han demostrado que los bacteriófagos son capaces de lisar bacterias multidrogoresistentes considerando que su mecanismo de acción es diferente al de los antibióticos. Actualmente existen muchos productos comerciales a base de fagos, entre estos tenemos a Ecoshield contra *Escherichia coli*, SPLX-1 contra *Salmonella* spp. y LISTEX P100 contra *Listeria monocytogenes*, que son los más conocidos (Segundo *et al.*, 2010), estos productos no se comercializan en el Perú ni otros productos a base de bacteriófagos.

En el Perú solo se han realizado algunos trabajos sobre bacteriófagos, se han utilizado bacteriófagos en fagoterapia frente a infecciones por *Staphylococcus aureus* meticilino resistente en ratones (Tamariz *et al.*, 2014) y también se han caracterizado bacteriófagos específicos de *Vibrio cholerae* aislados de muestras de aguas costeras del Perú (Talledo *et al.*, 1998) entre otros trabajos. Siendo estos trabajos, precedentes para la presente investigación, se aisló y caracterizó en base a aspectos microbiológicos y físico-químicos, un bacteriófago específico de *Escherichia coli* para conocer sus características, para posteriores aplicaciones como: fagoterapia, reducción de carga bacteriana en alimentos o detección de patógenos en alimentos.

En la actualidad, en el Perú, los estudios en bacteriófagos aún están en fase experimental, no hay ningún producto comercial, autorizado, a base de bacteriófagos. El primer paso para que un bacteriófago pueda ser parte de un producto comercial, es la caracterización del mismo, y dependiendo de sus características, se puede saber si este fago tiene alguna aplicabilidad.



## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1 BACTERIÓFAGOS

Los virus son complejos supramoleculares compuestos por DNA o RNA, el cual se encuentra rodeado por una cubierta proteica y que necesitan células viables para poder ser replicados. Los virus utilizan la maquinaria metabólica de las células para sintetizar su material genético y proteínas de la cápside y envoltura si es que la presentan. Existen distintos tipos de virus que pueden infectar células procariontes o células eucariontes. Los bacteriófagos (fagos) son parásitos intracelulares obligados que se multiplican al interior de las bacterias, haciendo uso de algunas o todas sus maquinarias biosintéticas.

Las partículas infecciosas, al igual que en otros virus, se llaman viriones y básicamente consisten en material genético rodeado por una cubierta proteica que lo protege del ambiente y le sirve como vehículo de transmisión de una célula hospedadora a otra. Debido al pequeño tamaño de los viriones, su visualización se hace imposible bajo el microscopio óptico, por lo que para realizar análisis morfológicos se tiene que recurrir a la observación en el microscopio electrónico.

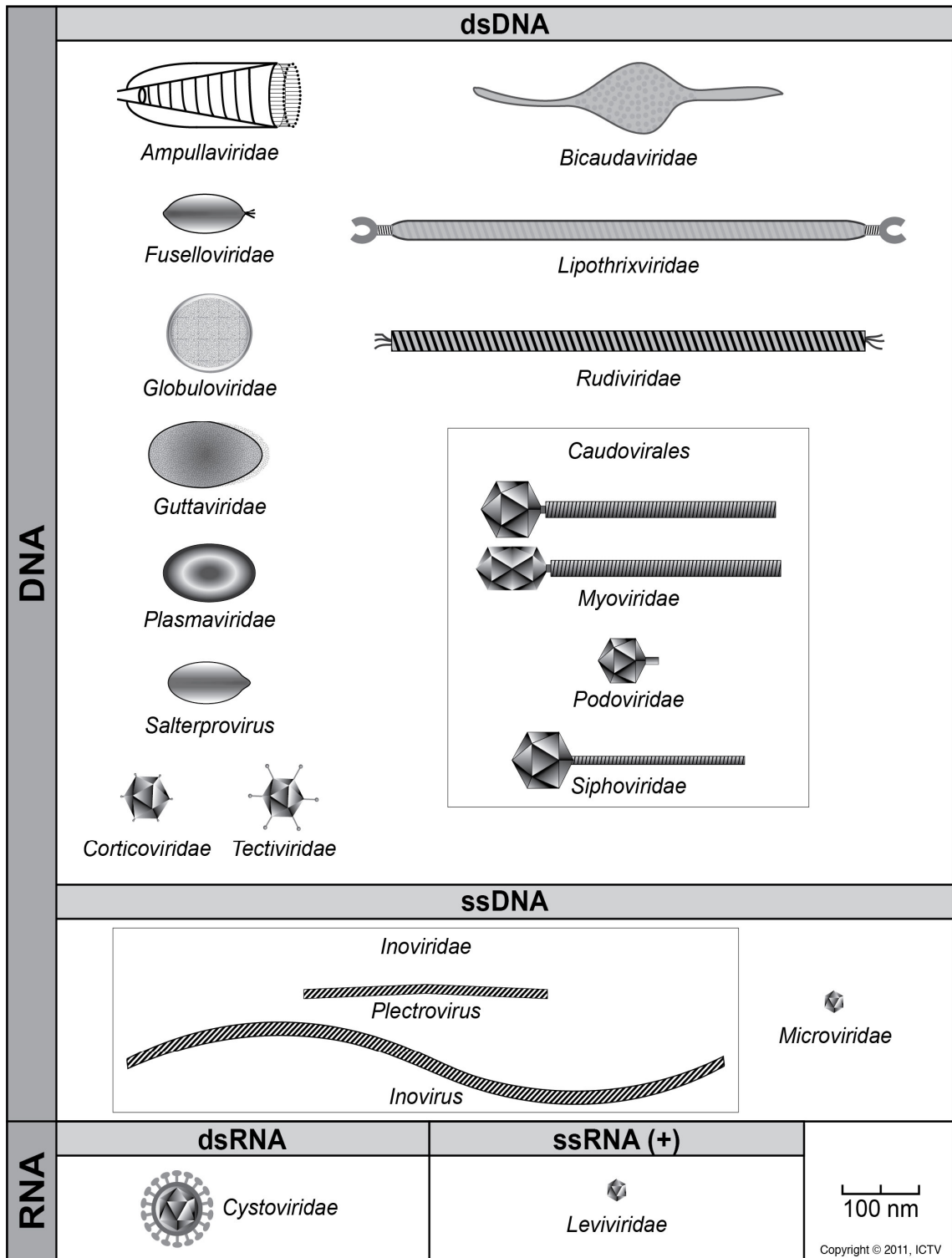
Actualmente se han examinado al microscopio electrónico más de 5500 bacteriófagos, que según su morfología pertenecen a 10 familias ya clasificadas. Esta clasificación no se realiza solo en base a las características morfológicas, sino también según el tipo de ácido nucleico y la presencia o ausencia de cubierta externa. Más de 96% de los bacteriófagos presentan cola y ADN de doble cadena y se ubican en las familias *Myoviridae*, *Siphoviridae* y *Podoviridae*. Las otras 7 familias de fagos cúbicos, filamentosos y pleomórficos presentan partículas pequeñas y bien definidas y contienen ADN o ARN de cadena simple o doble (Ackermann, 2007).

## 2.2 ESTRUCTURA DE LOS BACTERIÓFAGOS

Los fagos presentan una variedad de formas y tamaños, pero tienen características básicas estructurales que comparten una gran mayoría, como cabeza o cápside, cuello y cola. El tamaño de los fagos varía entre 24 y 200 nm de longitud, estando el fago T4 entre los más grandes con una medida de 200nm de longitud y de 80-100 nm de ancho.

Los fagos clásicos poseen una estructura a manera de cabeza y varían en simetría y tamaño. Algunos presentan simetría icosaédrica o esférica y otros presentan simetría helicoidal o filamentosa; al interior de esta cápside se encuentra el ácido nucleico protegido. La mayoría de los fagos presenta una cola unida a la cápside. La cola es un tubo hueco a través del cual el ácido nucleico es transferido a la célula durante la infección y su tamaño es variable en los fagos más complejos como el T4, donde la cola se rodea de una cortina proteica contráctil durante la infección de la bacteria. Al extremo de la cola los fagos más complejos como T4 presentan una placa en la base y una o más fibras unidas a ella. Esta placa de base y las fibras de la cola están involucradas en la unión de los fagos a la célula bacteriana. No todos los fagos tienen placas de base ni fibras de la cola, En tales casos existen otras estructuras que se ven asociadas en la unión de partícula del fago a la bacteria (Figura 1) (Mayer, 2015).

Según la estructura de los bacteriófagos el Comité Internacional de Taxonomía de virus (ICTV) en el 2014 determinó que más del 96 % de los bacteriófagos pertenecen al orden *Caudovirales*, es decir fagos con cola y ADN de doble cadena, y lo conforman 3 familias filogenéticamente relacionadas: *Myoviridae* son fagos con cola contráctil compuesta por una vaina y un tubo central que representa el 25,1 % de este orden, teniendo como modelo al fago T4; *Siphoviridae*, presentan colas larga no contráctiles representando el 60,8 % del orden y tienen como fago modelo al fago Lambda ( $\lambda$ ) y por último la familia *Podoviridae* con cola corta representando el 14,1 % del orden y teniendo como fago modelo al fago T7 (Ackermann, 2011).



**Figura 1.** Clasificación de las familias de bacteriófagos que infectan a bacterias y arqueas. (dsDNA: DNA de doble cadena; ssDNA: DNA de una cadena; dsRNA: RNA de doble cadena; ssRNA(+): RNA de una cadena de polaridad positiva).

Imagen tomada del libro Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses (Lefkowitz *et al.*, 2016)

## 2.3 REPLICACIÓN VIRAL

Los bacteriófagos pueden llevar a cabo dos tipos de ciclos dentro de la célula infectada:

### **Ciclo Lítico**

Durante el ciclo lítico ocurre la producción de nuevas partículas y la lisis de la célula hospedera, con la consiguiente liberación de la progenie de bacteriófagos. Los fagos son replicados utilizando maquinaria metabólica de la célula hospedadora, es por eso que es considerado un parásito obligado (Meza, 2016). Cada una de las etapas del ciclo lítico juega un papel importante en el predominio de un fago en específico por sobre otros que poseen el mismo huésped. Los parámetros del ciclo lítico se determinan a través de una prueba llamada “ciclo de crecimiento de un paso”, donde se analiza el número de partículas de fago liberadas en un ciclo lítico y para eso es importante conocer las etapas de infección del fago en su hospedero (Figura 2).

#### ➤ Reconocimiento y adsorción:

En la primera etapa del proceso de infección el fago reconoce los receptores presentes en la superficie celular y se adsorbe, esto se da de manera muy específica, los fagos se unen a la bacteria mediante cualquier parte que sea reconocida por el receptor celular, proteínas de cápside, cola, placa basal o fibras. Dependiendo de la bacteria varía el tipo de receptor que éstas presenten: elementos del peptidoglicano, ácidos teicoicos, lipoteicoicos y proteínas asociadas a la pared celular en bacterias gram-positivas y componentes de los lipopolisacáridos (LPS), proteínas de la membrana externa, como porinas y proteínas de transporte en bacterias gram-negativas; también los componentes de cualquier matriz externa que secreta la bacteria pueden ser utilizados como receptores, tal como los antígenos K de los exopolisacáridos capsulares o las proteínas de la capa S. Un mismo fago puede tener como receptores varias

moléculas y poseer varias adhesinas diferentes en su estructura. Cuantas más moléculas pueda reconocer como receptores, más amplio será el rango de huésped del fago, es decir, mayor será el número de cepas, especies y en algunos casos géneros bacterianos que podrá utilizar como huéspedes (Kutter y Sulakvelidze, 2004). La intensidad con la que interaccione la adhesina con su receptor determinará la eficiencia de adsorción del fago; experimentalmente una mayor eficiencia de adsorción se observa cuando la mayor parte de los fagos infectan a su hospedero, puede ocurrir que el total de fagos en una suspensión infecte a las bacterias o que solo un porcentaje de ellos lo haga (Clokier y Kropinski, 2008). Cofactores como los iones  $\text{Ca}^{+2}$  y  $\text{Mg}^{+2}$  muchas veces ayudan a una mejor eficiencia de adsorción.

➤ Inyección del material genético viral:

Cuando la adsorción del bacteriófago a su hospedero se da de manera irreversible se produce un cambio en la estructura de la proteína basal, provocando un poro en la membrana citoplasmática de la célula entonces se contrae la vaina del fago y ocasiona la inyección del genoma viral que se desplaza desde la cápside hasta el citoplasma bacteriano a través de la cola, y debido a que el poro no es lo suficientemente grande deja en el exterior a la partícula fágica vacía, que no es indispensable para la replicación del DNA fágico, en contraste de la mayoría de virus de eucariotas que normalmente se fusionan con la membrana citoplasmática de la célula para entregar su genoma. (Letellier *et al.*, 2004).

El genoma viral tiene aproximadamente 10 micras de largo y transferirse de la cápside al citoplasma le puede tomar desde segundos a minutos (Inamdar *et al.*, 2006), esta transferencia se da gracias a la liberación de la presión interna de la cápside que se origina cuando el genoma viral que está en solución acuosa dentro de la célula pasa a confinarse en una cápside que puede medir hasta 50

nm de diámetro, esto origina un aumento interno de concentración, densidad y presión alcanzando hasta las 60 atm de presión, este traspaso del genoma viral termina gracias a la síntesis de proteínas y un transporte activo (Letellier *et al.*, 2003).

➤ Replicación:

La replicación del material genético es la transición entre la transcripción temprana y la transcripción tardía, los productos de la transcripción temprana muchas veces son necesarios para que ocurra la replicación y después de esto se da lugar a la transcripción tardía donde se generan las proteínas estructurales entre otras. La eficiencia de replicación depende tanto del genoma del fago como de la cepa hospedera ya que para este proceso utilizará la maquinaria de replicación de su hospedero. No solo se replica el ADN para que genere nuevas copias y que sean transcritas y empaquetadas, también se generan nuevas proteínas de la estructura del bacteriófago, utilizando las enzimas de la célula huésped como la ARN polimerasa, ADN polimerasa, ribosomas y nucleótidos (Engelkirk *et al.*, 2011). El mRNA tardío genera proteínas que son parte de la estructura del bacteriófago (cápside y cola), proteínas que participan en el ensamblaje de la estructura, pero que no forman parte de la misma y también proteínas encargadas de la lisis celular.

➤ Ensamblaje:

Una vez que se han sintetizado todas las estructuras necesarias para formar nuevos bacteriófagos, se da paso al ensamblaje de las piezas del fago, donde se empaqueta el ADN en una envoltura proteica denominada cápside, que está ligado a su vez a estructuras como la cola que le proporciona la capacidad de infección. La cabeza se expande y gana estabilidad antes o durante el empaquetado del ADN (Guttman *et al.*, 2005). El empaquetamiento esta

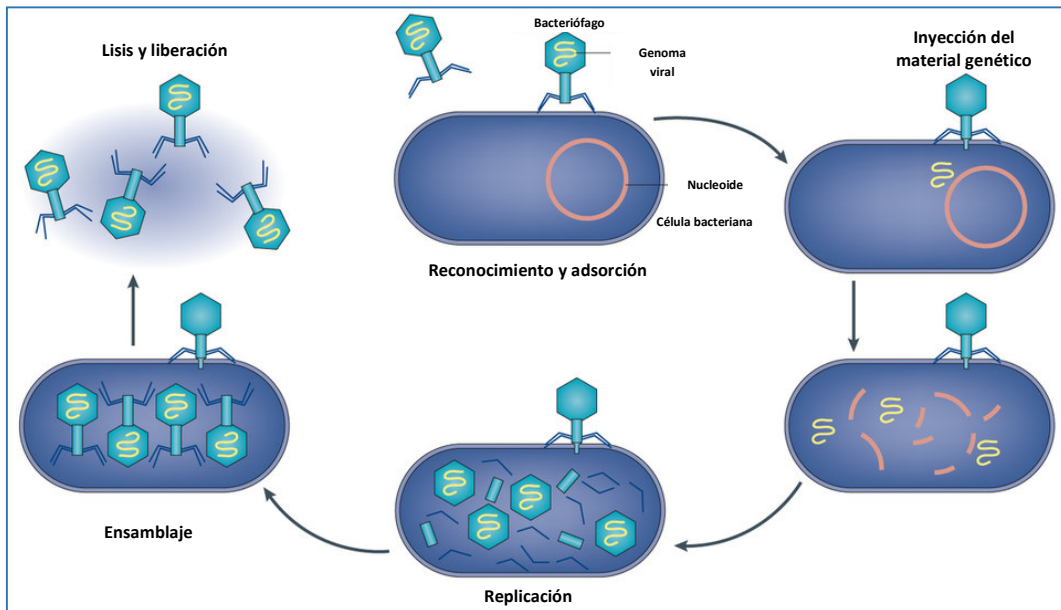
mediado por las terminasas y existen 2 mecanismos diferentes de empaquetamiento, el primero donde la terminasa se une al DNA cortándolo en una secuencia específica llamada *pac*, el segundo donde la terminasa reconoce una secuencias llamadas *cos* que flanquean el genoma completo del fago y determina los sitios de inicio y terminación del empaquetamiento (Black, 1989)

➤ Lisis y liberación:

El ensamblaje ocurre en el interior celular y estas partículas de fagos maduras necesitan lisar a su hospedero para así liberar la progenie viral e infectar a otras bacterias. La lisis de su hospedero se puede dar por la acumulación de fagos maduros en el interior de la célula o generalmente se da por la acción de enzimas específicas para esta función, la endolisina es una enzima que degrada el peptidoglicano de la pared celular, generando así una inestabilidad bacteriana (Bläsi y Young, 1996) y la holina que provoca la desorganización de la membrana bacteriana generando poros que permiten el acceso de la endolisina a la pared bacteriana (Brüssow, 2001). Este complejo endolisina-holina es importante para la lisis bacteriana (Young, 2002).

**Lisis desde afuera:**

La lisis del bacteriófago a su hospedero no siempre se da cumpliendo el ciclo lítico completo, hay un fenómeno llamado “lisis desde afuera” que ocurre cuando se enfrenta el fago con la bacterias a una MOI elevada (típicamente >20), aquí se da el reconocimiento y adsorción de un gran número de fagos en la superficie bacteriana, esto provoca la lisis de la bacteria por desestabilización de su estructura (Abedon, 2008), por lo tanto, en este fenómeno no se aprecia un aumento en la progenie de fagos.



**Figura 2.** Ciclo Lítico de los bacteriófagos que implica: adsorción, inyección del material genético, replicación, ensamblaje y la lisis de la bacteria.

Imagen modificada de (Kingwell, 2015).

### Ciclo Lisogénico

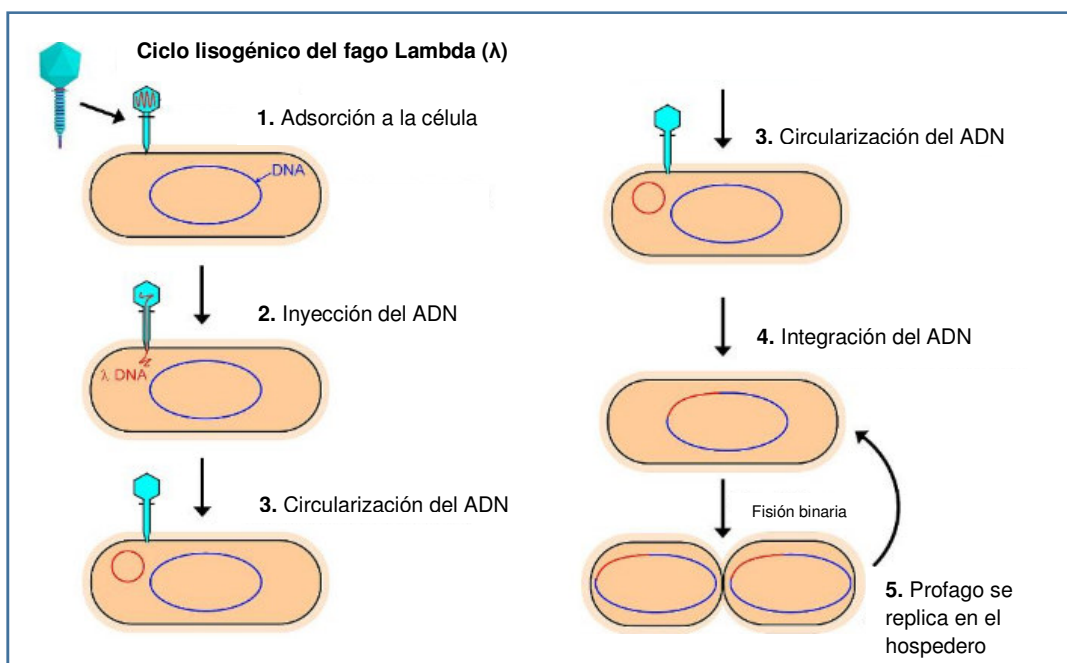
Tiempo después de que fueran descubiertos los fagos, se encontraron cepas bacterianas que tenían la presencia de fagos pero que no eran destruidas por estas, en los años 50 se observó que habían fagos que reconocían, adsorbían e inyectaban el material genético en su hospedero pero que no sintetizaban proteínas ni había un ensamblaje ni generación de progenie viral, a estas cepas bacterianas se les denominó cepas lisogénicas porque tienen una relación estable con el fago en su interior sin que este los lise. El fago permanece en estado latente y replica su ADN junto con el de su huésped, mientras que su huésped presenta inmunidad frente a ese fago, no puede ser reinfectado por el mismo virus (Figura 3).

