

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**E.A.P. DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA**

**Caracterización de bacteriófagos líticos de  
*Salmonella enterica* aislados de muestras de pollos**

**TESIS**

Para optar el Título Profesional de Bióloga Microbióloga  
Parasitóloga

**AUTOR**

Gloria Isabel FLORES ESCOBAR

**ASESOR**

Enrique Walter MAMANI ZAPANA

Lima - Perú

2017

## **DEDICATORIA**

***Con mucho amor y cariño:***

***A mis abuelitos***

***A mis padres***

***A mis hermanos***

***A mi pequeña Micaela***

***Gracias por todo, por su amor, cariño,  
y apoyo incondicional. Los amo.***

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a:

A Dios, por haberme permitido llegar hasta este punto, por haberme dado fuerzas y paciencia para lograr mis objetivos, por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo este tiempo.

A mis padres, por haberme apoyado desde siempre, por los valores inculcados, por los ejemplos de perseverancia y constancia, por ser la motivación más grande de mi vida, por el amor y cariño que siempre me han demostrado, por la gran y enorme paciencia que me tienen, gracias por miles de cosas más, pero sobre todo por ser los mejores padres del mundo.

A mis hermanos, Arturo, Raúl, Yisela y Noelia por el cariño, la confianza que depositan en mí, pero más aún, gracias por la paciencia. A mi pequeña Micaela, mi princesa hermosa que desde que llegó a nuestras vidas nos llenó de felicidad y paz, quien con una sonrisa y aun abrazo me hace olvidar momentos difíciles y de estrés.

A mi asesor Dr. Enrique Mamani, quien desde el primer momento confió en mí y me apoyó incondicionalmente. Gracias por la oportunidad brindada, por sus consejos, por su amistad, por su paciencia, por su guía, por la confianza, gracias por tanto, gracias a usted pude cumplir una de mis metas y siempre le estaré muy agradecida.

A la Dra. Egma Mayta por recibirme en su laboratorio, por su apoyo y confianza, por sus consejos y por las oportunidades brindadas.

A mis revisores, por su tiempo y dedicación, por sus valiosas recomendaciones para la mejora de este trabajo.

A mis mejores amigas Tatiana y Carla, a quienes quiero como unas hermanas, gracias por sus enseñanzas, por sus consejos, por su paciencia, por estar conmigo siempre, tanto en mis momentos buenos y malos, las quiero mucho. Gracias Carlita por todo el apoyo brindado en el desarrollo de mi tesis, de igual

forma agradezco a Violeta Flores quien siempre me ha apoyado y recibido en su laboratorio con mucho cariño.

A Renzo por el gran apoyo que siempre me da, por siempre estar a mi lado en momentos difíciles, ayudándome a seguir a pesar de cualquier obstáculo, por ser mi gran apoyo y fuerzas, por creer y confiar en mí, por los momentos de felicidad, por acompañarme a cumplir mis metas trazadas, por apoyarme en las nuevas metas y proyectos que van surgiendo en mi camino.

A mis amigos a Katy, Johan, Ronald, Eric, gracias por su ayuda y por los años amistad, gracias por siempre haber estado conmigo. También agradecer a mi gran amigo Roger Gamboa, muchas gracias Roger por todo el apoyo que me has dado desde que te conozco y que hasta el día de hoy sigo recibiendo, gracias por tu amistad sincera, gracias por ayudarme, gracias por ser mi amigo.

A mis compañeros y amigos del laboratorio de Virología Clínica y Molecular, de forma especial a Jack Chanco, muchas gracias Jack por toda tu ayuda desde el comienzo hasta el final, gracias por tu esfuerzo, por todas las horas y horas que trabajamos juntos, por tu amistad, quedo infinitamente agradecida contigo. Asimismo, agradezco a Bernardo, Andrea, Rubén, Mayra, Alys, Dylan, quienes también me apoyaron para el logro de este trabajo. Agradecer también a Lucas, Karla, Arturo, Adrián con quienes he compartido momentos muy agradables que quedarán en un bonito recuerdo.

Al señor Armando y a Elmer que en todo momento me ayudaron cuando lo necesitaba, agradecer la buena predisposición para apoyarme siempre.

Por último, agradecer las enseñanzas de la vida que, mediante los obstáculos, dificultades y errores durante esta etapa, me permitieron aprender de ellos, ser más fuerte y perseverante, confirmándome que la voluntad es el gran móvil para concluir todos los objetivos trazados.

¡Gracias a ustedes!

## ABREVIATURAS

- TSB Caldo Tripticasa Soya
- XLD Xilosa lisina desoxicolato
- TSI Triple azúcar hierro
- LIA Lisina hierro agar
- UFP Unidades formadoras de placas
- UFC Unidades formadoras de colonias
- MOI Multiplicidad de infección
- ETA Enfermedad de transmisión alimentaria
- OMS Organización Mundial de la Salud
- ICNB Código Internacional de Nomenclatura Bacteriana
- CDC Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades
- MET Microscopía Electrónica de Transmisión

## ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	3
2.1 Salmonella	3
2.1.1 Generalidades	3
2.1.2 Taxonomía y nomenclatura de <i>Salmonella</i>	4
2.1.3 Resistencia a antibióticos	6
2.2 Bacteriófagos	8
2.2.1 Generalidades	8
2.2.2 Taxonomía	9
2.2.3 Ciclo replicativo de los bacteriófagos	11
2.2.3.1 Ciclo lítico	12
2.2.3.1.1 Adsorción	12
2.2.3.1.2 Penetración	12
2.2.3.1.3 Replicación	13
2.2.3.1.4 Morfogénesis	13
2.2.3.1.4.1 Morfogénesis de la cabeza:	13
2.2.3.1.4.2 Embalaje de DNA	14
2.2.3.1.4.3 Morfogénesis de la cola	14
2.2.3.1.4.4 Lisis y liberación	15
2.2.3.2 Ciclo lisogénico	16
2.2.4 Rango de hospederos	17
2.2.4.1 Especificidad en la adsorción	17
2.2.5 Curva de crecimiento de bacteriófagos líticos	18

2.2.6	Uso de los bacteriófagos	20
3.	HIPÓTESIS	22
4.	OBJETIVOS	22
5.	MATERIAL Y MÉTODOS	23
5.1	Obtención de muestras	23
5.1.1	Colección de la muestra	23
5.1.2	Procesamiento de la muestra	23
5.1.3	Cepas bacterianas, aislamiento y condiciones de cultivo	23
5.1.3.1	Reactivación de <i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 14028	23
5.1.3.2	Aislamiento de <i>Salmonella enterica</i>	24
5.1.3.3	Curva de crecimiento de <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	24
5.1.4	Aislamiento, purificación y amplificación de bacteriófagos	25
5.1.4.1	Técnica del goteo	25
5.1.4.2	Técnica de doble capa	26
5.1.4.3	Purificación de bacteriófagos	26
5.1.4.4	Amplificación de bacteriófagos	27
5.1.4.5	Titulación de bacteriófagos	27
5.1.4.6	Caracterización de bacteriófagos	28
5.1.4.6.1	Rango de hospederos	28
5.1.4.6.2	Estabilidad a diferentes temperaturas	28
5.1.4.6.3	Estabilidad a diferentes pH	29
5.1.4.6.4	Sensibilidad al cloroformo	29
5.1.4.6.5	Multiplicidad de infección	29
5.1.4.6.6	Determinación de la tasa de adsorción	30
5.1.4.6.7	Curva de un paso del bacteriófago	31
5.1.4.6.8	Microscopía Electrónica de Transmisión	32

6. RESULTADOS	33
6.1 Aislamiento de <i>Salmonella enterica</i>	33
6.2 Curva de crecimiento de <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	35
6.3 Aislamiento, purificación y amplificación de bacteriófagos	36
6.4 Caracterización de bacteriófagos	38
6.4.1 Rango de hospederos	38
6.4.2 Estabilidad a diferentes temperaturas	40
6.4.3 Estabilidad a diferentes pH	41
6.4.4 Sensibilidad al cloroformo	42
6.4.5 Multiplicidad de infección	43
6.4.6 Determinación de la tasa de adsorción	44
6.4.7 Curva de un paso del bacteriófago	45
6.4.8 Microscopía Electrónica de Transmisión	46
7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	47
8. CONCLUSIONES	52
9. RECOMENDACIONES	53
9. BIBLIOGRAFÍA	54



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura N° 1.</b> Microscopía electrónica de <i>Salmonella</i> Typhi	3
<b>Figura N° 2.</b> Bacteriófago con simetría icosaédrica	8
<b>Figura N° 3.</b> Morfología básica de las familias de bacteriófagos	11
<b>Figura N° 4</b> Ciclo lítico del bacteriófago	15
<b>Figura N° 5</b> Ciclo Lisogénico del bacteriófago	16
<b>Figura N° 6</b> Curva de un paso del bacteriófago	19
<b>Figura N° 7</b> Curva de crecimiento bacteriano Ln UFC/mL vs tiempo	35
<b>Figura N° 8</b> Técnica del goteo	36
<b>Figura N° 9</b> Placas de lisis obtenidas mediante la técnica de doble capa	37
<b>Figura N° 10</b> Amplificación de bacteriófagos en caldo TSB	37
<b>Figura N° 11</b> Estabilidad a diferentes temperaturas	40
<b>Figura N° 12</b> Estabilidad a diferentes pH	41
<b>Figura N° 13</b> Sensibilidad al cloroformo	42
<b>Figura N° 14</b> Multiplicidad de infección	43
<b>Figura N° 15</b> Adsorción del bacteriófago	44
<b>Figura N° 16</b> Curva de un paso del bacteriófago	45
<b>Figura N° 17</b> Micrografía electrónica de transmisión	46

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla N° 1.</b> Especies, subespecies y del género <i>Salmonella</i>	6
<b>Tabla N° 2.</b> Identificación bioquímica de las cepas aisladas	33
<b>Tabla N° 3.</b> Sistema de identificación API 20E de cepa SS1	34
<b>Tabla N° 4.</b> Sistema de identificación API 20E de cepa SS2	34
<b>Tabla N° 5.</b> Rango de hospederos del fago S6 por método del goteo	38

## RESUMEN

Las infecciones causadas por *Salmonella* se dan generalmente por ingesta de productos avícolas generando un grave problema en salud pública, sumado a ello los tratamientos profilácticos y pos infección no son de gran utilidad debido a la resistencia a los antibióticos, incrementándose así las bacterias multirresistentes.

Los bacteriófagos son una alternativa para el control biológico de *Salmonella*, eliminando o reduciendo la población de dicha bacteria. Para ello se necesita evaluar las características biológicas y químicas del bacteriófago para determinar su estabilidad.

En el presente estudio se aisló el bacteriófago denominado S6 partir de una muestra de intestinos de pollo. Se evaluó la estabilidad del bacteriófago sometándolo a diferentes temperaturas y pH, también se determinó la sensibilidad al cloroformo y las características biológicas como multiplicidad de infección, tasa de adsorción y curva de un paso del bacteriófago aislado.

Los resultados indican que el bacteriófago S6 es estable a pH entre 6 - 8 y temperaturas de – 80°C hasta 60°C. Además, presenta características líticas solo para serovares de *Salmonella* como Typhimurium, Bispebjerg, Enteritidis. Mediante la microscopía electrónica de transmisión se determinó que pertenece al orden *Caudovirales* y a la familia *Siphoviridae*.

Todas estas características permiten emplearlo como una alternativa para la reducción de la población de *Salmonella enterica*.

**Palabras claves:** Bacteriófago, *Salmonella enterica*, estabilidad, sensibilidad,  
Microscopía Electrónica de Transmisión

## ABSTRACT

*Salmonella* infections are usually borne through poultry products, causing a serious problem in public health. In addition, prophylactic and post-infection treatments are not very useful due to resistance to antibiotics, thus increasing multiresistant bacteria.

Bacteriophages are an alternative for the biological control of *Salmonella*, eliminating or reducing the population of the bacteria. To do this we need to evaluate the biological and chemical characteristics of the bacteriophage to determine their stability.

In this study, the bacteriophage called S6 was isolated from a sample of chicken intestines. The stability of the bacteriophage was evaluated, it was tested at different temperatures and pH, sensitivity to chloroform and biological characteristics such as multiplicity of infection, adsorption rate and one-step growth of the isolated bacteriophage were also determined.

The results showed that the bacteriophage S6 is stable at different pH values and temperatures, at intervals between 6 and 8, - 80°C and 60 °C, respectively. Furthermore, it presents lytic characteristics in different *Salmonella* serovars like Typhimurium, Bispebjerg, Enteritidis. Through transmission electron microscopy it was determined that it belongs to the order *Caudovirales* and *Siphoviridae* family.

All these characteristics allow using it as an alternative for population reduction of *Salmonella enterica*.

**Key words:** Bacteriophage, *Salmonella enterica*, stability, sensitivity, Transmission Electron Microscopy.

## 1. INTRODUCCIÓN

*Salmonella* es una de las principales causas de infecciones en aves asociadas a la industria, representando un problema importante a nivel mundial, ocasionando grandes pérdidas económicas, no solo debido a la mortalidad que esta produce, sino por los costos de prevención y control (INPPAZ, 1996).

Por otro lado, algunas serovariedades de *Salmonella enterica* no causan cuadro clínico en los animales, pero estos se encuentran en estado portador, pudiendo así infectar a los seres humanos provocando tox infecciones alimentarias (Lax *et al.*, 1995). Esto conlleva a un problema de salud pública, produciéndose enfermedades por el consumo de alimentos contaminados de origen aviar.

Los serotipos *Salmonella* Typhimurium y *Salmonella* Enteritidis son de importancia ya que infectan humanos y animales. En humanos provoca serios cuadros de infección, a diferencia de los pollos en los que provoca infecciones asintomáticas, siendo este factor el que ayuda al incremento de infecciones en aves por *Salmonella* Enteritidis, ya que es difícil detectar la infección en pollos asintomáticos. (Ward *et. al* 1987)

Las estrategias de control para las infecciones por *Salmonella*, así como la bioseguridad en toda la cadena alimentaria, las vacunas y el uso de antimicrobianos no han logrado los resultados esperados (Borie *et al.* 2008).

La resistencia a antibióticos es un problema actual, generándose mayor cantidad de cepas multirresistentes. A diferencia de otros serotipos, *Salmonella* Typhimurium presenta resistencia a múltiples fármacos, siendo de importancia no solo en la industria avícola sino también en brotes de enfermedades alimentarias (Meslin, 1997). A todo ello se suma la capacidad que tiene la bacteria de producir biopelículas (De Olivera *et. al* 2013), todo esto conlleva a utilizar una herramienta como alternativa complementaria a los métodos de control y prevención de *Salmonella enterica*, que son los bacteriófagos.

En el Perú, la investigación sobre los bacteriófagos es poca, a diferencia de otros países, quienes utilizan estos virus como herramienta de control ante diferentes tipos de infecciones bacterianas. Por ello es necesario investigar sobre estos virus, para así reconocer qué bacteriófagos podrían ser útiles, aplicables y saber en qué condiciones son eficaces.

Una suspensión de bacteriófagos líticos caracterizados y específicos de *Salmonella enterica*, podría ser utilizadas más adelante como estrategia de eliminación o reducción de esta bacteria, jugando un papel muy importante en el tratamiento de infecciones bacterianas. El uso de estos bacteriófagos representa una alternativa favorable ya que no es nocivo, por ende, no representa ningún peligro para la salud humana ni de los animales.

