



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**  
Universidad del Perú. Decana de América  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología

**Aislamiento y caracterización de un bacteriófago lítico  
de *Listeria monocytogenes***

**TESIS**

Para optar el Título Profesional de Biólogo Microbiólogo  
Parasitólogo

**AUTOR**

Antori ALEGRE QUIJANO

**ASESOR**

Miguel Ángel Francisco TALLEDO RIVERA

Lima, Perú

2019



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

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

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

## Referencia bibliográfica

---

Alegre, A. (2019). *Aislamiento y caracterización de un bacteriófago lítico de Listeria monocytogenes*. Tesis para el título profesional de Biólogo Microbiólogo Parasitólogo. Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

---

## HOJA DE METADATOS COMPLEMENTARIOS

Código Orcid del autor (dato opcional):

0000-0001-5112-3260

Código Orcid del asesor o asesores (dato obligatorio):

0000-0003-3011-4212

DNI del autor:

700121839

Grupo de investigación:

Biotechnología para remediación (BIOREM)

Institución que financia parcial o totalmente la investigación:

Programa Nacional de Innovación para la Competitividad y Productividad (INNOVATE PERÚ), proyecto convenio N° 160-PNICP-PIAP-2015.

Ubicación geográfica donde se desarrolló la investigación. Debe incluir localidades y coordenadas geográficas:

Laboratorio de Bacteriófagos, facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima-Perú.

Año o rango de años que la investigación abarcó:

Año 2018.



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

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE  
BIÓLOGO MICROBIÓLOGO PARASITÓLOGO  
(MODALIDAD: SUSTENTACIÓN DE TESIS)**

Siendo las 10:12 horas del 26 de setiembre de 2019, en el Salón de Grados de la Facultad de Ciencias Biológicas y en presencia del jurado formado por los profesores que suscriben, se dio inicio a la sesión para optar al **Título Profesional de Biólogo Microbiólogo Parasitólogo de ANTORI ALEGRE QUIJANO**.

Luego de dar lectura y conformidad al expediente N° **024-EPMP-2019**, el titulando expuso su tesis: **“AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE UN BACTERIÓFAGO LÍTICO DE *Listeria monocytogenes*”** y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota 18...., calificativo: Aprobado con mención honrosa

Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología, y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el **Título Profesional de Biólogo Microbiólogo Parasitólogo** a **ANTORI ALEGRE QUIJANO** y se eleve lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo título, conforme a ley.

Siendo las 11:38 horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 26 de setiembre de 2019.

Dra. EGMA MAYTA HUATUCO  
(PRESIDENTA)

Blgo. MIGUEL TALLEDO RIVERA  
(ASESOR)

Dra. LIZ CRUZ PIO  
(MIEMBRO)

Blgo. AUGUSTO DE LA CRUZ CALVO  
(MIEMBRO)

*A veces la ciencia es más arte que  
ciencia. Mucha gente no lo entiende.*

Rick Sánchez, 2014

*Rick & Morty*

Esta tesis está dedicada a Elvira y Javier, quienes con su amor, paciencia, esfuerzo, ejemplo y consejo me inspiran a ser mejor y seguir caminado sin temor a nada porque Dios está conmigo siempre. Gracias por todo.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a mi familia por haberme dado la oportunidad de formarme en esta prestigiosa universidad y haber sido mi apoyo durante todo este tiempo. A Rosa y Alfonso, por sus oraciones y cariño; a Daniel, Ana, Diana, Marco y Víctor, por haberme brindado su apoyo para desarrollarme profesionalmente.

A mi asesor Miguel Talledo, por haberme guiado durante la elaboración de esta tesis, abrirme las puertas del laboratorio y confiarme esta parte de su proyecto. A la Dra. Susana Gutiérrez y Mg. Fernando Merino por el apoyo brindado, las enseñanzas y consejos. A los tres, por guiarme académicamente con su experiencia y profesionalismo.

A todos los miembros del Laboratorio de Bacteriófagos y del Laboratorio de Microbiología y Biotecnología Microbiana, por su apoyo durante el desarrollo de la parte experimental de esta tesis.

Al Programa Nacional de Innovación para la Competitividad y Productividad (INNOVATE PERÚ) que financió la presente tesis a través del Proyecto Convenio N° 160-PNICP-PIAP-2015.



## ABREVIATURAS

- °C Grado Celsius
- μm Micrómetro
- ADN Acido desoxirribonucleico
- ARN Ácido ribonucleico
- BHI Infusión de cerebro y corazón
- DO Densidad óptica
- EPA Agencia de Protección Ambiental
- ETA Enfermedad transmitida por alimentos
- FAO Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
- FDA Administración de Alimentos y Medicamentos
- ICTV Comité Internacional de Taxonomía de Virus
- mL Mililitro
- MOI Multiplicidad de infección
- MPa Milipascal
- nm Nanómetro
- OMS Organización Mundial de la Salud
- TSA Agar tripticasa y soya
- UFC Unidad formadora de colonia
- UFP Unidad formadora de placa
- UHT Ultra alta temperatura

## ÍNDICE GENERAL

|   | Pág. |
|---|------|
| I. INTRODUCCIÓN   | 1    |
| II. MARCO TEÓRICO   | 4    |
| 2.1. Bacteriófagos  | 4    |
| 2.1.1. Taxonomía de los bacteriófagos                           | 4    |
| 2.1.2. Replicación de los bacteriófagos                         | 5    |
| 2.1.2.1. Ciclo lítico   | 5    |
| 2.1.2.2. Ciclo lisogénico                                       | 7    |
| 2.1.2.3. Curva de crecimiento de un paso                        | 8    |
| 2.1.3. Fagoterapia  | 8    |
| 2.1.4. Ventajas y desventajas de los bacteriófagos              | 9    |
| 2.2. Características de <i>Listeria monocytogenes</i>           | 10   |
| 2.2.1. Generalidades  | 10   |
| 2.2.2. Serotipos  | 11   |
| 2.2.3. Patogenicidad y factores de virulencia                   | 11   |
| 2.2.4. Resistencia a antibióticos                               | 12   |
| 2.3. Listeriosis  | 13   |
| 2.4. <i>Listeria monocytogenes</i> en alimentos                 | 13   |
| III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS                                      | 16   |
| IV. MATERIALES Y METODOS  | 16   |
| 4.1. Material biológico   | 16   |
| 4.2. Métodos  | 18   |
| 4.2.1. Reactivación de cepas                                    | 18   |
| 4.2.2. Selección de <i>Listeria monocytogenes</i> sensible      | 18   |
| 4.2.3. Curva de crecimiento de <i>Listeria monocytogenes</i>    | 19   |
| 4.2.4. Aislamiento, propagación y selección de<br>bacteriófagos | 19   |

|          |  |    |
|----------|--|----|
| 4.2.5.   | Purificación, amplificación y cálculo de la concentración de bacteriófagos | 20 |
| 4.2.6.   | Caracterización fisicoquímica de los bacteriófagos                         | 21 |
| 4.2.6.1. | Termoestabilidad   | 21 |
| 4.2.6.2. | Resistencia a la acidez y alcalinidad                                      | 22 |
| 4.2.6.3. | Resistencia al cloroformo  | 22 |
| 4.2.7.   | Caracterización biológica de los bacteriófagos                             | 23 |
| 4.2.7.1. | Rango de hospedero   | 23 |
| 4.2.7.2. | Cálculo de la Multiplicidad de Infección (MOI)                             | 24 |
| 4.2.7.3. | Curva de crecimiento de un paso  | 24 |
| 4.2.8.   | Análisis estadístico   | 25 |
| V.       | RESULTADOS   | 26 |
| 5.1.     | Reactivación de cepas  | 26 |
| 5.2.     | Selección de <i>Listeria monocytogenes</i> sensible                        | 26 |
| 5.3.     | Curva de crecimiento de <i>Listeria monocytogenes</i>                      | 27 |
| 5.4.     | Aislamiento, propagación y selección de bacteriófagos                      | 27 |
| 5.5.     | Purificación, amplificación y cálculo de la concentración de bacteriófagos | 28 |
| 5.6.     | Caracterización fisicoquímica de los bacteriófagos                         | 30 |
| 5.6.1.   | Termoestabilidad   | 30 |
| 5.6.2.   | Resistencia a la acidez y alcalinidad                                      | 33 |
| 5.6.3.   | Resistencia al cloroformo  | 35 |
| 5.7.     | Caracterización biológica de los bacteriófagos                             | 37 |
| 5.7.1.   | Rango de hospedero   | 37 |
| 5.7.2.   | Cálculo de la Multiplicidad de Infección (MOI)                             | 41 |
| 5.7.3.   | Curva de crecimiento de un paso  | 43 |

|       |                            |    |
|-------|----------------------------|----|
| VI.   | DISCUSIÓN                  | 44 |
| VII.  | CONCLUSIONES               | 52 |
| VIII. | RECOMENDACIONES            | 53 |
| IX.   | REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS | 54 |