Los fagos que se encuentran en un estado de lisogenia con su huéspedes son llamados profagos o fagos temperados y estos generan una gran diversidad en las bacterias, representando un porcentaje significativo del total de su genoma, en la cepa *Escherichia coli* O157:H7 aproximadamente el 12 % de su genoma total está constituido por 18



profagos (Clokie y Kropinski, 2008), los profagos han estado presentes a lo largo de la evolución, siendo importantes en la transferencia de genes, lo cual le puede dar a la bacterias ciertas características como la generación de toxinas, virulencia, resistencia a antibióticos o antígenos de superficies (Dini, 2011).

La organización en los genomas de los profagos se divide en 2 grandes grupos, el primero que interviene en la integración y mantenimiento del genoma vírico y el segundo que induce la escisión llevándolo a un ciclo lítico. En el primer grupo para la integración, se encuentra principalmente el gen represor *CI*, sitios *att P* y gen de la integrasa (gen *int*), que reconoce el sitio *att B* en el genoma bacteriano produciendo una recombinación e integración catalizada por la enzima integrasa. El segundo grupo de genes consiste principalmente en las regiones del gen *Cro*, *att L* y *att R* que hacen que la lisogenia sea un proceso reversible, de manera que cuando hay una inducción del ciclo lítico se produce una recombinación específica de sitio entre las regiones *att L* y *att R*, liberándose el genoma viral y llevando a cabo el ciclo lítico (Leong et al., 1986).



**Figura 3.** Ciclo Lisogénico de los bacteriófagos que implica: adsorción, inyección del material genético, circularización e integración.

Modificado de [http://cronodon.com/BioTech/Virus\\_Tech\\_2.html](http://cronodon.com/BioTech/Virus_Tech_2.html)

### **Eventos que conducen a la terminación de la Lisogenia:**

En el momento que la bacteria lisogénica quede expuesta a condiciones adversas, el estado lisogénico puede ser terminado, a este proceso se le llama inducción. Las condiciones que favorecen la terminación del estado lisogénico incluyen: desecación, exposición a la luz UV o radiación ionizante, exposición a químicos mutagénicos, etc. Estas condiciones adversas conducen a la producción de una proteasa (proteína rec A) la cual destruye a la proteína CI que es un represor de los genes líticos y esto conduce a la expresión de estos genes líticos del fago, reprimiendo al grupo de genes lisogénicos y desencadenando el ciclo de replicación lítico del fago hasta la lisis de la bacteria (Mayer, 2015).

### **Curva de crecimiento de bacteriófagos líticos**

La curva de crecimiento es un seguimiento en el tiempo al ciclo lítico del bacteriófago, en esta curva se muestra el tiempo que se demora un fago en replicarse y generar una progenie en su hospedero, el cual varía dependiendo del hospedero, porque el fago mientras más receptores reconozca más amplio será el rango de hospedero, infectará a un número mayor de cepas, especies y hasta géneros (Kutter y Sulakvelidze, 2004).

La velocidad en que se replique el ADN del bacteriófago, genere sus proteínas y se ensamble formando fagos maduros determinarán el “periodo de eclipse” que se puede evidenciar experimentalmente con una lisis forzada con cloroformo. El intervalo de tiempo desde la infección del hospedero hasta la liberación de los fagos maduros por la lisis de la bacteria inducida por el mismo fago se conoce como el “periodo de latencia”, el último paso del ciclo lítico es la liberación de la progenie viral, el número de virus que se liberan por bacteria infectada es llamado “tamaño de explosión” y este depende mucho del fago como del hospedero y varía desde algunas unidades hasta miles (Dini, 2011).

## 2.4 FAGOTERAPIA

Con el descubrimiento de los fagos y de su evidente actividad bactericida sobre las cepas bacterianas específicas, Félix d'Herelle (1917) propuso el tratamiento de pacientes infectados con *Shigella dysenteriae* para controlar la difteria, siendo el primero en proponerlos como agentes terapéuticos. En un comienzo los tratamientos con bacteriófagos ocasionaban sepsis en los pacientes por la gran cantidad de antígenos bacterianos presentes, por lo que se tuvo que purificar, liberándolo de los restos bacterianos originados por la lisis celular. En 1921 Richard Bruyboche ya con un método estandarizado usó los fagos para tratar infecciones de estafilococos en la piel. En un inicio fueron utilizados por los países de Europa del este donde incluso d'Herelle estableció patentes en fagoterapia en países como Francia y Georgia, el uso de la fagoterapia se dio principalmente por la antigua Unión Soviética.

El Instituto de Inmunología y Terapia Experimental (también conocido como "Instituto Hirszfeld") fundado en 1952 en Wroclaw, Polonia, proporcionó los mejores casos documentados, donde reportan el uso de bacteriófagos como tratamiento a aproximadamente 2000 pacientes infectados con diferentes patógenos (enfisemas, peritonitis, osteomielitis y otras) y donde entre el 60 y 90 % de los casos fueron exitosos (Inal, 2003).

Posteriormente con el descubrimiento de los antibióticos se dejó de lado el uso de los fagos por algunos años, reemplazándose por la penicilina descubierta por Fleming en 1928, que era mucho más fácil de manejar, estabilizar y producir para su comercialización además de ser mucho más económica.

Después del descubrimiento de los antibióticos, en Occidente se produjeron y se usaron indiscriminadamente, para tratar infecciones bacterianas, lo que conllevó a la aparición de cepas resistentes a antibióticos. Con el pasar de los años se generaban nuevos antibióticos más efectivos; sin embargo, las cepas cada vez evolucionaban más rápido haciéndose resistentes a todas las líneas de antibióticos generados. Es el caso de la

bacteria *Staphylococcus aureus*, que en la actualidad presenta cepas resistentes a vancomicina, que es la última línea de antibióticos generada (Rodríguez y Vesga, 2005). Este problema de multiresistencia también se observó en las cepas de *Escherichia coli* shigatoxigénico (STEC), por el uso de los antibióticos no solo en infecciones en humanos, sino también en la medicina veterinaria (Mora *et al.*, 2005). Ante estos problemas se inició la búsqueda de nuevas soluciones, volviendo a tomar importancia el campo de la fagoterapia que se ha desarrollado en diversas áreas de la industria (Lu y Koeris, 2011).

El uso de los bacteriófagos para tratamiento o profilaxis tiene ventajas y desventajas, entre sus ventajas se encuentra que tienen un impacto limitante, es decir que si bien se replican dentro de la bacteria, cuando ésta ya no está disponible los fagos dejan de producirse y son gradualmente eliminados por el organismo humano; cuando se usa un cóctel de bacteriófagos, esto no solamente hace más efectivo el tratamiento sino también que reduce la probabilidad de que las cepas se puedan volver resistentes a los fagos usados, además que, al replicarse, el fago también sufre mutaciones y mientras la bacteria evoluciona generando resistencia, los fagos coevolucionan junto con ellas. Otra ventaja es la alta especificidad de éstas, a diferencia de los antibióticos que generan un desbalance en la flora bacteriana y pueden ocasionar una infección secundaria por *Pseudomonas sp.* o *Clostridium difficile*, que causan diarrea e infección al colon, los fagos solo atacan a una bacteria específica evitando este desbalance bacteriano. Además, la dosis requerida no es tan alta como en los antibióticos, porque el fago se autoreplica en la bacteria hospedera (Tabla 1).

La fagoterapia también tiene desventajas como el poder usar solamente fagos líticos, ya que una gran parte de ellos también pueden ser lisogénicos, recombinando su material genético con el de las bacterias dándoles un fenotipo diferente que muchas veces puede involucrar la producción novel de toxinas como el caso de *Vibrio cholerae* donde la toxina que afecta al humano fue adquirida por un fago lisogénico (Faruque y Mekalanos, 2012) , el uso en humanos o animales genera una reacción del sistema

inmunológico inactivando los fagos, por lo que se busca fagos poco inmunogénicos, otra desventaja es la aprobación para asegurar que estos fagos no generan un riesgo y poder comercializarlos, aunque ya hay algunos aprobados por la FDA y en la actualidad el campo de aplicación en la medicina aún está en fase experimental.

La fagoterapia en humanos se ha desarrollado principalmente en el Instituto Pasteur donde en 1974 ya tenían disponibles suspensiones fágicas para tratar *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *E. coli* y *Serratia* (Vieu *et al.*, 1976)

Actualmente la utilización de bacteriófagos en el ganado bovino se da por el problema que representa *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC), que utiliza a los bovinos como principal reservorio siendo ésta la principal fuente de contagio a los seres humanos por el consumo de carne contaminada. Y aunque en todo el proceso de manufactura se puede sufrir esta contaminación, tratar a los animales es la primera barrera de prevención, la eliminación del patógeno antes que se introduzca al proceso de manufactura, es por esto que se han realizado investigaciones en el tratamiento a bovinos contra la infección por cepas de EHEC (Johnson *et al.*, 2008).

Bacterias como *Aeromonas*, *Vibrio* o *Streptococcus* presentan un gran problema en diversas especies marinas, por lo que la acuicultura también tomó interés en la fagoterapia. La cepa *Pseudomonas plecoglossicida* presenta un grave problema para el pez *Plecoglossus altivelis* el cual fue tratado con 2 fagos reduciendo la mortalidad de estos (Park *et al.*, 2000)

En el campo de la agricultura la empresa AGRIPHAGE se encarga de generar productos fágicos para tratar infecciones de *Xanthomonas campestris* en tomate y pimiento también viene realizando estudios relacionados con el "Canker of Kiwifruit" que lo causa la bacteria *Pseudomonas syringae actinidiae* y que causa grandes pérdidas en el cultivo, estos productos a base de fagos no son tóxicos y son seguros tanto para las plantas como para los animales (Meza, 2016).

En el año 2006, la FDA anunció la aprobación de un preparado a base de bacteriófagos a partir de 6 fagos purificados individualmente, para ser utilizado como bioconservantes

en productos cárnicos y avícolas como agente antimicrobiano contra *Listeria monocytogenes*. El producto comercial llamado LISTEX P100 fue aprobado como un bioconservante y obtuvo el estatus de GRAS “Generalmente Reconocido como Seguro” (Food and Drug Administration, 2006). La aprobación de este producto contra *Listeria monocytogenes* con el fin de la seguridad alimentaria ha aumentado el impulso para las investigaciones y descubrimiento de nuevos bacteriófagos contra patógenos alimentarios. En la actualidad el uso de los bacteriófagos como agentes antimicrobianos se enfoca en la industria alimentaria, donde los antibióticos no pueden ser usados debido a que generan resistencia en las bacterias y los tratamientos físicos y químicos de inactivación de bacterias pueden alterar las características organolépticas de los productos (García *et al.*, 2010). Diversos estudios han demostrado que los bacteriófagos son capaces de lisar bacterias multidrogorresistentes considerando que su mecanismo de acción es diferente al de los antibióticos. Actualmente existen muchos productos comerciales a base de fagos, entre estos tenemos a Ecoshield contra *Escherichia coli*, SPLX-1 contra *Salmonella* spp. y LISTEX P100 contra *Listeria monocytogenes*, que son los más conocidos (Segundo *et al.*, 2010).

**Tabla 1.** Comparación de propiedades entre distintos tratamientos para el control de bacterias patógenas.

PROPIEDADES	FAGOTERAPIA	ANTIBIÓTICOS	VACUNAS
ESPECIFICIDAD	ALTA	BAJA (Afecta Microbiota)	ALTA
DOSIS	BAJA/ALTA	ALTA	ALTA
RESISTENCIA	ALTA (Solo en el Hospedero)	ALTA (En Todas las Bacterias)	BAJA
SUSTENTABILIDAD	ALTA (No Afecta el Medio Ambiente)	BAJA (Afecta el Entorno)	ALTA (No Afecta el Medio Ambiente)

Cuadro modificado de Romero (2015).

## 2.5 VISIÓN GENERAL DE *Escherichia coli*

La bacteria *Escherichia coli* es un bacilo gramnegativo de la familia *Enterobacteriaceae* que se encuentra principalmente en el tracto intestinal de humanos y animales de sangre caliente como parte de la flora natural (Kaper *et al.*, 2004). Esta bacteria coloniza el intestino humano pocas horas después del nacimiento y forma parte de la microbiota natural, siendo necesaria para el correcto funcionamiento del tracto digestivo, además de producir vitamina B y K. Pocas veces estas cepas causan enfermedad, sin embargo, también hay cepas que son patógenas para los humanos y animales, siendo las causantes de un amplio espectro de enfermedades como infecciones gastrointestinales, urinarias, sanguíneas, etc.

*Escherichia coli* es la bacteria más abundante en la flora intestinal y debido a sus características que nos permiten un fácil manejo, como la disponibilidad de la secuencia completa de su genoma, capacidad para crecer tanto en medio aerobios como anaerobios, la convierten en un organismo muy utilizado en la biotecnología. Esta bacteria es utilizada tanto en el área médica como industrial, es el organismo modelo para la tecnología del ADN recombinante gracias a su fácil cultivo y su capacidad de proliferar rápidamente (Yoon *et al.*, 2009).

Kauffmann (1947) clasificó a esta bacteria usando una identificación serológica, antígenos O (Lipopolisacáridos, LPS), H (flagelares), K (envoltura y cápsula). Actualmente se conoce 186 tipos de antígenos somáticos (O), 112 flagelares (H) y 60 capsulares (K). El antígeno O describe el serogrupo y junto con el antígeno H determinan el serotipo (Rodríguez-Angeles, 2002). Con los avances de la genética y disponibilidad del genoma de la bacteria, la clasificación de *Escherichia coli* se ha basado en el factor de virulencia y en el cuadro clínico asociado, clasificándose en patotipos (Tabla 2), donde se han definido 7 tipos de *Escherichia coli* entéricos y 3 tipos extraintestinales (Kaper *et al.*, 2004). Los patógenos intestinales utilizan la vía fecal-oral

para propagarse, es decir la ingestión de alimentos o agua contaminados, los principales tipos de patógenos intestinales son los siguientes:

➤ *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC):

Las cepas EPEC son el primer grupo que se identificó serológicamente y causan diarrea principalmente en los niños, en condiciones de poca higiene. Su patogenicidad se da principalmente por la adherencia íntima entre la bacteria y la membrana de las células del epitelio intestinal, seguida de la destrucción de la microvellosidad. Las cepas típicas cuando presentan el plásmido EAF. (Rodríguez-Angeles, 2002). Los principales serogrupos asociados son: O55, O86, O111ab, O119, O125ac, O126, O127, O128ab, y O142.

➤ *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC):

Esta cepa también es conocida como productora de toxina Vero o toxina semejante a Shiga (VTEC o STEC). La principal bacteria de este grupo es el serotipo O157:H7, este serotipo posee factores de virulencia parecida a las que se encuentran en *Shigella*, como la toxina shiga, estas toxinas actúan en el colon generando colitis hemorrágica y diarrea con sangre. También es responsable del Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) (Rodríguez-Angeles, 2002). Otros serotipos asociados son O26:H11, O103, O111, O113, y O121.

➤ *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC):

Es el patógeno más frecuente causante de la diarrea del viajero con diarrea acuosa leve en humanos de todas las edades. Esta cepa coloniza la mucosa del intestino delgado por medio de fimbrias o pilis llamadas CFA, puede sintetizar 1 o 2 toxinas que le otorgan patogenicidad, la toxina termolábil (LT) y una toxina termoestable (ST), los genes para estas toxinas normalmente se encuentran en



un plásmido que también contiene genes para las CFA, aunque algunos genes para ST se han encontrado también en transposones (Rodríguez-Angeles, 2002). Los serogrupos más comunes son O6, O8, O15, O20, O25, O27, O63, O78, O85, O115, O128ac, O148, O159, y O167.

➤ *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC):

Estas cepas han ocasionado brotes de enfermedades diarreicas en diferentes partes del mundo, afecta principalmente a niños de países en desarrollo e infectados por el VIH. Presenta un adherencia agregativa que se caracteriza por la aglutinación de bacterias entre sí, siendo inespecífica ya que se adhiere tanto a las células Hep-2 como a la superficie del cobre objeto. Los serotipos más comunes son O3:H2, O15:H18, O111:H21, O127:H2 (Rodríguez-Angeles, 2002).

➤ *Escherichia coli* de adherencia difusa (DAEC):

Causante de diarreas principalmente en niños de 1 a 5 años, poseen un tipo de fimbria en su superficie llamada F1845, que está relacionada en el fenómeno de adherencia difusa a líneas celulares como Hela o HEp-2. En ensayos *in vitro*, estas cepas tienen la capacidad de producir protuberancias, lo cual le confiere protección a la bacteria, estas protuberancias aún no se han demostrado en ensayos *in vivo*. El serotipo más común es O126:H27 (Rodríguez-Angeles, 2002).

➤ *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC):

Es la principal causa de diarreas acuosas y ocasionalmente disentería tanto en niños como adultos, estas cepas están estrechamente relacionadas con *Shigella spp.* Su patogenicidad se debe a la invasión del epitelio del colon, con una previa adhesión a las vellosidades de la mucosa mediante mucinasas y adhesinas, entra por endocitosis a la célula y se multiplica dentro de ellas. Los serogrupos

más comunes son O28ac, O29, O112, O124, O136, O143, O144, O152, O164, y O167 (Rodríguez-Angeles, 2002).

➤ *Escherichia coli* invasiva adherente (IAEC):

Es un patotipo que ha surgido recientemente, asociado con la enfermedad de Crohn, su síntoma es una persistente inflamación intestinal, gracias a sus fimbrias tipo 1, la cual le permiten invadir las células y replicarse hasta en macrófagos.

Las cepas de *Escherichia coli* extraintestinales están asociadas comúnmente a infecciones nosocomiales en las vías urinarias, respiratorias y en el sistema nervioso central. Pueden generar infecciones generalizadas (bacteriemias o sepsis) y se transmiten por medio de los animales como aves de crianza, cerdos, vacunos por un contacto directo con estos animales o con sus productos (Fratamico *et al.*, 2016). Los principales patógenos extraintestinales son los siguientes:

➤ *Escherichia coli* uropatogénica (UPEC):

Esta cepa es distinta a las cepas intestinales, a nivel fenotípico especialmente en los factores de virulencia. Esta es la cepa más común en infecciones del tracto urinario (UTI) en humanos, siendo responsable de aproximadamente el 80 % de los casos (Allocati *et al.*, 2013).

➤ *Escherichia coli* meningitis neonatal (NMEC):

NMEC es la principal causa de meningitis en neonatales en países desarrollados, dejando secuelas neurológicas en muchos de los sobrevivientes. En los últimos

años ha aumentado el número de cepas NMEC resistente a antibióticos (Allocati *et al.*, 2013).

➤ *Escherichia coli* patógena aviar (APEC):

Esta cepa patógena se encuentra en la microflora intestinal de las aves sanas, aunque también es la responsable de enfermedades extraintestinales en varias especies aviares. Estudios recientes han revelado similitudes en los serogrupos y los factores de virulencia entre las cepas de *Escherichia coli* extraintestinales que afectan a humanos y las cepas APEC que afectan a aves, lo que sugiere una posible fuente de enfermedades transmitidas por alimentos. Sin embargo, la capacidad de APEC para causar enfermedades en humanos aún no ha sido probada (Allocati *et al.*, 2013).