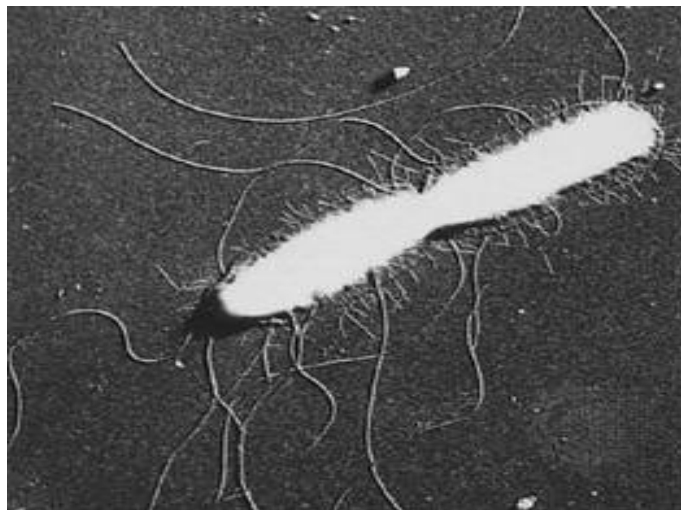
Además, que puede ser utilizado de diferentes formas, como reductor bacteriano, puede ser empleado como un indicador de la presencia de bacterias patógenas, entre ellas *Salmonella* spp. Detectar esta bacteria mediante el uso de bacteriófagos podría ser una técnica rápida a diferencia de las técnicas convencionales que requieren mucho más tiempo para lograr dicho objetivo.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 *Salmonella*

#### 2.1.1 Generalidades

*Salmonella* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, son bacilos Gram negativos de  $0,7 - 1,5 \times 2,0 - 5 \mu\text{m}$ , anaerobios facultativos, no esporulados, en su mayoría móviles por flagelos peritricos, se caracterizan por ser oxidasa y lactosa negativas. Se desarrollan en un amplio rango de temperaturas que oscilan entre  $7^\circ \text{C}$  y  $48^\circ \text{C}$ , siendo su temperatura óptima  $37^\circ \text{C}$ . Entre las características más importantes que definen de forma general a esta familia es el metabolismo glucídico, descarboxilación de la lisina, no fermenta sacarosa, ausencia de ureasa, utilización del citrato como única fuente de carbono, producción de hidrogeno sulfurado (Herrera, 2005).



**Fig. 1 Microscopía electrónica de *Salmonella* Typhi**

Fuente: [http://pendientedemigracion.ucm.es/info/diciex/proyectos/agua/imagenes/imagenes\\_web/contaminacion\\_riosylagos\\_1.JPG](http://pendientedemigracion.ucm.es/info/diciex/proyectos/agua/imagenes/imagenes_web/contaminacion_riosylagos_1.JPG)

*Salmonella*, es una bacteria zoonótica y una de las causantes de Enfermedades de Transmisión Alimentaria (ETA), a nivel mundial tanto en países desarrollados o en vías de desarrollo. La incidencia de *Salmonella* a nivel internacional se estima entre 14 y 120 casos por 100 000 personas (FAO/OMS 2005). Está presente de manera asintomática en el tracto intestinal de varios animales que actúan como reservorio, siendo fuente de infección para el hombre. Su principal reservorio son los huevos y las aves de corral que constituyen una amenaza durante toda la cadena alimentaria, ya que la ingesta de carne o vísceras mal cocidas, contaminación cruzada con utensilios, mesas, manos de quienes manejan el producto y preparan alimentos y además de una dosis de infección baja (menos de  $10^3$  microorganismos) facilitan la transmisión de *Salmonella* (Camacho *et al.*, 2010).

### **2.1.2 Taxonomía y nomenclatura de *Salmonella***

El Código Internacional de Nomenclatura Bacteriana (ICNB) es el sistema de nomenclatura de bacterias, que designa el nombre científico a cada una de ellas, basada en normas aprobadas internacionalmente, que designan nombrar a estos microorganismos mediante dos vocablos: el primero define al género y el segundo a la especie (Delgado, 2015).

En la familia Enterobacteriaceae, *Salmonella* es una de las bacterias que ha tenido variaciones en la nomenclatura propuesta por Kauffmann en el año 1996 (Barreto, 2012).

El nombre de *Salmonella*, se debe a su descubridor David Elmer Salmon, quien en 1884 llegó al descubrimiento de esta. Inicialmente el género incluía más de dos mil especies y se designaron nombres según el lugar de origen donde por primera vez fue aislada.



Años más tarde las investigaciones determinaron que se trataban de serotipos y concluyeron que solo había dos especies: *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori* (Delgado, 2015).

Shelobolina *et al.* (2004), aislaron una cepa ambiental poco usual, representando una nueva especie denominada *Salmonella subterranea* sp. nov., la cual fue aceptada poco después por el Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC).

Dentro de la clasificación de *Salmonella enterica*, esta se divide en seis subespecies que se distinguen por sus características bioquímicas. Estas subespecies están ordenadas mediante números romanos: I enterica; II salamae; IIIa arizonae; IIIb diarizonae; IV houtenae y VI indica. (Delgado, 2015).

*Salmonella enterica* subespecie *enterica* se divide en cinco serogrupos, los cuales comprenden múltiples serovares de importancia médica (Barreto, 2012).

De acuerdo a las variaciones taxonómicas, también se realizaron cambios en la nomenclatura donde solo se conservan los nombres de los serovares de la subespecie *enterica*, las cuales no deben escribirse en cursiva con el fin de enfatizar que dicho nombre no corresponde a una especie y además su letra inicial será con letra mayúscula. Como ejemplo siguiendo las normas actuales, la denominación correcta *Salmonella* Typhi, de forma abreviada; y *Salmonella enterica*, subespecie enterica serovariedad Typhi, siendo esta la nomenclatura completa para referirse al mismo agente patógeno (Delgado, 2015).

**Tabla 1. Especies, subespecies y número de serovares del género *Salmonella*.**

Especies de <i>Salmonella</i>	Subespecies de <i>Salmonella</i>	N° de serovariedades
<i>Salmonella enterica</i>	<i>enterica</i> (I)	1.454
	<i>salamae</i> (II)	489
	<i>arizonae</i> (IIIa)	94
	<i>diarizonae</i> (IIIb)	324
	<i>houtenae</i> (IV)	70
	<i>indica</i> (VI)	12
<i>Salmonella bongori</i> (V)	-	20
<i>Salmonella subterranea</i>	-	1
TOTAL		2.464

(Fuente: Soria, 2012)

### 2.1.3 Resistencia a antibióticos

La resistencia a los antibióticos es un problema cada vez mayor tanto en la salud de las personas como en los animales, debido al uso indiscriminado de antibióticos tanto en medicina humana como en medicina veterinaria, siendo esta última la que los emplea no solo con fines terapéuticos y profilácticos, sino también como promotores de crecimiento en producción animal provocando el desarrollo de cepas resistentes y multiresistentes a los antibióticos (WHO, 2000).

El uso de antibióticos como promotores de crecimiento en la producción animal, es una práctica conocida desde la década de 1950, en el que se descubrió que pequeñas dosis de tetraciclina mejoraban el desarrollo de los animales, desestimándose el efecto de resistencia que estos podían producir al emplear antibióticos destinados al tratamiento de infecciones humanas como cloramfenicol, penicilina y tetraciclina con fines de engorde animal. Y no es hasta fines de los años 70 en que surgen los primeros reportes

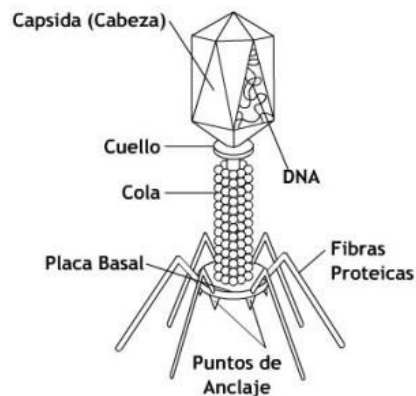
de incremento de resistencia de *Salmonella* al cloramfenicol relacionados con esta práctica, más adelante múltiples trabajos destacan la resistencia bacteriana en salud humana, vinculada con aislamientos de procedencia animal (Peña *et al.*, 2011).

En los últimos años diferentes estudios han reportado el aumento de resistencia antimicrobiana en cepas de *Salmonella* spp. aisladas de alimentos de origen animal. Una revisión de artículos hecha en ciertos países de América Latina, revela la resistencia de esta bacteria a múltiples antibióticos, incluyendo los de uso clínico. Las cepas de *Salmonella* presentaron resistencia frecuente al ácido nalidíxico (19 de 21 estudios); ampicilina (15 de 24 estudios); tetraciclina (20 de 22 estudios); y cloramfenicol (15 de 22 estudios). En cuanto a antibióticos de uso clínico las cepas de *Salmonella* spp. mostraron resistencia a ciprofloxacina (8 de 20 estudios), cefotaxima (1 de 7 estudios) y a ceftriaxona (4 de 8 estudios). Estos resultados reflejan una problemática que podría estar asociada al fracaso terapéutico en humanos, produciendo costos económicos, sociales y emocionales. Todo esto indica la necesidad de establecer estrategias orientadas a disminuir la resistencia bacteriana (Quesada *et al.*, 2016).

## 2.2 Bacteriófagos

### 2.2.1 Generalidades

Los bacteriófagos o fagos son virus que infectan bacterias de forma específica, están formados por proteínas y su material genético, se compone de DNA o RNA, pudiendo ser este de doble cadena o cadena simple. Su estructura está determinada por sus proteínas de envoltura, cuya función principal es de la proteger el material genético. La complejidad estructural y la forma del bacteriófago están en función al acomodo o arreglo de las proteínas alrededor del material genético del virus, de tal modo que existen fagos icosaedros, helicoidales o filamentosos. (Segundo *et al.*, 2010).



**Figura 2. Bacteriófago T4 con simetría icosaédrica**

(Fuente: <http://b.se-todo.com/biolog/13564/index.html>)

Los bacteriófagos fueron descubiertos muchos años atrás. En 1896, el bacteriólogo británico Ernest Hankin detectó la acción bactericida de agua de dos ríos de la India, sobre *Vibrio cholerae*, sugiriendo que al ingerirse esta agua la enfermedad del cólera no podría expandirse (Fernández *et al.*, 2004). Dos años después el bacteriólogo ruso Nikolay Gamaleya observó un efecto similar en *Bacillus subtilis*.

En 1915 el bacteriólogo británico, Frederick Twort, dedujo que el agente antimicrobiano eran virus. Al no poder concluir estos estudios, en 1917 el francocanadiense Félix d'Herelle, del instituto Pasteur de París, les puso el nombre de "Bacteriófagos", considerándose el descubrimiento de estos por primera vez (Gómez *et al.*, 2009). En 1930 Salvador Luria y Max Delbrück utilizaron los bacteriófagos como modelo para investigar muchos aspectos de la virología como la estructura y su morfogénesis de los viriones (Herrero, 2013).

Los bacteriófagos han sido importantes en la exploración de diferentes procesos genéticos y la problemática de resistencia a antibióticos, debido a su potencial como controladores de bacterias patógenas (Gómez *et al.*, 2009), y además son los virus más estudiados y los que más han contribuido al desarrollo de la Biología Molecular (Vispo y Puchades, 2001).

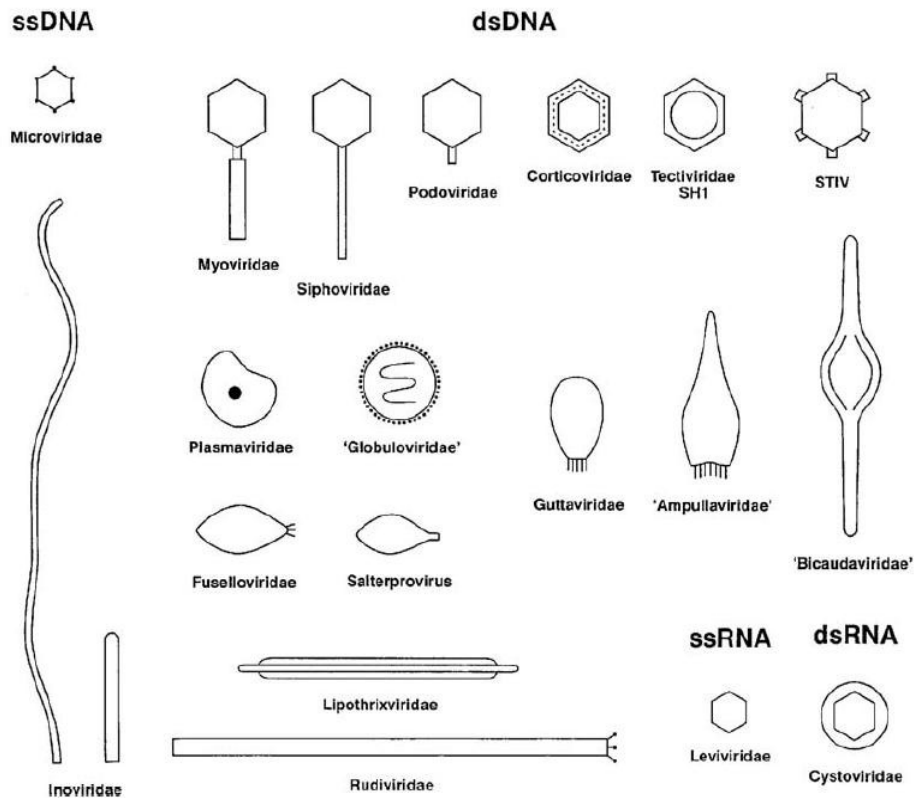
### **2.2.2 Taxonomía**

Desde el descubrimiento de los bacteriófagos, su clasificación ha sido tema de discusión ya que tiempo atrás el sistema de clasificación de estos estuvo basado en esencialmente en el rango de huésped (Ackermann, 2009).

En 1966 se estableció el *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV), en el que se desarrolló un sistema taxonómico universal para los virus. Los viriones son de cola, poliédricos, filamentosos y pleomórficos y la mayoría contiene dsDNA, los demás que contienen ssDNA, ssRNA, o dsRNA se encuentran en pequeños grupos. No existen criterios universales de clasificación para los géneros y las especies (Ackermann, 2005).

Los bacteriófagos que conforman el 96% del total de virus bacterianos reportados, pertenecen al orden *Caudovirales*, que se encuentran dentro del grupo de dsDNA y los que a su vez se dividen en 3 familias: *Myoviridae* (24%), *Siphoviridae* (62%) y *Podoviridae* (14%). La división de este orden según el ICTV, está basada únicamente en la morfología de la cola, ya que los miembros de la familia *Myoviridae* tienen colas largas y contráctiles, *Siphoviridae* tienen colas largas no contráctiles y *Podoviridae* tienen colas cortas (ICTV, 2011).