## ÍNDICE DE TABLAS

|   | Pág. |
|---|------|
| Tabla 1. Cepas bacterianas utilizadas para la presente investigación.   | 17   |
| Tabla 2. Características para la clasificación e interpretación de los resultados del ensayo de rango de hospedero. | 23   |
| Tabla 3. ANOVA de los datos del experimento de termoestabilidad.  | 31   |
| Tabla 4. Prueba de Tukey HSD de las medias del experimento de termoestabilidad.                                     | 31   |
| Tabla 5. ANOVA de los datos del experimento de resistencia a la acidez y alcalinidad.                               | 33   |
| Tabla 6. Prueba de Tukey HSD de las medias del experimento de resistencia a la acidez y alcalinidad.                | 34   |
| Tabla 7. Prueba t de Welch de los datos del experimento de resistencia al cloroformo.                               | 36   |
| Tabla 8. Sensibilidad de las cepas bacterianas frente al fago ACSF1 mediante la técnica de goteo.                   | 38   |
| Tabla 9. ANOVA de los datos del experimento de cálculo de MOI óptima.   | 41   |
| Tabla 10. Prueba de Tukey HSD de las medias según tratamientos MOI.   | 42   |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|  | Pág. |
|--|------|
| Figura 1. Enfrentamiento por el método de goteo de <i>L. monocytogenes</i> PCB 93 frente al filtrado fágico de aguas servidas de camales de la ciudad de lima. | 26   |
| Figura 2. Curva de crecimiento de <i>L. monocytogenes</i> PCB 93.  | 27   |
| Figura 3. Enfrentamiento del filtrado fágico de aguas servidas de camales de la ciudad de Lima y <i>L. monocytogenes</i> PCB 93.                               | 28   |
| Figura 4. Aclaramiento del caldo de cultivo en los ensayos de amplificación del fago ASCF1.  | 29   |
| Figura 5. Placas de lisis formadas por el fago ASCF1.  | 29   |
| Figura 6. Placas de lisis formadas por el fago ASCF1 vistas al microscopio (400X).   | 30   |
| Figura 7. Efecto de la temperatura sobre la concentración del bacteriófago ASCF1.  | 32   |
| Figura 8. Placas de lisis formadas por el bacteriófago ASCF1 a 45°C.   | 32   |
| Figura 9. Efecto del pH sobre la concentración del bacteriófago ASCF1.   | 34   |
| Figura 10. Placas de lisis formadas por el bacteriófago ASCF1 a pH 7.  | 35   |
| Figura 11. Efecto del cloroformo sobre la concentración del bacteriófago ASCF1.  | 36   |
| Figura 12. Placas de lisis formadas por el bacteriófago ASCF1 después de 1 hora de exposición al cloroformo.   | 37   |
| Figura 13. <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19115 sensible (+++) al bacteriófago ASCF1.  | 39   |
| Figura 14. <i>Vibrio cholerae</i> ATCC "G" sensible (++) al bacteriófago ASCF1.  | 39   |
| Figura 15. <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 19028 sensible (+) al bacteriófago ASCF1.  | 40   |
| Figura 16. <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 resistente al bacteriófago ASCF1.  | 40   |

|   |    |
|---|----|
| Figura 17. Ensayo de cálculo de la Multiplicidad de Infección (MOI) optima. | 42 |
| Figura 18. Curva de crecimiento de un paso del bacteriófago ASCF1.          | 43 |

## RESUMEN

La contaminación microbiana de alimentos durante la cadena de producción es una de las principales causas de enfermedades transmitidas por alimentos (ETAS). *Listeria monocytogenes*, es un microorganismo patógeno causante de la listeriosis humana, una enfermedad con alta morbilidad, hospitalización y mortalidad, principalmente en poblaciones vulnerables. Su presencia en alimentos es favorecida por su resistencia a bajas temperaturas y amplio rango de pH; los brotes están vinculados a carnes frescas y procesadas, productos lácteos y alimentos listos para comer.

En los últimos años los bacteriófagos han sido propuestos para su uso con fines terapéuticos y como una alternativa para el control biológico de *Listeria monocytogenes* y otros microorganismos patógenos en alimentos. Los bacteriófagos son virus que infectan a las bacterias, se componen de una cadena simple o una cadena doble de ADN o ARN cubiertos por una cápside proteica y están presentes casi en todos los ecosistemas.

A partir de un filtrado de aguas servidas de camales de la ciudad de Lima, se seleccionó, aisló y caracterizó fisicoquímica y biológicamente un bacteriófago lítico para *Listeria monocytogenes*: el fago ASCF1. Este bacteriófago es estable a temperaturas entre 4°C y 45°C, es tolerante a un amplio rango de pH (desde 4 hasta 9), presenta un amplio rango de hospedero, infectando también cepas de *Salmonella typhimurium* y *Vibrio cholerae*. Tiene una multiplicidad de infección (MOI) óptima de 10, un periodo de latencia de 120 minutos y un tamaño de explosión promedio de 9.72 unidades formadoras de placa por célula infectada.

Estos resultados indican que el bacteriófago ASCF1 puede ser aplicado para la descontaminación de alimentos y superficies.

**Palabras clave:** Bacteriófago, *Listeria monocytogenes*, alimentos, aislamiento, caracterización.



## ABSTRACT

Food contamination by microbials during the production chain is one of the main causes of foodborne diseases. *Listeria monocytogenes* is a pathogenic microorganism that causes human listeriosis, a disease with high morbidity, hospitalization and mortality, mainly in vulnerable populations. The resistance to low temperatures and wide pH range, favored its presence in foods. The outbreaks are linked to fresh meats, processed dairy products and ready-to-eat foods.

In last years, bacteriophages have been proposed for therapeutic use and as an alternative for *Listeria monocytogenes* biological control and other pathogenic microorganisms in food. Bacteriophages are viruses that infect bacteria, they are composed of a single chain or a double strand of DNA or RNA covered by a protein capsid and they are present almost in all ecosystems.

A *Listeria monocytogenes* lytic bacteriophage was selected, isolated and physicochemically and biologically characterized from slaughterhouses sewage filtrate in Lima city. Phage ASCF1 is stable in a wide range of temperatures (from 4°C to 45°C) and is tolerant to a wide range of pH (from 4 to 9), it has a wide range of host, also infecting strains of *Salmonella typhimurium* and *Vibrio cholerae*. It has an optimal multiplicity of infection (MOI) of 10, a latent period of 120 minutes and an average burst size of 9.72 plaque-forming units per infected cell.

These results indicate that the bacteriophage ASCF1 can be applied for the decontamination of food and surfaces.

**Key words:** Bacteriophage, *Listeria monocytogenes*, food, isolation, characterization.

## I. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) son consideradas como las de mayor morbilidad y mortalidad en países desarrollados y en vías de desarrollo; la contaminación dentro de la cadena de producción, la contaminación cruzada entre alimentos y la contaminación por parte de los manipuladores son las principales causas para la emergencia de estas infecciones (Sánchez et al., 2006). Por este motivo, *Listeria monocytogenes* es considerado un microorganismo patógeno, cuya presencia en alimentos, puede afectar gravemente la salud de los consumidores (Rossi et al., 2008).

*L. monocytogenes* es causante de la listeriosis humana, una zoonosis poco frecuente pero grave, con una alta morbilidad, hospitalización y mortalidad en las poblaciones vulnerables, además de provocar abortos, sepsis e infecciones al sistema nervioso central, este microorganismo es considerado una amenaza seria para la salud pública debido a su amplia distribución en el medio ambiente, la habilidad de sobrevivir en condiciones adversas, tales como tolerancia a un amplio rango de pH (entre 4,3 y 9,4) y temperatura (entre 4°C y 45°C); así como la emergencia de cepas con resistencia a diversos antibióticos como la oxacilina, penicilina, ácido nalidixico, gentamicina, estreptomina y su capacidad para sobrevivir a la limpieza y desinfección gracias a la formación de *biofilms* (Centurión y Takajara, 2004; Harakeh et al., 2009; Herrero, 2013; Schöbitz et al., 2009; Jeyasanta y Patterson, 2016).

En Estados Unidos, se calculan 76 millones de casos de ETA al año, 2 500 son de listeriosis humana y aproximadamente 500 de ellos tendrían como consecuencia la muerte del paciente (Alcayaga y Hott, 2008); en el Perú, según Díaz et al. (2013) “solo en la región de La Libertad se han reportado 42 casos de listeriosis entre los años 2001 y 2008”. Lamentablemente, la incidencia de la enfermedad es mucho mayor; pues solo se reporta entre el 1% y 10% de los casos (Corpas, 2007). En

respuesta a este problema, la industria busca alternativas no térmicas para reducir o eliminar la carga bacteriana en los alimentos sin que dicho tratamiento afecte las características organolépticas, por esta razón, los bacteriófagos han sido propuestos para el control, de bacterias patógenas, sin alterar las propiedades organolépticas del alimento (García et al., 2010; Somolinos et al., 2008).

Los bacteriófagos, también llamados fagos, son ubicuos en nuestro planeta; se encuentran en océanos, suelos, fuentes de agua, alimentos. Son las entidades vivientes más abundantes en la tierra (Guttman et al., 2005), se componen de una cadena simple o una cadena doble de ADN o ARN y están cubiertos por una cápside proteica; están presentes en todos los ecosistemas y se estima que son  $10^{31}$  partículas virales en el océano, aproximadamente 10 fagos por cada bacteria (Tan, 2014). Actualmente podemos encontrar un gran número de investigaciones y productos a base de fagos, para el control de diversos géneros bacterianos (Segundo et al., 2010).

Se han aislado fagos de diferentes lugares, pero la fuente más común son las aguas servidas (procedentes de centros de tratamiento de agua, hospitales, plantas de procesamiento de alimentos marinos, productos cárnicos y lácteos, entre otros) ya que existe una alta prevalencia de poblaciones bacterias patógenas que habitan en estrecha proximidad en aguas servidas así como de fagos específicos para dichas bacterias (Sundar et al., 2009). Muchas de las cepas patógenas de *L. monocytogenes* están relacionadas con la carne de bovino, leche y sus derivados, por esta razón, las aguas servidas de los centros de faenado de animales (camales) son una buena fuente para el aislamiento de bacteriófagos líticos de *L. monocytogenes*.

En nuestro país, la investigación en el campo de los bacteriófagos y la terapia con fagos (fagoterapia) está tomando mayor relevancia, se han investigado fagos específicos de *Vibrio cholerae*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*,

*Escherichia coli*, *Salmonella entérica*, *Pseudomonas aeruginosa* (Flores, 2017; García y Porras, 2018; Meza, 2016; Punil, 2017; Talledo et al., 1998; Tamariz et al., 2014) entre otros estudios que son un claro ejemplo de la importancia que ha tomado la investigación de fagos y sus aplicaciones. Sin embargo en el Perú no existen trabajos publicados sobre bacteriófagos de *L. monocytogenes*.

Esta tesis contribuye al brindar valiosa información sobre la interacción de *L. monocytogenes* con bacteriófagos líticos, además de las características fisicoquímicas y biológicas de dicho bacteriófago y propone las condiciones necesarias para la aplicación de este bacteriófago como agente de control de *L. monocytogenes*, especialmente en alimentos.