## **2.6 *Escherichia coli* COMO ARMA BIOLÓGICA**

La guerra usando armas biológicas se ha dado por siglos, y el uso de agentes infecciosos (patógenos) y toxinas con este fin sigue siendo una amenaza. Los agentes bioterroristas potencialmente peligrosos son principalmente microorganismos que producen ántrax, plaga, tularemia y viruela. Sin embargo *Escherichia coli* también se encuentra en la lista del Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC) como un agente biológico que presenta una potencial amenaza contra la salud pública y la seguridad. La CDC clasifica estas armas biológicas en 3 categorías. Los de categoría A son diseminados de persona a persona presentando una alta tasa de mortalidad y un impacto en la salud pública, la categoría B son patógenos moderadamente fáciles de diseminar lo que genera una morbilidad moderada y baja mortalidad, la categoría C son patógenos con morbilidad y mortalidad alta y que pueden ser fácilmente diseminados. La cepa O157:H7 está presente en la categoría B como “amenaza a la seguridad alimentaria” (Anderson y Bokor, 2012).

**Tabla 2.** Características de los patotipos de *Escherichia coli*.

Patotipo (acrónimo)	Enfermedades	Síntomas	Factor de virulencia
<b><i>E. coli</i> entérica</b>			
<i>E. coli</i> enteropatógena (EPEC)	Diarrea en niños	Diarrea acuosa y vómitos	Bfp, intimina, LEE
<i>E. coli</i> enterohemorrágica (EHEC)	Colitis hemorrágica HUS	Diarrea sanguinolenta	Toxina shiga, intimina Bfp
<i>E. coli</i> enterotoxigénica (ETEC)	Diarrea del viajero	Diarrea acuosa y vómitos	Toxinas termolábil y CFA
<i>E. coli</i> enteroagregativa (EAEC)	Diarrea en niños	Diarrea con mucus y vómitos	AAFs, citotoxinas
<i>E. coli</i> adherente difusa (DAEC)	Diarrea aguda en niños	Diarrea acuosa, UTI recurrente	Daa, AIDA
<i>E. coli</i> enteroinvasiva (EIEC)	Parecido a shigelosis	Diarrea acuosa, disentería	Toxina shiga, hemolisina, invasión celular, Ipa
<i>E. coli</i> invasiva adherente (AIEC)	Asociado a la enfermedad de Crohn	Inflamación intestinal persistente	Fimbrias tipo I, invasión celular
<b><i>E. coli</i> extraintestinal</b>			
<i>E. coli</i> uropatógena (UPEC)	Infección sistémica	Cistitis, Pielonefritis	Fimbria P tipo I, AAFs, hemolisina
<i>E. coli</i> meningitis neonatal (NMEC)	Meningitis neonatal	Meningitis aguda, sepsis	Fimbria S, capsula K1
<i>E. coli</i> patógena aviar (APEC)	Probable fuente de enfermedades transmitidas por alimentos	-	Fimbria P tipo I, capsula K1

Modificado de Allocati *et al.* (2013)

UTI: Terapia intensiva; Bfp: Pili de formación de haces; LEE: Locus para el borrado de enterocitos; HUS: Síndrome urémico hemolítico; CFA: antígeno de factor de colonización; AAF: Fimbria adherente agregativa; Daa: Adhesina difusa; AINDA: Adhesina envuelta en adherencia difusa; Ipa: Antígeno de plásmido de invasión.

## 2.7 RESISTENCIA MICROBIANA EN *Escherichia coli*

El aumento de la resistencia a los antibióticos de las cepas de *Escherichia coli* es motivo de preocupación a nivel mundial, ya que complica el tratamiento de infecciones severas con este patógeno. Desde el descubrimiento de la penicilina y su introducción en el mercado global, un gran número de bacterias han respondido a estas, evolucionando, adquiriendo y transmitiendo diferentes mecanismos de resistencia a otras especies, el abuso de los antibióticos en los diferentes campos y la constante migración de personas a nivel nacional e internacional aceleraron este proceso de adquisición de cepas multidrogoresistentes (Normark y Normark, 2002).

Una cepa multidrogoresistente es aquella que es resistente a 3 o más clases de antibiótico a las que la bacteria no mostraba resistencia intrínseca. *Escherichia coli* es intrínsecamente resistente a la penicilina G a niveles terapéuticos, debido a su membrana externa, además de otros antibióticos con diferentes mecanismos de acción. Las cepas productoras de beta-lactamasas que son enzimas que se codifican en plásmidos, presenta resistencia a antibióticos beta-lactámicos, como penicilinas o cefalosporinas y presenta un gran problema en las Enterobacterias en general. La resistencia al carbapenem viene dada por las enzimas carbapenemasas que también se encuentra codificado en plásmidos y están presentes principalmente en cepas de *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. La resistencia a quinolonas viene dada por mutaciones en las proteínas blanco o por la transferencia de genes de resistencia, estos genes se pueden ubicar en plásmidos como en los cromosomas. Los aminoglucósidos son antibióticos bactericidas que actúan inhibiendo la síntesis de proteínas, pero en los últimos años alteraciones del sitio 16S RNAr por las enzimas metiltransferasas amenaza a esta clase antimicrobiana (Tabla 3) (Allocati *et al.*, 2013).

Para la mayoría de pacientes infectados con cepas diarreicas no es recomendado el tratamiento antibiótico, debido a que el uso de estos en exceso está asociado a resistencia, sin embargo en casos de ETEC su uso si es recomendado. Los genes de

resistencia también se encuentran en *Escherichia coli* que forman parte de la flora natural del intestino actuando como reservorios de genes de resistencia antibiótica (Mosquito *et al.*, 2011). En el Perú la determinación de resistencia a antibióticos de las cepas de *Escherichia coli* se realiza de manera *in vitro*, mediante métodos fenotípicos, determinando la sensibilidad o resistencia a determinados antibióticos. Los estudios en el Perú para cepas resistentes se centran principalmente en las cepas beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE) y carbapenemasas (EPC) que pueden causar bacteremias y llevar a la muerte (Adrianzén *et al.*, 2016).

**Tabla 3.** Mecanismos de resistencia en *Escherichia coli*.

<b>Mecanismo</b>	<b>Ejemplo</b>	<b>Objetivo</b>
Inactivación de enzimas	$\beta$ -lactamasas: tipo TEM, tipo SHV	Penicilina de amplio espectro
	ESBLs: Variantes tipo TEM/SHV; Clusters: CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9, CTX-M-25; Tipos GES/PER/VEB (baja frecuencia)	Penicilinas y cefalosporinas
	Clase A: serino-carbapenemasas Clase B: metalo- $\beta$ -lactamasas sitio de zinc activo	Carbapenems
	Clase D: $\beta$ -lactamasas OXA	
Mutaciones cromosomales	Enzima blanco alterada: ADN girasa, topoisomerasa IV, Disminuye el consumo del antibacteriano; Disminuye la permeabilidad de la membrana; Sobreexpresión de bombas de eflujo	Quinolonas
Resistencia a quinolonas mediados por plásmidos	TMQRs: Qnr, AAC(6'-Ib-cr), QepA, OqxAB	
Inactivación de enzimas	Acetiltransferasas, nucleotidiltransferasas, fosfotransferasas.	
Disminuye el consumo del antibacteriano	Disminuye la permeabilidad de la membrana; Sobreexpresión de bombas de eflujo	Aminoglucósidos
Metilación 16S rRNA	ArmA/familia Rmt	

Modificada de Allocati *et al.* (2013).

ESBLs:  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido; TMQRs: mecanismo transferible de resistencia a quinolonas.

### III. HIPÓTESIS

En las aguas servidas de la planta de tratamiento de aguas residuales “La Taboada”, se encuentran bacteriófagos que infectan *Escherichia coli*, siendo conveniente hacer estudios de aislamiento y caracterización con fines de futuras aplicaciones.

## IV. OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GENERAL

- ✓ Aislar y caracterizar un bacteriófago lítico que infecta *Escherichia coli*, de agua procedente de la planta de tratamiento de aguas residuales “La Taboada”.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Aislar cepas silvestres de *Escherichia coli* que habitan en aguas residuales.
- ✓ Aislar y purificar un bacteriófago lítico que infecta a cepas silvestres y ATCC de *Escherichia coli*.
- ✓ Caracterizar fisicoquímicamente el bacteriófago que infecta a *Escherichia coli*.
- ✓ Caracterizar microbiológicamente el bacteriófago que infecta a *Escherichia coli*.



## V. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 MATERIAL BIOLÓGICO

- Bacteriófago ΦGF1
- *Escherichia coli* ATCC 25922
- *Escherichia coli* ATCC 13076
- Cepas silvestres de *Escherichia coli*

### 5.2 METODOLOGÍA

#### 5.2.1 Aislamiento de *Escherichia coli* ambientales

Se colectaron muestras de aguas servidas de la planta de tratamiento de aguas residuales “La Taboada” y del camal frigorífico “La Colonial”, ambas ubicadas en Lima Metropolitana, en botellas de vidrio estériles de 1L, desde donde se transfirió 25 mL a 225 mL de caldo BHI y se incubó a 37 °C por 24 horas. De este caldo se aislaron las cepas de *Escherichia coli* de la siguiente manera: se realizó el estriado del caldo incubado en agar EMB y en agar MacConkey, y se incubó a 37 °C por 24 horas. Se seleccionaron las colonias que presentaron un color verde metálico característico para *Escherichia coli* en el agar EMB según Tzschope *et al.* (2012) y las colonias con color rosado y un borde definido en el agar MacConkey según Feng *et al.* (2011).

Algunas cepas de *Citrobacter spp.* pueden generar un falso positivo en la selección de colonias en el agar EMB y otras cepas lactosa positivo también generan colonias rosadas en el agar MacConkey, es por eso que una vez aisladas las colonias y pasadas a ceparios se realizó una identificación bioquímica de las cepas, teniendo como control positivo una cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922. Solo se seleccionaron las cepas que fueron rojo de metilo positivo, voges proskauer negativo, indol positivo, H<sub>2</sub>S negativo, motilidad positiva, LIA K/K, TSI A/A y citrato negativo (Rivas *et al.*, 2007).

### 5.2.2 Aislamiento de un bacteriófago que infecta *Escherichia coli*

De las muestras de aguas servidas recolectada de la planta de tratamiento, 300 mL se filtraron en papel Whatman grado 1 para eliminar los residuos sólidos, y este filtrado fue centrifugado a 5 000 rpm por 10 minutos. El sobrenadante de la muestra se filtró con la ayuda de la bomba de vacío, con membranas Millipore de 0.45 µm obteniendo un filtrado libre de restos orgánicos y bacterias, a este filtrado se le hizo un control de esterilidad, inoculando 1 mL en 10 mL de caldo BHI e incubándolo a 37 °C por 24 horas.

Una vez comprobada la ausencia de bacterias en el filtrado, se enfrentó en 10 mL de caldo BHI, 1 mL del filtrado con 100 µL de la cepa *Escherichia coli* ATCC 25922 se incubó toda la noche y se hizo un control negativo, para poder comparar la turbidez de ambos caldos, inoculando solo 100 µL de la cepa en 10 mL del caldo y se llevó a incubar a 37 °C por 8 horas (Jamalludeen *et al.*, 2007). Se tomó el caldo de enfrentamiento que presentó un aclaramiento de la turbidez, en comparación con su control, se centrifugó a 8 000 rpm por 8 minutos y el sobrenadante se filtró con membranas Millipore de 0.45 µm, el procedimiento realizado se hizo siguiendo los lineamientos según Saju *et al.* (2014) modificado. Se realizó una Prueba en Zona (“*spot test*”) para la detección cualitativa de fagos, diseminando 100 µL del cultivo de *Escherichia coli* ATCC 25922 crecido toda la noche a 37°C en caldo BHI, en una placa con 20 mL de agar TSA y se dejó secar de 10 a 15 minutos en flujo laminar, luego se añadió 100 µL del filtrado, en forma de gotas en 3 regiones diferentes y equidistantes para corroborar la presencia de los bacteriófagos en el filtrado.

El filtrado que dio positivo, en el aclaramiento en caldo y el “*spot test*”, fue sembrado en una bicapa de agar para obtener placas de lisis según el método de Adams (1959) modificado, este método de “bicapa de agar” consiste en realizar diluciones seriadas de 1/10 del filtrado, mezclar 1 mL de cada dilución con 1 mL del cultivo de bacteria, a una concentración de 10<sup>8</sup> UFC/mL, agitar e incubar a 37 °C por 10 minutos, añadir agar TSA al 70 % mantenido entre 40-45 °C, mezclar mediante vórtex y verter sobre una placa de

Petri que ya contiene una capa fina de Agar TSA al 100 %. Incubar a 37 °C por 24 horas y luego contar el número de placas de lisis, este número se multiplica por la inversa de la dilución en el cual se contaron las placas de lisis, para poder hallar la concentración de fagos en Unidades Formadoras de Placa por mililitro (UFP/mL), aunque en este caso la bicapa se realizó con el objetivo de obtener placas de lisis separadas y así recuperarlas con mayor facilidad.

Siguiendo las recomendación de Jamalludeen *et al.* (2007), se seleccionaron aquellas placas de lisis que presentaron un mayor diámetro de aclaramiento y con un borde definido. Estas placas de lisis fueron tomadas con la punta de una pipeta Pasteur estéril y se succionó suavemente, con la perilla de goma, los bacteriófagos presentes en la placa de lisis. El contenido de la pipeta se transfirió a un tubo de microcentrífuga con solución salina (NaCl 0,9 % p/v) y se mezcló mediante vórtex. Se mantuvo a temperatura ambiente entre 1 a 2 horas para permitir que el bacteriófago se difunda fuera del agar. El contenido de estos tubos de microcentrífuga fueron filtrados con membranas Millipore de 0.45  $\mu\text{m}$  y fueron almacenados a -20 °C hasta su purificación.

### **5.2.3 Purificación y preparación de la suspensión de trabajo**

A la suspensión de bacteriófagos almacenados a -20 °C, en los tubos de microcentrífuga, se le realizó el método de la bicapa de agar, repetidas veces, hasta obtener 1 placa de lisis en una placa de Petri, para asegurar la pureza de este bacteriófago. Esta placa de lisis fue aislada con la pipeta Pasteur como ya fue descrito (Jamalludeen *et al.*, 2007). A la suspensión de esta placa de lisis se le realizó enfrentamientos fago-bacteria, el cual consiste en combinar el bacteriófago con su respectivo hospedero, con la finalidad que el bacteriófago se autoreplique, aumentando el número de fagos en la suspensión (amplificación). Se realizaron 8 enfrentamientos en 10 mL de caldo BHI cada uno, en cada caldo se añadió 100  $\mu\text{L}$  de la cepa *Escherichia*

*coli* ATCC 25922, crecido toda la noche a 37 °C en caldo BHI, y 100 µL de la suspensión de bacteriófagos puro y se incubó a 37 °C por 8 horas. Pasado el tiempo de incubación se centrifugó los 8 tubos de amplificación a 4 400 rpm por 30 minutos, y se filtró el sobrenadante, con membranas de nitrocelulosa Millipore de 0.45 µm. Esta suspensión de trabajo se almacenó a 4 °C.

#### **5.2.4 Curva de crecimiento de *Escherichia coli* ATCC 25922**

En un matraz con 50 mL de caldo BHI se incubó la cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922 a 37 °C toda la noche, de este caldo se inoculó 100 µL en un matraz con 500 mL de caldo BHI y se incubó a 37 °C en agitación durante 10 horas. Se tomaron muestras de 5 mL al inicio del experimento y por cada hora. A cada muestra se le midió la densidad óptica (D.O), a una longitud de onda de 540 nm., y se le halló el número de unidades formadoras de colonia (UFC) por mililitro, mediante la técnica de incorporación, que consiste en realizar diluciones seriadas a la muestra y sembrar cada dilución en una placa de Petri, con agar TSA mantenido a 45-50 °C, para luego calcular la relación entre la D.O de la cepa *Escherichia coli* ATCC 25922 y la concentración de bacterias presentes por mililitro (UFC/mL) (Ian y Charles, 2004). Tanto la D.O como el número de UFC por mililitro se hallaron por duplicado.

### **CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICAS**

#### **5.2.5 Termoestabilidad**

La estabilidad térmica del bacteriófago se estimó incubando la suspensión de bacteriófagos a una concentración de  $2 \times 10^{10}$  UFP/mL a las siguientes temperaturas: 40, 50, 60, 70 y 80 °C en un tubo de microcentrífuga en baño María y se tomaron muestras para cada temperatura a los 0, 5, 15, 30, 45 y 60 minutos, siguiendo las

recomendaciones de Drulis-Kawa *et al.* (2014). Cada ensayo de termoestabilidad se realizó por triplicado. La concentración de la suspensión de bacteriófagos para cada muestra se determinó mediante la técnica de la bicapa de agar de Adams (1959).

#### **5.2.6 Resistencia a la acidez y la alcalinidad**

Para determinar el rango de tolerancia al pH del bacteriófago, este fago se expuso a diferentes condiciones de pH, desde pH: 3 hasta pH: 10, durante 1 hora. Se adicionó 100  $\mu\text{L}$  de la suspensión de fagos a una concentración de  $1.3 \times 10^8$  UFP/ mL a 900  $\mu\text{L}$  de solución salina (NaCl 0,9 % p/v), ajustada al pH específico, y se incubó a 37 °C por 1 hora. Como control del ensayo se tomó 100  $\mu\text{L}$  de la suspensión de fagos y se incubó en 900  $\mu\text{L}$  de solución salina (NaCl 0,9 % p/v) sin variar el pH. Después del periodo de incubación, cada muestra expuesta a los diferentes pH se llevó a pH 7 según Hoa *et al.* (2014) y se halló la concentración de los fagos. Cada ensayo de resistencia al pH se realizó por triplicado. La concentración de la suspensión de bacteriófagos para cada muestra se determinó mediante la técnica de la bicapa de agar de Adams (1959).

#### **5.2.7 Sensibilidad al cloroformo**

Para estimar la sensibilidad al cloroformo se añadió 500  $\mu\text{L}$  de la suspensión de bacteriófagos a una concentración de  $2 \times 10^{10}$  UFP/mL en 500  $\mu\text{L}$  de cloroformo químicamente puro y se agitó durante 1 hora. Luego se centrifugó a  $4 \times 10^4 \text{ xg}$  por 5 minutos y se recuperó la fase acuosa en un tubo de microcentrífuga, esta fase acuosa se incubó por 6 horas a temperatura ambiente para eliminar, por evaporación, cualquier residuo de cloroformo. Como controles se preparó bajo el mismo procedimiento 500  $\mu\text{L}$  de la suspensión de fagos y 500  $\mu\text{L}$  de solución salina (NaCl 0,9 % p/v) siguiendo el método de Chénard *et al.* (2015). Cada ensayo se realizó por duplicado. La

concentración de la suspensión de bacteriófagos para cada muestra se determinó mediante la técnica de la bicapa de agar de Adams (1959).

### **5.2.8 Temperatura de almacenamiento**

Para determinar la temperatura óptima de almacenamiento del bacteriófago en el tiempo, se siguió el protocolo de Wong (1994) modificado, para lo cual se distribuyó la suspensión de bacteriófagos a una concentración de  $2 \times 10^{10}$  UFP/mL en tubos de microcentrífuga y se determinó la concentración de cada tubo; previo a su almacenamiento, posteriormente estos tubos se almacenaron a las temperaturas de 25, 4 y  $-20$  °C respectivamente. Luego de 4 meses de almacenamiento se atemperaron los tubos de microcentrífuga expuestos a las temperatura de  $-20$  y 4 °C, para determinar la concentración de la suspensión de bacteriófagos, de todos los tubos expuestos, a las 3 diferentes temperaturas por 4 meses, mediante la técnica de la bicapa de agar de Adams (1959). Cada ensayo se realizó por duplicado.