Las demás familias de virus bacterianos no tienen todavía un orden asignado, y en la mayoría de estas su material genómico es dsDNA, como por ejemplo la familia *Corticoviridae*, los cuales presentan membranas icosaédricas, con genoma circular de 10 kb y solo una especie ha sido reconocida *Pseudoalteromonas virus de PM2* (Oksanen e ICTV, 2017). Otros ejemplos son las familias *Tectiviridae*, *Plasmaviridae*, *Fuselloviridae*, *Guttaviridae*. Dentro de las familias con ssDNA se encuentran *Microviridae* e *Inoviridae*. Y por último las familias cuyo genoma es RNA son *Cystoviridae* y *Leviviridae* (ICTV, 2011).



**Fig 3. Morfología básica de las familias de bacteriófagos**

(Fuente: Ackermann, 2009)

### 2.2.3 Ciclo replicativo de los bacteriófagos

Los bacteriófagos al igual que los demás virus tienen la capacidad de replicarse con la ayuda de la célula huésped a la que infectan. La primera etapa del proceso de infección es la adhesión del fago a la bacteria, luego de reconocimiento de receptores específicos en la superficie del huésped, para luego tener 2 posibles ciclos replicativos: ciclo lítico o ciclo lisogénico (Meza, 2016).

### **2.2.3.1 Ciclo lítico**

#### **2.2.3.1.1 Adsorción**

La adsorción es el primer paso del ciclo de infección del bacteriófago a la célula huésped y está mediada por estructuras o receptores específicos. La naturaleza de éstos pueden ser proteínas y lipopolisacáridos de la pared celular, ácidos teicoicos, flagelos y pili los cuales pueden servir como receptores. La velocidad y eficiencia de adsorción son aspectos importantes que varían en la interacción entre el bacteriófago y huésped, de factores externos y del estado fisiológico del hospedero (Prada *et al.*, 2015).

La infección de la célula empieza cuando las fibras de fago se unen a las moléculas de la superficie bacteriana. En bacterias Gram negativas, cualquiera de las estructuras mencionadas anteriormente, pueden ser receptores para algunos fagos, a diferencia de las bacterias Gram positivas, debido a que la mureína es más compleja teniendo lugares de unión muy diferentes (Guttman *et al.*, 2005). (Ver Fig. 4)

#### **2.2.3.1.2 Penetración**

Después de la adhesión del bacteriófago a la célula huésped, el material genético del fago ingresa a ella. La punta de la cola penetra la capa del peptidoglucano y la membrana interna para poder liberar el genoma del fago (Guttman *et al.*, 2005).

El genoma viral mide aproximadamente 10  $\mu\text{m}$  y el tiempo de transferencia del DNA o RNA vírico podría ser desde segundos a minutos (Inamdar *et al.*, 2006) (Ver Fig. 4).



### **2.2.3.1.3 Replicación**

Después que el material genético ingresa a la célula hospedera, el DNA se recirculariza evitando la degradación de exonucleasas de la bacteria, iniciándose su proceso de multiplicación. El inicio de la replicación se da en la región *ori* que contiene zonas ricas de adenina y timina, permitiendo así la separación de hebras de DNA y sitios de unión para las proteínas que inician la replicación.

El proceso de replicación de los bacteriófagos tiene un orden, ya que primero se expresan los genes tempranos, los cuales sintetizan copias del material genético, posteriormente los genes medios o cuasi tardíos, quienes codifican las proteínas estructurales, y finalmente se expresan los genes tardíos, quienes se encargan de sintetizar las lisinas que rompen la pared celular, liberando así la progenie viral. El proceso de replicación no se detiene, es decir, mientras se sintetizan las lisinas que provocan la ruptura de la pared celular, a la vez se están produciendo proteínas estructurales y se está ensamblando el fago, por lo que al momento en que la célula se lisa, se pueden encontrar virus completos e infectivos, fragmento de material genético, cápsides y demás proteínas estructurales vacías y no infectivas (Segundo *et al.*, 2010).

### **2.2.3.1.4 Morfogénesis**

#### **2.2.3.1.4.1 Morfogénesis de la cabeza:**

La formación de la cabeza o cápside es un procedimiento complejo, está formada por proteínas y en su interior se encuentra empaquetado el DNA antes de ser unida a las estructuras de la cola, formando así partículas infecciosas. El ensamblaje de la cabeza empieza con la formación de un complejo iniciador de proteínas, este complejo forma

uno de los doce vértices de la cabeza icosaédrica siendo el punto de inicio para el ensamblaje de la cabeza y sirve como punto de unión para el complejo de enzimas que empaquetan el DNA, para el conducto a través del cual el DNA entra y sale de la cabeza y para el sitio de unión para la cola del fago (Kutter *et al.*, 2005).

#### **2.2.3.1.4.2 Embalaje de DNA:**

El empaquetamiento del DNA comienza a partir de un concatémero largo y lineal y termina cuando se reconocen secuencias específicas. Cuando el DNA se está empaquetando dentro de la cápside, esta se expande para dar cabida a toda la longitud del material genético (Kutter *et al.*, 2005).

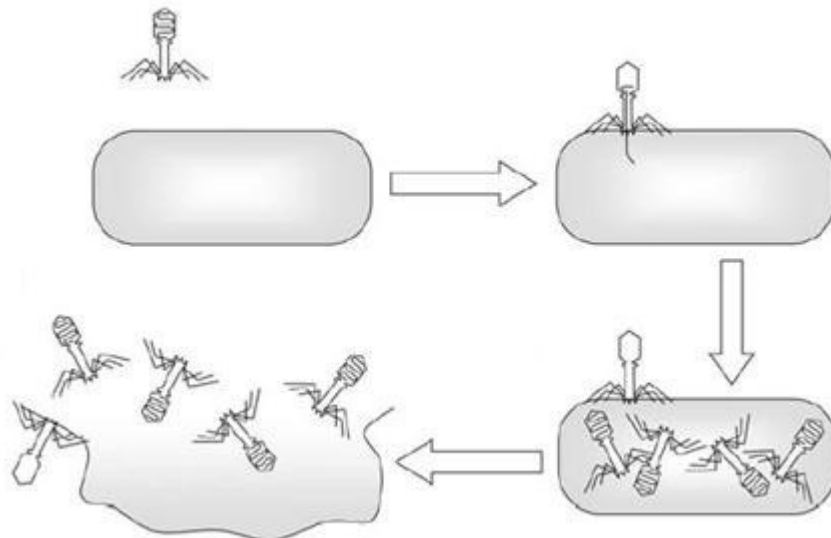
#### **2.2.3.1.4.3 Morfogénesis de la cola:**

Las colas de los fagos de la familia *Siphoviridae*, son tubos largos y flexibles hechos de muchas copias de una proteína iniciadora importante, a las cuales se les une una o más fibras. La cola es estabilizada por una proteína terminadora que luego se une a la cabeza completa.

En la familia *Myoviridae*, los componentes de la cola contráctil se unen de forma ordenada. Su placa base se forma por la unión de 6 espigas, cada una tiene 7 tipos de proteínas que se ensamblan ordenadamente, obteniendo la forma de una cúpula (Kutter *et al.*, 2005).

#### 2.2.3.1.4.4 Lisis y liberación

La liberación de la progenie viral mediante la lisis es la última etapa del ciclo lítico, donde en la mayoría de fagos emplean dos proteínas para la lisis: holina y endolisina, la primera forma poros en la membrana interna, permitiendo así que la endolisina alcance la capa de peptidoglucano, cortando sus enlaces, produciéndose la lisis bacteriana. Los fagos liberados reinfectan nuevas células bacterianas (Guttman *et al.*, 2005). (Ver Fig. 4)

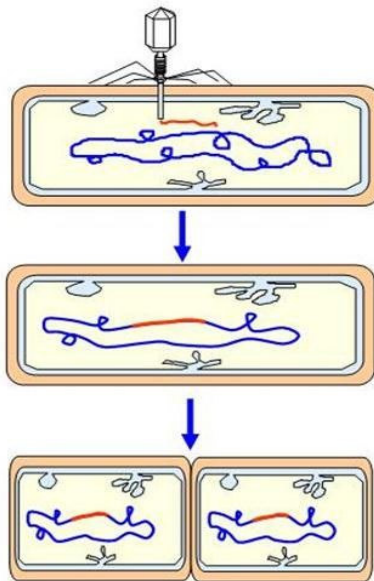


**Fig. 4 Ciclo lítico del bacteriófago. Se observa la adhesión a la superficie del huésped, la penetración del material genético, la replicación y la liberación de la progenie viral.**

Fuente: Keer Benjamin, 2008

### 2.2.3.2 Ciclo lisogénico

El ciclo lisogénico a diferencia del ciclo lítico, no destruye a la célula hospedera, después de la adsorción del bacteriófago y penetración del material genético, este es integrado al cromosoma del huésped, replicándose como parte del genoma bacteriano pudiendo permanecer en estado de latencia o estado de profago, por periodos indeterminados pudiendo inducirse el ciclo lítico debido a factores ambientales (Jorquera *et al.*, 2015). Los fagos que son capaces de realizar este ciclo son llamados temperados y las bacterias infectadas por estos fagos continúan reproduciéndose por varias generaciones, llevando consigo la información genética del fago, creando resistencia a ser re infectada por el mismo fago e inclusive a otros fagos similares al original. (Meza, 2016).



**Fig. 5 Ciclo Lisogénico del bacteriófago**

Fuente: [http://images.slideplayer.es/6/1633857/slides/slide\\_42.jpg](http://images.slideplayer.es/6/1633857/slides/slide_42.jpg)

#### **2.2.4 Rango de hospederos**

El ciclo de vida de los fagos, implica la cooperación del metabolismo celular hacia la producción de nuevas partículas víricas, además de la liberación de la progenie viral y la adquisición a nuevas células. Por lo tanto, el ciclo de vida de un virus solo tiene éxito en la medida en que esos tres pasos se completen productivamente. Muchos factores pueden afectar en el curso del ciclo de vida viral de tal manera que nunca se logra la infección productiva, por lo tanto, el concepto de rango de hospederos consiste únicamente en aquellas bacterias que un fago puede infectar productivamente (Hyman y Abedon 2010).

Los géneros, especies y cepas que un fago puede lisar, es una de las características de un virus bacteriano particular (Kutter, 2009). Sin embargo, esta no es una característica invariante de un fago, ya que el rango de hospederos puede alterarse como resultado de la mutación del bacteriófago o por algún cambio en la superficie bacteriana que puede bloquear la adsorción de un fago capaz de multiplicarse en dicho huésped. Estos cambios a menudo se asocian con cambios antigénicos (Adams, 1959).

##### **2.2.4.1 Especificidad en la adsorción:**

Un bacteriófago específico es capaz de infectar un rango de huéspedes estrechos de una especie o cepa microbiana concreta. Tal especificidad en la interacción del fago con la célula bacteriana está determinada por la especificidad de la adsorción, que a su vez depende de la naturaleza y las peculiaridades estructurales de los receptores en la superficie bacteriana. Además, se atribuye un papel vital a la localización del receptor en la superficie celular, su cantidad y densidad en la pared celular.

La naturaleza de los receptores en contacto con los bacteriófagos, es diferente en los diversos grupos taxonómicos y se definen en gran medida por la composición de la pared celular del huésped y las estructuras superficiales (Rakhuba *et al.*, 2010).

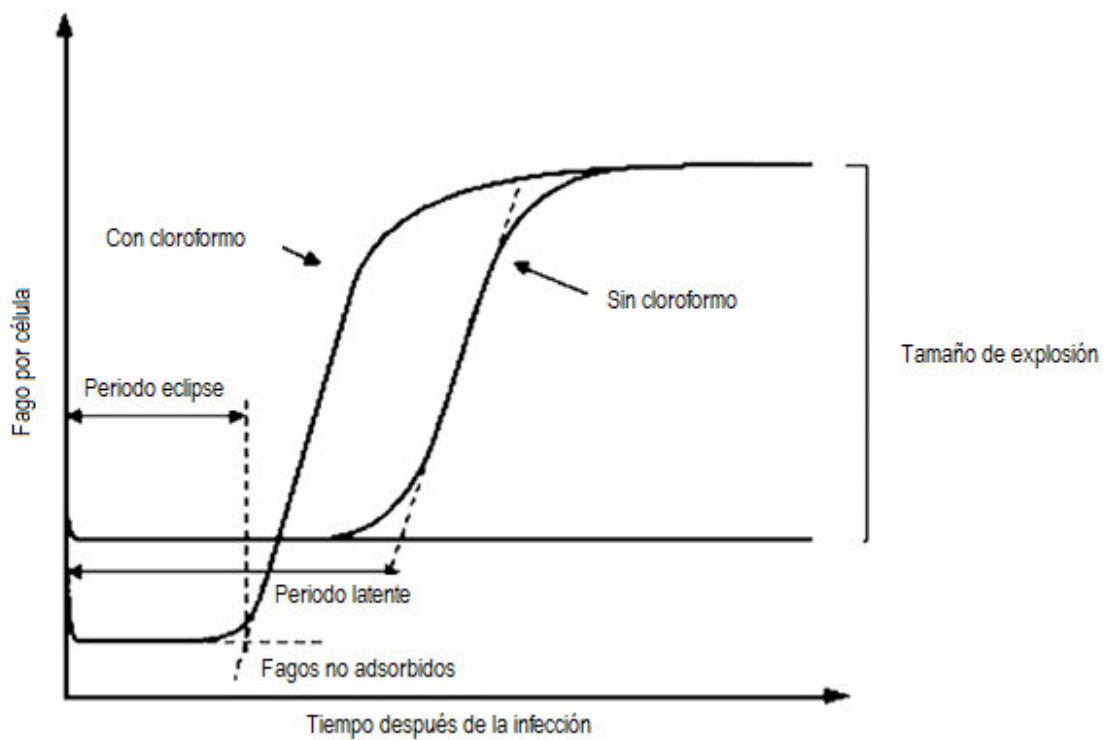
### **2.2.5 Curva de crecimiento de bacteriófagos líticos**

El experimento de la curva de un paso fue originalmente desarrollado por Ellis y Delbrück (1939), el cual permite conocer la interacción fago - bacteria, ya que a través de ella se determina el número de viriones liberados por la bacteria infectada llamado *burst size*, la duración del tiempo de eclipse y del periodo de latencia (Prada *et al.*, 2015). Este experimento está diseñado de tal manera que se permita dar un solo ciclo de infección, y que además debe conocerse la proporción entre fago y bacteria, ya que la infección entre ambos debe hacerse a una multiplicidad de infección (MOI) baja por ejemplo 0.1 y 0.01, ya que a mayor MOI la probabilidad de que las células infectadas por más de un fago se incrementan (Middelboe *et al.*, 2010).

El periodo eclipse, el periodo latente y el número de viriones liberados son parámetros esenciales en la caracterización de los bacteriófagos, y estos varían de acuerdo a las diferentes condiciones de crecimiento de la bacteria huésped, y entre los diferentes fagos (Middelboe *et al.*, 2010).

El periodo eclipse es el tiempo que dura desde la infección hasta la formación de las primeras partículas infecciosas dentro de las bacterias infectadas y para hallar este tiempo se utiliza cloroformo de tal forma que se induzca la lisis bacteriana y se libere los fagos que estén dentro de ella. Esta etapa se caracteriza por tener una activa síntesis de los ácidos nucleicos y las proteínas codificadas por genes tempranos del fago son imprescindibles (Hernández y Castellanos, 2014).