## **II. MARCO TEÓRICO**

### **2.1. Bacteriófagos**

Los virus infectan todas las formas de vida: eucariotas (animales vertebrados, animales invertebrados, plantas y hongos) y procariotas (bacterias y *archaea*); los más abundantes son los virus que infectan exclusivamente bacterias y se conocen como bacteriófagos o fagos (del griego *faguēton*, que significa 'alimento', 'ingestión') y fueron descubiertos independientemente por Frederick Twort (1915) y Felix d'Herelle (1917), como todos los virus, están compuestos por una cubierta proteica o cápside que protege el material genético contenido en su interior; estos virus son parásitos intracelulares estrictos, por lo que necesitan de células viables para poder replicarse, utilizando la maquinaria metabólica de la célula hospedera; el genoma fágico puede ser ADN o ARN, de simple o doble cadena, circular o lineal; pueden tener formas icosaédricas, filamentosas y algunos más complejos que presentan cola (Carter y Saunders, 2007).

#### **2.1.1. Taxonomía de los bacteriófagos**

Según el Comité internacional de Taxonomía de Virus (ICTV por sus siglas en inglés), para la clasificación taxonómica de un bacteriófago se debe evaluar la morfología de la cápside a través de un microscopio electrónico y la naturaleza del genoma (tipo, tamaño y estructura) (Meza, 2016), bajo este criterio existen 13 familias de fagos. Existen ensayos que pueden aportar información adicional sobre las características del bacteriófago como la prueba de rango de hospedero o la resistencia a solventes orgánicos.

En el año 2001, Hans W. Ackermann, publicó los resultados del análisis por microscopía electrónica de más de 5100 bacteriófagos aislados desde el año 1959,

el autor encontró que el 96% del total corresponde a fagos con cola y solo el 3,6% de los fagos analizados fueron cúbicos, filamentosos o pleomorfos (Dini, 2011).

### **2.1.2. Replicación de los bacteriófagos**

Existen dos mecanismos de replicación fágica: el ciclo lítico que tiene como finalidad la proliferación viral; y el ciclo lisogénico, que es llevado a cabo por los fagos temperados (profagos) y es considerado un modo de infección latente de baja frecuencia que no causa daño a la célula hospedera (Segundo et al., 2010).

#### **2.1.2.1. Ciclo lítico**

Los bacteriófagos son considerados parásitos obligados, debido a que utilizan la materia, energía y maquinaria de la bacteria infectada para la producción de nuevas partículas virales; el ciclo lítico consiste en la producción de dichas partículas y la lisis bacteriana para la liberación de la progenie viral (meza, 2016). A continuación se explican, brevemente, cada uno de los pasos de este ciclo.

##### **a. Reconocimiento y adsorción**

Los bacteriófagos poseen estructuras proteicas que sirven para reconocer diversos receptores bacterianos (tanto en Gram positivas como en Gram negativas) y formar uniones irreversibles entre dichas moléculas permitiendo al fago adherirse a la superficie bacteriana. Muchos fagos pueden reconocer más de una molécula bacteriana como receptor, lo que favorece su capacidad de infección, el rango de hospedero es más amplio y el fago será capaz de infectar incluso a bacterias de diferentes géneros (Guttman et al., 2005).

### **b. Inyección del material genético fágico**

Cuando el fago está unido irreversiblemente a la bacteria, la estructura de la proteína basal cambia y la membrana citoplasmática sufre la formación de un poro a través del cual se desplaza el ácido nucleico fágico desde la cápside hasta el citoplasma de la célula hospedera; la cola, por ser de mayor tamaño que el poro, queda vacía en el exterior de la bacteria (Letellier et al., 2004). El genoma viral tiene aproximadamente 10 micras de largo y transferirse de la cápside al citoplasma le puede tomar desde segundos hasta minutos (Inamdar et al., 2006).

### **c. Replicación**

En este paso se producen los componentes virales (ácido nucleico y proteínas) utilizando la maquinaria bacteriana. El proceso inicia con el reconocimiento de promotores de los fagos, para dar paso a la transcripción de genes tempranos inmediatos, luego se transcriben los genes intermedios encargados de sintetizar el ácido nucleico de fago y finalmente los genes tardíos que codifican los componente proteicos del bacteriófago (Meza, 2016).

### **d. Ensamblaje**

En la mayoría de fagos, el ensamblaje consiste en complejas interacciones de las proteínas de soporte y proteínas estructurales. El ácido nucleico viral es empaquetado dentro de una envoltura proteica icosaédrica (cápside), en cuyo extremo se encuentra un portal que sirve como el punto de inicio para el ensamblaje de la cabeza, que una vez formada se expande y estabiliza, dando espacio para el acoplamiento del ácido nucleico viral y finalmente se ensambla un conducto que permitirá el paso del genoma durante una nueva infección; además, en el caso de los *myovirus* y *siphovirus*, la cabeza posee un sitio de unión para la cola del fago, que se ensambla por separado (Guttman et al., 2005; Meza, 2016).

### **e. Lisis y liberación**

La lisis de la célula hospedera puede darse por dos mecanismos: la acumulación de fagos maduros en el interior de la bacteria y en el caso de los fagos con cola, mediante la acción enzimática de las lisinas o endolisinas (enzimas que cortan los principales enlaces en la matriz de peptidoglicano de la pared celular) y las holinas (proteínas que provocan la desorganización de la membrana interna); el sistema holina-lisina precipita la lisis bacteriana, primero la holina forma poros para que luego la lisina pueda alcanzar la pared de peptidoglicano (Guttman et al., 2005).

La velocidad con la que se replica el ácido nucleico, se generan las proteínas de cubierta y se ensambla el fago determinan el periodo de eclipse, que viene a ser el tiempo que transcurre desde la inyección del material genético viral hasta la formación de partículas fágicas completas e infectivas (Dini, 2011).

#### **2.1.2.2. Ciclo lisogénico**

Entre los años 1920 y 1930, algunos investigadores afirmaban haber encontrado fagos irregularmente asociados con sus cultivos bacterianos y creían que la bacteria era capaz de generar fagos espontáneamente. Lwoff y Gutmann (1950), demostraron que las células de *Bacillus megatherium* podían dividirse en un medio libre de fagos pero, ocasionalmente, una célula podía lisar espontáneamente y liberar fagos; a este estado intracelular del genoma viral se le llamó profago y a la célula hospedera, bacteria lisogénica, este profago permanece en estado de latencia dentro de la bacteria, replicando su material genético junto con el de su hospedero, mientras que la bacteria adquiere inmunidad a dicho fago; los daños graves al genoma bacteriano, como la luz ultravioleta y otros agentes, pueden inducir al profago a salir de su estado inactivo e iniciar el ciclo lítico. Finalmente, los profagos cumplen una función ecológica muy importante, pues actúan como vectores de



transferencia de genes aportando diversidad genética a las bacterias en diferentes ecosistemas (Dini, 2011).

### **2.1.2.3. Curva de crecimiento de un paso**

Este experimento, desarrollado por Ellis y Delbrück (1939), fue diseñado para caracterizar el ciclo lítico de un bacteriófago; solo se lleva a cabo un ciclo de infección y permite medir el periodo de latencia y el tamaño de explosión, que son esenciales en la descripción de las propiedades del fago; estos parámetros varían de un fago a otro y pueden ser influenciados por las características y condiciones de crecimiento de la célula hospedera. El periodo de latencia es el tiempo que toma desde la adsorción del fago hasta la lisis y liberación de fagos; el tamaño de explosión es el promedio del número de fagos liberados por una célula hospedera infectada (Middelboe et al., 2010).

### **2.1.3. Fagoterapia**

Los primeros tratamientos con fagos datan del año 1915, cuando una crisis de disentería hemorrágica azotaba Francia, d'Herelle aisló lisados libres de bacterias a partir de heces de pollo y trató exitosamente la infección primero en aves y luego en humanos; años más tarde, en 1921 Richard Bruynoghe y Joseph Maisin trataron infecciones cutáneas causadas por *Staphylococcus* usando bacteriófagos, al mismo tiempo que en Francia y Estados Unidos, se empezaron a producir los primeros productos comerciales a base de fagos para el tratamiento de diferentes infecciones bacterianas, los cuales consistían en lisados fágicos que eran propagados en caldos de cultivo bacteriano (Hermoso et al., 2007; Lozano, 2006; Sulakvelidze et al., 2001).

Durante los años 40, en Occidente, el descubrimiento de los antibióticos eclipsó la investigación en fagos; sin embargo, continuó en países como Rusia, Polonia (Instituto Hirzfield), la India y Georgia (Centro Tbilisi y el Instituto Eliava); este último con sus dos instituciones son, hasta la fecha, los centros de referencia a nivel mundial en bacteriófagos y fagoterapia en humanos. En las últimas décadas, la emergencia de cepas resistentes a los antibióticos ha motivado que los investigadores retomen el interés en los fagos; actualmente existen compañías dedicadas a la fabricación y comercialización de productos a base de fagos líticos contra *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter Baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Clostridium perfringens*, *Salmonella* sp., *Streptococcus* sp., *Proteus* sp., *Campylobacter* sp., *Shigella* sp., que cuentan con la aprobación de la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA por sus siglas en inglés) y la Agencia de Protección Ambiental (EPA por sus siglas en inglés) para ser comercializados (Kutter y Sulakvelidze, 2005; Segundo et al., 2010).

Actualmente los bacteriófagos son utilizados para combatir bacterias patógenas en áreas como: veterinaria, acuicultura, medicina humana, saneamiento ambiental y alimentos.

#### **2.1.4. Ventajas y desventajas de los bacteriófagos**

Los bacteriófagos tienen como principal ventaja su capacidad para producir la lisis de las bacterias resistentes a los antibióticos; además, son altamente específicos (no afectan la microbiota normal del paciente), no se requiere de dosis muy altas para el tratamiento (pues los bacteriófagos tienen la capacidad de alcanzar concentraciones muy altas durante su replicación) y una vez que se ha eliminado a

la bacteria patógena, la replicación se detiene y los fagos son eliminados gradualmente por el mismo organismo del paciente (Segundo et al., 2010).