## **CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA**

### **5.2.9 Rango de hospedero**

La susceptibilidad de las cepas al bacteriófago se evidenciaron mediante la Prueba en Zona (“*spot test*”) por ser el método más rápido y eficaz para determinar el rango de hospederos de una colección de cepas (Kutter, 2009). En el ensayo se diseminó 100  $\mu$ L del cultivo crecido por 24 horas a 37 °C en caldo BHI, de cada cepa bacteriana a evaluar, en una placa con 20 mL de agar TSA, luego se añadió 100  $\mu$ L de la suspensión de bacteriófagos a una concentración de  $2 \times 10^{10}$  UFP/mL, en forma de gotas en 3 regiones diferentes y equidistantes; y se dejó secar de 10 a 15 minutos en flujo laminar hasta la total absorción de las gotas para luego incubar todas las placas a 37 °C por 24 horas. Después del tiempo de incubación se observó si las cepas habían crecido correctamente

en la placa de agar y si presentaban regiones de aclaramiento donde fueron colocadas las gotas con la suspensión de bacteriófagos tal como lo menciona Dini y Urraza (2010).

### **5.2.10 Multiplicidad de infección**

La multiplicidad de infección (MOI) se calcula dividiendo el número de partículas virales entre el número de células a infectar. Para determinar la MOI óptima del bacteriófago, se enfrentó 1 mL de cada suspensión de bacteriófagos a las concentraciones de  $10^9$ ,  $10^8$  y  $10^7$  UFP/mL con 1 mL de la cepa *Escherichia coli* ATCC 25922 a una concentración de  $10^9$  UFC/mL, en un tubo con 8 mL de BHI, resultando en MOI de 1, 0.1 y 0.01 respectivamente, luego se incubó a 37 °C por 4 horas siguiendo el protocolo de Li y Zhang (2014) modificado. Después del tiempo de incubación, cada tubo se centrifugó a 6 000 rpm por 5 minutos y se filtró con membranas de nitrocelulosa de 0.45  $\mu$ m de porosidad, la concentración de cada prueba se determinó mediante la técnica de la bicapa de agar de Adams (1959). Cada prueba se realizó por triplicado y la MOI utilizada que generó una concentración más alta al final de la prueba fue considerada la MOI óptima.

### **5.2.11 Curva de crecimiento de un paso**

La curva de crecimiento de un paso del bacteriófago se realizó según el protocolo de Middelboe *et al.* (2010) con algunas modificaciones. Para lo cual, 100  $\mu$ L de la cepa *Escherichia coli* ATCC 25922 crecida toda la noche en caldo BHI a 37 °C se inoculó en 10 mL de caldo BHI y se incubó a 37 °C hasta alcanzar una concentración aproximada de  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>. Luego 1 mL de la cepa se enfrentó con 1 mL del fago utilizando la MOI óptima obtenida previamente. Se incubó por 10 minutos a 37 °C y se centrifugó a 4 000  $\times$ g por 3 minutos, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 2 mL de caldo BHI. Se transfirió 100  $\mu$ L de este cultivo resuspendido a 50 mL de caldo BHI. Se tomó

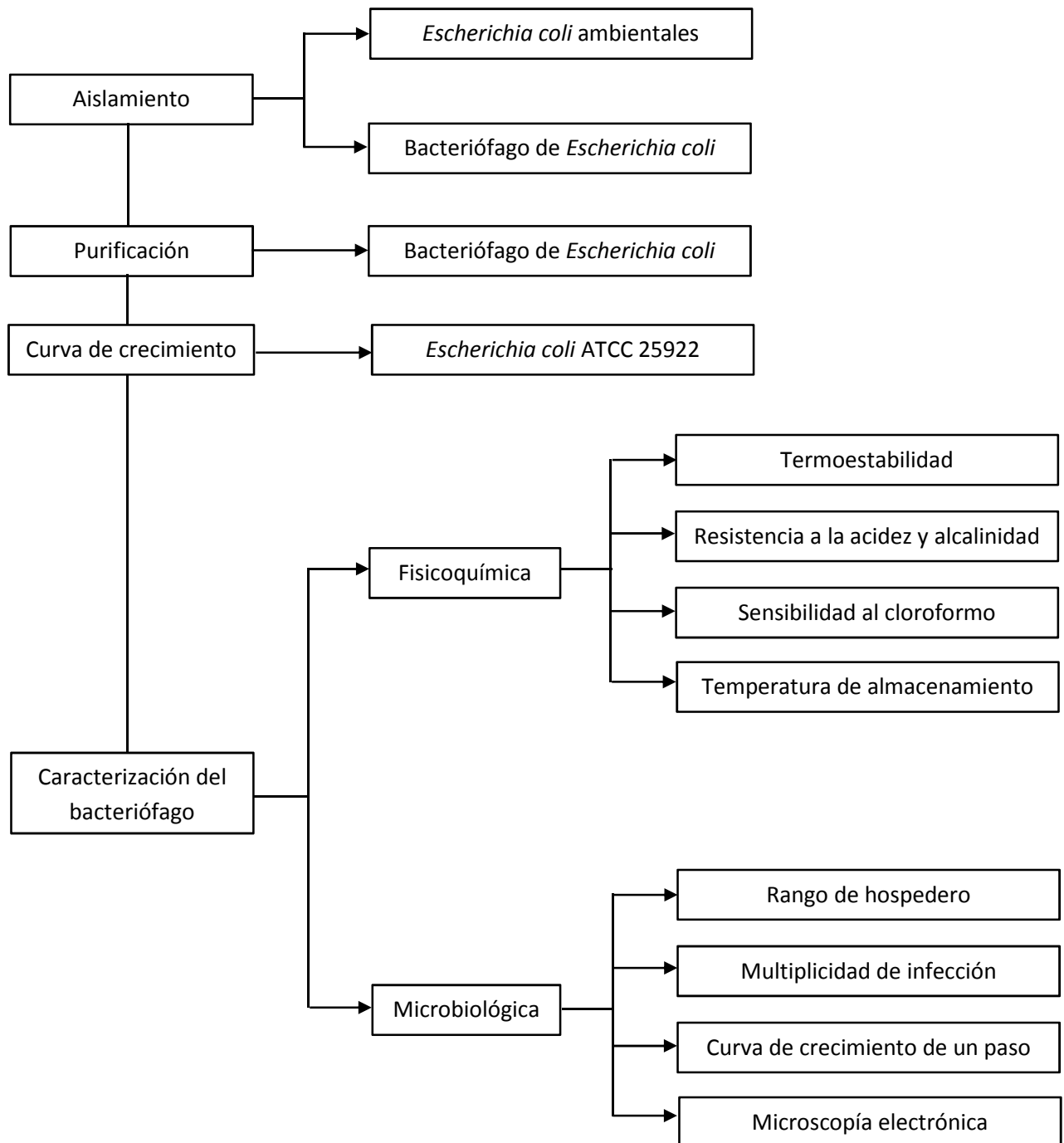
muestras al iniciar el experimento y por cada 5 minutos hasta concluir los 60 minutos, se tomaron muestras por duplicado y se determinó la concentración de las muestras para cada tiempo mediante la técnica de la bicapa de agar de Adams (1959), incubando las placas a 37 °C durante 24 horas.

#### **5.2.12 Microscopía electrónica**

La morfología de los bacteriófagos fue examinada con el microscopio electrónico de transmisión (MET) JEOL JEM-1400Plus por tinción negativa. Una muestra de 10 µL se depositó sobre una rejilla de cobre con 300 mallas, revestida de Formvar, y se fijó por 10 minutos, luego se removió el excedente para añadir 10 µL de acetato de uranilo al 2% por 15 minutos, se removió el excedente para proceder a observar la muestra ya fijada al MET a 110 kV con una ampliación de 120 000 X. El bacteriófago fue clasificado de acuerdo a las directrices del Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) del 2016 (Lefkowitz *et al.*, 2016).



### 5.3 ESQUEMA DE LA METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN



## VI. RESULTADOS

### 6.1 Aislamiento de *Escherichia coli* ambientales

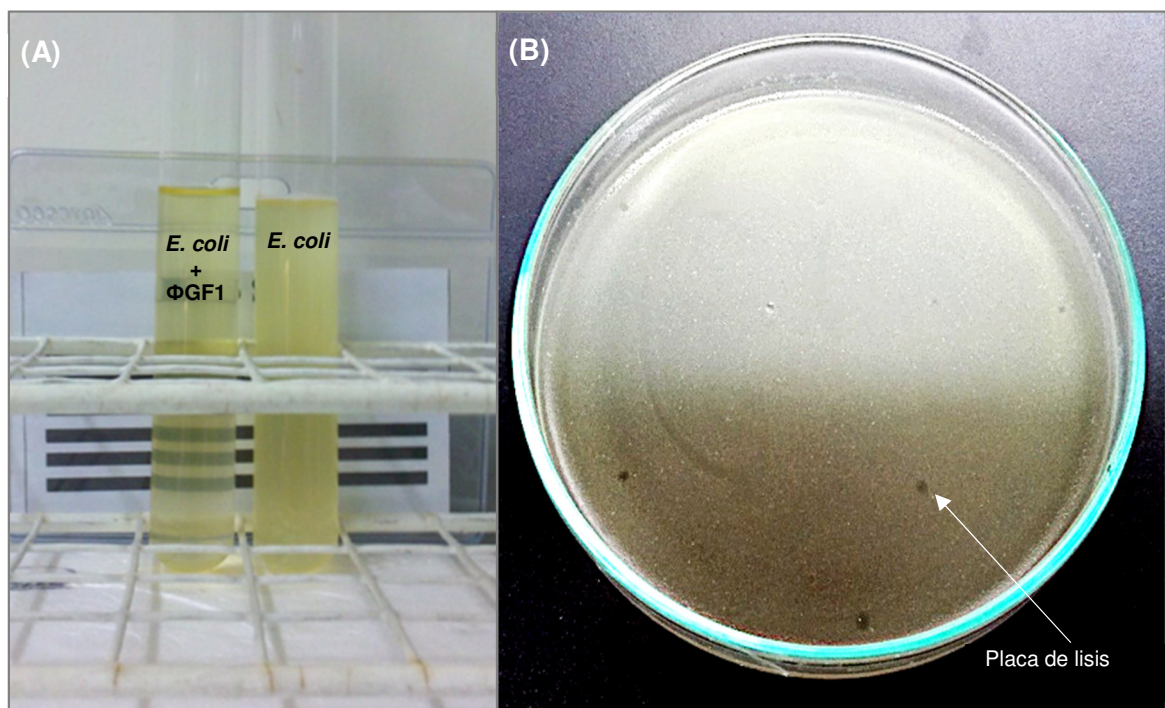
A partir de las muestras obtenidas de la planta de tratamiento de aguas residuales “La Taboada” y del camal frigorífico “La Colonial” se aislaron por estriado 16 cepas presuntivas de *Escherichia coli*, que después de someterlas a las pruebas bioquímicas correspondientes, dieron positivo 10 cepas para *Escherichia coli* que son GF1, GF2, AR, EC1, EC2, EC3, EC5, EC6, EC7 y EC8. Las 3 primeras cepas fueron aisladas de “La Taboada”, mientras que las siguientes 7 cepas fueron aisladas de “La Colonial”. Junto a estas cepas silvestres también se disponía de 2 cepas de la colección ATCC, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Escherichia coli* ATCC 13706, para las posteriores pruebas con él bacteriófago, como se observa en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Características bioquímicas de las cepas de *Escherichia coli* aisladas en el laboratorio respecto a la cepa *Escherichia coli* ATCC 25922.

<i>Escherichia coli</i>	CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS							
	MR	VP	Indol	Sulfuro	Motilidad	LIA	TSI	Citrato
<b>ATCC 25922</b>	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	K/K	A/A	(-)
<b>GF1</b>	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	K/K	A/A	(-)
<b>GF2</b>	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	K/K	A/A	(-)
<b>AR</b>	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	K/K	A/A	(-)
<b>EC1</b>	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	K/K	A/A	(-)
<b>EC2</b>	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	K/K	A/A	(-)
<b>EC3</b>	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	K/K	A/A	(-)
<b>EC5</b>	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	K/K	A/A	(-)
<b>EC6</b>	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	K/K	A/A	(-)
<b>EC7</b>	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	K/K	A/A	(-)
<b>EC8</b>	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	K/K	A/A	(-)

## 6.2 Aislamiento y purificación de los bacteriófagos

Se aisló y purificó el bacteriófago  $\Phi$ GF1 de la planta de tratamiento de aguas residuales “La Taboada”. Este fago fue aislado utilizando como cepa hospedera la cepa silvestre GF1. El enfrentamiento de fago-bacteria, que se utiliza para amplificar el número de virus, también puede ser utilizado como una prueba cualitativa para determinar la presencia del fago, dándole seguimiento a la turbidez del caldo de cultivo BHI por 4 horas. El caldo de cultivo donde estén presentes tanto el fago,  $\Phi$ GF1, como la bacteria, *Escherichia coli* ATCC 25922, tendrá una turbidez menor que el caldo donde se encuentra solo la bacteria como se muestra en la Figura 4A. La solución de trabajo del bacteriófago se realizó, utilizando como hospedero la cepa *Escherichia coli* ATCC 25922, debido a que esta cepa es sensible a este bacteriófago.

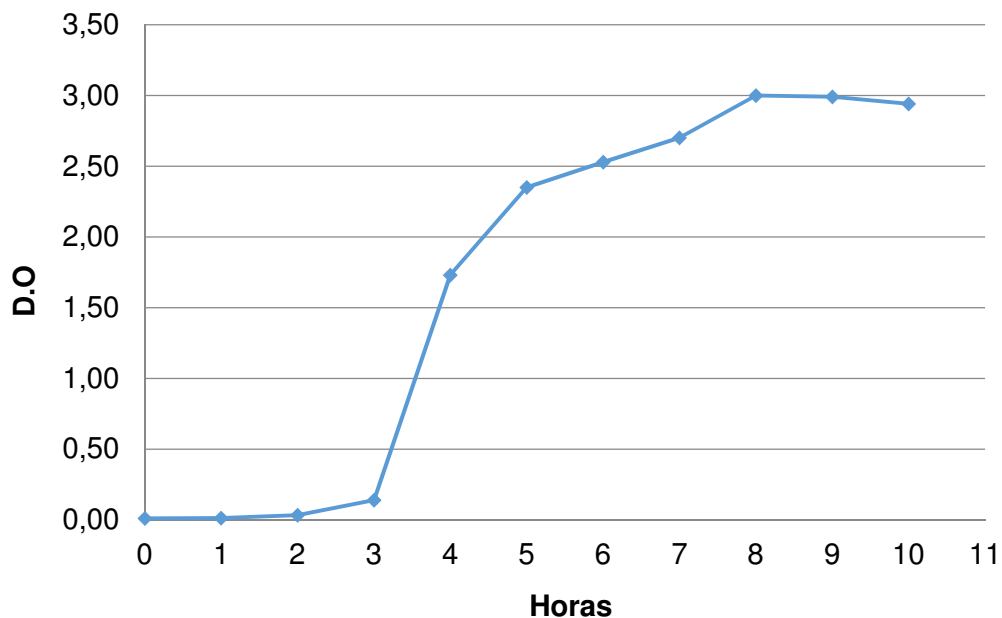


**Figura 4.** A) Aclaramiento en caldo BHI del fago  $\Phi$ GF1 B) Placas de lisis del fago  $\Phi$ GF1.

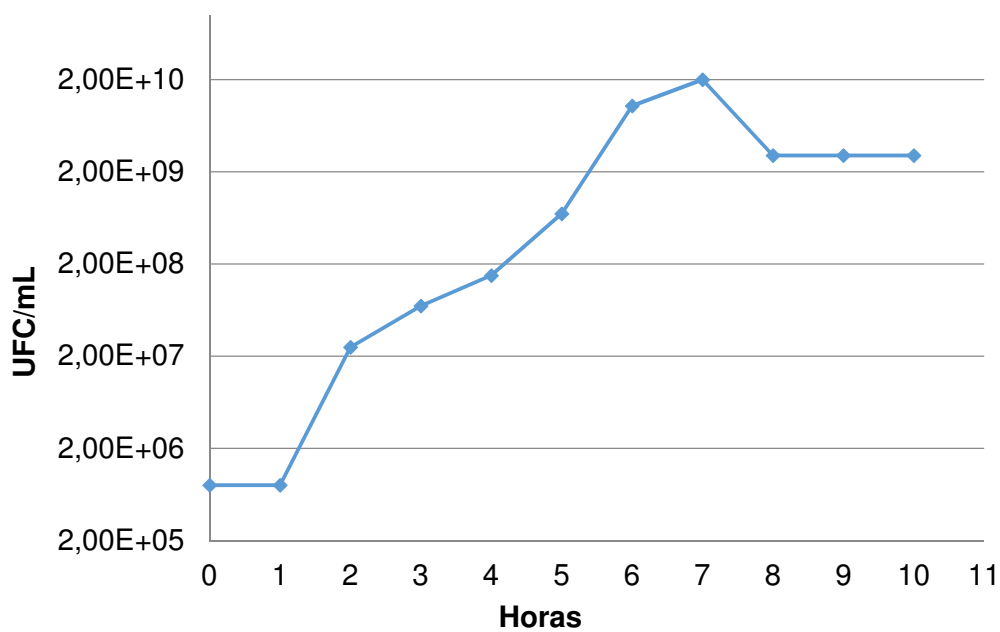
### 6.3 Curva de crecimiento de *Escherichia coli* ATCC 25922

El muestreo solo se dio durante las 10 primeras horas porque la densidad óptica (D.O) se mantuvo durante las 3 últimas horas. En la Figura 5 se grafica la curva de crecimiento de *Escherichia coli* ATCC 25922, correlacionando la D.O versus el tiempo en horas, se observa que la fase logarítmica comienza entre las 3 y 4 horas de iniciado el experimento y que el cultivo llega a la fase estacionaria en 8 horas, conservándose la D.O a las 8, 9 y 10 horas. No se halló el tiempo de muerte porque el objetivo del experimento solo fue determinar el inicio y final de la fase logarítmica.

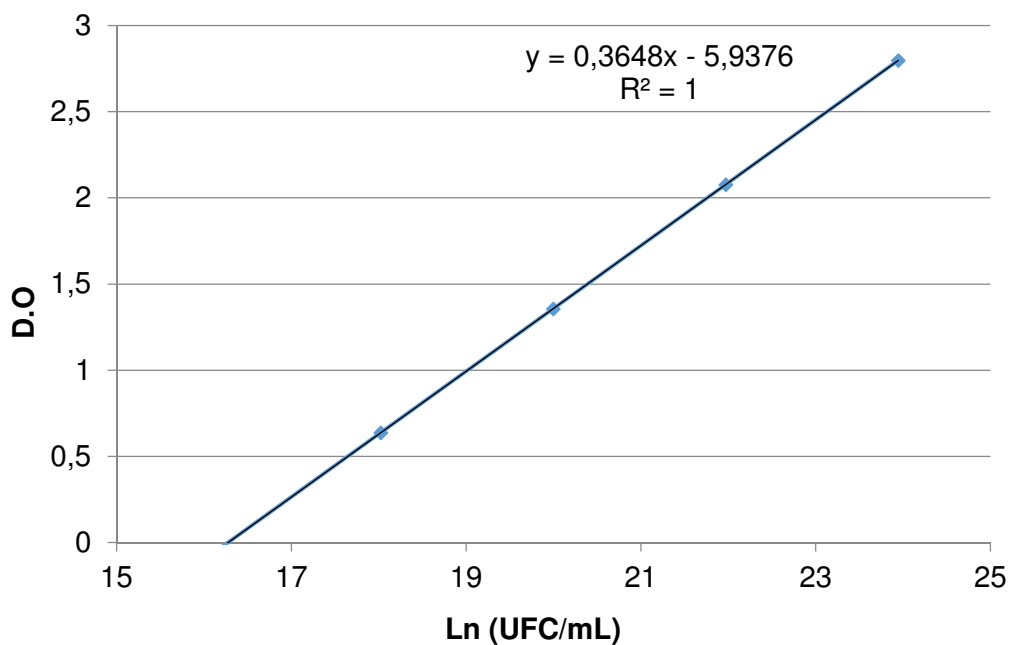
En la Figura 6 se observa que la concentración aproximada de  $10^8$  UFC/mL se encuentra entre las 3 y 4 horas, llegando a la fase estacionaria en 8 horas. Se corrigieron los valores de los puntos que se encuentran en la fase logarítmica, de la D.O y del logaritmo neperiano (Ln) de las concentraciones (UFC/mL) (Figura 7).