El periodo de latencia es el tiempo desde que ocurre la infección hasta la liberación de la progenie de la célula huésped. Ambos periodos deben ser analizados de forma separada, evitando la reinfección de la nueva progenie viral. El *burst size* se halla mediante la relación entre el número de placas de lisis obtenidas antes y después de la lisis (Meza, 2016).



**Fig. 6 Curva de un paso del bacteriófago**

(Fuente: Modificado de Kutter, 2005)

## 2.2.6 Uso de los bacteriófagos

Los bacteriófagos son entidades biológicas de amplia distribución en la naturaleza y por ser parásitos intracelulares se encuentran en todos los ambientes donde las bacterias proliferan, ellos pueden ser de orígenes diversos como por ejemplo en suelos y aguas de diferentes tipos. Alguna de las aplicaciones de los bacteriófagos es como herramienta para el tratamiento de infecciones bacterianas multirresistentes a los antibióticos (Hernández y Castellanos, 2014).

Estudios realizados detallan el uso de bacteriófagos en el tratamiento de infecciones provocados por distintas bacterias como: *Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus spp.* y *Streptococcus spp.*, en los cuales describen las vías de administración y farmacocinética de los fagos. Entre uno de los ejemplos más destacados de la fagoterapia es el uso de bacteriófagos específicos como control biológico de *E. coli* O157:H7 productora de colitis hemorrágica. También se ha empleado los fagos para erradicar *P. aeruginosa* en pacientes con fibrosis quística, así como también para tratar las infecciones por *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina (Lopardo, 2017).

La industria alimentaria en la necesidad de controlar y eliminar patógenos en la fabricación de alimentos, ha empleado bacteriófagos contra *Listeria monocytogenes*, el cual fue aprobado por la FDA (*Food and Drug Administration*) para ser utilizado como aditivo alimentario en productos cárnicos y aves de corral listos para consumo (Hagens *et al.*, 2010).



En el campo de la acuicultura también son empleados los bacteriófagos, ya que los peces y mariscos no solo sufren constantemente la amenaza de infecciones bacterianas, las cuales representan fuertes pérdidas económicas, sino también el frecuente uso de antimicrobianos como medida de prevención. Investigadores japoneses han propuesto métodos que permiten evaluar los bacteriófagos como agentes terapéuticos en la acuicultura (Ronda, 2003). Actualmente en nuestro país, Fernández *et al.*, (2017), aislaron el bacteriófago Va1, altamente lítico contra *Vibrio alginolyticus*, siendo este fago una alternativa para el tratamiento de enfermedades en este campo.

En la agricultura los bacteriófagos se emplean frente a la problemática de resistencia antimicrobiana, siendo el control de fitopatógenos, ya que los fagos se caracterizan por la alta especificidad a su huésped, presentando baja toxicidad tanto para los seres humanos como para el medio ambiente (Hernández, 2014).

### 3. HIPÓTESIS

En intestinos de pollo existen bacteriófagos de amplio espectro para los serovares Typhimurium, Enteritidis, Bispebjerg pertenecientes a *Salmonella enterica* con potencial lítico y estable a diferentes condiciones químicas.

### 4. OBJETIVOS

#### - **Objetivo General**

- Caracterizar las propiedades biológicas y químicas de un bacteriófago específico de *Salmonella enterica* aislados de muestras de pollos.

#### - **Objetivos Específicos**

- Aislar *Salmonella enterica* a partir de muestras de intestinos de pollos.
- Aislar bacteriófagos líticos de *Salmonella enterica* a partir de muestras de intestinos de pollos.
- Determinar la especificidad del bacteriófago mediante la evaluación del rango de hospederos.
- Establecer los parámetros biológicos del bacteriófago, como tiempo de adhesión, multiplicidad de infección, ciclo de infección.
- Establecer la sensibilidad del bacteriófago ante amplios rangos de temperatura, pH y exposición al cloroformo.
- Clasificar taxonómicamente el bacteriófago aislado, mediante la morfología obtenida con microscopía electrónica de transmisión.

## **5. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **5.1 Obtención de muestras**

#### **5.1.1 Colección de la muestra**

Las muestras se obtuvieron a partir de intestino grueso de pollos de engorde recién sacrificados del mercado de Caquetá – Rímac. Estas fueron guardadas en bolsas herméticas de primer uso y transportadas en recipientes con bolsas de hielo para una mejor conservación y fueron procesadas 3 horas después.

#### **5.1.2 Procesamiento de la muestra**

Antes de procesar la muestra, los intestinos se abrieron con la ayuda de un bisturí para garantizar que el contenido se pueda homogenizar de manera correcta. Se adicionó solución salina estéril y se homogenizó con la ayuda de un *stomacher* durante 1 minuto. Luego esta fue filtrada con gasa y papel filtro para retener los restos sólidos. El líquido restante fue centrifugado a 14 000 rpm por 10 minutos y luego fue filtrado a través de membranas de nitrocelulosa con porosidad de 0.45 µm. Este filtrado fue guardado a 4°C.

#### **5.1.3 Cepas bacterianas, aislamiento y condiciones de cultivo**

##### **5.1.3.1 Reactivación de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028**

La cepa ATCC fue resuspendida en caldo tripticasa soya (TSB) e incubada a 37°C durante la noche.

### **5.1.3.2 Aislamiento de *Salmonella enterica***

La bacteria hospedera fue aislada a partir de las muestras obtenidas, mediante el método ICMSF 2000. Se tomó aproximadamente 25 gramos de la muestra y se mezcló con 225 mL de agua peptonada tamponada para un pre enriquecimiento, luego fue homogenizada e incubada a 35°C por 24 horas. Para el enriquecimiento selectivo, se tomaron 2 alícuotas de 1 mL y se transfirieron a tubos con 10 mL de caldo selenito y caldo tetrionato, luego se incubó a 43 °C por 24 horas. Después del tiempo transcurrido, cada tubo se sembró por la técnica de agotamiento en agar xilosa lisina desoxicolato (XLD).

Para la identificación bioquímica, las colonias sospechosas fueron sembradas por punción y estría en agar triple azúcar hierro (TSI), y en agar lisina hierro (LIA). Estas fueron incubadas a 37°C por 24 horas.

Para confirmar las cepas aisladas se utilizó el Sistema de Identificación API 20 E (*Biomériux* 2010), en el cual se suspendió la cepa presuntiva en fase logarítmica a un tubo con solución salina estéril hasta llegar a una escala de McFarland de 1, luego se procedió a inocular los 20 microtubos, se dejó incubar a 37°C por 24 horas.

### **5.1.3.3 Curva de crecimiento de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028**

Se realizó la curva de crecimiento bacteriano mediante el método de conteo en placa (UFC/mL). De un cultivo de *Salmonella* incubado toda la noche, se tomaron 10 µL para ser inoculado en un matraz que contenía 100 mL de TSB. Se consideró este momento como el tiempo cero ( $T_0$ ) y se tomó una muestra de 4 mL. Se emplearon diluciones seriadas y estas fueron sembradas por incorporación en agar tripticasa soya (TSA), luego se incubó a 37°C por 24 horas.

El matraz se incubó a 37°C en agitación por 9 horas y se tomaron muestras por cada hora repitiéndose el mismo procedimiento. El ensayo se realizó por triplicado.

Después del tiempo de incubación se efectuó el conteo en placa, tomándose las diluciones que estén dentro del rango de 30 a 300 colonias, determinándose así el número de unidades formadoras de placa por mililitro (UFC/mL) por cada tiempo. Asimismo, se graficó el log<sub>10</sub> UFC/mL, determinándose así la duración de cada fase de la curva de crecimiento.

#### **5.1.4 Aislamiento, purificación y amplificación de bacteriófagos**

##### **5.1.4.1 Técnica del goteo (Adams, 1959)**

Se sembró la cepa *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, con la ayuda de un hisopo estéril, el cual fue sumergido en un caldo tripticasa soya, con dicha bacteria en fase logarítmica. Luego se sembró por toda la superficie del agar, al centro de la placa se colocó una gota del filtrado obtenido. Se dejó secar por unos 15 minutos y se incubó a 37°C por 24 horas. A la vez se realizó un control negativo en otra placa a la cual únicamente se sembró la cepa.

La muestra fue positiva cuando se observó una zona de aclaramiento, lo cual indicó la presencia de bacteriófagos que han lisado la cepa huésped.

#### **5.1.4.2 Técnica de doble capa (Adams, 1959)**

Para esta técnica se realizaron diluciones seriadas 1:10 de la muestra filtrada, luego 1 mL de cada dilución fueron pasadas a tubos estériles, para luego ser mezcladas con *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, manteniendo la proporción de 1:1. Se dejó incubar a 37°C por 15 minutos. Luego del tiempo transcurrido, a estos tubos se le echo 5 mL aproximadamente de agar tripticasa soya al 70%, se homogenizó con la ayuda de un vórtex y se vertió una placa Petri la cual tenía previamente una capa delgada de TSA al 100%. Se dejó secar por unos 15 minutos y se incubó a 37°C por 24 horas.

#### **5.1.4.3 Purificación de bacteriófagos**

Después del realizar la técnica de doble capa descrita anteriormente, se examinaron las placas para observar la presencia de calvas de lisis aisladas. Siguiendo la metodología empleada por Akhtar *et al.*, (2014), se escogió una placa de lisis que sea única dentro de la placa Petri, se cortó con la ayuda de un asa de siembre estéril y se colocó en un tubo microcentrífuga que contenía solución salina estéril. Luego de ser homogenizado este tubo, se procedió a centrifugar y el sobrenadante se filtró utilizando filtros de jeringa de 0.22 µm de porosidad, y con este nuevo filtrado se volvió a repetir la técnica de la bicapa buscando obtener otra placa aislada y de esta forma se repitió este proceso 3 veces para asegurar así la purificación del bacteriófago. Conservar el filtrado a 4°C.

#### 5.1.4.4 Amplificación de bacteriófagos

Una vez obtenido el bacteriófago puro, se propagó siguiendo la metodología empleada por Fortier y Moineau (2009) con ciertas modificaciones. En 10 mL de TSB, se añadió 1 mL de la muestra filtrada y 1 mL de la cepa huésped en fase logarítmica, se dejó incubar a 37°C por 24 horas. Después de este tiempo se debe observar un aclaramiento en el caldo debido a la actividad lítica de los bacteriófagos, por ello se sembró 1 mL de cepa en 10 mL de TSB, siendo este un control de crecimiento bacteriano que servirá para establecer una comparación. Luego de hacer la lectura, se centrifugó a 5 000 rpm por 10 minutos a 4°C, se filtró y se almacenó a 4°C.

#### 5.1.4.5 Titulación de bacteriófagos

Después del tiempo de incubación de la técnica de doble capa, se cuentan las placas de lisis que se encuentren dentro de un rango de 30 – 300 placas de lisis, determinando el título mediante el siguiente cálculo:

$$\frac{\text{UFP}}{\text{mL}} = \text{n}^{\circ} \text{ de placas de lisis} \times \frac{1}{\text{dilución}} \times \frac{1}{\text{inóculo}}$$

UFP: Unidades formadoras de placas

#### **5.1.4.6 Caracterización de bacteriófagos**

##### **5.1.4.6.1 Rango de hospederos**

Se determinó la gama de bacterias susceptibles al bacteriófago, utilizando la técnica del goteo descrita anteriormente (Sección 5.1.4.1). Se emplearon 25 cepas diferentes entre ATCC (American Type Culture Collection) y cepas de *Salmonella* aisladas de diferentes orígenes. Una vez sembrada cada bacteria por la técnica de diseminación, se agregó 10 µL del *stock* de fagos, con un título de  $10^{10}$  UFP/mL.

La lectura después del tiempo de incubación se analizó mediante la presencia de zonas de aclaramiento en la superficie del agar donde se colocaron las gotas del filtrado, indicando una lisis positiva, y una “lisis negativa” donde el césped bacteriano mantiene su concentración. El ensayo se realizó por duplicado y también se estableció comparación con un control negativo para esta prueba.

##### **5.1.4.6.2 Estabilidad a diferentes temperaturas**

El ensayo se realizó según el método empleado por Haq *et al.*, (2011). Se depositó 1 000 µL del bacteriófago en tubos de microcentrífuga por triplicado y se incubó en baño maría a la temperatura deseada (40°C, 50°C, 60°C, 70°C y 80°C) y se refrigeró para someterlos a las temperaturas de -80°C y -20°C. El experimento se realizó por triplicado. El título de fago se determinó mediante la técnica de doble capa.



#### **5.1.4.6.3 Estabilidad a diferentes pH**

Para determinar la estabilidad a diferentes pH se siguió el método empleado por Dini modificado (2011). Se adicionó 100  $\mu\text{L}$  del bacteriófago en 900  $\mu\text{L}$  de solución salina (0.85% p/v) ajustada al pH deseado (pH 3, 4, 5, 6, 7,8, 9, 10,11 y 12) con HCL 1.5M y NaOH 1M. Se utilizó como control 100  $\mu\text{L}$  del bacteriófago en 900  $\mu\text{L}$  de solución salina a pH 7. Estas mezclas se incubaron a 37°C durante 24 horas. Después del tiempo de incubación, se reajustó a pH 7. El título de fago fue determinado mediante la técnica de doble capa en agar tripticasa soya. La prueba se realizó por triplicado.

#### **5.1.4.6.4 Sensibilidad al cloroformo**

Se mezcló 500  $\mu\text{L}$  del bacteriófago ( $10^8$  UPF/mL) con 500  $\mu\text{L}$  de cloroformo puro, se incubó a temperatura ambiente en constante agitación por 1 hora. Luego se centrifugó esta mezcla para separar el cloroformo de la solución salina, extrayendo esta última y colocándola en otro tubo estéril. A partir de este tubo se halló el título viral, mediante la técnica de bicapa. Para la muestra control se mezcló 500  $\mu\text{L}$  del bacteriófago en 500  $\mu\text{L}$  de solución salina estéril (0.85% p/v). Este ensayo se realizó por triplicado, según la metodología empleada por KESIK (2013).

#### **5.1.4.6.5 Multiplicidad de infección**

Para hallar la multiplicidad de infección óptima (MOI) se siguió la metodología empleada por Li y ZHANG (2014), entendiéndose por MOI al número de fagos (UFP/mL) dividido entre el número de bacterias huéspedes (UFC/mL). Se evaluó tres proporciones diferentes: 1, 0.1 y 0.01. Se incubó a 37°C por 3.5 horas. Después del tiempo de incubación se centrifugó a 8000 rpm por 10 minutos, el sobrenadante fue filtrado y se determinó el título de cada uno, mediante la técnica de doble capa. El ensayo se realizó por triplicado.

#### 5.1.4.6.6 Determinación de la tasa de adsorción

Para el estudio del tiempo de adsorción del fago, se empleó el método seguido por Rahaman *et al.*, (2014), modificado como se describe: en un matraz de 50 mL de cultivo se le adicionó 500  $\mu$ L del bacteriófago, de modo tal que la proporción entre ellos tenga una multiplicidad de infección (MOI) de 0.01. Se incubó a 37°C en agitación y se tomaron muestras a diferentes intervalos de tiempo (0, 10, 20 30, 40, 50 y 60 minutos).