Una de las principales preocupaciones del uso de fagos es la posibilidad de aparición de resistencia en las células hospederas; sobre esto, se sabe que existe una coevolución fago-bacteria, en la que el fago se adapta a las modificaciones que pueda sufrir la bacteria para continuar infectándola; además, las bacterias Gram negativas que mutan para evadir al fago, pierden componentes de la capsula o lipopolisacáridos y por lo tanto son menos virulentos; otra alternativa es el uso de cócteles terapéuticos con fagos que reconozcan diferentes tipos de receptores y finalmente, la secuenciación del genoma fágico y la aplicación de técnicas de edición genética podrían garantizar que el fago esté libre de genes que codifiquen la lisogenia, virulencia y/o resistencia a antibióticos (Dini, 2011; Drexler et al., 1991; Montag et al., 1987).

## **2.2. Características de *Listeria monocytogenes***

### **2.2.1. Generalidades**

*Listeria monocytogenes* es un bacilo Gram positivo no esporulado, aerobio y anaerobio facultativo, psicotrófico, crece entre 1,1°C y 45°C (temperatura óptima de crecimiento entre 30°C y 37°C) y pH entre 4,1 y 9,6 (pH óptimo de crecimiento entre 7,2 y 7,6), posee movilidad por medio de 4 flagelos peritricos a 20°C y 25°C y un flagelo polar a 37°C; produce listeriosina O (que es una exotoxina hemolítica y citolítica) y es resistente a altas concentraciones de cloruro de sodio (30%) (Jay, 1994; Michanie, 2004).

### **2.2.2. Serotipos**

Las técnicas de serotipificación, tipificación con fagos y electroforesis enzimática son las más usadas para determinar las características fenotípicas de *L. monocytogenes*; actualmente, la tipificación serológica o serotipificación es la herramienta de diagnóstico más utilizada, con el sistema de Patterson modificado por Seelinger y Höhne, y la detección de antígenos somáticos y flagelares se ha logrado caracterizar la especie *L. monocytogenes* en trece serotipos: 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e, y 7 (Centurión y Takajara, 2004; Muñoz, 2012).

### **2.2.3. Patogenicidad y factores de virulencia**

*L. monocytogenes* es un parásito intracelular y ha sido clasificado como oportunista debido a la estrecha relación entre la susceptibilidad del paciente y la presencia de la enfermedad luego de la exposición al patógeno; se ha observado inmunidad celular disminuida en los pacientes, por lo que se considera como poblaciones de riesgo a mujeres gestantes, mayores de edad, recién nacidos y pacientes inmunocomprometidos (Torres et al., 2005). El ciclo de infección inicia cuando la bacteria ingresa al organismo a través del tracto gastrointestinal, atraviesa la barrera mucosa del intestino, llega al torrente sanguíneo y se disemina por todo el organismo, especialmente al sistema nervioso central y la placenta (Crespo et al., 1999; Doyle, 2001).

La patogenicidad de *L. monocytogenes* está relacionada con sus factores de virulencia, de los cuales los más importantes son: la listeriosina O (hemolisina), dos fosfolipasas y una proteína (Act A) esencial para la motilidad intracelular. Cuando el patógeno atraviesa la barrera intestinal, es internalizada en una vacuola por la célula hospedera, esta vacuola es destruida por la acción de la listeriosina O y las bacterias

quedan libres en el citoplasma donde se replican rápidamente (Kathariou, 2002). En el citoplasma, las bacterias, con ayuda de la proteína Act A, se desplazan hacia la periferia de la célula hospedera donde forman protuberancias (en forma de evaginaciones citoplasmáticas con una bacteria en su extremo) que son fagocitadas por las células vecinas, la bacteria escapa del fagosoma e inicia un nuevo ciclo de infección (López et al., 2006).

#### **2.2.4. Resistencia a antibióticos**

*L. monocytogenes* ha mantenido relativamente estable su sensibilidad a los antibióticos por muchos años, este microorganismo ha sido sensible a los antibióticos efectivos contra bacterias Gram positivas tales como ampicilina o penicilina, eritromicina, gentamicina, sulfametoxazol, tetraciclinas y trimetoprima; y ha sido intrínsecamente resistente a las quinolonas de primera generación, fosfomicina y cefalosporinas de tercera generación (Charpentier y Courvalin, 1999; Cherubin et al., 1991). Sin embargo, los reportes de cepas resistentes han aumentado en los últimos años; se cree que este aumento de la resistencia puede estar asociado con el uso profiláctico y terapéutico de antibióticos en animales productores de alimentos (Allen et al., 2016), Además, existen evidencias que indican que la presencia de plásmidos auto transferibles y transposones conjugativos originados en *Enterococcus-Streptococcus* estarían actuando como reservorio de genes de resistencia y *L. monocytogenes* podría adquirir estos genes en el tracto digestivo de animales y humanos; actualmente se han reportado aislamientos de *L. monocytogenes*, de origen clínico y animal, resistentes a tetraciclina, trimetoprima, gentamicina, estreptomina, eritromicina, kanamicina, sulfametoxazol y rifampicina (Charpentier y Courvalin, 1999).

### **2.3. Listeriosis**

Es una enfermedad causada por *L. monocytogenes*, fue reportada por primera vez en 1981 cuando se evidencio su transmisión por alimentos y actualmente se sabe que también se transmite por contacto con animales, por vía transplacentaria y a través del canal vaginal (Centurión y Takajara, 2004). El contacto con animales produce infecciones focalizadas en lesiones cutáneas, en el caso de la ingestión de alimentos con altos niveles del patógeno (mayores a  $10^7$  UFC/mL) se produce una gastroenteritis que puede ser leve o severa, con vómitos y diarrea al cabo de 24 horas después del consumo, en algunos casos produce bacteriemia con síntomas parecidos a la gripe (fiebre, dolores musculares y escalofríos) y pueden estar acompañados de náuseas y diarrea (Harris, 2006; Herrero, 2013). En el caso de mujeres embarazadas (listeriosis perinatal), la infección es invasiva, existe mayor frecuencia de infección durante el primer trimestre pero puede ocurrir en cualquier periodo de la gestación, precipitando el parto (con muerte fetal o feto infectado), además el recién nacido puede adquirir al patógeno a través de la placenta, desarrollando una granulomatosis infantiséptica con abscesos o granulomas diseminados en múltiples órganos (Centurión y Takajara, 2004; Torres et al., 2005).

### **2.4. *Listeria monocytogenes* en alimentos**

El aumento del número de aislamientos de *L. monocytogenes*, sumado a diversos brotes epidémicos en humanos en Norteamérica y Europa a partir de 1983 han establecido a la listeriosis como una importante enfermedad transmitida por alimentos, el patógeno está ampliamente distribuido y se encuentra tanto en ambientes terrestres como en el agua y puede llegar a ambientes de procesamiento y producción de alimentos (Alcayaga y Hott, 2008; Codex Alimentarius Commission, 2007). La alta humedad y presencia de nutrientes en estos ambientes favorecen el

crecimiento de *L. monocytogenes*, contaminando materias primas y productos del proceso, además algunas serovariedades como 1/2a, 1/2b y 1/2c son capaces de formar *biofilms*, lo que permite la adhesión a superficies de equipos, utensilios y suelos, haciendo más difícil la limpieza y desinfección de los ambientes (Córdoba et al., 2015). Este microorganismo ha sido aislado de alimentos sin procesar y de alimentos procesados; sin embargo los brotes de listeriosis se relacionan mayormente con alimentos listos para consumir (que han recibido tratamiento térmico) y son conservados por prolongados periodos de tiempo en refrigeración (Consulta de Expertos FAO/OMS, 2000). El personal que labora dentro de la cadena de procesamiento y producción ocupa un papel importante en la presencia del patógeno dentro de las plantas procesadoras de alimentos, pues el microorganismo ingresa en sus manos, ropa, etc. (Schöbitz et al., 2009).

Entre los productos cárnicos, la carne de pollo es la más relacionada con la listeriosis; la carne puede contaminarse durante el sacrificio del animal, pues aumenta el riesgo de contacto entre las heces y la carne, facilitando la diseminación del patógeno; además, la carne contaminada que es refrigerada o congelada puede contaminar otros alimentos (Capita et al., 1999; Centurión y Takajara, 2004). En el caso de vegetales, la contaminación por *L. monocytogenes* es consecuencia del uso de aguas contaminadas o residuales para el riego de cultivos, uso de estiércol como abono, agua contaminada para el lavado o refrigeración y debido a la falta de higiene del manipulador; se ha aislado *L. monocytogenes* en tomates, lechuga, pepinos, judías, coliflores, brócolis, rábanos, entre otros; la contaminación varía de acuerdo al lugar de cultivo, zona de recolección, los abonos usados, la temperatura, los procedimientos de lavado y el contacto con el suelo (ICMSF, 2001). *L. monocytogenes* también causa enfermedad invasiva en diferentes animales como vacunos, ovinos y caprinos cuya leche y productos derivados, se han relacionado con brotes de listeriosis en humanos; el patógeno se inactiva eficazmente por

pasteurización, pero la contaminación cruzada suele ocurrir en los alimentos listos para consumo (leche, queso fresco, yogurt y otros productos artesanales), mientras que el personal involucrado en cadena de producción así como los encargados del sacrificio de dichos animales pueden ser portadores del patógeno y aumentar el riesgo de transmitirlo a los alimentos (Muñoz et al., 2013). La amplia distribución de *L. monocytogenes* hace que la contaminación de alimentos por este patógeno pueda producirse en los puntos de venta final (supermercados, mercados populares, autoservicios) e incluso en las cocinas de hogares y restaurantes (Centurión y Takajara, 2004).



### **III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

#### **3.1. Hipótesis:**

A partir de las muestras de aguas servidas de canales de la ciudad de Lima se puede aislar y caracterizar un bacteriófago lítico de *Listeria monocytogenes*.

#### **3.2. Objetivos:**

##### **3.2.1. Objetivo general**

Aislar y caracterizar un bacteriófago lítico de *Listeria monocytogenes* a partir de muestras de agua servida de canal.

##### **3.2.2. Objetivos específicos**

- Seleccionar un bacteriófago lítico de *Listeria monocytogenes*.
- Caracterizar fisicoquímicamente un bacteriófago lítico de *Listeria monocytogenes*.
- Caracterizar biológicamente un bacteriófago lítico de *Listeria monocytogenes*.