**Figura 5.** Curva de crecimiento de *E. coli* ATCC 25922 correlacionando la densidad óptica (D.O) del cultivo versus el tiempo de crecimiento (horas).



**Figura 6.** Curva de crecimiento de *E. coli* ATCC 25922 correlacionando la concentración (UFC/mL) del cultivo versus el tiempo de crecimiento (horas).



**Figura 7.** Densidad óptica del cultivo versus el logaritmo neperiano de las UFC/mL de la curva de crecimiento.

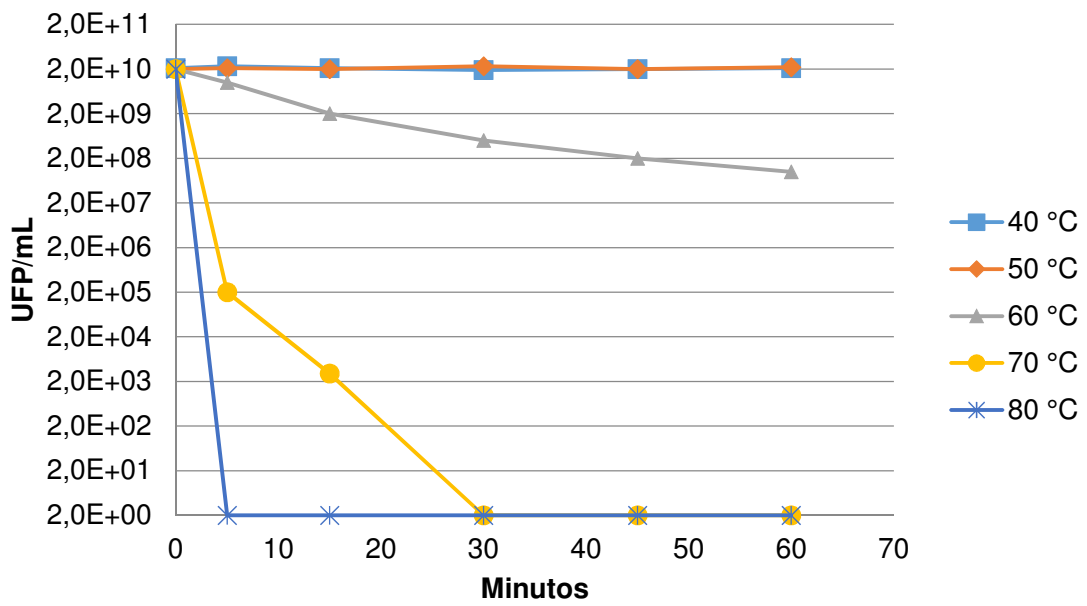
#### **6.4 Termoestabilidad**

La estabilidad térmica del fago  $\Phi$ GF1 se realizó para conocer las temperaturas que afectan a las partículas virales y con qué intensidad en el tiempo, para tener en cuenta las condiciones del almacenamiento. Para probar el tiempo de exposición del fago en todas las temperaturas se comenzó con una concentración de  $2 \times 10^{10}$  UFP/mL. A las temperaturas de 40 y 50 °C no se observó una reducción significativa hasta el minuto 60 de exposición del fago  $\Phi$ GF1 tal como se observa en la Figura 8.

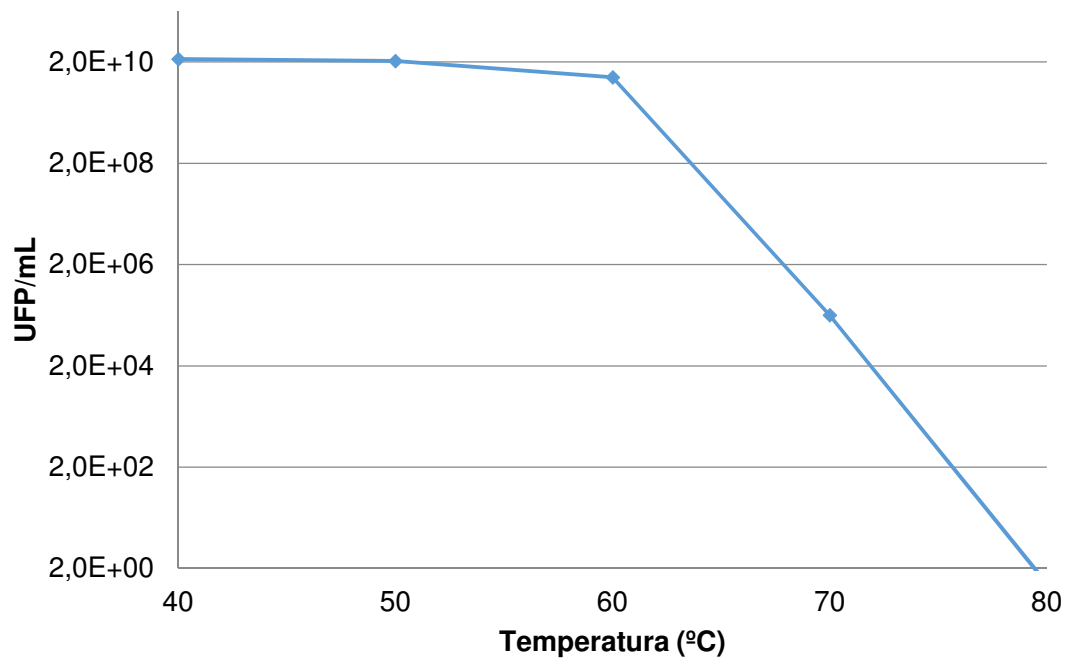
Cuando la suspensión de fagos es expuesta a la temperatura de 60 °C ya se puede apreciar una reducción significativa, a los 5 minutos se observa una reducción del 50 % de la población, a los 15 minutos, hay una reducción en 1 escala logarítmica y a los 60 minutos se observa una reducción en 2 escalas logarítmicas, reduciéndose la población a  $1 \times 10^8$  UFP/mL (Figura 8).

La temperatura de 70 °C reduce en 5 escalas logarítmicas la concentración de la suspensión de fago a los 5 minutos, a los 15 minutos la concentración se redujo a  $3 \times 10^3$  UFP/mL. A los 30 minutos de exposición a la temperatura de 70 °C se inactivaron todas las partículas virales (Figura 8). La temperatura de 80 °C inactivó todas las partículas virales a los 5 minutos de exposición (Figuras 8 y 9).

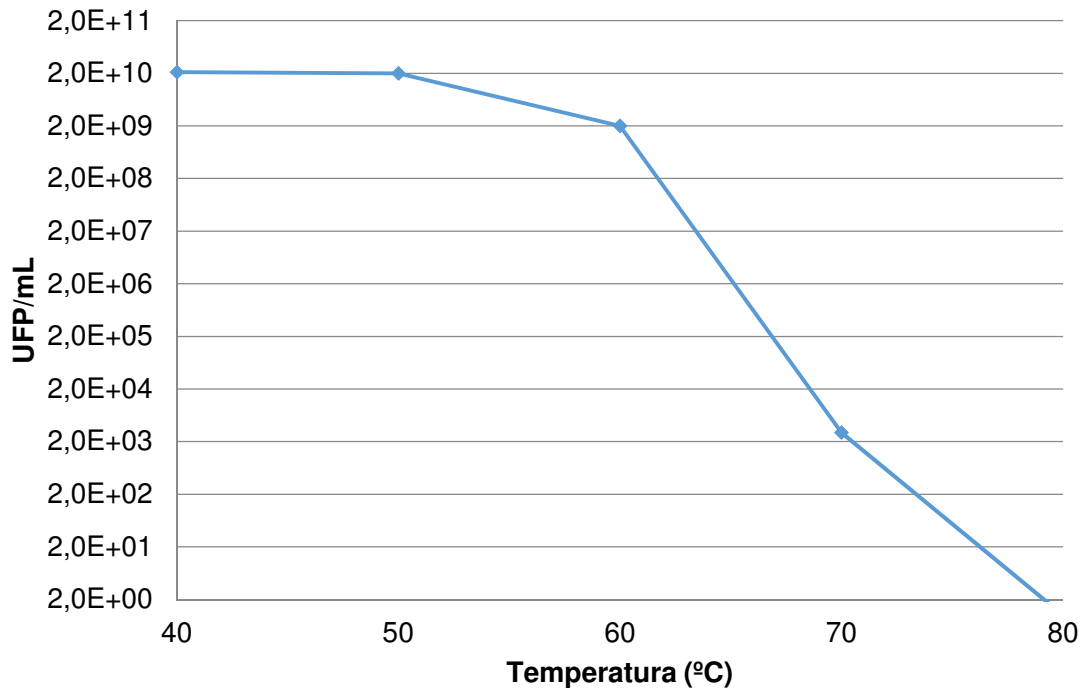
El fago  $\Phi$ GF1 es estable a las temperaturas de 40 y 50 °C hasta por 60 minutos de exposición, mientras que a los 5 y 15 minutos de exposición a 60, 70 y 80 °C ya se observa una reducción significativa en la concentración de fagos, hasta la inactivación total de estos, como se observa en las Figuras 9 y 10.



**Figura 8.** Variación de la concentración del fago en el tiempo según la temperatura (°C) a la que fue expuesta.



**Figura 9.** Diferentes temperaturas de exposición de la suspensión de fagos en  $2 \times 10^{10}$  UFP/mL durante 5 minutos.



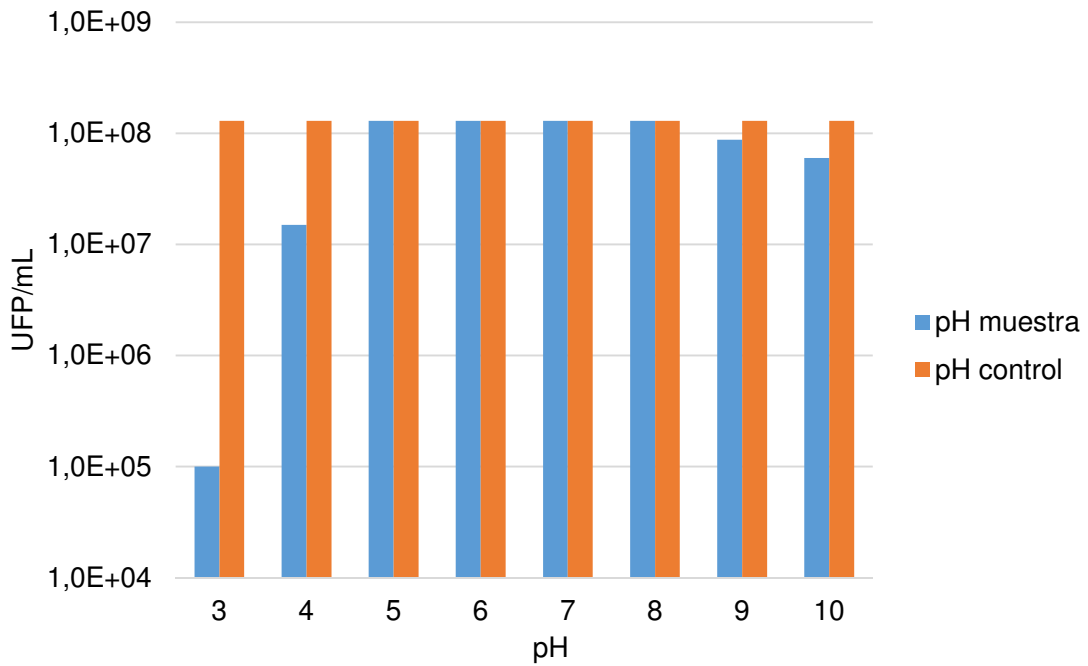
**Figura 10.** Diferentes temperaturas de exposición de la suspensión de fagos en  $2 \times 10^{10}$  UFP/mL durante 15 minutos.

### 6.5 Resistencia a la acidez y la alcalinidad

Es necesario conocer las condiciones de pH a la que puede exponerse el bacteriófago sin afectar su infectividad. Al exponer la solución de bacteriófagos por 1 hora a diferentes pH se puede observar si estos afectan o no la concentración de la suspensión. La concentración de la suspensión del bacteriófago  $\Phi$ GF1 se mantuvo a los pH 5, 6, 7 y 8; mientras que a pH 9 se redujo en un 33 % y a pH 10 en un 54 % (Figura 11).

Los pH más ácidos como 3 y 4 afectan en mayor grado a las partículas virales, reduciendo la concentración en escalas logarítmicas. El pH 4 reduce la concentración en 1 escala logarítmica, obteniendo una concentración de  $1.5 \times 10^7$  UFP/mL. El pH 3 reduce la concentración en 3 escalas logarítmicas, reduciéndola hasta  $1 \times 10^5$  UFP/mL (Figura 11). Ninguno de los pH experimentados elimina el total de las partículas virales como se muestra en la Figura 11.

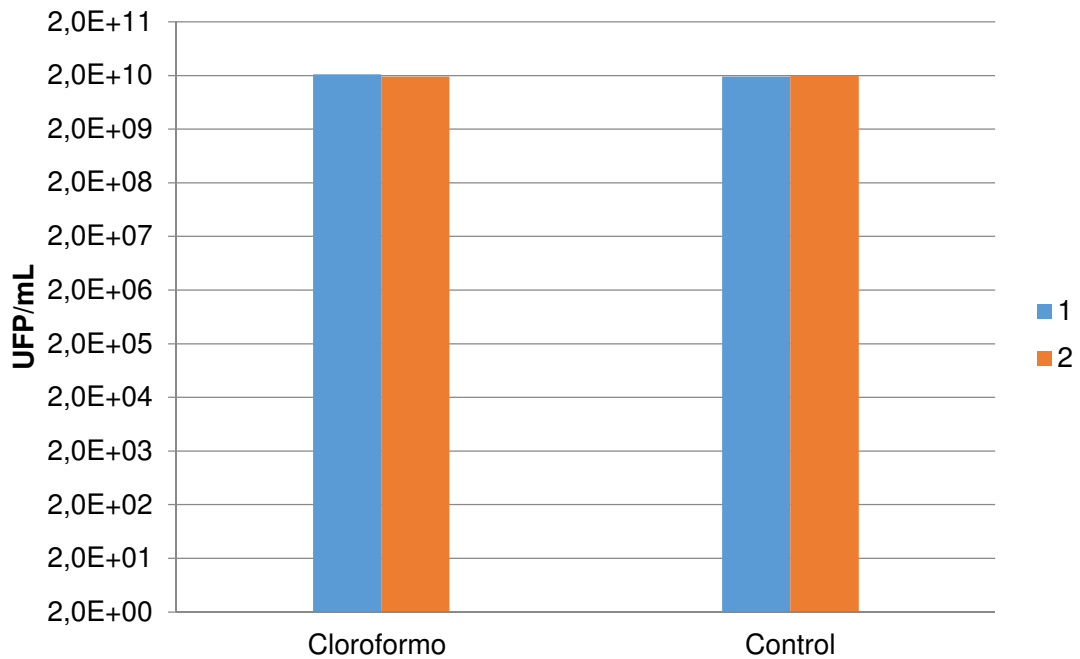




**Figura 11.** Variación de la concentración del fago expuesto a diferentes pH, comparado con la muestra control (pH 7).

### 6.6 Sensibilidad al cloroformo

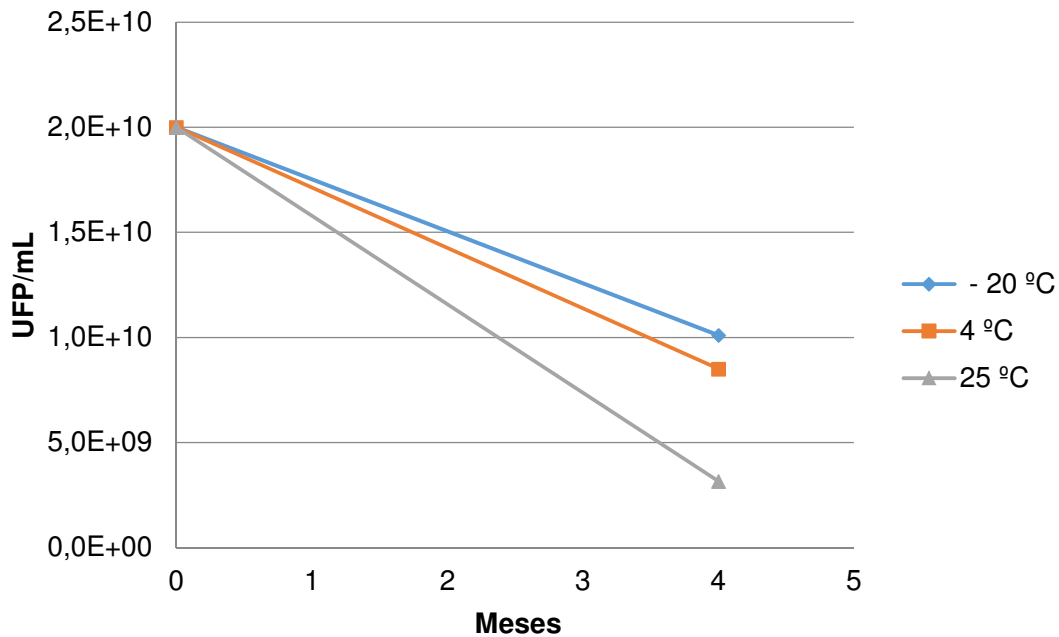
La suspensión de bacteriófagos  $\Phi$ GF1 no se vio afectada luego de 1 hora de exposición al cloroformo, manteniendo la concentración inicial como se observa en la Figura 12. Para calcular la concentración final de la muestra control es necesario multiplicar por 2 el resultado final, ya que en la muestra control se adicionó 1 volumen de solución salina, la cual es hidrofílica y diluye a la mitad la concentración de la muestra, lo contrario al cloroformo que es hidrofóbico y que no diluye la concentración del fago, esta operación se realizó con la finalidad de no obtener falsos positivos en relación a la reducción de la concentración.



**Figura 12.** Concentración de bacteriófagos expuesta al cloroformo y a la solución salina (control), los números 1 y 2 indican las réplicas realizadas (2).

### 6.7 Temperatura de almacenamiento

El almacenamiento a las temperaturas de 25, 4 y -20 °C por un periodo de 4 meses redujo la concentración del bacteriófago  $\Phi$ GF1 hasta en un 84%, como se observa en la Figura 13, sin embargo, la concentración después de 4 meses de almacenamiento en las 3 temperaturas, fue mayor a  $10^9$  UFP/mL. Después del periodo de almacenamiento a la temperatura de 25 °C, la concentración de la suspensión del fago se redujo en un 84 %, a la temperatura de 4 °C se redujo en un 57 % y a la temperatura de -20 °C se redujo en un 49 %. La temperatura de almacenamiento donde la suspensión del fago se mantiene más estable es a -20 °C, como se muestra en la Figura 13.



**Figura 13.** Concentración de bacteriófagos en función a la temperatura de almacenamiento. El almacenamiento a 25 °C experimenta una mayor reducción de la concentración mencionada.