El estudio de la adsorción del bacteriófago se realizó por triplicado, mediante la medida de los fagos libres, el cual fue determinado mediante la técnica de doble capa. La evaluación de la adsorción será mediante el porcentaje de fagos libres utilizando la siguiente formula:

$$\text{Porcentaje de bacteriófagos libres} = (N/N_0) \times 100$$

Dónde:  $N_0$  es las UFP por mililitro de fagos en el  $T= 0$  min

$N$  es UFP por mililitro en el  $T= 10, 20, 30, 40, 50$  y  $60$  min

La tasa de adsorción se halló mediante la fórmula empleada por Kropinski (2009):

$$K = \frac{2.3}{Bt} \log \frac{P_0}{P}$$

Donde  $K$ : es la constante de adsorción (ml/min)

$B$ : es la concentración de bacterias

$P_0$ : Título inicial de bacteriófagos no adsorbidos

$P$ : Título final de bacteriófagos no adsorbidos

$t$ : es el intervalo de tiempo entre  $P_0$  y  $P$

#### 5.1.4.6.7 Curva de un paso del bacteriófago

Este experimento se realizó siguiendo las estrategias sugeridas por Middelboe *et al.* (2010), con algunas modificaciones. De un cultivo incubado toda la noche, se tomaron 100  $\mu\text{L}$  a un tubo con caldo TSB incubándose a 37 ° C hasta llegar a escala de McFarland de 0.5. Una vez que se obtuvo esta densidad, alícuotas de 1 mL de bacteria y fago se mezclaron en un tubo microcentrifuga, tal que la multiplicidad de infección sea de 0.01. Se dejó incubar a 37 °C por 20 minutos para que los fagos sean adsorbidos. Luego del tiempo de incubación, se procedió a descartar los fagos no adsorbidos (fagos libres), para esto se centrifugó a 8000 rpm por 5 minutos y el sobrenadante se descartó con la ayuda de una micropipeta, el *pellet* fue resuspendido con 1 mL de TSB. Este procedimiento se repitió 3 veces. Después del lavado el *pellet*, nuevamente fue resuspendido con 1 mL de TSB y homogenizado con la ayuda de un vórtex. De este cultivo resuspendido, rotulado como tubo A, se transfirió 100  $\mu\text{L}$  a un matraz que contenía 100 mL de caldo TSB estéril, este se homogenizó y se tomaron 2 muestras de 1 mL cada uno, en tubos microcentrifugas estériles, siendo estos el tiempo cero (T=0) del experimento. Al primer tubo se le agregó 200  $\mu\text{L}$  de cloroformo, se agitó y homogenizó en vórtex por 1 minuto, luego se centrifugó a 8 000 rpm por 5 minutos para separar la fase acuosa del cloroformo, esta se tomó con una micropipeta y se trasladó a otro tubo microcentrifuga estéril. A partir de aquí se realizaron diluciones seriadas en 900  $\mu\text{L}$  de solución salina estéril para luego hallar el título mediante la técnica de bicapa. Este procedimiento se elaboró para determinar el tiempo del periodo eclipse del virus. El segundo tubo a diferencia del primero, después de ser homogenizado, se procedió a diluir de la misma forma, luego se hizo la doble capa de agar, esto fue para determinar el tiempo del periodo latente.

Las muestras fueron tomadas al principio cada 5 minutos hasta el minuto 10, después de este tiempo las muestras se tomaron cada 10 minutos por 50 minutos, repitiéndose el mismo procedimiento para cada tubo.

El cultivo sobrante del tubo A, se centrifugó, filtró, se diluyó y se halló el título de la misma forma. Este procedimiento se realizó para determinar la cantidad de fagos libres que puedan quedar después del lavado, siendo posteriormente restados al tiempo cero (T=0).

Además, esta prueba nos permitió hallar el tamaño de explosión o *burst size*, que es el número de partículas de fago liberadas por la bacteria infectada (Adams, 1959).

El *burst size* se halló mediante la división del título fágico final entre el título inicial (T=0).

#### **5.1.4.6.8 Microscopía Electrónica de Transmisión**

Para la microscopía electrónica de transmisión (MET), del bacteriófago se empleó la tinción negativa propuesta por Ackermann (2008). En una rejilla de cobre revestida por Formvar, se colocó una alícuota de 10  $\mu$ L y se dejó fijar. Luego la muestra fue teñida con acetato de uranilo al 2% por 15 minutos. Se observó en microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM-1400 Plus, a un voltaje de aceleración de 100 kv y la magnitud del aumento es de 80 000 X, empleando una escala de 100 nm.

Mediante la morfología del bacteriófago se logró clasificar taxonómicamente, teniendo como guía los reportes del Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV).

Para una mejor exactitud de las medidas de la foto captada por el MET, se utilizó el programa Image J.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Aislamiento de *Salmonella enterica*

Se aislaron 2 cepas de *Salmonella* de las muestras de intestinos de pollos. En la tabla N°1 se muestra los resultados obtenidos los cuales corresponden a microorganismos del género *Salmonella*.

**Tabla 2. Resultados de la identificación bioquímicas de las cepas aisladas (SS1 y SS2).**

<b>Medio</b>	<b>Resultado</b>
<b>XLD</b>	Colonias transparentes con centros negros
<b>TSI</b>	K/A + H <sub>2</sub> S
<b>LIA</b>	K/K

K: alcalinidad; A: acidez

Cepa SS1 y SS2: Aislada de muestras de intestinos de pollos.

**Tabla 3. Cuadro de identificación de la cepa SS1. Sistema de identificación API 20E**

MUY BUENA IDENTIFICACION						
Galería	API 20 E V4.1					
Perfil	2704712					
Nota	CONFIRMAR POR PRUEBAS SEROLOGICAS					
Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra			
Salmonella spp	99.8	0.71	LDC 82%	MEL 90%		

**Tabla 4. Cuadro de identificación de la cepa SS2. Sistema de identificación API 20E**

EXCELENTE IDENTIFICACION EN EL GENERO						
Galería	API 20 E V4.1					
Perfil	6704552					
Nota	CONFIRMAR POR PRUEBAS SEROLOGICAS					
Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra			
Salmonella spp	89.4	1.0				
Salmonella choleraesuis ssp arizonae	10.5	0.75	ONPG 98%			

## 6.2 Curva de crecimiento de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028

En la figura 7 se muestra los resultados de la curva de crecimiento, relacionando los recuentos por conteo en placa (UFC/ml) y el tiempo, donde se puede observar que entre las 2 y 4 horas se encuentra fase logarítmica y a partir de las 5 horas empieza la fase estacionaria.

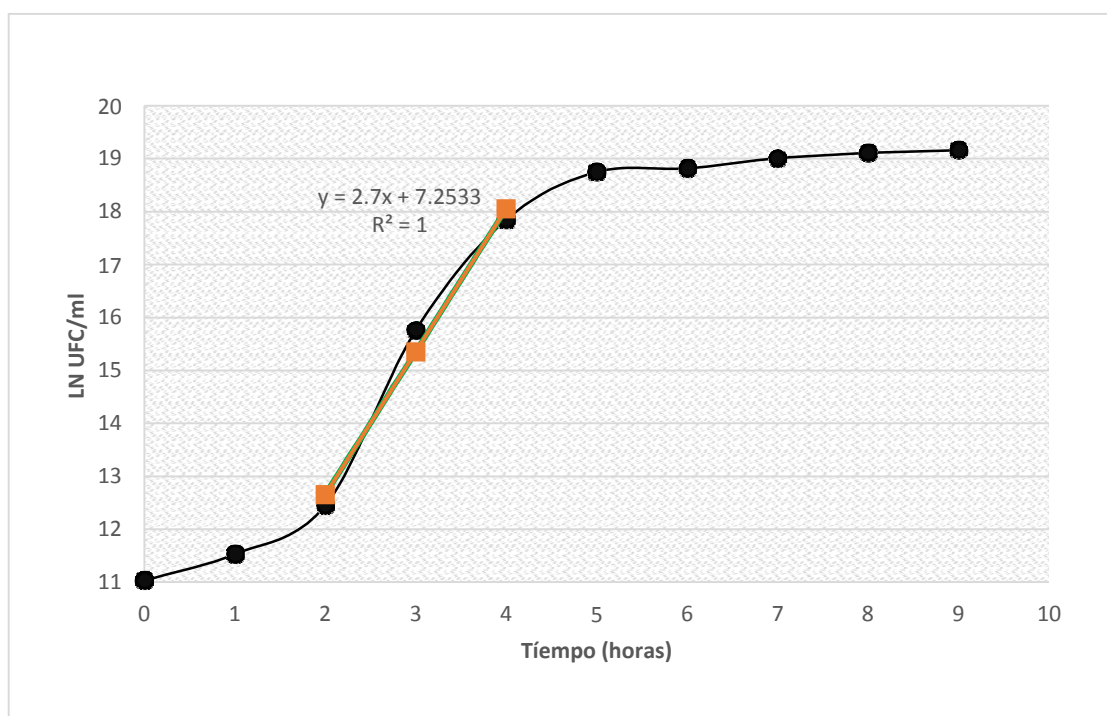
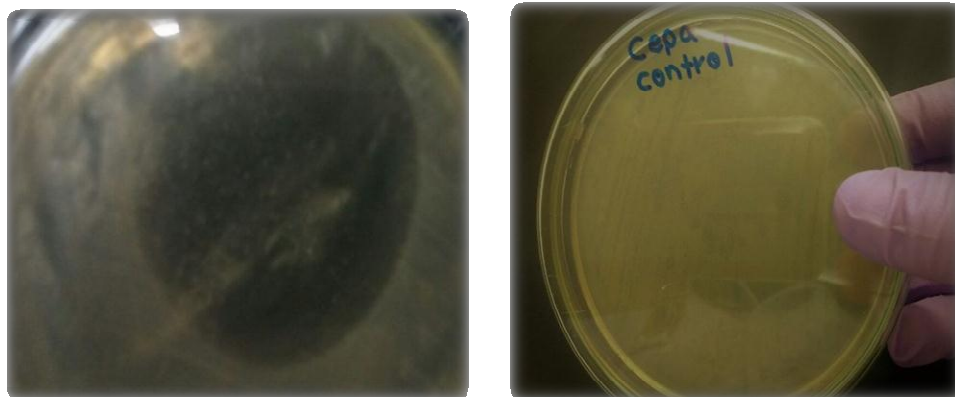


Fig. 7 Curva de crecimiento bacteriano Ln UFC/mL vs tiempo.

### 6.3 Aislamiento, purificación y amplificación de bacteriófagos

El resultado de la técnica del goteo salió positivo, en la placa se observa una zona de lisis completa en el césped bacteriano, a diferencia de la placa control en el que no se inoculó el bacteriófago (Fig.8b). Esta placa positiva fue lavada y filtrada, y posteriormente se procedió hacer la doble capa de agar, en la que podemos observar placas de lisis (Fig. 9) y se diluyó hasta obtener 1 sola placa de lisis en la placa Petri. Después de repetir 3 veces el ensayo se replicó en caldo para obtener un mayor título viral y así poder efectuar la caracterización del bacteriófago. El resultado luego del tiempo de incubación fue un aclaramiento en el caldo (Fig. 10) Luego de centrifugar y filtrar este *stock* de fagos se guardó a 4°C. El fago aislado y purificado se codificó como Fago S6.

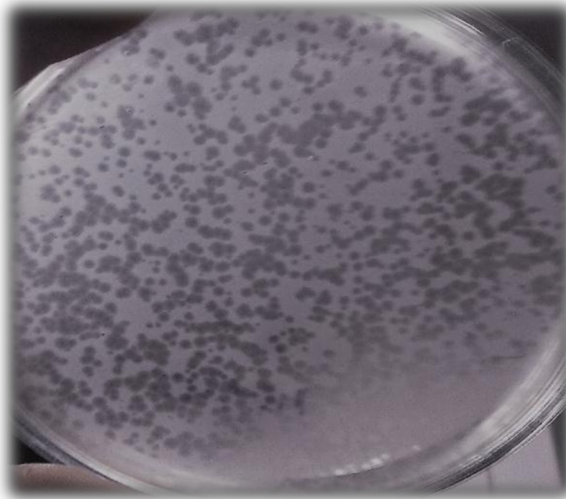


a) Lisis completa

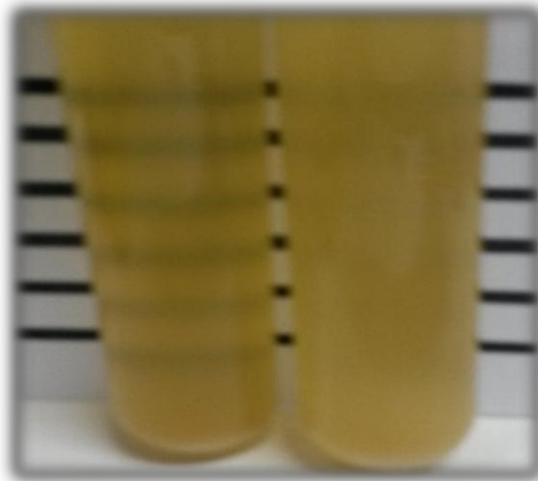
b) Control

**Fig. 8 Técnica del goteo.** En la figura izquierda se observa un goteo positivo (a) y a la derecha se observa con control de cepa sin colocar el filtrado (b).





**Fig. 9** Placas de lisis obtenidas mediante la técnica de doble capa.



**Fig. 10** Amplificación de bacteriófagos en caldo TSB. En el tubo izquierdo (TSB + fago) se aprecia el aclaramiento del caldo debido a la presencia de fagos. A la derecha es el tubo control (TSB sin fago), donde se observa el crecimiento de la cepa sola.

## 6.4 Caracterización de bacteriófagos

### 6.4.1 Rango de hospederos

Uno de los ensayos más importantes para la caracterización de bacteriófagos es precisar la especificidad de bacterias huéspedes para el bacteriófago S6.

Se evaluaron 25 cepas ATCC, entre bacterias Gram negativas y Gram positivas, observándose en 5 de ellas zonas de aclaramiento o zonas de lisis y las otras 20 fueron negativas (Tabla 2).