### **IV. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **4.1. Material biológico**

- Filtrado fágico de aguas servidas de canales de la ciudad de Lima, perteneciente al Laboratorio de Bacteriófagos de la Facultad de Ciencias Biológicas, UNMSM.
- Se utilizaron cepas bacterianas pertenecientes a la colección del Laboratorio de Bacteriófagos de la Facultad de Ciencias Biológicas, UNMSM (Tabla 1).

**Tabla 1.** Cepas bacterianas utilizadas para la presente investigación.

| <b>CÓDIGO</b> | <b>CEPA</b>                              | <b>ORIGEN</b>  |
|---------------|--|--|
| PCB 165       | <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19115 | Colección ATCC                                       |
| PCB 156       | <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15114 |  |
| PCB 158       | <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 33090 |  |
| PCB 93        | <i>Listeria monocytogenes</i>            | Aguas servidas de<br>canales de la ciudad de<br>Lima |
| PCB 94        | <i>Listeria monocytogenes</i>            |  |
| PCB 95        | <i>Listeria monocytogenes</i>            |  |
| PCB 96        | <i>Listeria monocytogenes</i>            |  |
| PCB 102       | <i>Listeria monocytogenes</i>            |  |
| PCB 159       | <i>Listeria monocytogenes</i>            |  |
| PCB 160       | <i>Listeria monocytogenes</i>            |  |
| PCB 162       | <i>Listeria monocytogenes</i>            |  |
| PCB 163       | <i>Listeria monocytogenes</i>            |  |
| PCB 31        | <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 19028 |  |
| PCB 33        | <i>Salmonella choleraesuis</i> ATCC      |  |
| PCB 137       | <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922       |  |
| S7B90         | <i>Escherichia coli</i> ATCC A           |  |
| S7B108        | <i>Escherichia coli</i> ATCC 25022       |  |
| S7B115        | <i>Escherichia coli</i> ATCC 25322       |  |
| S7B117        | <i>Escherichia coli</i> ATCC 13706       |  |
| S7B106        | <i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048 |  |
| S7B111        | <i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 12048 |  |
| S7B19         | <i>Proteus vulgaris</i> ATCC 6380        |  |
| S7B164        | <i>Vibrio cholerae</i> ATCC "G"          |  |

## **4.2. Métodos**

### **4.2.1. Reactivación de cepas**

Las cepas bacterianas utilizadas en la presente investigación (Tabla 2), fueron mantenidas mediante subcultivos seriados en viales con Agar Cerebro Corazón (BHI Agar) y se almacenaron a temperatura ambiente. Estas cepas fueron reactivadas en 2,5 mL de Caldo Cerebro Corazón (BHI) suplementado con extracto de levadura, incubadas a temperatura ambiente durante 24 a 48 horas. Para comprobar la viabilidad y pureza de las cepas bacterianas, estas cepas fueron sembradas por estriado sobre placas de Agar Cerebro Corazón (BHI Agar) suplementado con extracto de levadura, bajo las mismas condiciones de reactivación. Las cepas fueron conservadas como stocks de trabajo, en microtubos con 500 µl de caldo BHI y glicerol a -18°C. Este stock de trabajo fue utilizado para todos los ensayos de la presente investigación con la finalidad de evitar la contaminación de ceparios y la aparición de células mutantes espontáneas.

### **4.2.2. Selección de *Listeria monocytogenes* sensible**

Para seleccionar una cepa de *Listeria monocytogenes* y utilizarla como hospedero en los ensayos posteriores, la sensibilidad de las cepas nativas de *Listeria monocytogenes* frente al filtrado fágico de aguas servidas de camales de la ciudad de Lima fue evaluada mediante la prueba de goteo *spot test* según Kutter (2009). 500 µL de cada uno de los cultivos bacterianos crecidos toda la noche fueron sembrados por diseminación en placas Petri con Agar Cerebro Corazón (BHI Agar). Estas placas fueron divididas en 3 regiones (de un tercio cada una), a continuación en una cabina de flujo laminar, se goteó 10 µL del filtrado fágico en el centro de cada región, las placas fueron incubadas a 35°C. Se hizo una primera lectura

después de 24 horas de incubación y una segunda lectura, después de 48 horas de incubación.

#### **4.2.3. Curva de crecimiento de *Listeria monocytogenes***

Con la finalidad de estudiar el crecimiento de La cepa de *Listeria monocytogenes* seleccionada en el apartado 4.2.2., dicha cepa fue incubada en un matraz con 25 mL de caldo BHI toda la noche a 35°C. A partir de este cultivo, se pasó un inóculo de 100 µL a un matraz con 50 mL de caldo BHI y fue incubado a 35°C. Para monitorear el crecimiento bacteriano, se midió la densidad óptica (DO) a una longitud de onda de 540 nm inmediatamente después de agregar el inóculo y posteriormente por cada hora, durante 15 horas. Además, se determinó el número de Unidades Formadoras de Colonia por mililitro (UFC/mL) en cada hora, según las especificaciones de la norma ISO 11290-2:2017 modificado.

#### **4.2.4. Aislamiento, propagación y selección de bacteriófagos**

El filtrado fágico de aguas servidas de camales de la ciudad de Lima, fue centrifugado a 5000 rpm por 10 minutos. El sobrenadante obtenido fue filtrado a través de una membrana de nitrocelulosa de 0.45 µm de porosidad para garantizar su esterilidad.

La propagación de bacteriófagos se llevó cabo por el método de la bicapa de agar según Adams (1959). Se realizaron diluciones seriadas del filtrado, se mezcló 1 mL de cada dilución con 1 mL del cultivo bacteriano incubado toda la noche. La mezcla fue homogenizada en un vórtex y fue incubada a 35°C por 10 minutos. A continuación, se añadió agar TSA al 70% a 45°C, se mezcló mediante vórtex y la mezcla fue vertida sobre placas Petri con una capa fina de Agar TSA al 100%. Las placas Petri fueron incubadas a 37°C por 24 horas.

La selección de bacteriófagos se hizo siguiendo el procedimiento propuesto por Punil (2017) con algunas modificaciones. Las placas de lisis que presentaron mayor diámetro de aclaramiento y borde definido, fueron tomadas con la punta de un *tip* estéril de micropipeta, se succionó suavemente la placa de lisis con los bacteriófagos en ella. El contenido del *tip* fue transferido a un tubo de microcentrífuga con tampón SM (100 mM NaCl, 8,1 mM MgSO<sub>4</sub> - 7H<sub>2</sub>O, 50 mM Tris - Cl (pH 7,5), 0,01 % gelatina) y fue homogenizado mediante vórtex. Esta solución fue mantenida a temperatura ambiente por 2 horas para permitir que el bacteriófago se difunda fuera del agar. El contenido de estos tubos de microcentrífuga fue filtrado con membranas Millipore de 0.45 µm de porosidad y fue almacenado a -20°C hasta su purificación.

#### **4.2.5. Purificación, amplificación y cálculo de la concentración de bacteriófagos**

La suspensión de bacteriófagos almacenados a -20°C, fue enfrentada con la bacteria hospedera por el método de la bicapa de agar, según Adams (1959) de manera consecutiva hasta obtener placas de lisis completamente aisladas y homogéneas en cada placa Petri para asegurar la purificación de un solo tipo de bacteriófago. Además, se observaron las placas de lisis formadas por el fago en un microscopio marca Leica, modelo DM750 con cámara fotográfica y se midió el diámetro de las placas de lisis usando el software LAS EZ versión 3.2.1. Estas placas de lisis se seleccionaron siguiendo los pasos antes descritos.

Con la finalidad de aumentar la concentración de bacteriófagos (UFP/mL) se realizó ensayos de amplificación, mediante enfrentamientos fago-bacteria. En 10 tubos de ensayo, cada uno con 10 mL de caldo BHI estéril se añadió 100 µL de cultivo de *L. monocytogenes* seleccionada en el apartado 4.2.2. crecido toda la noche y 1000 µL de la suspensión purificada de bacteriófagos y fue incubada a 35°C por 24 horas.

Después del periodo de incubación el contenido de los tubos de ensayo fue trasvasado a tubos de centrifuga de 15 mL y fue centrifugado a 4400 rpm por 30 minutos. El sobrenadante de cada uno de los tubos de centrifuga fue filtrado dentro de una cabina de flujo laminar a través de filtros de nitrocelulosa Millipore de 0.45 µm de porosidad. Esta suspensión filtrada, fue almacenada a 4°C y fue utilizada en todos los ensayos posteriores.

Para el cálculo de la concentración de los bacteriófagos se realizaron recuentos por el método de la bicapa de agar según Adams (1959). Se realizaron diluciones seriadas de la suspensión filtrada; se mezclaron 100 µL de cultivo de *L. monocytogenes* seleccionada en el apartado 4.2.2. crecido toda la noche y 1000 µL de cada dilución, La mezcla fue homogenizada en un vórtex y fue incubada a 35°C por 10 minutos. A continuación, se añadió agar TSA al 70% a 45°C, se mezcló mediante vórtex y la mezcla fue vertida sobre placas Petri con una capa fina de Agar TSA al 100%. Las placas Petri fueron incubadas a 37°C por 24 horas. Para determinar la concentración de fagos en la suspensión, se contaron las placas de lisis; el número de placas de lisis fue multiplicado por la inversa de la dilución en el cual se contaron las placas de lisis. Finalmente se expresó en Unidades Formadoras de Placa por mililitro (UFP/mL) empleando la siguiente fórmula:

$$\frac{UFP}{mL} = \text{Numero de placas de lisis contadas} \times \frac{1}{\text{Dilución}}$$

#### **4.2.6. Caracterización fisicoquímica de los bacteriófagos**

##### **4.2.6.1. Termoestabilidad**

Para la evaluación de la estabilidad térmica del bacteriófago ASFC1, la suspensión de bacteriófagos fue incubada en tubos de microcentrifuga estériles, a una concentración de  $1.07 \times 10^{14}$  UFP/mL, a temperaturas de 4°C, 24°C, 35°C y 45°C durante 1 hora. Se tomaron muestras de 100 µL cada 10 minutos y la concentración de bacteriófagos para cada temperatura se determinó por la técnica de bicapa de

agar según Adams (1959). Cada ensayo de termoestabilidad se realizó por triplicado.