### 6.8 Rango de hospedero

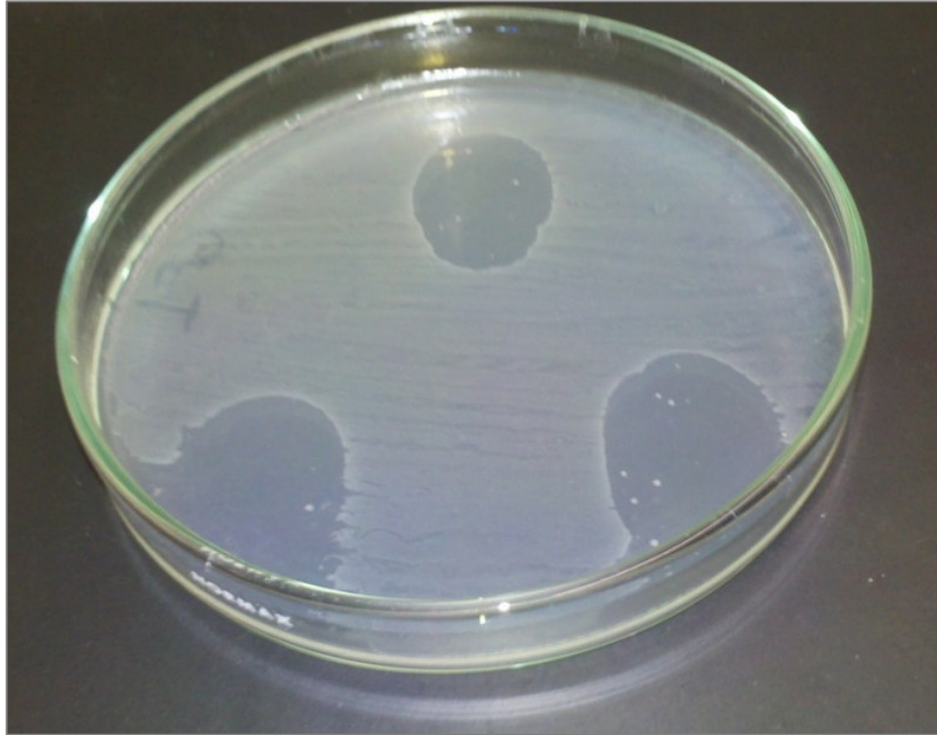
Es necesario conocer el rango de hospedero de los bacteriófagos antes de su aplicación, para precisar el rango de hospedero del fago  $\Phi$ GF1 se realizó la técnica del “spot test” (Figura 14) en las diferentes cepas de *Escherichia coli* tal como las ATCC 25922, ATCC 13706 y las cepas silvestres aisladas. Luego se procedió a determinar el rango de hospedero con las enterobacterias relacionadas a *Escherichia coli* como *Shigella*, *Salmonella*, *Proteus* y *Enterobacter*. También se incluyó una colección de cepas Gram negativas y Gram positivas. El bacteriófago  $\Phi$ GF1 infecta las 2 cepas ATCC de *Escherichia coli* y 3 cepas silvestres aisladas que son GF1, GF2 y EC3. De la familia de las enterobacterias, el fago  $\Phi$ GF1 infecta a la cepa *Shigella sonnei* ATCC 25931, lo que confirma su amplio rango de hospedero. Las demás cepas de la familia de las Enterobacterias, Gram negativas y las Gram positivas fueron resistentes al fago  $\Phi$ GF1. En la Tabla 5, se observa las diferentes cepas usadas para determinar el rango de hospedero y la susceptibilidad o resistencia de estas.

**Tabla 5.** Relación de cepas bacterianas empleadas para evaluar el rango de hospedero.

BACTERIAS	SUSCEPTIBILIDAD
GF1	+
GF2	+
AR	-
EC1	-
EC2	-
EC3	+
EC5	-
EC6	-
EC7	-
EC8	-
<i>Escherichia coli</i> (ATCC® 13706™)	+
<i>Escherichia coli</i> (ATCC® 25922™)	+
<i>Shigella sonnei</i> (ATCC® 25931™)	+
<i>Shigella flexneri</i> (ATCC® 12022™)	-
<i>Salmonella typhimurium</i> (ATCC® 14028™)	-
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Abortusequi</i> (ATCC® 9842™)	-
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Enteritidis</i> (ATCC® 13076™)	-
<i>Proteus vulgaris</i> (ATCC® 6380™)	-
<i>Proteus mirabilis</i> (ATCC® 12453™)	-
<i>Enterobacter aerogenes</i> (ATCC® 13048™)	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC® 15442™)	-
<i>Vibrio cholerae</i> (ATCC®™)	-
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (ATCC® 17802™)	-
<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC® 29212™)	-
<i>Streptococcus agalactiae</i> (ATCC® 12386™)	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (ATCC® 12228™)	-
<i>Bacillus cereus</i> (ATCC® 14579™)	-
<i>Listeria monocytogenes</i> (ATCC® 19114™)	-
<i>Listeria monocytogenes</i> (ATCC® 19115™)	-
<i>Listeria ivanovii</i> (ATCC® 19119™)	-
<i>Listeria innocua</i> (ATCC® 33090™)	-

(+): Susceptible

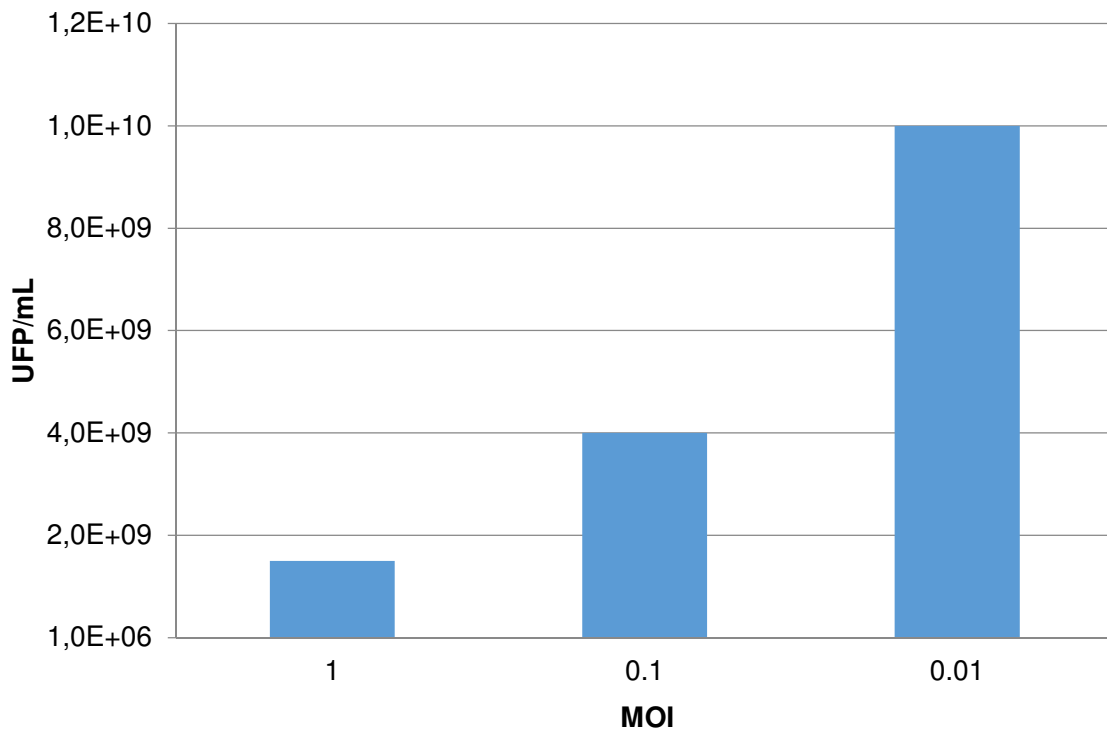
(-): Resistente



**Figura 14.** Resultado de la técnica del “*spot test*” que muestra la imagen del goteo positivo del fago  $\Phi$ GF1.

### 6.9 Multiplicidad de infección

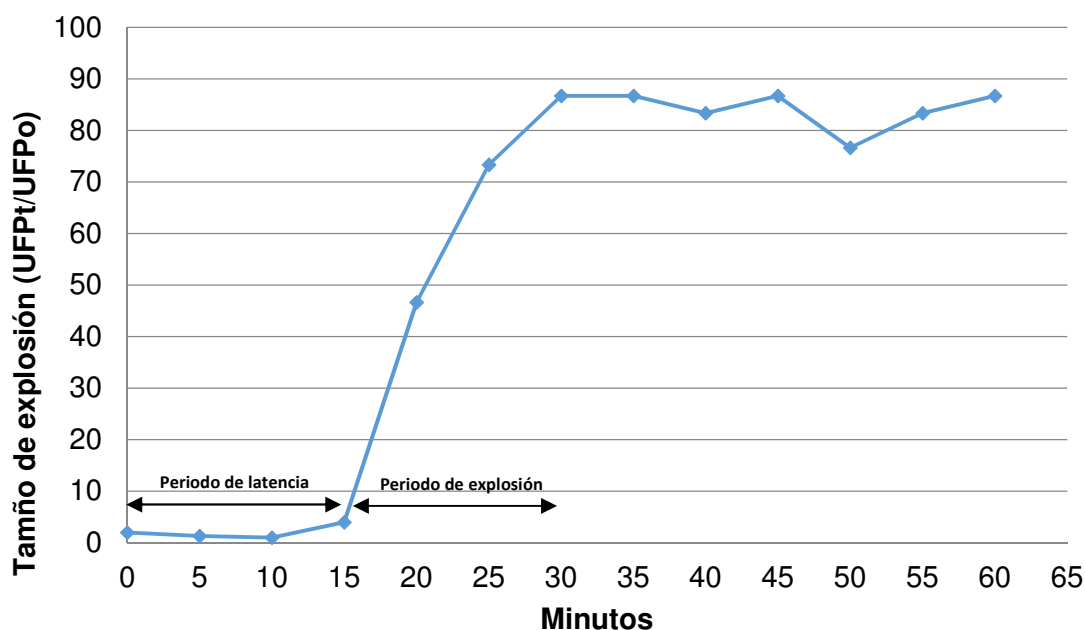
En los 3 tipos de MOI ensayados la concentración bacteriana alcanzaba  $10^8$  UFC/mL aproximadamente, para asegurarse que la bacteria estaba en fase logarítmica. Se observó un aumento de las partículas virales en todas las MOI, pero la MOI óptima para el fago  $\Phi$ GF1 fue de 0.01, como se observa en la Figura 15, donde la concentración del fago aumentó a  $1 \times 10^{10}$  UFP/mL, mientras que en las MOI de 0.1 y de 1 la concentración aumentó a  $4 \times 10^9$  UFP/mL y a  $1,5 \times 10^9$  UFP/mL respectivamente, a pesar que las MOI de 0.1 y de 1 comenzaron con un número 10 y 100 veces mayor de virus que la MOI de 0.01.



**Figura 15.** Concentración final de bacteriófagos a las diferentes MOI ensayados. La MOI de 0.01 genera una concentración más alta al final de la amplificación.

### 6.10 Curva de crecimiento de un paso

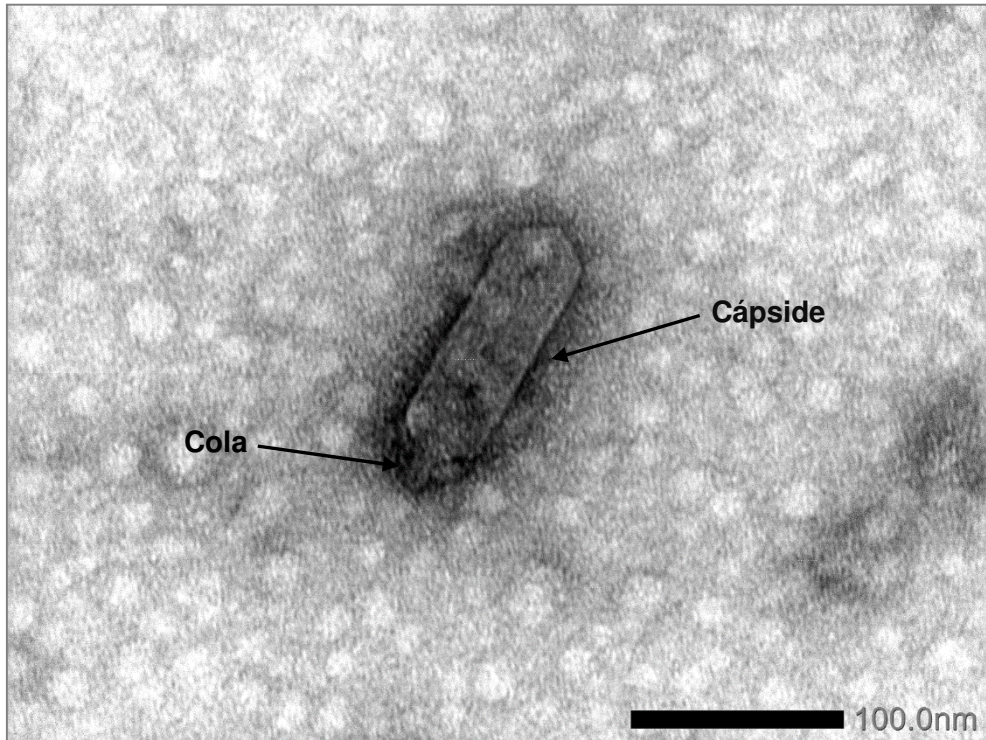
La curva de crecimiento de un paso del fago  $\Phi$ GF1, utilizando como hospedero a la cepa *Escherichia coli* ATCC 25922 se muestra en la Figura 16. El periodo de latencia es de 15 minutos y su tamaño de explosión es de aproximadamente 85 fagos por célula. En la Figura 16 se observa el número de fagos liberados por cada célula en función al tiempo. A partir del minuto 15 recién se nota un aumento significativo en el número de partículas virales hasta alcanzar el número máximo de fagos liberados por célula en el minuto 30. El tiempo de liberación de la progenie viral es llamado periodo de explosión y para el fago  $\Phi$ GF1 es de 15 minutos.



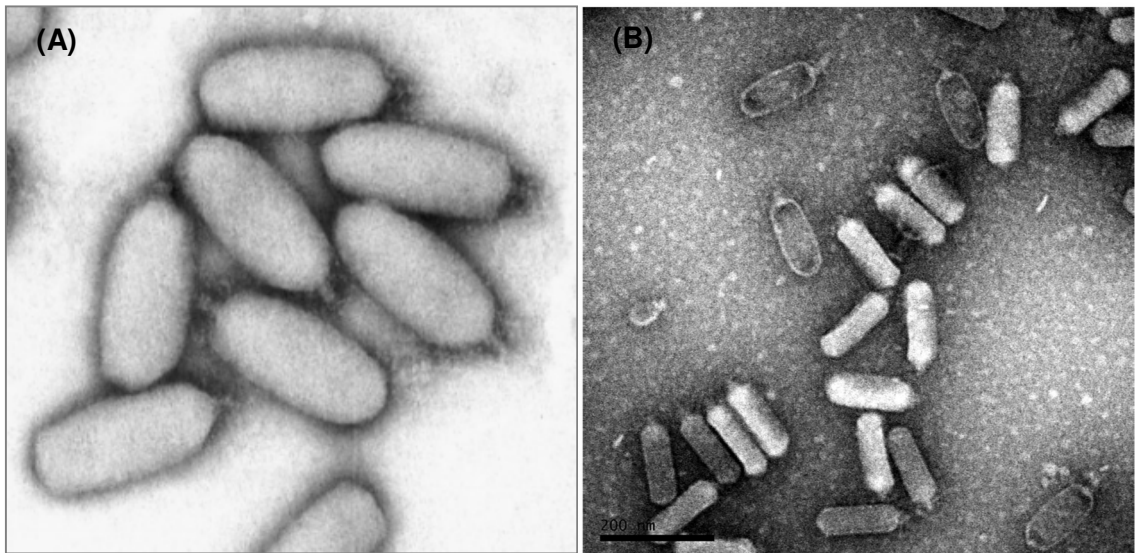
**Figura 16.** Curva de crecimiento de un paso del fago  $\Phi$ GF1 en la cepa *Escherichia coli* ATCC 25922 durante 60 minutos.

### 6.11 Microscopía electrónica

El bacteriófago  $\Phi$ GF1 fue caracterizado según su morfología y clasificado siguiendo las directrices de la ICTV en el 2016 (Lefkowitz *et al.*, 2016), su ultraestructura fue examinada usando el MET. La cápside del fago  $\Phi$ GF1 presenta una estructura isométrica pero más alargada de aproximadamente 125 nm de largo y 41 nm de ancho, su cola presenta aproximadamente 20 nm de largo y 11 nm de ancho como se observa en las Figuras 17 y 19. Esta morfología corresponde al morfotipo C3 de la familia *Podoviridae*, orden *Caudovirales*, caracterizada por poseer una cápside alargada y una cola muy corta como se observa en la Figura 18.



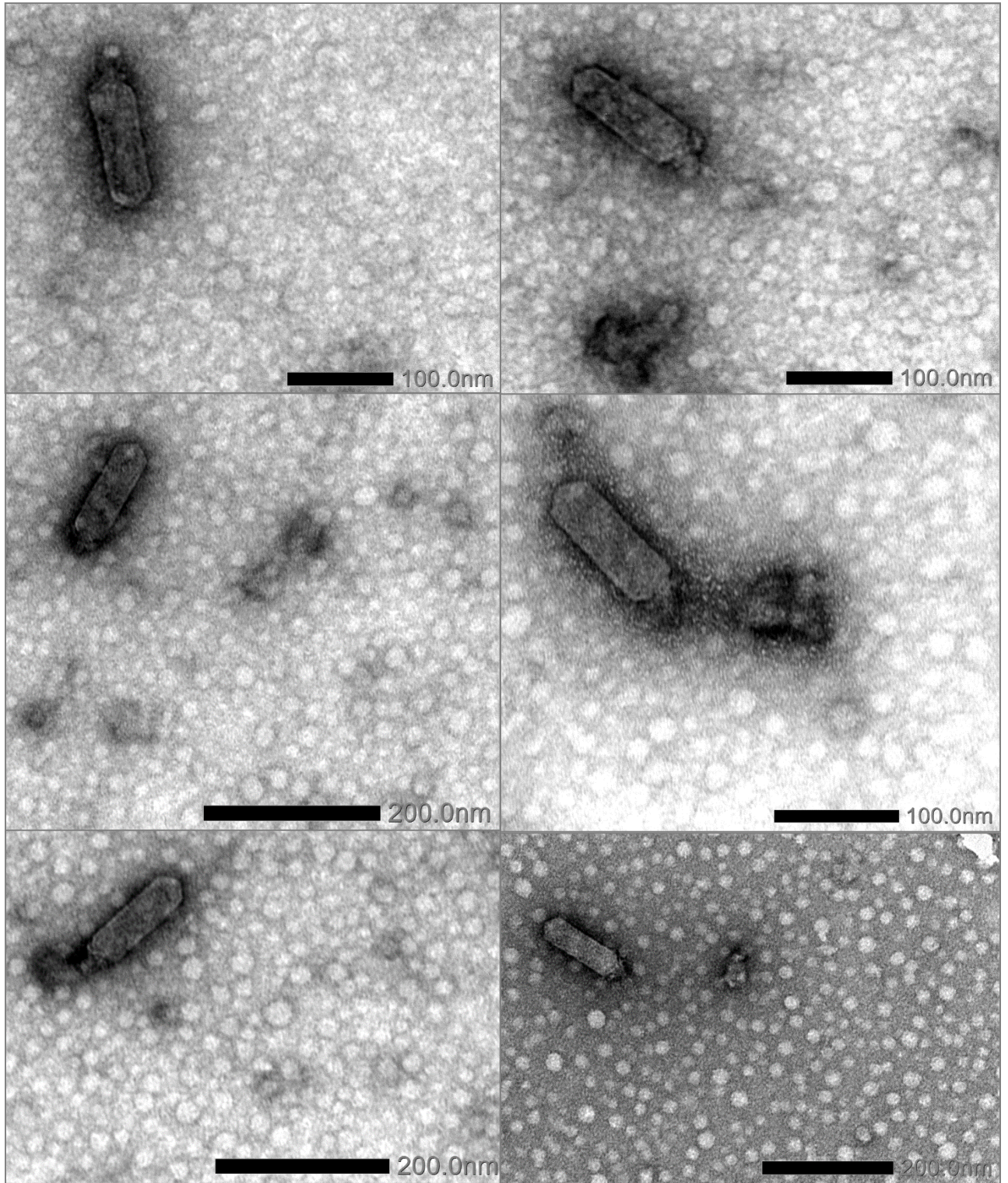
**Figura 17.** Microfotografía obtenida por MET del fago  $\Phi$ GF1. La amplificación final de 120,000X y la barra representa 100 nm.



**Figura 18.** Microfotografía de 2 fagos con morfotipo C3. A) Fago phiEco32 específico de *Escherichia coli* B) Fago SU10 específico de *Escherichia coli*.

Imagen tomada de Savalia *et al.* (2008) y Mirzaei *et al.* (2014).





**Figura 19.** Microfotografías tomadas con el MET del fago  $\Phi$ GF1 en diferentes campos.

## VII. DISCUSIÓN

Las 10 cepas silvestres de *Escherichia coli* aisladas de la planta de tratamiento de aguas residuales “La Taboada” y del camal frigorífico “La Colonial” cumplen con los requisitos de las características bioquímicas analizadas. En las aguas servidas hay una mayor probabilidad de encontrar cepas de *Escherichia coli* patogénicas, resistente a antibióticos y con una gran diversidad genética (Franz *et al.*, 2015) es por esto que “La Taboada”, que recibe aguas servidas de Lima y Callao (Perú), y “La Colonial”, que es un matadero de ganado porcino y vacuno, son lugares idóneos para aislar una gran diversidad de cepas de *Escherichia coli* y que muchas de ellas puedan ser patogénicas, estas cepas son necesarias para aislar diferentes tipos de bacteriófagos y poder realizar un rango de hospedero diverso dentro del mismo género.