**Tabla 5. Rango de hospederos del fago S6 por método del goteo**

Cepas Bacterianas	Lisis
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium ATCC 14028	+
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Bispebjerg ATCC 9842	+
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Enteritidis ATCC 13076	+
<i>Salmonella</i> spp. SS1	+
<i>Salmonella</i> spp. SS2	+
<i>Alcaligenes faecalis</i> subsp <i>faecalis</i> ATCC 35655	-
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	-
<i>Citrobacter braakii</i> ATCC 10625	-
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19114	-
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19115	-
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 12453	-
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 6380	-

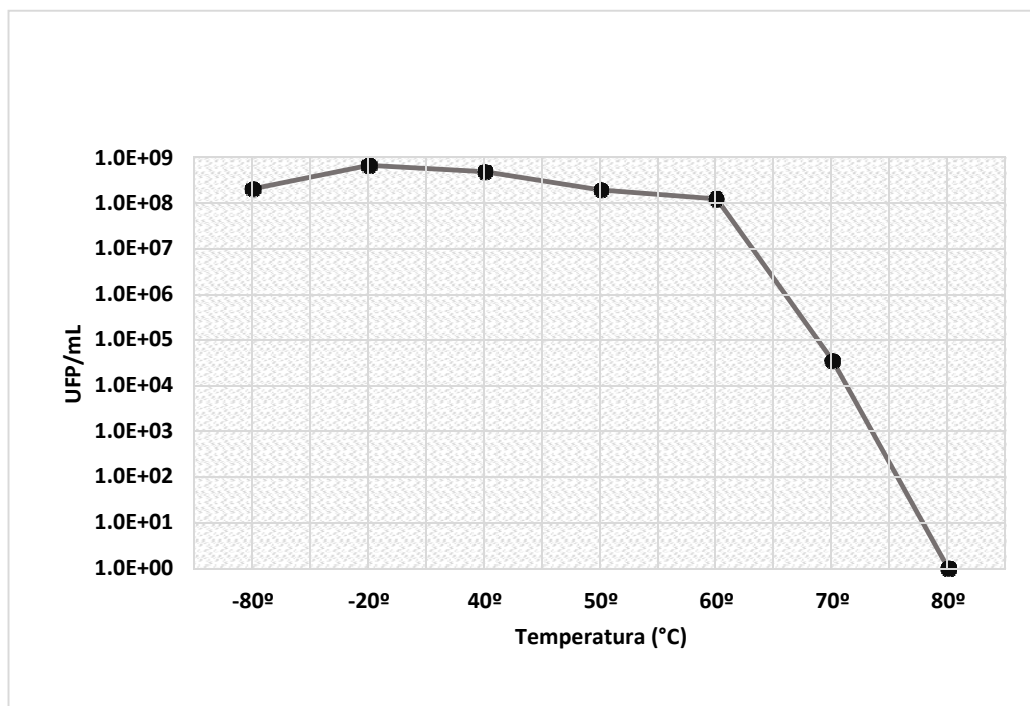
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	-
<i>Pseudomonas putida</i> ATCC 31483	-
<i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	-
<i>Staphylococcus epidermis</i> ATCC 12228	-
<i>Streptococcus agalactiae</i> ATCC 27956	-
<i>Streptococcus iniae</i> ATCC 43397	-
<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 700610	-
<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	-
<i>Vibrio parahaemoliticus</i> ATCC 17802	-
<i>Yersinia ruckeri</i> ATCC 29473	-

Lisis: +

Lisis negativa: -

#### 6.4.2 Estabilidad a diferentes temperaturas

La estabilidad a diferentes temperaturas se puede observar en la figura 11, donde se observa que el fago S6 es estable ante las temperaturas de  $-80^{\circ}\text{C}$ ,  $-20^{\circ}\text{C}$ ,  $40^{\circ}\text{C}$ ,  $50^{\circ}\text{C}$  y  $60^{\circ}\text{C}$ . La incubación a  $70^{\circ}\text{C}$  redujo cuatro órdenes logarítmicos y a  $80^{\circ}\text{C}$  la población de fagos fue mínima.



**Fig. 11 Estabilidad del fago S6 a diferentes temperaturas.** En la gráfica se observa que el fago pierde estabilidad a temperaturas mayores a  $60^{\circ}\text{C}$ .

### 6.4.3 Estabilidad a diferentes pH

La incubación del bacteriófago a diferentes pH por 24 horas, nos muestra que el fago S6 es estable a pH 6, 7 y 8, disminuyendo un orden de magnitud a partir de pH 9 hasta pH 11, y disminuyendo 2 órdenes a pH 12.

A diferencia de los pH básicos, a pH 3, 4 y 5 reduce 7, 5, y 4 órdenes logarítmicos respectivamente, siendo el fago S-6 más estable a pH básicos que ácidos.

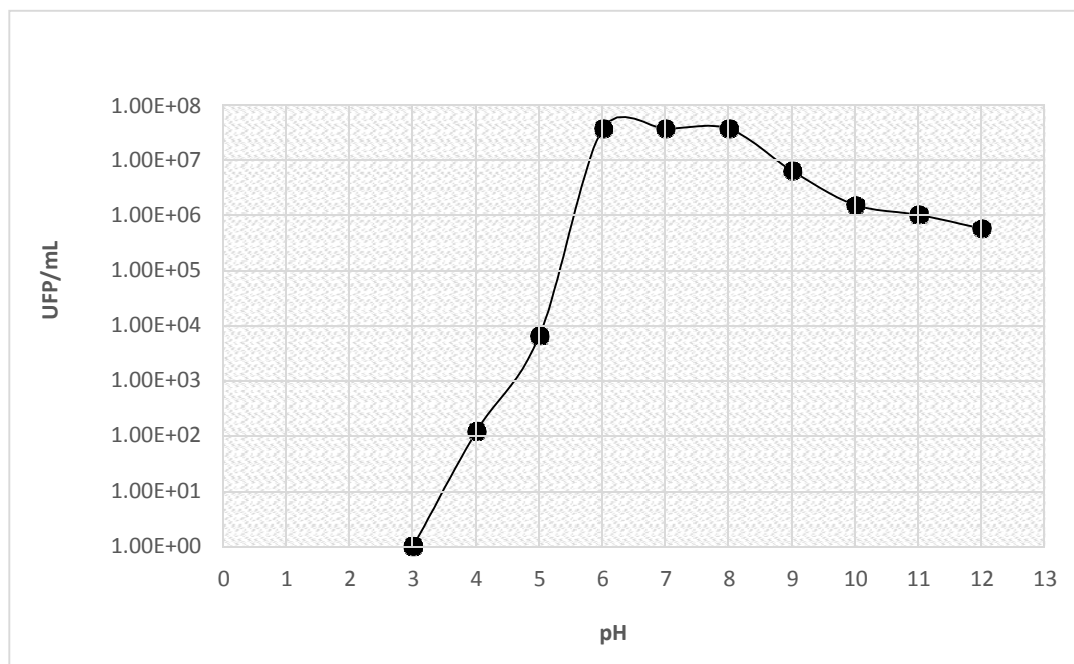
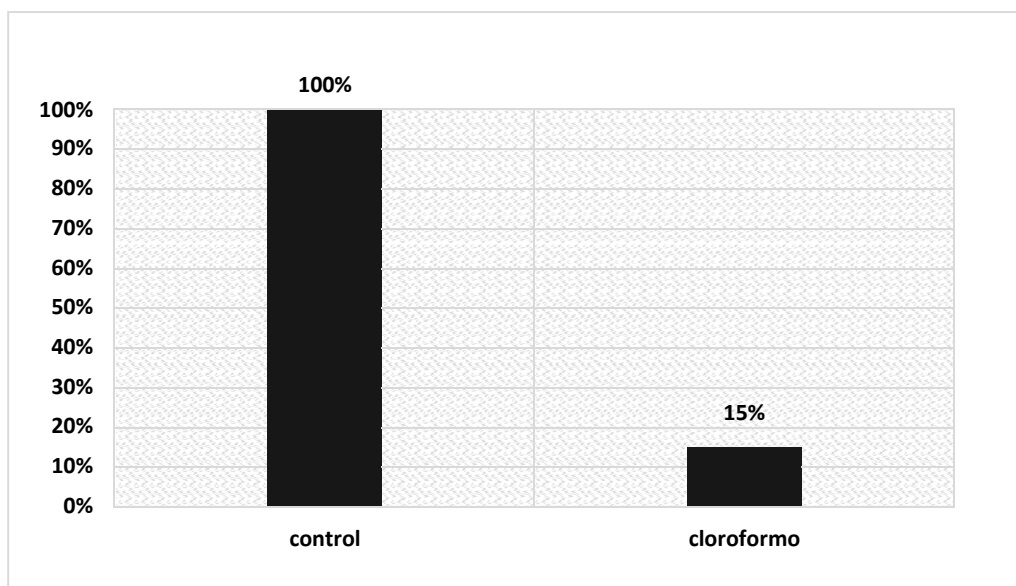


Fig. 12 Estabilidad del fago S-6 a diferentes pH.

#### 6.4.4 Sensibilidad al cloroformo

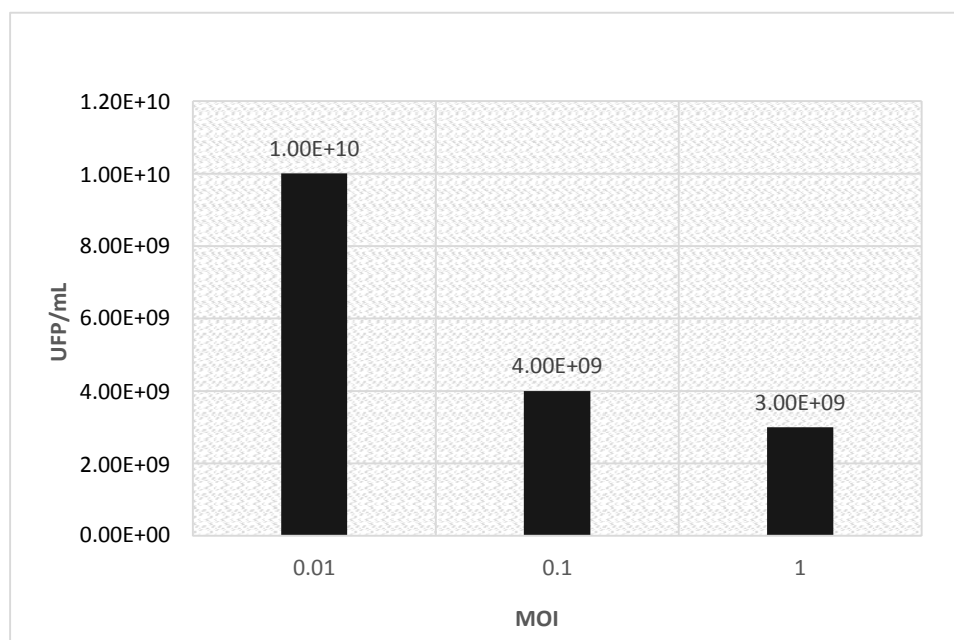
Después del tratamiento con cloroformo puro por el tiempo de una hora, el resultado del ensayo demuestra que el fago S6 es sensible al cloroformo, ya que se observa una reducción en el título fágico de 1 orden logarítmico con respecto a la muestra control, esto equivale a una reducción de un 85%, quedando el 15% de bacteriófagos viables (Fig. 13).



**Fig. 13 Sensibilidad al cloroformo del fago S-6.** En el gráfico se observa que la reducción del fago es al 15% después de la exposición al cloroformo.

#### 6.4.5 Determinación de la multiplicidad de infección óptima

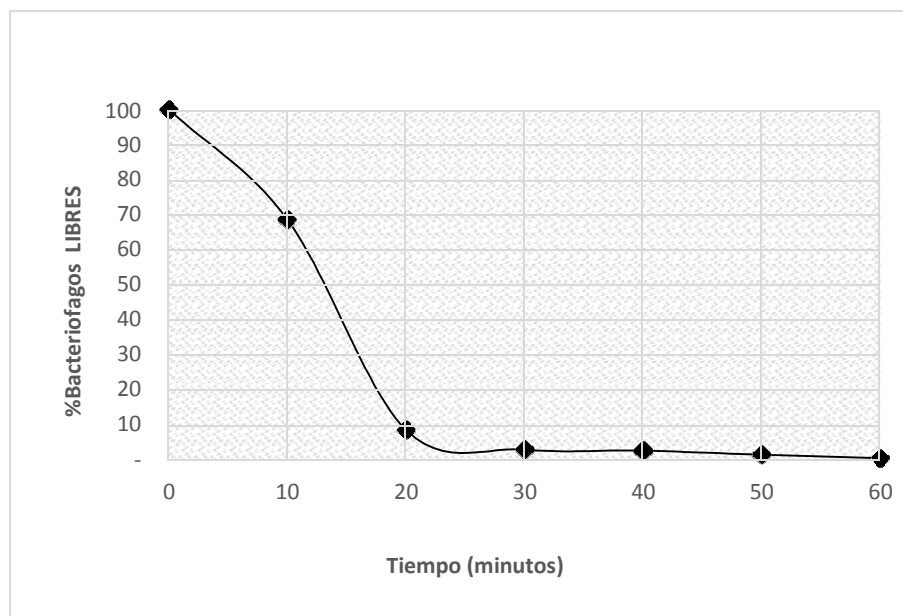
Los resultados de la multiplicidad de infección se pueden observar en la figura 14, donde se observa que, para una MOI de 1, 0.1 y 0.01 el título viral es  $3 \times 10^9$  UFP/ml,  $4 \times 10^9$  UFP/ml y  $10^{10}$  UFP/ml respectivamente. Se determinó 0.01 como MOI óptima.



**Fig.14 Multiplicidad de infección óptima del fago S-6**

#### 6.4.6 Determinación de la tasa de adsorción

La evaluación del ensayo de adsorción del bacteriófago, es un parámetro importante en la caracterización de bacteriófagos, ya que es el primer paso del proceso de infección a la bacteria huésped. Además, es fundamental para los estudios de ecología de los fagos para estimar el impacto del fago en las células hospedadoras (Kropinsky, 2009). La tasa de adsorción del bacteriófago fue de  $8.5 \times 10^{-8}$  ml/min. En la figura 15 se observa el porcentaje de fagos no adsorbidos o fagos libres a través del tiempo. Se observa que el fago S6 al minuto 10 se reduce al 69% y al minuto 20 se reduce al 9% y va descendiendo hasta llegar al 0,6% en el minuto 60.

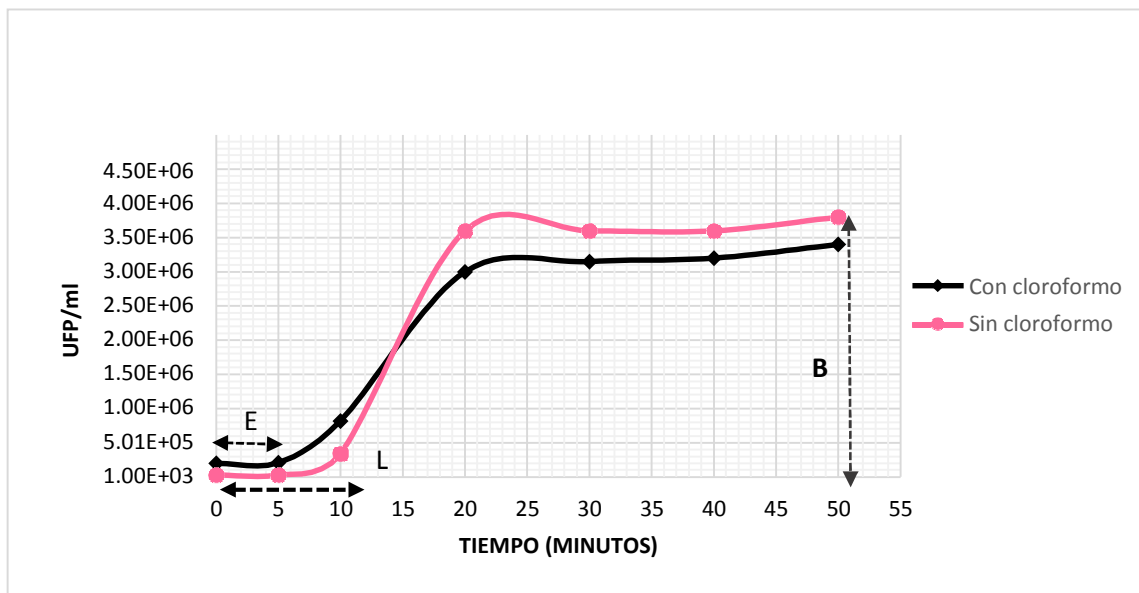


**Fig. 15 Adsorción del fago S6.** Se observa que los fagos libres disminuyen a un 90% al minuto 20 y van descendiendo al pasar los minutos.