#### **4.2.6.2. Resistencia a la acidez y alcalinidad**

Para determinar el rango de tolerancia de pH del fago ASCF1, la suspensión de bacteriófagos fue expuesta a diferentes condiciones de pH de 4, 5, 6, 7, 8, 9 por 1 hora y luego se comprobó la supervivencia de estos. 100  $\mu\text{L}$  de la suspensión de fagos a una concentración de  $6.7 \times 10^{11}$  UFP/mL fueron adicionados a 900  $\mu\text{L}$  de solución salina (NaCl 0,9 % p/v) ajustada al pH específico para cada ensayo y fueron incubados a 35°C por 1 hora. Después del periodo de incubación se realizaron diluciones seriadas de cada tubo; fueron enfrentados 100  $\mu\text{L}$  de cultivo de *L. monocytogenes* seleccionada en el apartado 4.2.2. crecida toda la noche con 1 mL de cada dilución, las mezclas se incubaron a 35°C por 10 minutos. Se determinó la concentración de bacteriófagos mediante la técnica de la bicapa de agar según Adams (1959). Cada ensayo de resistencia la acidez y alcalinidad se realizó por triplicado.

#### **4.2.6.3. Resistencia al cloroformo**

Para determinar la resistencia al cloroformo del bacteriófago ASCF1 se utilizó el método empleado por Chénard et. al. (2015) modificado. 500  $\mu\text{L}$  de la suspensión de bacteriófagos fue añadido a 500  $\mu\text{L}$  de cloroformo puro, la mezcla fue agitada en vórtex durante 1 hora. Para remover el cloroformo, la mezcla fue centrifugada a 4400 rpm por 10 minutos, la fase acuosa fue transferida a un tubo de microcentrífuga y fue incubado por 6 horas a temperatura ambiente. Como control se realizó el mismo procedimiento con 500  $\mu\text{L}$  de la suspensión de fagos y 500  $\mu\text{L}$  de solución salina al 0.85 % estéril. Se determinó la concentración de bacteriófagos

para cada ensayo mediante la técnica de la bicapa de agar según Adams (1959). El ensayo de resistencia al cloroformo se realizó por duplicado.

#### 4.2.7. Caracterización biológica de los bacteriófagos

##### 4.2.7.1. Rango de hospedero

La sensibilidad de las cepas de *L. monocytogenes* al bacteriófago ASCF1, además de la sensibilidad de cepas de referencia de *Salmonella typhimurium*, *Salmonella choleraesuis*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus vulgaris* y *Vibrio cholerae* fue evaluada mediante la prueba de goteo *spot test* según Kutter (2009). 500  $\mu$ L de cada uno de los cultivos bacterianos crecidos toda la noche fueron sembrados por diseminación en placas Petri con Agar Cerebro Corazón (BHI Agar). Estas placas fueron divididas en 3 regiones (de un tercio cada una), a continuación en una cabina de flujo laminar, se goteó 10  $\mu$ L del filtrado fágico en el centro de cada región, las placas fueron incubadas a 35°C. Se hizo una primera lectura después de 24 horas de incubación y una segunda lectura, después de 48 horas de incubación.

La sensibilidad de la cepa bacteriana fue evidenciada por el aclaramiento de la región donde se agregaron las gotas de la suspensión de fagos y fue clasificada de acuerdo a los criterios descritos en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Características para la clasificación e interpretación de los resultados del ensayo de rango de hospedero.

| <b>CARACTERÍSTICAS</b>   |                      |                       |
|--------------------------|----------------------|-----------------------|
| <b>DEL ACLARAMIENTO</b>  | <b>CLASIFICACIÓN</b> | <b>INTERPRETACIÓN</b> |
| Totalmente translúcido   | +++                  | Muy sensible          |
| Parcialmente translúcido | ++                   | Sensible              |
| Opaco                    | +                    | Poco sensible         |
| Sin aclaramiento         | -                    | Resistente            |



#### **4.2.7.2. Cálculo de la Multiplicidad de infección (MOI)**

Para calcular la MOI óptima del bacteriófago ASCF1 se siguieron los pasos del método descrito por Herrero (2013) modificado. En tubos de ensayo con 8 mL de caldo BHI, 1000  $\mu$ L de la suspensión de fagos a concentraciones de  $10^8$  UFP/mL,  $10^9$  UFP/mL y  $10^{10}$  UFP/mL fueron enfrentadas, cada una, con 100  $\mu$ L de cultivo de *L. monocytogenes* seleccionada en el apartado 4.2.2. a una concentración de  $10^8$  UFC/mL que corresponden a MOI de 1, 10 y 100 respectivamente. Se incubaron a 35°C por 4 horas, cada tubo fue centrifugado a 4400 rpm por 30 minutos. Los sobrenadantes fueron filtrados a través de filtros de nitrocelulosa Millipore de 0.45  $\mu$ m de porosidad. Se determinó la concentración de bacteriófagos mediante la técnica de la bicapa de agar según Adams (1959). Cada ensayo se realizó por triplicado y la MOI que generó la concentración más alta de fagos al final de los ensayos se consideró la MOI óptima.

#### **4.2.7.3. Curva de crecimiento de un paso**

La curva de un paso del bacteriófago ASCF1 fue realizada según el protocolo de Middelboe et al. (2010) modificado. 100  $\mu$ L de cultivo de *L. monocytogenes* seleccionada en el apartado 4.2.2. crecido toda la noche, fueron inoculados en 10 mL de caldo BHI y fue incubado a 35°C hasta alcanzar una concentración de  $10^8$  UFC/mL. Cuando el cultivo alcanzó la concentración de  $10^8$  UFC/mL, se tomó un inóculo de 100  $\mu$ L que fue enfrentado con 1000  $\mu$ L de la suspensión de fagos (se considera este como el tiempo cero del experimento). El tubo con el enfrentamiento fago-bacteria fue incubado por 10 minutos a 35°C, luego fue centrifugado a 16000 rpm por 10 minutos, el sobrenadante fue eliminado y se agregó 1 mL de caldo BHI al *pellet*. La suspensión se homogenizó y 100  $\mu$ L fueron inoculados a un matraz con 50 mL de caldo BHI que fue incubado a 35°C. Se tomaron por triplicado muestras

de 1 mL al iniciar el experimento y cada 10 minutos durante 360 minutos. Se determinó la concentración de bacteriófagos de cada una de las muestras tomadas mediante la técnica de la bicapa de agar según Adams (1959).

#### **4.2.8. Análisis estadístico**

Se utilizó el software Microsoft Excel 2013 para realizar las gráficas y tablas para describir las curvas de crecimiento y de un paso, la termoestabilidad, resistencia a la acidez y alcalinidad, resistencia al cloroformo, rango de hospedero y cálculo de la MOI.

Se utilizó el software estadístico SPSS V. 22.0 para el análisis estadístico inferencial. Los datos obtenidos fueron analizados mediante el método de ANOVA, la comparación múltiple de medias se realizó mediante la prueba de Tukey HSD con un nivel de confianza de 95% y un nivel de significancia 0,001. Para el ensayo de resistencia al cloroformo, los datos obtenidos fueron analizados mediante la prueba de t de Welch con un nivel de confianza de 95% y un nivel de significancia de 0,01.

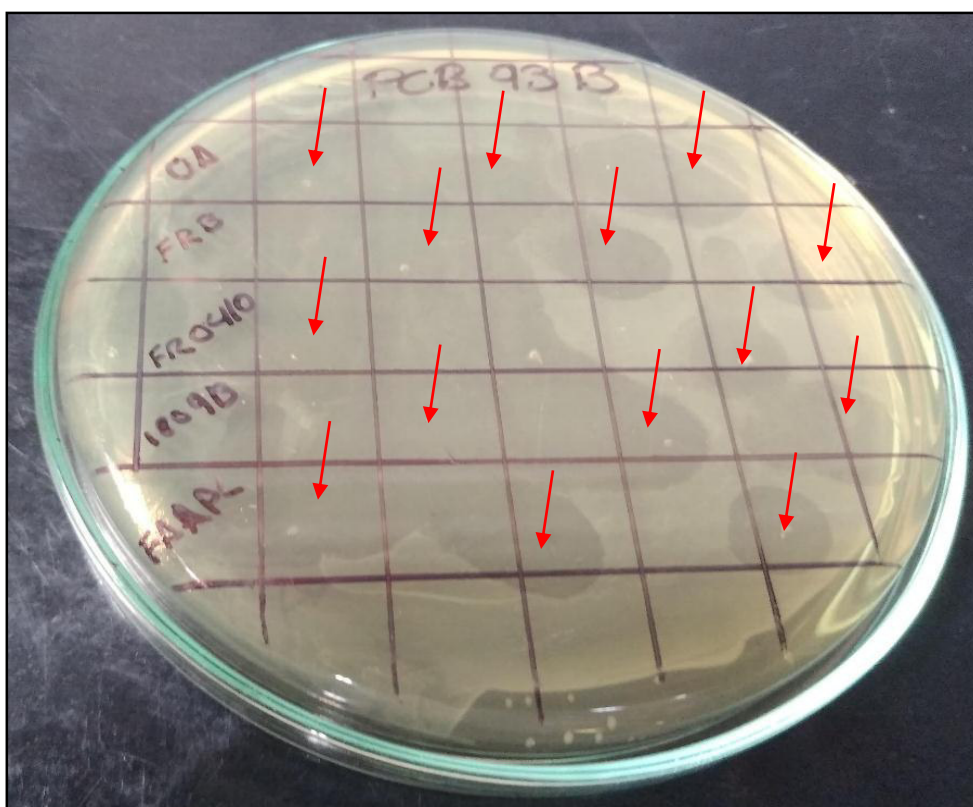
## V. RESULTADOS

### 5.1. Reactivación de cepas

Se reactivaron un total de 11 cepas de *Listeria monocytogenes*, 9 cepas provenientes de agua servidas de diferentes camales de la ciudad de Lima y 2 cepas de referencia, *Listeria monocytogenes* ATCC 15114 y *Listeria monocytogenes* ATCC 19115, además de 11 cepas de referencia de los géneros *Salmonella*, *Escherichia*, *Proteus*, *Enterobacter* y *Vibrio*.