El aislamiento del bacteriófago de una planta de tratamiento de aguas residuales, se realizó con el fin de encontrar 1 bacteriófago que fuera capaz de infectar y lisar a cepas de colección, entre ellas la cepa *Escherichia coli* ATCC 25922 que se utiliza usualmente como referencia en los estudios de control de calidad (Sacsquispe y Velásquez, 2002) y cepas salvajes que podemos encontrarlas como contaminantes en alimentos o en la flora natural de organismos.

La especificidad que tienen los fagos depende de los receptores específicos situados en la superficie de la bacteria, y la multiplicación del fago solo ocurre cuando estos receptores de la bacteria y el fago coinciden (Gaviria y Castaño, 2012). Los fagos de *Escherichia coli* con un rango de hospedero estrecho son de gran utilidad en el control de cepas patogénicas, ya que por lo normal solo lisan el serotipo al cual son específicos sin alterar la flora microbiana del hospedero (Jamalludeen *et al.*, 2009).

El fago  $\Phi$ GF1 presenta un amplio rango de hospedero lisando no solo a la cepa salvaje GF1 con la cual fue aislada, sino también, a la cepa *Escherichia coli* ATCC 25922, por esta característica fue elegido para continuar con los estudios de caracterización. Si bien

los fagos de amplio espectro pueden afectar la flora natural de un organismo, estos se pueden utilizar como indicadores de contaminación bacteriana y para la reducción de estas mismas en alimentos y así controlar las enfermedades transmitidas por alimentos (Jorquera *et al.*, 2015). En el proceso de purificación del bacteriófago  $\Phi$ GF1 se observaron diferentes morfologías de placas de lisis que significa diferentes tipos de bacteriófagos, sin embargo, al obtener el fago puro y amplificado aún se presentaban estas diferentes placas de lisis, aunque siempre predominaba la morfología de placa del fago estudiado. Al titular una muestra del fago  $\Phi$ GF1 en las placa Petri donde se podía contar más de 50 UFP se presentaban también algunas placas de lisis de diferente morfología, mientras que en las de menor UFP la morfología de las placas de lisis era uniforme como se aprecia en la Figura 4B. Esta variación en las placas de lisis se debe a las altas concentraciones de bacteriófagos que infectan y reinfectan las células bacterianas (Gaviria y Castaño, 2012).

Es necesario conocer el tiempo y la densidad a la cual la cepa *Escherichia coli* ATCC 25922 alcanza la fase logarítmica y en la cual está a una concentración de  $10^8$  UFC/mL, porque estos datos son indispensables para las pruebas de caracterización fisicoquímica y microbiológica. Tanto en la D.O como en el conteo de UFC/mL se obtiene que la bacteria inicia la fase logarítmica entre las 2 y 4 horas, esta información se ajusta a lo planteado por Santos *et al.* en el 2005. La cepa alcanza aproximadamente una concentración de  $10^8$  UFC/mL a una densidad óptica de 0.78 en caldo BHI medido a una longitud de onda de 540 nm, esto difiere de lo planteado por Dini en el 2011, con una cepa de *Escherichia coli* enterohemorrágica O157:H7 y a una longitud de onda de 600 nm. Posiblemente esto difiera debido a la diferencia de cepas, medio de cultivo y longitud de onda usadas, a pesar que ambas cepas son *Escherichia coli*.

El bacteriófago  $\Phi$ GF1 fue sometido a un amplio rango de temperaturas, pasando por 40, 50, 60, 70 y 80 °C; 40 °C es la más cercana a 37 °C, que es la temperatura óptima del bacteriófago, y que no redujo significativamente la cantidad de partículas virales en

la suspensión de fagos, como sucede en la mayoría de fagos cuyos hospederos tienen una temperatura óptima de 37 °C. Es el caso de los fagos de *Escherichia coli* y *Pseudomonas* (Drulis-Kawa *et al.*, 2014), donde su concentración tampoco varía a 50 °C, a diferencia de los bacteriófagos con un hospedero cuya temperatura óptima es menor a la temperatura corporal, por ejemplo *Bacillus thuringiensis*, donde su temperatura óptima se encuentra entre 26 y 30 °C; su bacteriófago  $\mu\beta$ -19 mostró sensibilidad a 45 y 50 °C disminuyendo significativamente su concentración y a partir de la exposición durante 5 minutos a 55 °C, se inactivaron completamente las partículas virales del fago  $\mu\beta$ -19 (Wong, 1994), mientras que el fago  $\Phi$ GF1 es estable a las temperaturas de 40 y 50 °C.

Los bacteriófagos están adaptados a sus hospederos, por lo tanto son estables a temperaturas cercanas a la temperatura óptima de su hospedero, a 70 y 80 °C inactivan a los fagos que tienen como hospedero a bacterias mesófilas, mientras que existen fagos como  $\Phi$ YS40 que son menos estables a temperaturas menores a 55 °C y mayores a 78°C, esto se debe a que su hospedero *Thermus thermophilus* es una bacteria termófila y su temperatura óptima de crecimiento también es 65 °C (Sakaki y Oshima, 1975). Los fagos aislados por Yu *et al.* en el 2006 que tenían como hospederos a diferentes especies del género *Thermus*, fueron resistentes a las altas temperaturas sometidas, incluso algunos bacteriófagos fueron resistentes incluso a 100 °C por 1 hora y a 80 °C por 24 horas, esto nos indica que la termoestabilidad del bacteriófago depende mucho de la estabilidad a la temperatura de su hospedero. *Escherichia coli* es una bacteria mesófila que crece en un rango de temperatura de 7 y 50 °C (WHO, 2016), esto explica la estabilidad del fago a las temperaturas de 40 y 50 °C; y la inactivación a las altas temperaturas de 70 y 80 °C.

El uso de los bacteriófagos depende mucho de la resistencia al pH que tenga, bacteriófagos que son resistentes a pH ácidos pueden ser utilizados para la biopreservación de alimentos ácidos (Choi *et al.*, 2009), aplicarse en conjunto en

tratamiento de descontaminación con ácidos (Laury *et al.*, 2009) y tratamientos *in vivo* con una vía de administración oral ya que deben tolerar la acidez extrema del tracto gastrointestinal (Dini, 2011). El bacteriófago  $\Phi$ GF1 es estable al rango de pH entre 5-8, concordando parcialmente con los resultados de Jamalludeen *et al.* (2007) y Hoa *et al.* (2014) donde los fagos de *Escherichia coli* son resistentes al rango de pH entre 5-9, el fago  $\Phi$ GF1 reduce su concentración en un 33 % al ser expuesto por 1 hora al pH 9, mientras que reduce en un 54 % al pH 10; aunque la reducción es significativa, el pH básico no afecta intensamente a la concentración de los bacteriófagos como sí ocurre en los pH más ácidos, el pH 4 disminuyó la concentración en un orden logarítmico, mientras que el pH 3 redujo la concentración en 3 ordenes logarítmicos, el pH 3 fue el que más afectó a la concentración de los bacteriófagos por lo tanto el bacteriófago  $\Phi$ GF1 es sensible a pH muy ácidos.

La exposición de los bacteriófagos por 1 hora a los diferentes pH nos permite saber si estos afectan o no su concentración, sin embargo con un mayor tiempo de exposición a los diferentes pH, podemos observar una mayor intensidad en el caso de los pH que reducen la concentración de la suspensión de bacteriófagos, Dini en el 2011 expuso a pH 4 a 11 bacteriófagos de *Escherichia coli* por 16 horas, reduciéndose en todos los casos de 3 a 5 órdenes logarítmicos y al ser expuestos a pH 3 se observó una inhibición total de las partículas virales de los 11 bacteriófagos, el fago  $\Phi$ GF1 si bien reduce significativamente su concentración a pH 3, no muestra una inhibición total, como en los resultados de Dini, esto se puede deber a la diferencia en los tiempos de exposición de los fagos.

El cloroformo es un compuesto químico muy utilizado en el campo de los bacteriófagos, su uso se extiende desde la conservación de los bacteriófagos para mantenerlos libre de contaminación microbiana, aunque la presencia de lípidos en la estructura de algunos fagos limita su uso, hasta la caracterización del ciclo replicativo del bacteriófago, forzando la lisis bacteriana para determinar el periodo de eclipse (Clokic y Kropinski,

2008). El bacteriófago  $\Phi$ GF1 presenta resistencia al cloroformo al ser expuesto hasta por una hora, por lo que se puede deducir que no presenta envoltura ni lípidos en su estructura infectiva. Aunque normalmente la susceptibilidad al cloroformo está asociada a la presencia de lípidos, un tercio de los fagos con cola con ausencia de lípidos son sensibles al cloroformo (Ackermann, 2006). El fago  $\Phi$ GF1 puede ser almacenado en cloroformo sin que este afecte la infectividad de los fagos.

El almacenamiento de los bacteriófagos ha tomado una gran importancia tanto en el área de investigación como en el área comercial, es indispensable almacenar un lote de producción de fagos sin que este reduzca su concentración con el tiempo, ya que este mismo lote puede servir para futuras investigaciones o en el área comercial, se necesita un producto el cual no reduzca significativamente su eficacia como en el caso de Ecoshield y ListShield que son productos a base de bacteriófagos usados en la industria alimentaria (Segundo *et al.*, 2010). El impacto de la temperatura en la reducción de la concentración es un factor que debe conocerse para determinar qué tan estricto debe ser su control durante el almacenamiento a largo plazo (Dini, 2011). Después de 4 meses de almacenamiento a las 3 diferentes temperaturas de -20, 4 y 25 °C, se observó una reducción en la concentración de bacteriófagos, ya que no se utilizó ningún método de conservación para estos virus, como la liofilización (Dini, 2011).

A pesar de haber sufrido una reducción en la concentración a las 3 temperaturas, en ninguna se llegó a reducir en 1 orden de magnitud, sin embargo a 25°C redujo la concentración en un 84 %, siendo la temperatura que menos conservó al fago  $\Phi$ GF1, por lo tanto no es recomendable almacenar los fagos a temperatura ambiente (25 °C), la temperatura de 4 °C que es la temperatura a la que comúnmente se almacenan los bacteriófagos y muchos medios de cultivo, redujo la concentración en un 57 %, mientras que a -20 °C redujo la concentración en un 49 %, siendo esta temperatura la que mejor conservó a los bacteriófagos. La reducción a temperatura ambiente concuerda con los datos de Dini (2011), donde el fago CA933P también sufre una reducción a los 120 días

de almacenamiento, sin llegar a reducirse en 1 orden logarítmico. Esta reducción a temperatura ambiente es más pronunciada en tiempos mayores para el fago CA933P0. Dini (2011), analizó 2 temperaturas de almacenamiento a congelación, -20 y -80 °C, observándose una mejor conservación a la temperatura de -20 °C, aunque en la presente investigación no se analizó la temperatura de -80 °C, los resultados concuerdan con lo hallado por Dini, donde la temperatura óptima de almacenamiento es -20 °C en relación a la temperatura ambiente.

Las aplicaciones de los bacteriófagos de *Escherichia coli* dependen mucho de su rango de hospedero. Los fagos de *Escherichia coli* que se usan como agentes terapéuticos en animales o humanos, deben tener un rango de hospedero estrecho, lisando solo a las cepas patogénicas a tratar y no a las cepas no patogénicas, porque eso originaría un desbalance en la flora intestinal normal (Tanji *et al.*, 2005), en cambio aquellos fagos que presenten un amplio rango de hospedero para *Escherichia coli* se puede utilizar para la descontaminación de superficies, aditivos alimenticios (Kudva *et al.*, 1999, O'Flynn *et al.*, 2004) o en el tratamiento de infecciones superficiales (O'Flaherty *et al.*, 2009), por lo tanto resulta indispensable conocer el rango de hospedero del fago a caracterizar.

El fago  $\Phi$ GF1 puede lisar a las 2 cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 y ATCC 13706, ambas cepas son inocuas, también lisó a las cepas GF1, GF2 y EC3 que son cepas aisladas de “La Taboada” y “La Colonial”, pero no solo infectó a las cepas del mismo género, también fue capaz de infectar a la cepa *Shigella sonnei* ATCC 25931, reafirmando su amplio rango de hospedero, aunque este fago no pudo lisar a la mayoría de las cepas aisladas del camal “La Colonial” lo que puede ser causado por la función del fago o el estado fisiológico del huésped (Flayhan *et al.*, 2012). Los resultados concuerdan parcialmente con los obtenidos por Dini (2011) donde el fago CA933P además de infectar a cepas patógenas de *Escherichia coli*, también infecta a *Shigella flexneri*. De las Enterobacterias utilizadas en el rango de hospedero, el fago  $\Phi$ GF1 solo

infectó a *Shigella sonnei* ATCC 25931, se sabe que el género *Shigella* está estrechamente relacionado a las *Escherichia coli* enteroinvasivas (EIEC) (Lan *et al.*, 2004) además de haber una relación entre los bacteriófagos de *Escherichia coli* y la toxina Shiga que las cepas patógenas presentan (O'Brien *et al.*, 1984).

La MOI óptima es la relación entre virus y bacterias que en una amplificación nos genera la mayor cantidad de partículas virales. Al realizar la amplificación de los bacteriófagos, se encuentran variaciones en el número total de bacteriófagos, estas variaciones se deben a la proporción virus/bacteria utilizada para la amplificación, dependiendo de esta proporción encontraremos una mayor o menor cantidad de virus al final de la amplificación, para el fago  $\Phi$ GF1 la MOI óptima es de 0.01, teniendo una diferencia significativa con las MOI de 0.1 y 1. La MOI óptima obtenida aumentó la concentración de bacteriófagos en 4 órdenes de magnitud, la MOI de 0.1 aumentó en 2 órdenes de magnitud la concentración inicial y la MOI de 1 la aumentó solo en 1 orden de magnitud. Estos datos son importantes para poder realizar la curva de crecimiento de un paso, como se puede observar el ciclo de replicación de los bacteriófagos y su capacidad de replicación también depende de la MOI utilizada, es por eso que para obtener los parámetros del ciclo de replicación del bacteriófago usualmente se utiliza la MOI óptima hallada.

El ciclo lítico de un bacteriófago puede ser caracterizado por la curva de crecimiento de un paso donde solo se da un ciclo de infección. Los parámetros hallados en este ciclo varían entre fagos y dependen también del hospedero y de las condiciones adecuadas a las que sean sometidas. El tiempo de latencia hallado para el fago  $\Phi$ GF1 es de 15 minutos, que es muy cercano a los periodos de latencia de los fagos T7 y T3, que son 13 y 17 minutos, respectivamente (De Paepe y Taddei, 2006), estos 2 fagos también pertenecen a la familia *Podoviridae*. El tiempo de latencia del fago  $\Phi$ GF1 es menor que el tiempo hallado para otros bacteriófagos de *Escherichia coli* como el fago  $\Omega$ 8 que tiene un periodo de latencia de 19 minutos. El periodo de latencia en *Escherichia coli* es muy



variado y puede ser incluso de 55 minutos como es el caso del fago  $\Phi 80$  (De Paepe y Taddei, 2006). El tamaño de explosión del fago  $\Phi GF1$  fue de aproximadamente 85 UFP, una cantidad mucho menor a la calculada por Dini (2011) para el fago CA933P donde presenta 376 UFP y por Jann *et al.* (1971) para el fago  $\Omega 8$  que presenta un tamaño de explosión de 130 UFP. El tamaño de explosión se puede ver afectado por la tasa de crecimiento del huésped (Middelboe, 2000), mientras tenga más nutrientes y este creciendo exponencialmente se espera un número más alto, por el contrario si tiene una cantidad limitante de nutrientes se espera que el tamaño de explosión sea más bajo (Middelboe *et al.*, 2010). Los resultados en los parámetros hallados nos muestran que los resultados muchas veces son independientes de la bacteria utilizada, pues también depende mucho del tipo de bacteriófago aislado y de las condiciones de crecimiento de la cepa hospedera.

Los bacteriófagos con el morfotipo C3 que se caracterizan porque el largo de sus cabezas excede en varias veces al ancho, son extremadamente raros entre los miembros la familia de los *Podoviridae* y representan solo el 0.5% de los más de 5.500 fagos que han sido examinados por el microscopio electrónico (Li *et al.*, 2012). Los bacteriófagos de *Enterobacterias* con el morfotipo C3 están relacionados por serología y homología del DNA (Grimont y Grimont, 1981). De acuerdo a lo planteado por Grimont en 1981 y por el tamaño del genoma de las 6 especies con este morfotipo, el tamaño del genoma completo del bacteriófago  $\Phi GF1$  podría aproximarse a 77.5 Kb.

## VIII. CONCLUSIONES

- ❖ En las aguas servidas de la planta de tratamiento de aguas residuales “La Taboada”, se encuentran bacteriófagos que infectan *Escherichia coli*.
- ❖ En las aguas servidas de Lima Metropolitana se encuentran las siguientes cepas silvestres de *Escherichia coli*: GF1, GF2, AR, EC1, EC2, EC3, EC5, EC6, EC7 y EC8; y el bacteriófago  $\Phi$ GF1.
- ❖ El fago  $\Phi$ GF1 presenta un amplio rango de hospedero, infectando a cepas de *Escherichia coli* y *Shigella sonnei* lo que lo convierte en un buen candidato para reducir la contaminación por *E. coli* en alimentos.
- ❖ La concentración del fago  $\Phi$ GF1 se mantiene al ser expuesto por una hora al cloroformo, lo que indica la ausencia de lípidos en su estructura infectiva y muestra una estabilidad hasta la temperatura de 50 °C y en un rango de pH 5-8.
- ❖ La microscopía electrónica de transmisión efectuada al fago  $\Phi$ GF1 indica que pertenece a la familia *Podoviridae*.

## IX. RECOMENDACIONES

- Es importante conocer la serología de las cepas de *Escherichia coli* silvestres aisladas, para determinar si el bacteriófago  $\Phi$ GF1 solo infecta cepas no patógenas o también infecta a serotipos patógenos de *Escherichia coli*.
- Utilizar una colección más amplia de *Escherichia coli* para el rango de hospedero, con cepas de diferentes serotipos, resistentes a antibióticos y cepas aisladas de alimentos contaminados y de pacientes infectados.
- Estudiar la capacidad de infección del bacteriófago  $\Phi$ GF1 en *Shigella sonnei* y su capacidad de reducir la contaminación, por sus hospederos, en alimentos.
- Secuenciar el genoma del fago  $\Phi$ GF1 para verificar si presenta o no, genes de lisogenia.

## X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEDON, Stephen T. Bacteriophage ecology: population growth, evolution, and impact of bacterial viruses, 2008, p. xviii, 508 p.
- ACKERMANN, H.-W. 5500 Phages examined in the electron microscope. *Archives of virology*, 2007, vol. 152, no 2, p. 227-243.
- ACKERMANN, Hans W. Bacteriophage taxonomy. *Microbiology Australia*, 2011, vol. 32, no 2, p. 90-94.
- ACKERMANN, Hans-W. Classification of bacteriophages. *The bacteriophages*, 2006, vol. 635, p. 8-16.
- ADAMS, M. H. Bacteriophages. Interscience Publishers. 1959. New York, p 27.
- ADAMS, M. H. Bacteriophages. Second printing. 1966. New York. N.Y. U.S.A. pp 1, 2, 6, 122, 444.
- ADRIANZÉN, Diego; ARBIZU, Ángela; ORTIZ, Jimmy; *et al.* Mortalidad por bacteriemia causada por *Escherichia coli* y *Klebsiella spp.* productoras de beta lactamasas de espectro extendido: cohorte retrospectiva en un hospital de Lima, Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 2016, vol. 30, no 1.
- ALLOCATI, Nerino; MASULLI, Michele, ALEXEYEV, Mikhail; *et al.* *Escherichia coli* in Europe: an overview. *International journal of environmental research and public health*, 2013, vol. 10, no 12, p. 6235-6254.
- ANDERSON, Peter D. and BOKOR, Gyula. Bioterrorism: pathogens as weapons. *Journal of pharmacy practice*, 2012, vol. 25, no 5, p. 521-529.
- BLACK, Lindsay W. DNA packaging in dsDNA bacteriophages. *Annual Reviews in Microbiology*, 1989, vol. 43, no 1, p. 267-292.
- BLACKBURN, Clive and MCCLURE, Peter J. (ed.). *Foodborne pathogens: hazards, risk analysis and control*. Elsevier, 2009.