### 6.4.7 Curva de un paso del bacteriófago

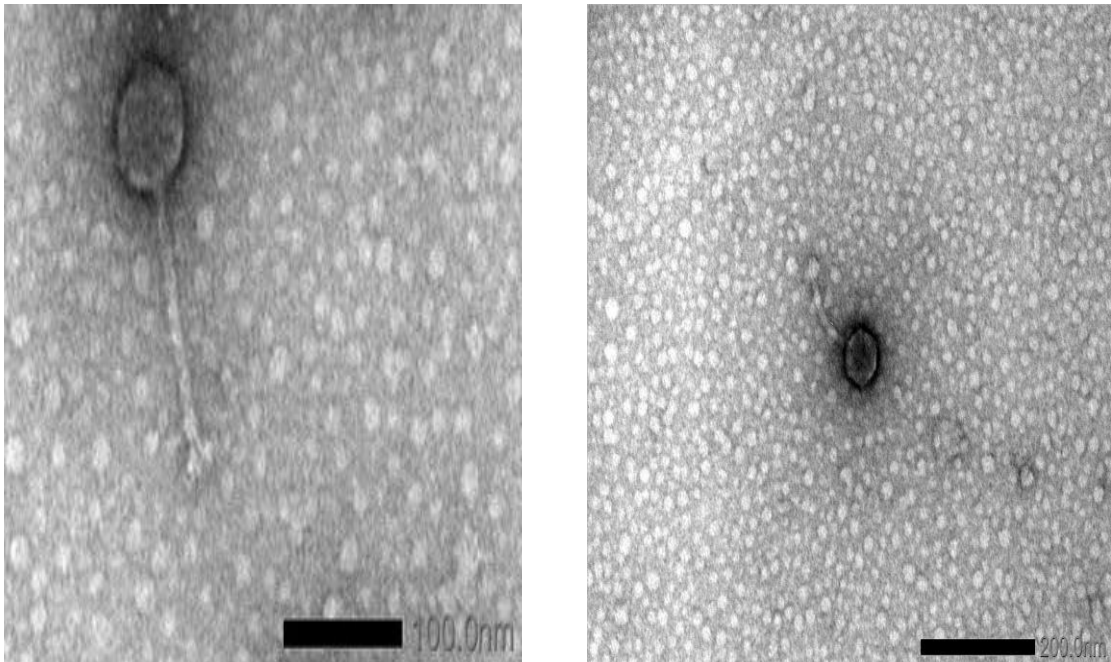
Se realizó la curva de un paso del bacteriófago S6, determinando el periodo de latencia, eclipse y el tamaño de explosión, ya que son características importantes en el proceso de infección. El período de eclipse duró 5 minutos, el de latencia 10 minutos y el tamaño de explosión fue de 131 partículas de fago por célula infectada (Fig. 16).



**Fig. 16 Curva de un paso del bacteriófago S6 en *Salmonella Typhimurium* a 37°C.** Los parámetros de crecimiento se indican en la figura que muestra el período latente (L) en 10 minutos, (E) el periodo eclipse (5 minutos) y el tamaño de explosión (B) de 131 UFP por célula infectada.

#### 6.4.8 Microscopía Electrónica de Transmisión

De acuerdo a la microscopía electrónica de transmisión podemos observar que la morfología del fago S6 pertenece a la familia *Siphoviridae*, fagos de dsDNA. La morfología de la cabeza es icosaédrica y cuyo diámetro mide 63.4 nm. Tiene una cola larga y flexible con un tamaño de 130.2 x 9 nm, en el extremo terminal de la misma se observan unas fibras. Las medidas fueron tomadas utilizando el programa *Image J*, utilizando la escala determinada para cada foto.



**Fig.17 Micrografía electrónica del fago S-6.** Tinción negativa, utilizando acetato de uranilo al 2%. La imagen izquierda tiene una escala de 100 nm con magnitud de aumento de 80 000X. En la derecha se observa a una escala de 200 nm con magnitud de aumento de 50 000X.

(Micrografía electrónica: Instituto Carlos Chagas – Fiocruz, Paraná, Brasil)

## 7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La proliferación de *Salmonella* en diferentes fuentes, la infección tanto en animales como en el hombre, la resistencia a los antibióticos y los efectos ecológicos y medioambientales que estos provocan, han motivado a la búsqueda de métodos eficaces que ayuden a reemplazar o complementar estos métodos profilácticos contra diferentes bacterias patógenas, empleando bacteriófagos como un método de biocontrol (Ahmadi *et al.*, 2016). Para ello se necesita conocer las características biológicas del bacteriófago que permitan demostrar su eficacia y estabilidad en diferentes condiciones. Por ello, en el presente trabajo se caracterizó el fago S6, bacteriófago lítico y específico para *Salmonella* aislado de intestinos de pollos con fines de ser usado posteriormente para el biocontrol de dicha bacteria.

Una característica bastante importante es determinar la capacidad de infección del fago ante diferentes géneros, así como diferentes serotipos dentro del género *Salmonella*. El rango de huéspedes reveló que el fago S6 es específico a nivel de especie, pero de amplio rango a nivel de serovar, ya que este infecta no solo el serovar Typhimurium, sino también Enteritidis, Bispebjerg, coincidiendo con Akhtar *et al.*, (2013), quien reportó que de 59 fagos aislados solo el 25% infectaban por lo menos dos serovares, y el resto infectaba únicamente 1 serovar. Shin *et al.*, (2012) evaluaron la gama de huéspedes de 25 fagos aislados, siendo algunos específicos del serovar Typhimurium, pero otros de amplio espectro no solo a nivel de serovar, sino también de especie, infectando *E. coli* y *Shigella flexneri*. Según lo reportado en este estudio se infiere que el fago S6 solo tiene proteínas relacionadas con la adhesión en común con dichos serovares y no con otras especies.

La evaluación de la estabilidad a diferentes temperaturas es otro parámetro importante, el fago S6 es estable a temperaturas bajas entre -80°C y -20°C y se mantiene viable a temperaturas hasta de 50° y 60°C, resultados que son semejantes a Ahmadi *et al.*, (2016) y Tuner (2013) quienes coinciden que entre estas temperaturas de incubación los bacteriófagos de *Salmonella* aislados, son estables a diferencia de otros reportes de bacteriófagos de otras especies como *Staphylococcus aureus* y *Edwardsiella ictaluri* reportados por Li *et al.*, (2014) y Walakira *et al.*, (2008) respectivamente, quienes reportan que dichos bacteriófagos pierden estabilidad ante temperaturas por encima de los 40°C.

Además, el fago S6 se mantiene viable a pH entre 6 a 8, siendo susceptible a pH ácidos, obteniendo títulos bajos a pH 4 y permaneciendo relativamente estables a pH alcalinos, resultados similares reportados por Rahaman *et al.*, (2014), quien aisló un bacteriófago de *Salmonella* cuya estabilidad se mantiene a pH alcalinos.

La exposición del fago al cloroformo por una hora redujo el título fágico hasta el 15%, resultados similares coinciden con Chénard *et al.* (2015) y con Fernández *et al.* (2017), donde el primero manifiesta que esto podría estar relacionado con la presencia de lípidos en la estructura del virus. Fortier y Moineau (2009), menciona que los fagos que contienen lípidos son inactivados por el cloroformo y que ciertos fagos que no poseen lípidos pueden ser también sensibles al cloroformo. De acuerdo a la microscopía electrónica se pudo observar que el fago aislado pertenece al orden *Caudovirales*, quienes no presentan lípidos en su estructura (ICTV, 2011). Ackermann (2006), menciona que los fagos que tienen cola no presentan envoltura, y consisten típicamente en proteínas y ADN y que, a pesar de la ausencia de lípidos, aproximadamente un tercio de estos fagos, son sensibles al cloroformo.

La multiplicidad de infección y el ensayo de adsorción son parámetros importantes a tomar en cuenta para realizar la curva de un paso. La MOI óptima fue de 0.01 y la constante de adsorción fue de  $8.5 \times 10^{-8}$  ml/min, siendo esta una velocidad de adsorción mayor comparada con las reportadas por Turner (2013) y Bardina (2011) quienes hallaron constantes de adsorción menores en distintos fagos de *Salmonella* Typhimurium y *Salmonella* Enteritidis. Esta característica varía entre los distintos fagos, debido a diferentes causas. Kropinsky (2011), menciona que factores como la presencia de sales, compuestos orgánicos, número de receptores en la superficie celular, agitación, temperatura, entre otros influyen en “k”. Kasma *et al.*, (2002), mencionan como ejemplo a los fagos T – *even*, quienes pueden utilizar hasta 300 sitios de unión por célula huésped, cuya tasa de adsorción es de  $2.4 \times 10^{-9}$  cm<sup>3</sup>/min, mientras que el fago filamentoso M13, que tiene solo 2 o 3 sitios de unión por célula, su tasa de adsorción es de  $3 \times 10^{-11}$  cm<sup>3</sup>/min siendo este último menor.

La adsorción del 90% de los fagos ocurrió a los 20 minutos, resultados similares reporta Rahaman *et al.*, (2014) y diferentes por Wong en el que al minuto 10 el 95% de los fagos son adsorbidos. En este ensayo se observó que al minuto 60, quedó un pequeño porcentaje de fagos libres, esto se debe a que siempre queda una fracción que se adsorbe lentamente o una fracción no adsorbente, ya que las preparaciones de los fagos no son homogéneas con respecto a sus propiedades de adsorción (Schlesinger, 1965). Además, mencionar que, en el proceso de todos los ensayos realizados en el presente trabajo, no se emplearon iones divalentes. Si bien es cierto que la adsorción del fago depende de la presencia de receptores específicos en la superficie celular, en ciertos fagos también puede depender de la presencia de ciertos cationes en el medio, tales como magnesio y calcio (Lu *et al.*, 2003), este no fue el caso en este trabajo, ya que el fago S6 no es estrictamente dependiente de estos iones, coincidiendo con Watanabe y

Takesue (1972), quienes demostraron que el bacteriófago PL-I contra *Lactobacillus casei*, no requería calcio para adsorción del fago. Además, demostraron que el cloruro de calcio no solo está relacionado con el proceso de adhesión, sino que ciertos fagos dependen de esta sal para poder penetrar su material genético. Sin embargo, aunque no se ha comprobado, la adición del cloruro de calcio en el fago S6, podría acelerar el proceso de adsorción, variando por lo tanto su constante “K”, la cinética del fago, además de promover una propagación más rápida de estos virus (Lu *et al.*, 2003).

En la curva de un paso se obtuvo que el tiempo de latencia fue de 10 minutos, el de eclipse 5 minutos y el tamaño de explosión de 131 viriones por célula infectada. Estudios anteriores reportan tiempos diferentes de latencia para *Salmonella* Typhimurim de 46 y 58 minutos, tiempos de eclipse de 38 y 46 minutos, y tamaño de explosión de 95 y 55 respectivamente; similares reportes son para *Salmonella* Enteritidis a diferencia del tamaño de explosión que varía entre 3.5 y 5 ufp/ufc respectivamente (Bardina, 2011). McLaughlin y King (2008) aislaron bacteriófagos de *Salmonella* con periodos de latencia de 20 minutos, pero con tamaño de explosión de 100 ufp/célula infectada.

En este ensayo, el tamaño de explosión es mayor y los tiempos de latencia y de eclipse son menores que los mencionados. Estos parámetros son característicos de cada fago en condiciones particulares ya que son afectadas por el huésped utilizado, el medio de cultivo y temperatura (Kutter, 2005). Middelboe (2010), menciona que el tamaño de explosión puede variar debido a la velocidad de crecimiento del huésped, y que se espera tener un número de explosión más alto cuando las bacterias tienen los nutrientes suficientes, mientras que se podría observar un número de explosión más bajo, si los nutrientes del huésped son limitados.

Muchos bacteriófagos de *Salmonella* han sido reportados dentro del orden *Caudovirales*. Por las observaciones al microscopio electrónico de transmisión se pudo comprobar la pureza de bacteriófago, y por las características morfológicas se clasificó dentro de la familia *Siphoviridae*. Esta familia se caracteriza por tener cabeza icosaédrica y colas largas, no contráctiles y finas que a menudo son flexibles. Los tamaños de estas estructuras difieren entre los diferentes fagos de *Salmonella* reportados, encontrándose tamaños de cápside entre 50 nm y 100 nm de diámetro y colas entre 20 nm y 290 nm de largo (Ackermann, 2007). Las medidas del bacteriófago aislado, muestra cierta semejanza con los bacteriófagos aislados por De Lappe *et al.*, (2009) quien reportó fagos de la familia *Siphoviridae*, especies Jersey, con cápside de 62.5 nm de diámetro y colas de 120 nm de largo x 7nm de ancho. De igual forma, el tamaño de cápside y morfología del fago S6, presenta similitud con el bacteriófago vB\_SenS-Ent1 caracterizado por Turner (2013), cuya cápside mide 64 nm de diámetro y una cola de 116 nm x 8.5 nm y posee fibras terminales.

En este estudio solo se clasificó el bacteriófago S6 a nivel de familia mas no de género, ya que éstos se diferencian por la organización del genoma, los mecanismos de envasado de DNA y la presencia o ausencia de DNA polimerasas (ICTV, 2017).

El bacteriófago aislado en el presente estudio, presenta características favorables para ser utilizado posteriormente como alternativa de control o reducción de *Salmonella enterica*.

## 8. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente estudio permiten llegar a las siguientes conclusiones:

- Se aisló *Salmonella enterica* a partir de la muestra de intestinos de pollos.
- El bacteriófago aislado muestra especificidad a nivel de género e infecta distintos serovares de *Salmonella enterica*.
- Los fagos son estables a amplios rangos de temperaturas, estables a pH neutro y relativamente estables a pH alcalino.
- El bacteriófago es sensible al cloroformo, la exposición por una hora reduce considerablemente el título viral.
- La infección óptima del bacteriófago es a una proporción de 1 fago por cada 100 bacterias.
- Los bacteriófagos casi en su totalidad se adsorben antes del minuto 20.
- En un ciclo de infección la progenie liberada es de 131 fagos por célula bacteriana en un tiempo no mayor a 10 minutos.
- El fago S6 pertenece al orden *Caudoviridae* y a la familia *Siphoviridae*.
- El aislamiento del bacteriófago, confirma que los pollos actúan como reservorio de estos virus.