### 5.2. Selección de *Listeria monocytogenes* sensible

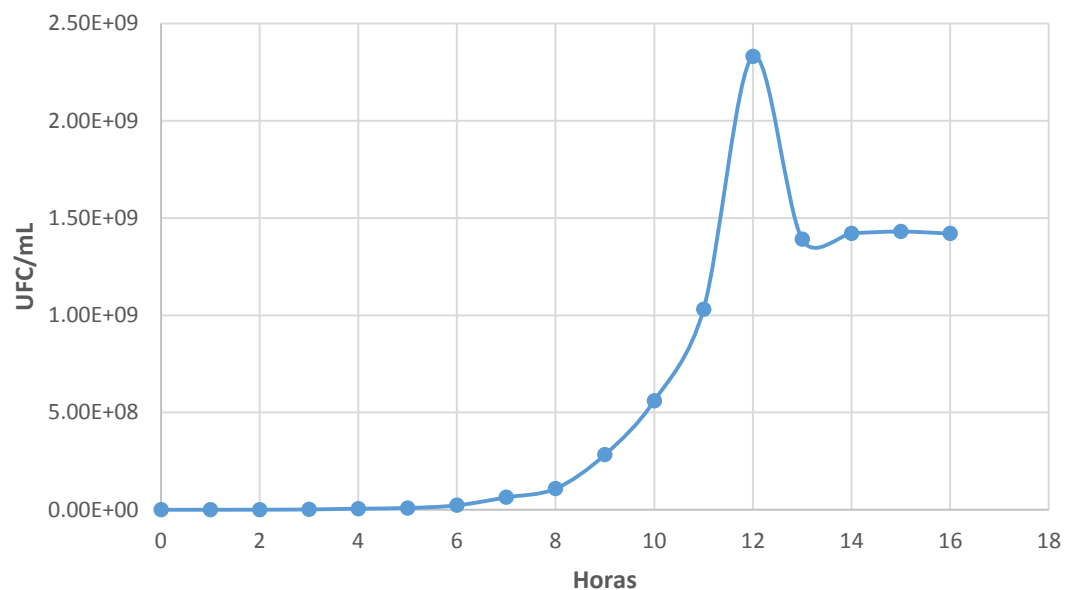
La cepa de *Listeria monocytogenes* PCB 93 fue seleccionada para los ensayos realizados en esta investigación debido a la alta sensibilidad mostrada en la pruebas de goteo frente al filtrado fágico de aguas servidas de camales de la ciudad de Lima (figura 1).



**Figura 1.** Enfrentamiento por el método de goteo de *L. monocytogenes* PCB 93 frente al filtrado fágico de aguas servidas de camales de la ciudad de Lima. Las flechas indican las zonas de aclaramiento. OA: filtrado original A; FRB: filtrado frasco B; FR0410: filtrado 04 de octubre; 1809B: filtrado 18 de setiembre B; FARPL: filtrado a partir de placas de lisis.

### 5.3. Curva de crecimiento de *Listeria monocytogenes*

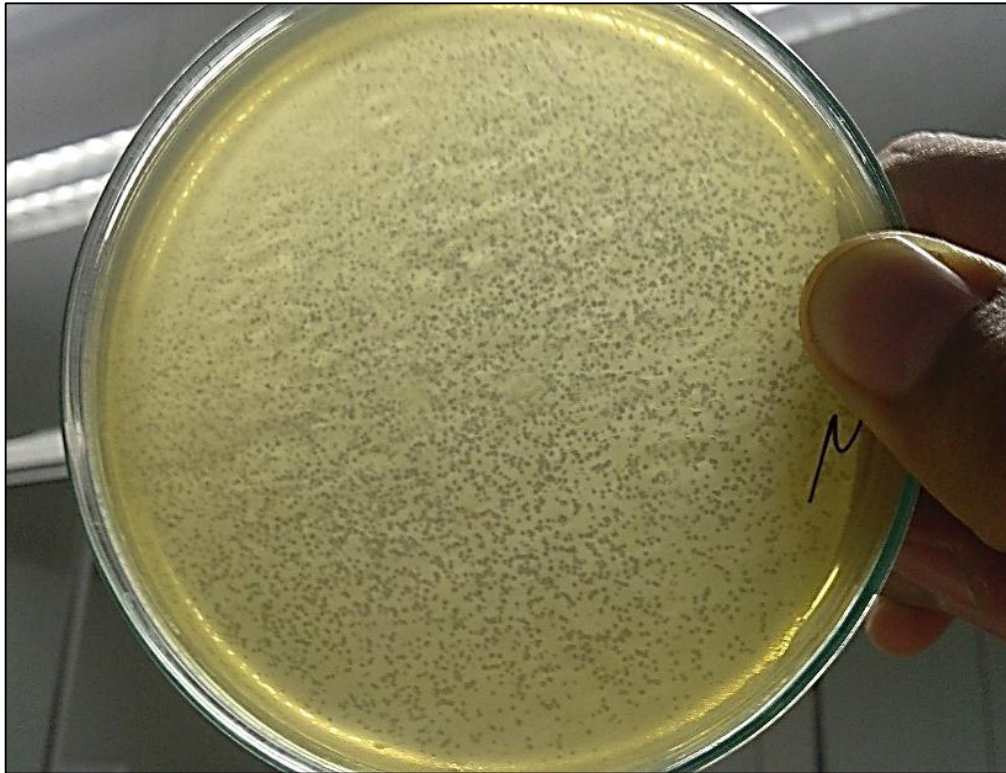
La curva de crecimiento fue desarrollada para *L. monocytogenes* PCB 93 con la finalidad de conocer el tiempo que tarda en alcanza la fase de crecimiento logarítmico, pues es un dato valioso para los ensayos posteriores. La cepa alcanzó la fase de crecimiento logarítmico a partir de las 8 horas de incubación, logrando un máximo de  $2.33 \times 10^9$  UFC/mL a las 12 horas (Figura 2).



**Figura 2.** Curva de crecimiento de *L. monocytogenes* PCB 93.

### 5.4. Aislamiento, propagación y selección de bacteriófagos

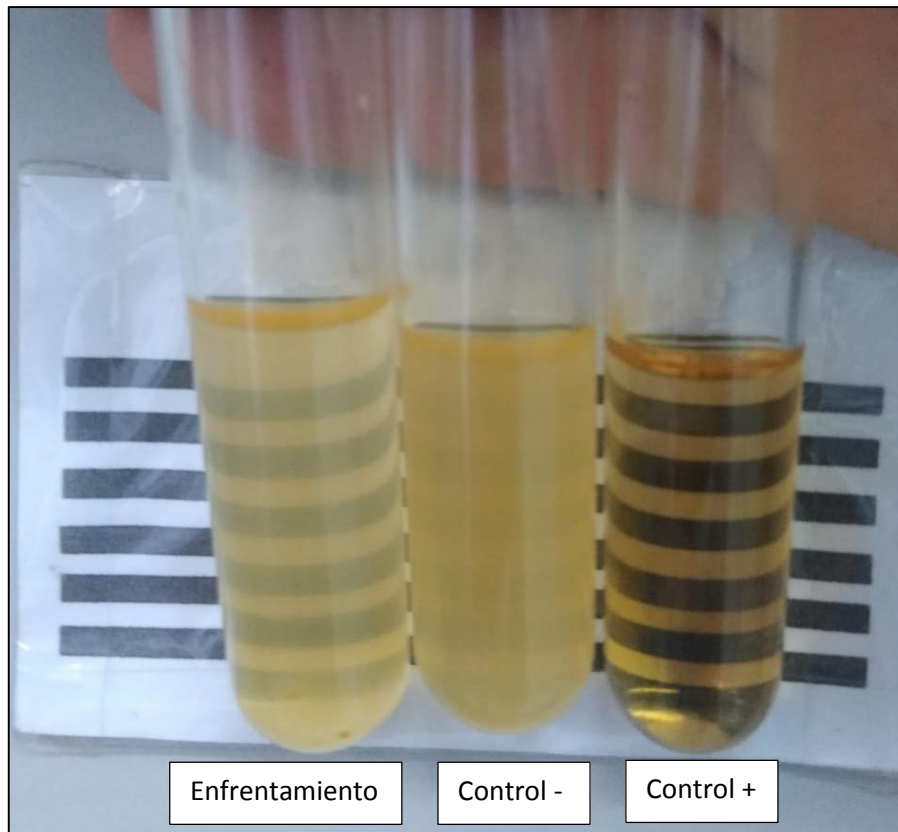
A partir de los ensayos de propagación de los bacteriófagos presentes en el filtrado de aguas servidas de camales de la ciudad de Lima, se seleccionó y aisló el bacteriófago ASCF1 por ser el que originó mayor número de placas de lisis, todas del mismo tamaño (Figura 3). La propagación fue llevada a cabo utilizando a *L. monocytogenes* PCB 93 como célula hospedera.