- BLÄSI, Udo and YOUNG, Ry. Two beginnings for a single purpose: the dual-start holins in the regulation of phage lysis. *Molecular microbiology*, 1996, vol. 21, no 4, p. 675-682.
- BRÜSSOW, Harald. Phages of dairy bacteria. *Annual Reviews in Microbiology*, 2001, vol. 55, no 1, p. 283-303.
- CHÉNARD, C., CHAN, A. M., VINCENT, W. F., *et al.* Polar freshwater cyanophage S-EIV1 represents a new widespread evolutionary lineage of phages. *The (International Society for Microbial Ecology) ISME journal*, 2015., 1-13
- CHOI, Y. M., KIM, O. Y., KIM, K. H., *et al.* Combined effect of organic acids and supercritical carbon dioxide treatments against nonpathogenic *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* and *E. coli* O157: H7 in fresh pork. *Letters in applied microbiology*, 2009, vol. 49, no 4, p. 510-515.
- CLOKIE, M.R. and KROPINSKI, Andrew M. *Bacteriophages: methods and protocols* Humana, 2008. Press, New York.
- D'HERELLE, Felix. Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques. *CR Acad. Sci. Paris*, 1917, vol. 165, p. 373-375.
- DE PAEPE, Marianne; TADDEI, François. Viruses' life history: towards a mechanistic basis of a trade-off between survival and reproduction among phages. *PLoS biology*, 2006, vol. 4, no 7, p. e193.
- DINI, C. and DE URRAZA, P. J. Isolation and selection of coliphages as potential biocontrol agents of enterohemorrhagic and Shiga toxin-producing *E. coli* (EHEC and STEC) in cattle. *Journal of applied microbiology*, 2010, vol. 109, no 3, p. 873-887.
- DINI, Cecilia. “Aislamiento y caracterización molecular de bacteriófagos de bacterias enteropatógenas para biocontrol de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA)”. Asesores: Patricio de Urza y Graciela de Antoni. Tesis

Doctoral. Universidad Nacional de la Plata, Facultad de Ciencias Exactas, La Plata. 2011.

- DRULIS-KAWA, Zuzanna, OLSZAK, Tomasz, DANIS, Katarzyna, *et al.* A giant *Pseudomonas* phage from Poland. *Archives of virology*, 2014, vol. 159, no 3, p. 567-572.
- ENGELKIRK, Paul G.; DUBEN-ENGELKIRK, Janet L.; BURTON, Gwendolyn R. Wilson. *Burton's microbiology for the health sciences*. Lippincott Williams & Wilkins, 2011.
- FAGAN, Peter K., HORNITZKY, Michael A., BETTELHEIM, Karl A., *et al.* Detection of Shiga-like toxin (stx1 and stx2), intimin (eaeA), and enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) hemolysin (EHEC hlyA) genes in animal feces by multiplex PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, vol. 65, no 2, p. 868-872.
- FARUQUE, Shah M. and MEKALANOS, John J. Phage-bacterial interactions in the evolution of toxigenic *Vibrio cholerae*. *Virulence*, 2012, vol. 3, no 7, p. 556-565.
- FENG, P.; WEAGANT, S. D.; JINNEMAN, K. Bacteriological Analytical Manual, Chapter 4A, Diarrheagenic *Escherichia coli*. Available: <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070080.htm> Accessed, 2011, vol. 12, p. 14.
- FLAYHAN, Ali; WIEN, Frank, PATERNOSTRE, Maïté, *et al.* New insights into pb5, the receptor binding protein of bacteriophage T5, and its interaction with its *Escherichia coli* receptor FhuA. *Biochimie*, 2012, vol. 94, no 9, p. 1982-1989.
- FLORES, Tania González y HERRERA, Rafael Antonio Rojas. Enfermedades transmitidas por alimentos y PCR: prevención y diagnóstico. *Salud pública de México*, 2005, vol. 47, no 5, p. 388-390.

- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. FDA Approval of *Listeria*-specific bacteriophage preparation on ready-to-eat (RTE) meat and poultry products. 2006.
- FRANZ, Eelco, VEENMAN, Christiaan, VAN HOEK, Angela Ham, *et al.* Pathogenic *Escherichia coli* producing Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases isolated from surface water and wastewater. *Scientific reports*, 2015, vol. 5, p. 14372.
- FRATAMICO, Pina M., DEBROY, Chitrita, LIU, Yanhong, *et al.* Advances in molecular serotyping and subtyping of *Escherichia coli*. *Frontiers in microbiology*, 2016, vol. 7.
- GARCÍA, Pilar, RODRIGUEZ, Lorena, RODRIGUEZ, Ana, *et al.* Food biopreservation: promising strategies using bacteriocins, bacteriophages and endolysins. *Trends in Food Science & Technology*, 2010, vol. 21, no 8, p. 373-382.
- GAVIRIA, Gabriel y CASTAÑO, Jhon. Técnica para aislamiento de bacteriófagos específicos para *E. coli* DH5 $\alpha$  a partir de aguas residuales. *Revista MVZ Córdoba*, 2012, vol. 17, no 1, p. 2852-2860.
- GONÇALVES, G.A.M., SUEHIRO, B.Y.B., COSTA, L.F.Z.P., *et al.* Criteria for selection of lytic bacteriophage for use in medical field (setting): preliminary data. *Veterinária e Zootecnia*, 2015, vol. 22, no 1, p. 72-82.
- GOYAL, Sagar M. (ed.). *Viruses in foods*. Springer, 2006.
- GRIMONT, Francine and GRIMONT, Patrick AD. DNA relatedness among bacteriophages of the morphological group C3. *Current Microbiology*, 1981, vol. 6, no 2, p. 65-69.
- GUTTMAN, Burton; RAYA, Raul; KUTTER, Elizabeth. Basic phage biology. *Bacteriophages: Biology and applications*, 2005, vol. 4.

- HAKOVIRTA, Janetta. Modern techniques in detection, identification and quantification of bacteria and peptides from foods. 2008. <http://urn.fi/URN:ISBN:978-952-10-4723-7>
- HANKIN, M. E. of the Jamuna and Ganges rivers on Cholera microbes. *Ann. Inst. Pasteur* 10: 511–523.1896.
- HOA, Nguyen Xuan, TANG, Fang, BAI, Qinqin, *et al.* Isolation and characterization of two T4-like bacteriophages against pathogenic *Escherichia coli* of piglet. *African Journal of Microbiology Research*, 2014, vol. 8, no 41, p. 3604-3611.
- IAN, L. P. and CHARLES, P. G. *Environmental Microbiology: A laboratory manual*. 2004.
- INAL, Jameel M. Phage therapy: a reappraisal of bacteriophages as antibiotics. *ARCHIVUM IMMUNOLOGIAE ET THERAPIAE EXPERIMENTALIS-ENGLISH EDITION-*, 2003, vol. 51, no 4, p. 237-244.
- INAMDAR, Mandar M.; GELBART, William M.; PHILLIPS, Rob. Dynamics of DNA ejection from bacteriophage. *Biophysical journal*, 2006, vol. 91, no 2, p. 411-420.
- JAMALLUDEEN, N., SHE, Y.M., LINGOHR, E.J., *et al.* Isolation and characterization of virulent bacteriophages against *Escherichia coli* serogroups O1, O2, and O78. *Poultry science*, 2009, vol. 88, no 8, p. 1694-1702.
- JAMALLUDEEN, N., JOHNSON, R.P., FRIENDSHIP, R, *et al.* Isolation and characterization of nine bacteriophages that lyse O149 enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Veterinary microbiology*, 2007, vol. 124, no 1, p. 47-57.
- JANN, K., SCHMIDT, G., WALLENFELS, B., *et al.* Isolation and Characterization of *Escherichia coli* bacteriophage  $\Omega$  8 specific for *E. coli* strains belonging to serogroup O 8. *Microbiology*, 1971, vol. 67, no 3, p. 289-297.



- JOHNSON, R.P., GYLES, C.L., HUFF, W.E, *et al.* Bacteriophages for prophylaxis and therapy in cattle, poultry and pigs. *Animal Health Research Reviews*, 2008, vol. 9, no 02, p. 201-215.
- JORQUERA, Denisse; GALARCE, Nicolás; BORIE, Consuelo. El desafío de controlar las enfermedades transmitidas por alimentos: bacteriófagos como una nueva herramienta biotecnológica. *Revista chilena de infectología*, 2015, vol. 32, no 6, p. 678-688
- KAPER, James B.; NATARO, James P.; MOBLEY, Harry LT. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 2004, vol. 2, no 2, p. 123-140.
- KAUFFMANN, F. The serology of the coli group. *J. immunol*, 1947, vol. 57, no 1, p. 71-100.
- KINGWELL, Katie. Bacteriophage therapies re-enter clinical trials. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2015, vol. 14, no 8, p. 515-516.
- KUDVA, I.T., JELACIC, S., TARR, P.I., *et al.* Biocontrol of *Escherichia coli* O157 with O157-specific bacteriophages. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, vol. 65, no 9, p. 3767-3773.
- KUTTER, Elizabeth. Phage host range and efficiency of plating. *Bacteriophages: Methods and Protocols, Volume 1: Isolation, Characterization, and Interactions*, 2009, p. 141-149.
- KUTTER, Elizabeth and SULAKVELIDZE, Alexander (ed.). *Bacteriophages: biology and applications*. CRC Press, 2004. p. 510 p.
- LAN, R., ALLES, M.C., DONOHOE, K., *et al.* Molecular evolutionary relationships of enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella spp.* *Infection and immunity*, 2004, vol. 72, no 9, p. 5080-5088.
- LAURY, A.M., ALVARADO, M.V., NACE, G., *et al.* Validation of a lactic acid–and citric acid–based antimicrobial product for the reduction of *Escherichia coli* O157:

H7 and Salmonella on beef tips and whole chicken carcasses. *Journal of food protection*, 2009, vol. 72, no 10, p. 2208-2211.

- LEFKOWITZ, Elliot J., DAVISON, Andrew J., SABANADZOVIC, Sead, *et al.* (ed.). *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses*. Tenth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, 2016. Online. [https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv\\_online\\_report/](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/)
- LEONG, John M.; NUNES-DÜBY, S. E., OSER, A. B *et al.* Structural and regulatory divergence among site-specific recombination genes of lambdoid phage. *Journal of molecular biology*, 1986, vol. 189, no 4, p. 603-616.
- LETELLIER, L., BOULANGER, P., DE FRUTOS, M., *et al.* Channeling phage DNA through membranes: from *in vivo* to *in vitro*. *Research in microbiology*, 2003, vol. 154, no 4, p. 283-287.
- LETELLIER, L., BOULANGER, P., PLANÇON, L., *et al.* Main features on tailed phage, host recognition and DNA uptake. *Front Biosci*, 2004, vol. 9, no 1, p. 1228-1339.
- LI, Longping and ZHANG, Zhiying. Isolation and characterization of a virulent bacteriophage SPW specific for *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis of lactating dairy cattle. *Molecular biology reports*, 2014, vol. 41, no 9, p. 5829-5838.
- LI, Y., CHEN, M., TANG, F., *et al.* Complete genome sequence of the novel lytic avian pathogenic coliphage NJ01. *Journal of virology*, 2012, vol. 86, no 24, p. 13874-13875.
- LU, Timothy K. and KOERIS, Michael S. The next generation of bacteriophage therapy. *Current opinion in microbiology*, 2011, vol. 14, no 5, p. 524-531.
- MAYER, D.G. Bacteriophage. In: *Microbiology and Immunology On-line*, Hunt, R.C. 2015. editor. <http://www.microbiologybook.org/mayer/phage.htm>

- MEZA, Pacheco y ADRIANA, Paula. Aislamiento y caracterización de bacteriófagos para cepas nosocomiales de *Acinetobacter baumannii* de Lima e Iquitos, Perú 2014-2015. 2016.
- MIDDELBOE, Mathias. Bacterial growth rate and marine virus–host dynamics. *Microbial Ecology*, 2000, vol. 40, no 2, p. 114-124.
- MIDDELBOE, Mathias; CHAN, Amy; BERTELSEN, Sif Koldborg. Isolation and life-cycle characterization of lytic viruses infecting heterotrophic bacteria and cyanobacteria. En *Manual of Aquatic Viral Ecology*. ASLO. ASLO, 2010.
- MIRZAEI, Mohammadali Khan, ERIKSSON, Harald, KASUGA, Kie, *et al.* Genomic, proteomic, morphological, and phylogenetic analyses of vB\_EcoP\_SU10, a *podoviridae* phage with C3 morphology. *PLoS One*, 2014, vol. 9, no 12, p. e116294.
- MORA, A., BLANCO, J.E., BLANCO, M., ALONSO, M.P., DHABI, G., ECHEITA, A., GONZÁLEZ, E.A., BERNÁRDEZ, M.I. AND BLANCO, J. Antimicrobial resistance of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* O157: H7 and non-O157 strains isolated from humans, cattle, sheep and food in Spain. *Research in Microbiology*, 2005, vol. 156, no 7, p. 793-806.
- MOSQUITO, Susan, RUIZ, Joaquim, BAUER, José Luis, *et al.* Mecanismos moleculares de resistencia antibiótica en *Escherichia coli* asociadas a diarrea. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*, 2011, vol. 28, no 4, p. 648-56.
- NORMARK, B. Henriques; NORMARK, S. Evolution and spread of antibiotic resistance. *Journal of internal medicine*, 2002, vol. 252, no 2, p. 91-106.
- O'BRIEN, A.D., NEWLAND, J.W., MILLER, S.F., *et al.* Shiga-like toxin-converting phages from *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis or infantile diarrhea. *Science*, 1984, vol. 226, p. 694-697.

- O'FLAHERTY, Sarah; ROSS, R. Paul; COFFEY, Aidan. Bacteriophage and their lysins for elimination of infectious bacteria. *FEMS microbiology reviews*, 2009, vol. 33, no 4, p. 801-819.
- O'FLYNN, G., ROSS, R.P., FITZGERALD, G.F., *et al.* Evaluation of a cocktail of three bacteriophages for biocontrol of *Escherichia coli* O157: H7. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, vol. 70, no 6, p. 3417-3424.
- PARK, Se Chang, SHIMAMURA, Ichiro, FUKUNAGA, Minoru, *et al.* Isolation of bacteriophages specific to a fish pathogen, *Pseudomonas plecoglossicida*, as a candidate for disease control. *Applied and environmental microbiology*, 2000, vol. 66, no 4, p. 1416-1422.
- RIVAS, M.; LEOTTA, G.; CHINEN, I. Diagnóstico y caracterización de *Escherichia coli* O157 productor de toxina shiga a partir de alimentos. Departamento Bacteriología Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán" Centro Regional de Referencia del WHO Global Salm Surv para América del Sur, 2007.
- RODRÍGUEZ, Carlos Andrés y VESGA, Omar. *Staphylococcus aureus* resistente a vancomicina. *Biomédica*, 2005, vol. 25, no 4, p. 575-87.
- RODRÍGUEZ-ANGELES, Guadalupe. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *salud pública de méxico*, 2002, vol. 44, no 5, p. 464-475.
- RODRÍGUEZ-LÁZARO, D. and HERNÁNDEZ, M. Molecular methodology in Food Microbiology diagnostics: trends and current challenges. En *13th World Congress of Food Science & Technology 2006*. 2006. p. 643-643.
- ROMERO, Jaime. Fagoterapia: alternativa para el control de enfermedades bacterianas. *Universidad de Chile*, 2015.
- SACSAQUISPE R. y VELÁSQUEZ J. 2002. Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión. Serie de

Normas Técnicas N.º 30. Lima: Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud.  
68 p.

- SAJU, G., MENON, K.V., LATHA, C, *et al.* Isolation of *Listeria*-specific bacteriophage from three different towns in Kerala, India. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*, 2014, vol. 3, no 9, p. 667-669.
- SAKAKI, Yoshiyuki and OSHIMA, Tairo. Isolation and characterization of a bacteriophage infectious to an extreme thermophile, *Thermus thermophilus* HB8. *Journal of virology*, 1975, vol. 15, no 6, p. 1449-1453.
- SANTOS, A. Ramírez; FERRAT, G. Contreras; EICHELMANN, MC Gómez. La fase estacionaria en la bacteria *Escherichia coli*. *Rev, Latinoamericana Microbiología*, 2005, vol. 47, p. 92-101.
- SAVALIA, Dhruvi, WESTBLADE, Lars F., GOEL, Manisha, *et al.* Genomic and proteomic analysis of phiEco32, a novel *Escherichia coli* bacteriophage. *Journal of molecular biology*, 2008, vol. 377, no 3, p. 774-789.
- SEGUNDO, N., HERNÁNDEZ, E., LÓPEZ, O., *et al.* Los bacteriófagos como una alternativa en el tratamiento de enfermedades infecciosas Bacterianas (Fagoterapia). *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 2010, vol. 41, no 3, p. 17-26.
- SOMOLINOS, Maria, GARCÍA, Diego, PAGÁN, Rafael, *et al.* Relationship between sublethal injury and microbial inactivation by the combination of high hydrostatic pressure and citral or tert-butyl hydroquinone. *Applied and environmental microbiology*, 2008, vol. 74, no 24, p. 7570-7577.
- SULAKVELIDZE, Alexander; ALAVIDZE, Zemphira; MORRIS, J. Glenn. Bacteriophage therapy. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2001, vol. 45, no 3, p. 649-659.

- TALLEDO, Miguel, GUTIÉRREZ, Susana, MERINO, Fernando, *et al.* Detección, cuantificación y caracterización morfológica de bacteriófagos indicadores de *Vibrio cholerae*. *Revista Peruana de Biología*, 1998, vol. 5, no 2, p. 090-097.
- TAMARIZ, Jesús H.; LEZAMETA, Lizet; GUERRA, Humberto. Fagoterapia frente a infecciones por *Staphylococcus aureus* meticilino resistente en ratones. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 2014, vol. 31, no 1, p. 69-77.
- TANJI, Yasunori, SHIMADA, Takuya, FUKUDOMI, Hiroshi, *et al.* Therapeutic use of phage cocktail for controlling *Escherichia coli* O157: H7 in gastrointestinal tract of mice. *Journal of bioscience and bioengineering*, 2005, vol. 100, no 3, p. 280-287.
- TZSCHOPPE, Markus; MARTIN, Annett; BEUTIN, Lothar. A rapid procedure for the detection and isolation of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) serogroup O26, O103, O111, O118, O121, O145 and O157 strains and the aggregative EHEC O104: H4 strain from ready-to-eat vegetables. *International journal of food microbiology*, 2012, vol. 152, no 1, p. 19-30.
- VIEU, J. F.; DIVERNEAU, G.; BINETTE, H. La fièvre typhoïde en France: Lysotypie de 529 souches de *Salmonella typhi* isolées en 1975. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 1976, vol. 6, no 7, p. 260-262.
- WONG GONZÁLEZ, Alfredo. "Purificación y caracterización biológica del bacteriófago uB-19 específico de *Bacillus thuringiensis*". Asesores: Benito Pereyra, Jorge Saldaña. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey. 1994.
- World head organization (WHO). *E.coli* [en línea] [ref. octubre del 2016]. Disponible en web: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs125/es/>
- YOON, Sung Ho, JEONG, Haeyoung, KWON, Soon-Kyeong, *et al.* Genomics, biological features, and biotechnological applications of *Escherichia coli* B:"Is B

for better?!". En *Systems Biology and Biotechnology of Escherichia coli*. Springer Netherlands, 2009. p. 1-17.

- YOUNG, R. Y. Bacteriophage holins: deadly diversity. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 2002, vol. 4, no 1, p. 21-36.
- YU, M. X.; SLATER, M. R.; ACKERMANN, H.-W. Isolation and characterization of *Thermus* bacteriophages. *Archives of virology*, 2006, vol. 151, no 4, p. 663-679.