## 9. RECOMENDACIONES

- Trabajar con cepas huésped ATCC obtenidas comercialmente, garantizando su identidad y pureza.
- Emplear iones divalentes como  $\text{CaCl}_2$ , ya que ciertos fagos dependen de estas sales para iniciar su proceso de infectivo. En caso el fago no dependa estrictamente de ellas, realizar pruebas que midan su efecto en la adsorción del bacteriófago en su huésped.
- Para la microscopía electrónica de transmisión se recomienda tener un alto título viral. Si en caso el título fuera menor, se recomienda emplear un método de concentración del bacteriófago
- Realizar pruebas moleculares del genoma como secuenciamiento, que permitan complementar el estudio de los bacteriófagos.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- ACKERMANN Hans. *Bacteriophage classification*. En: KUTTER Elizabeth and SULAKVELIDZE Alexander (edit.) *Bacteriophages – Biology and Applications*. CRC Press, 2005 p. 67–89.
- ACKERMANN Hans. *Phage Classification and Characterization*. En CLOKIE Martha, KROPINSKI Andrew (Eds.). *Bacteriophages: Methods and Protocols, Volume 1: Isolation, Characterization, and Interactions*. Humana Press, a part of *Springer protocols*, 2005 p. 127 – 140.
- ACKERMANN Hans. *Salmonella phages examined in the electron microscope*. *Methods Mol Biol*, 2007, vol. 394, 213-234.
- ACKERMANN, Hans. *Basic phage electron microscopy*. *Methods in molecular biology*. New Jersey, 2008, vol. 501, p. 113-126.
- ADAMS, Mark. *Bacteriophages*. Interscience. New York, 1959, p. 450.
- AHMADI, Mosab; KARIMI Amir; RAHIMI Shaban; DENNEHY John. *Prophylactic Bacteriophage Administration More Effective than Post-infection Administration in Reducing Salmonella enterica serovar Enteritidis Shedding in Quail*. *Frontiers in Microbiology*, 2016, vol. 7:1253.
- AKHTAR, Mastura; VIAZIS, Stelios; DIEZ Francisco. *Isolation, identification and characterization of lytic, wide host range bacteriophages from waste effluents against Salmonella enterica serovars*. *Food Control*, 2014, vol. 38, p. 67-74.
- BARDINA, Carlota. “*Estudios sobre terapia fágica contra S. enterica en Gallus gallus*”. Asesores: Montserat Llagostera, Pilar Cortés Garmendia. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona, Departamento de Genética y Microbiología, Bellaterra, 2011.

- BARRETO Guillermo, RODRÍGUEZ Herlinda. La nomenclatura científica en el caso particular de *Salmonella*. *Revista de Producción Animal*. 2012, vol. 24 n° 2, p. 37-38.
- BORIE C, ZURITA P, SANCHEZ M, ROJAS V, SANTANDER J, ROBENSON J. Prevención de la infección por *Salmonella enterica* subespecie enterica serotipo Enteritidis (*Salmonella Enteritidis*) en pollos mediante un bacteriófago. *Archivos de medicina veterinaria*, 2008, vol. 40, no 2, p. 197-201.
- CAMACHO Omar, ACEDO Laura, MORENO Griselda, SANCHEZ Reyna, CASTILLON Lucia, NAVARRO Moisés. Detección de *Salmonella* resistente a los antibióticos en vísceras de pollo. *Revista Biotecnia*. 2010, vol. 12, n° 1.
- CHÉNARD C, CHAN A, VINCENT W, SUTTLE C. Polar freshwater cyanophage S-EIV1 represents a new widespread evolutionary lineage of phages. *The ISME journal*, 2015, vol. 9, no 9, p. 2046-2058.
- DE LAPPE N, DORAN G, CONNOR J, O'HARE C, CORMICAN M. Characterization of bacteriophages used in the *Salmonella enterica* serovar Enteritidis phage-typing scheme. *Journal of Medical Microbiology*, 2009, Vol 58: 86-93.
- DE OLIVEIRA Débora, FERNANDES Junior, ARAUJO Junior. Ability of *Salmonella* spp. to produce biofilm is dependent on temperature and surface material. *Foodborne pathogens and disease*, 2014, vol. 11, n° 6, p. 478-483.
- DELGADO, Rándolph. Peculiaridad de la clasificación taxonómica y nomenclatura del género *Salmonella*. *Acta Médica del Centro*, 2015, vol. 9, no 4, p. 73-75.
- DINI, Cecilia. *Aislamiento y caracterización molecular de bacteriófagos de bacterias enteropatógenas para biocontrol de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA)*. Asesor: Dr Patricio De Urraza. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de La Plata, Facultad de Ciencias Exactas, Departamento de Química, Departamento de Ciencias Biológicas. Buenos Aires, 2011.

- ELLIS Emory, DELBRÜCK Max. The growth of bacteriophage. *The Journal of general physiology*, 1939, vol. 22, n° 3, p. 365-384.
- FERNÁNDEZ Carla; FLORES Violeta; MEDINA, Marco. Aislamiento y caracterización del bacteriófago Va1 específico a *Vibrio alginolyticus*. *Revista Peruana de Biología*, 2017, vol. 24, n° 1, p. 93-100.
- FERNÁNDEZ Julio, PUCHADES Yaquelin; VISPO Nelson. *Los bacteriófagos en la biología molecular pasada y actual*. 1 ed. Elfo Scientiae, 2004, p 41-56.
- FORTIER, Louis-Charles; MOINEAU, Sylvain. Phage production and maintenance of stocks, including expected stock lifetimes. En CLOKIE Martha, KROPINSKI Andrew (edit.). *Bacteriophages: Methods and Protocols*. Reino Unido: Humana Press, 2009 p. 203-219.
- GOMEZ María, VIVES Martha. "Bacteriófagos, virus de bacterias que curan infecciones". *Hipótesis: Apuntes científicos Uniandinos*. 2009, vol. 10 n°10 p. 36-46.
- GUTTMAN Burton, RAYA Raul Raya, KUTTER Elizabeth. Basic Phage Biology. En: KUTTER Elizabeth, SULAKVELIDZE Alexander, (edit.) *Bacteriophages – Biology and Applications*. Washington, D.C: CRC Press, 2005
- HAGENS, Steven; LOESSNER, Martin J. Bacteriophage for biocontrol of foodborne pathogens: calculations and considerations. *Current pharmaceutical biotechnology*, 2010, vol. 11, no 1, p. 58-68.
- HERNÁNDEZ Reina, CASTELLANOS Léonides. Uso de los bacteriófagos en el sector agropecuario. *Revista Científica Agroecosistemas*, 2014, vol. 2, no 2, p. 361-371.
- HERRERA ARIAS, Fanny Consuelo; SANTOS BUELGA, Jesús Angel. Prevalencia de *Salmonella* spp en pescado fresco expandido en Pamplona (Norte de Santander). *Bistua: Revista de la Facultad de Ciencias Básicas*, 2005, vol. 3, no 2, p. 34-41.

- HERRERO SÁNCHEZ María. “Evaluación de bacteriófagos y bacteriocinas para la eliminación de *Listeria monocytogenes*”. Asesores: Ana Rodríguez, Pilar García. Tesis Magistral. Universidad de Oviedo, España, 2013.
- HYMAN, Paul; ABEDON, Stephen T. Bacteriophage host range and bacterial resistance. *Advances in applied microbiology*, 2010, vol. 70, p. 217-248.
- INAMDAR Mandar, GELBART William, PHILLIPS Rob. Dynamics of DNA ejection from bacteriophage. *Biophysical journal*, 2006, vol. 91, no 2, p. 411-420.
- INSTITUTO PANAMERICANO DE PROTECCIÓN DE ALIMENTOS Y ZONOSIS OPS-OMS. Brotes y casos de ETA notificados en 1996 al Sistema de Información para la Vigilancia epidemiológica de las enfermedades transmitidas por alimentos (SIRVE-ETA) [En línea]. Disponible en: <http://www.inppaz.org.ar/MENUPAL/INFTEC/FOS/VE ETA/BOLETI96.HTM>.
- INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF). *Microorganismos de los alimentos. Volumen 1. Su significado y métodos de enumeración*. 2° ed. 2000 Toronto, p. 160-172.
- INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES (ICTV). 9th Report, 2011. Disponible en: <https://talk.ictvonline.org>.
- INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES (ICTV). 10th Report, 2017. Disponible en: [https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv\\_online\\_report/](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/).
- 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, n° 6, p. 678-688.
- KASMAN, Laura M., et al. Overcoming the phage replication threshold: a mathematical model with implications for phage therapy. *Journal of virology*, 2002, vol. 76, no 11, p. 5557-5564

- KERR Benjamin, WEST Jevin, BOHANNAN Brendan. Bacteriophages: models for exploring basic principles of ecology. En Stephen T. Abedon (edit.). *Bacteriophage Ecology: Population Growth, Evolution, and Impact of Bacterial Viruses*, Cambridge University Press 2008.p. 31-32.
- KĘSIK Agata, DRULIS Kawa, WEBER Dabrowska, KASSNER J, MAIKOWSKA G, AUGUSTYNIAK D, SZELACHOWSKA Luisiak, ZACZEK M. Characterising the biology of novel lytic bacteriophages infecting multidrug resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Virology journal*, 2013, vol. 10, no 1, p. 100.
- KROPINSKI Andrew, MAZZOCCO Amanda, WADDELL Thomas, LINGOHR Erika, JOHNSON Roger. Enumeration of bacteriophages by double agar overlay plaque assay. En CLOKIE Martha, KROPINSKI Andrew (edit.). *Bacteriophages: Methods and Protocols*. Reino Unido: Humana Press, 2009 p. 69-76.
- KROPINSKI Andrew. Measurement of the Rate of Attachment of Bacteriophage to Cells. En CLOKIE Martha, KROPINSKI Andrew (edit.). *Bacteriophages: Methods and Protocols*. Reino Unido: Humana Press, 2009 p. 151-155.
- KUTTER Elizabeth, RAYA Raul, CARLSON Karin. Molecular Mechanisms of Phage Infection. En: KUTTER Elizabeth, SULAKVELIDZE Alexander (edit.) *Bacteriophages – Biology and Applications*. CRC Press, 2005,
- LAX A, BARROW P, JONES P, WALLIS T. Current perspectives in salmonellosis. *British Veterinary Journal*, 1995, vol. 151, n° 4, p. 351-377.
- LI, Longping; 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, n° 9, p. 5829-5838.
- LOPARDO, Horacio. Fagoterapia: la multirresistencia nos obliga a revisar el pasado. *Revista argentina de microbiología*, 2017, vol. 49, no 1, p. 1-2.

- LU, Zhongjing, et al. Isolation and characterization of a *Lactobacillus plantarum* bacteriophage,  $\Phi$ JL-1, from a cucumber fermentation. *International journal of food microbiology*, 2003, vol. 84, no 2, p. 225-235.
- MCLAUGHLIN, Michael, KING, Rodney. Characterization of *Salmonella* bacteriophages isolated from swine lagoon effluent. *Current microbiology*, 2008, vol. 56, no 3, p. 208-213.
- MESLIN, F. X. Global aspects of emerging and potential zoonoses: a WHO perspective. *Emerging infectious diseases*, 1997, vol. 3, no 2, p. 223-228.
- MEZA Adriana. "Aislamiento y caracterización de bacteriófagos para cepas nosocomiales de *Acinetobacter baumannii* de lima e Iquitos, Perú 2014-2015". Asesor: REYNOLDS Nathanael. Tesis Título Profesional. Universidad Católica De Santa María, Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica, Arequipa 2016.
- MIDDELBOE Mathias, CHAN Amy, BERTELSEN Sif. Isolation and life-cycle characterization of lytic viruses infecting heterotrophic bacteria and cyanobacteria. En *Manual of Aquatic Viral Ecology*. 2010 p.118-133.
- ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN/ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. (FAO /OMS). *Evaluaciones de riesgos de Salmonella en huevos y pollos para asar*. (Serie de evaluación de riesgos microbiológicos (Resumen interpretativo). Italia: 2005, p. 1-7. ISSN 1813-5323.
- PEÑA Yamila, HERNÁNDEZ María, CASTILLO Viriginia. Resistencia antimicrobiana en *Salmonella* y *E. coli* aisladas de alimentos: revisión de la literatura. *Panorama Cuba y salud*, 2011, vol. 6, no 1, p. 30-38.
- PRADA Catalina, HOLGUÍN Angela, GONZALES Andrés, VIVES Martha. Fagoterapia, alternative para el control de las infecciones bacterianas. Perspectivas en Colombia. *Universitas Scientiarum*, 2015, vol. 20, no 1, p. 43-59.

- QUESADA Adriana, REGINATTO Gabriel, RUIZ Ayelen, COLANTONIO Lisandro, BURRONE María. Resistencia antimicrobiana de *Salmonella* spp aislada de alimentos de origen animal para consumo humano. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 2016, vol. 33, no 1, p. 32-44.
- RAHAMAN MT, RAHAMAN M, KHAN M. Poultry Salmonella specific bacteriophage isolation and characterization. *Bangladesh Journal of Veterinary Medicine*, 2014, vol. 12, n° 2, p. 107-114.
- RAKHUBA, D. V., et al. Bacteriophage receptors, mechanisms of phage adsorption and penetration into host cell. *Pol. J. Microbiol*, 2010, vol. 59, no 3, p. 145-155.
- RONDA, Concepción; VÁZQUEZ, Manuela; LÓPEZ, Rubens. Los bacteriófagos como herramienta para combatir infecciones en Acuicultura. *Revista AquaTIC*, 2016, no 18 p. 3-10.
- SCHLESINGER M, Adsorption of bacteriophages to homologous bacteria II: Quantitative investigation on adsorption velocity and saturation. Estimation of the particle size of the bacteriophage. In: *Papers on Bacterial Viruses*. Edited by Stent G.S. Litle, Brown, Boston, 1965.
- SEGUNDO Nallelyt; HERNÁNDEZ., Efrén; LÓPEZ., Oliver; TORRES., Oscar. 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.
- SHELOBOLINA, Evgenya, SULLIVAN Sara, NEILL Kathleen, NEVIN Kelly, LOVLEY Derek. Isolation, characterization, and U (VI)-reducing potential of a facultatively anaerobic, acid-resistant Bacterium from Low-pH, nitrate-and U (VI)-contaminated subsurface sediment and description of *Salmonella* subterranea sp. nov. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, vol. 70, no 5, p. 2959-2965.



- SHIN Hakdong, LEE Ju, KIM Hyeryen, HEU Sunggi, RYU Sangryeol. Receptor Diversity and Host Interaction of Bacteriophages Infecting *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *PLoS ONE* 2012, vol. 7, n° 8, p. 43392.
- SORIA, Mario Alberto. “*Presencia de Salmonella y características físicas de huevos destinados a consumo humano*”. Asesor: BUENO Javier, FRIZZO Laureano. Tesis Magistral. Universidad Nacional del Litoral, Facultad de Ciencias Veterinarias, Esperanza 2012.
- TURNER, Dann. “*Characterisation of three bacteriophages infecting serovars of salmonella entérica*”. Asesor: REYNOLDS Darren. Tesis Doctoral. University of the West of England. Department of Applied Sciences, University of the West of England, Bristol, 2013.
- VISPO Nelson, PUCHADES Yaquelin. Bacteriófagos: de la terapia con fagos a la biología combinatoria. *Biotecnología Aplicada*, 2001, vol. 18, no 3, p. 135-147.
- WALAKIRA J, CARRIAS A, HOSSAIN M, JONES E, TERHUNE J, LILES M. Identification and characterization of bacteriophages specific to the catfish pathogen, *Edwardsiella ictaluri*. *Journal of applied microbiology*, 2008, vol. 105, n° 6, p. 2133-2142.
- WARD L, DE SA J, ROWE B. A phagotyping scheme for *Salmonella* Enteritidis. *Epidemiology & Infection*, 1987, vol. 99, n° 2, p. 291-294.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO Global Principles for the Containment of Antimicrobial Resistance in Animals Intended for Food, 2000 pp. 5–9. Disponible en: <http://www.who.int/foodsafety/publications/containment-amr/en/>