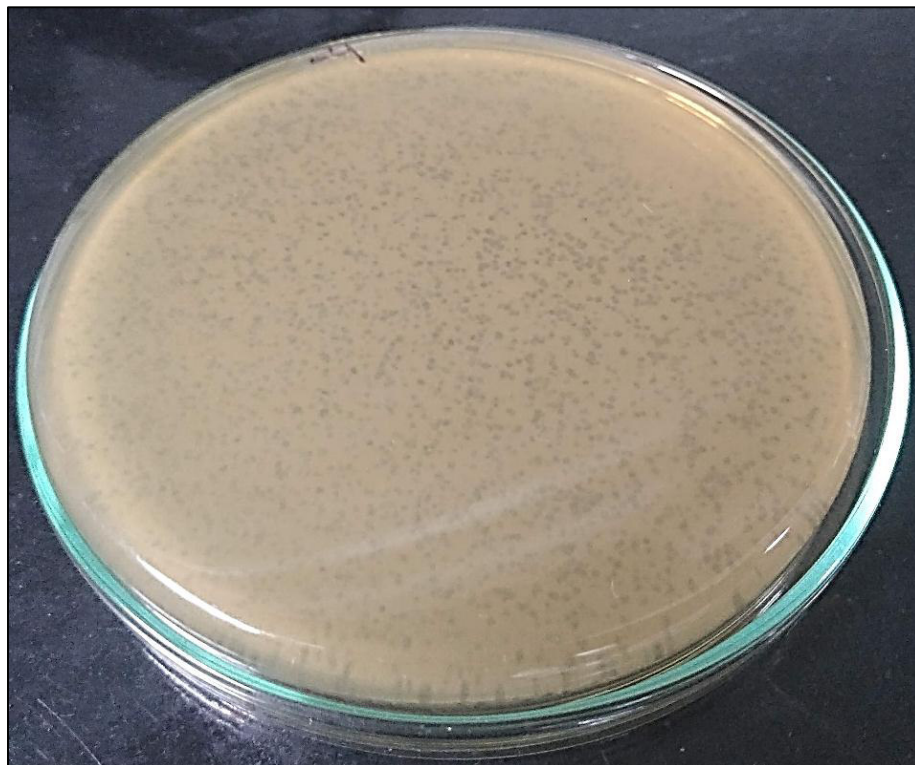
**Figura 3.** Enfrentamiento del filtrado fágico de aguas servidas de camales de la ciudad de Lima y *L. monocytogenes* PCB 93.

### **5.5. Purificación, amplificación y cálculo de la concentración de bacteriófagos**

Con la finalidad de asegurar que se cuenta con un solo tipo de fago, las placas de lisis formadas por el fago ASCF1 fueron purificadas y, posteriormente, se aumentó la concentración del bacteriófago mediante ensayos de amplificación (Figura 4). Las placas de lisis formadas por el fago ASCF1 tienen en promedio un diámetro de 0.0446 milímetros, a simple vista tienen borde regular y son totalmente translúcidas (figura 5 y 6). Después de los ensayos de amplificación se obtuvo una concentración de partículas virales de  $4.07 \times 10^{11}$  UFP/mL.

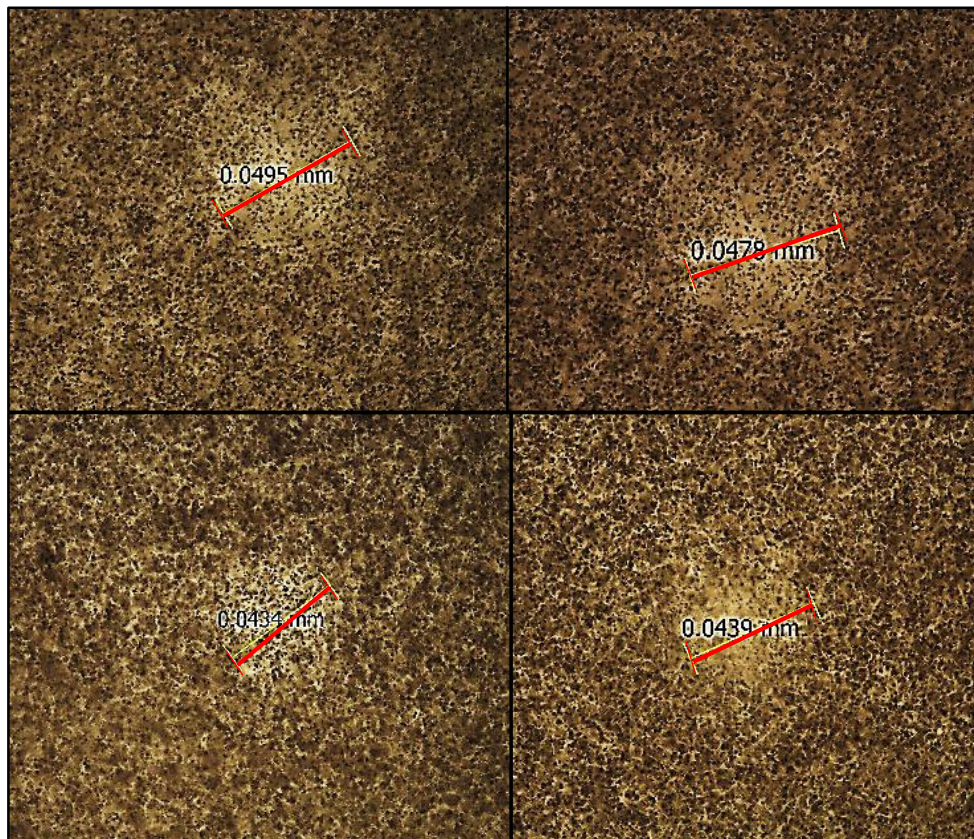


**Figura 4.** Aclaramiento del caldo de cultivo en los ensayos de amplificación del fago ASCF1.



**Figura 5.** Placas de lisis formadas por el fago ASCF1.





**Figura 6.** Placas de lisis formadas por el fago ASCF1 vistas al microscopio (400X).

### 5.6.1. Termoestabilidad

El bacteriófago ASCF1 mostró estabilidad a las cuatro temperaturas evaluadas: 4°C, 24°C, 25°C y 45°C. La concentración inicial de bacteriófagos fue de  $1.07 \times 10^{14}$  UFP/mL y no se observó una reducción significativa durante los 60 minutos de evaluación.

En la tabla 3, se observa un p-valor de 0.000006 ( $p < 0.05$ ), siendo significativo hasta un nivel de significancia de 0.001, por lo que se asume que al menos una media de los recuentos de cada temperatura es diferente al resto. La tabla 4 resume la comparación múltiple de medias, en la cual los experimentos que se encuentran en el mismo subconjunto (1 o 2) no presentan diferencias significativas (son estadísticamente iguales), por lo tanto los experimentos que ejercen efectos estadísticamente iguales son a las temperaturas de 24°C y 35°C, que mostraron una reducción en la concentración de fagos durante los 10 primeros minutos de

evaluación y a partir de los 30 minutos, la concentración de partículas virales se mantuvo constante hasta el final del experimento. A los 60 minutos la concentración de bacteriófagos fue de  $9.10 \times 10^{12}$  UFP/mL a 24°C y  $3.77 \times 10^{13}$  UFP/mL a 35°C (Figura 7).

Por otro lado los experimentos a temperaturas de 4°C y 45°C también ejercen un efecto estadísticamente igual sobre el crecimiento del bacteriófago ASCF1, ambos tratamientos mostraron menor variación en su concentración a lo largo del experimento, manteniendo la concentración de partículas virales en la misma escala logarítmica al inicio y al final del experimento del experimento (figura 8). Además en los tratamientos de 4°C y 45°C se observó mayor concentración del bacteriófago ASCF1 ( $10.8143 \times 10^{13}$  UFP/mL y  $10.8714 \times 10^{13}$  UFP/mL en promedio respectivamente).

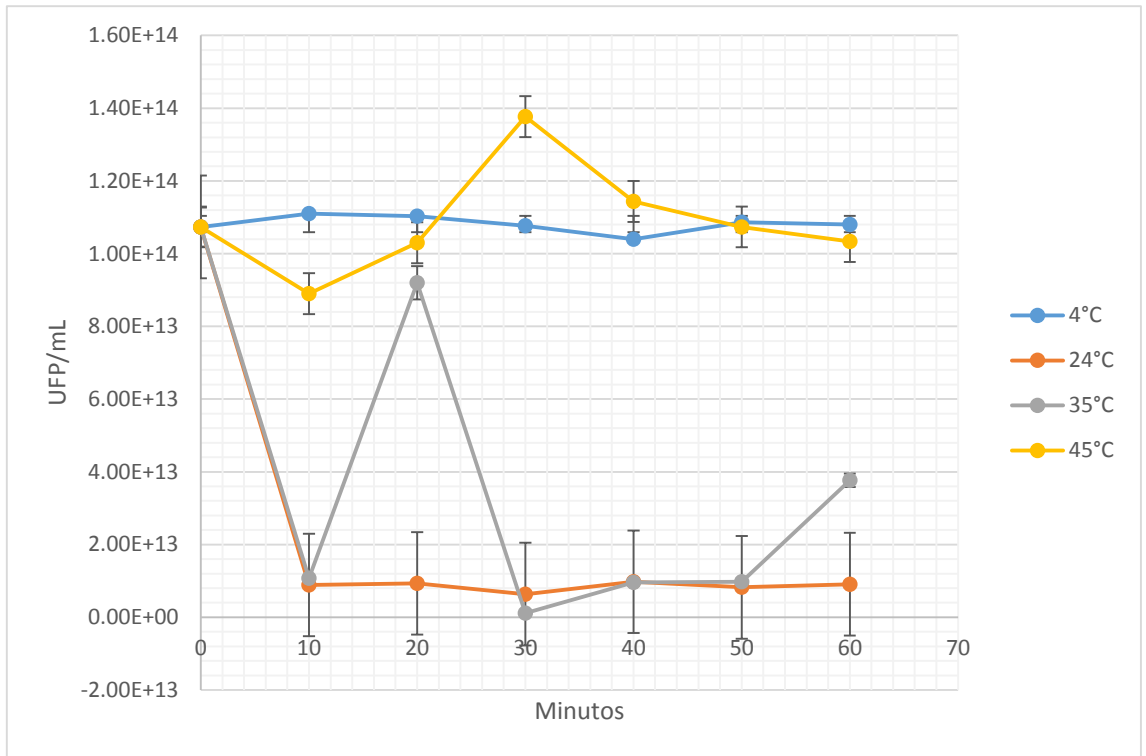
**Tabla 3.** ANOVA de los datos del experimento de termoestabilidad.

| Origen                 | Tipo III de suma de cuadrados | gl | Cuadrático promedio | F      | Sig.            |
|------------------------|-------------------------------|----|---------------------|--------|-----------------|
| <b>Experimentos</b>    | 433.979                       | 3  | 144.660             | 19.859 | <b>0.000006</b> |
| <b>Bloques</b>         | 79.573                        | 6  | 13.262              | 1.821  | 0.151           |
| <b>Error</b>           | 131.116                       | 18 | 7.284               |        |                 |
| <b>Total corregido</b> | 644.667                       | 27 |                     |        |                 |

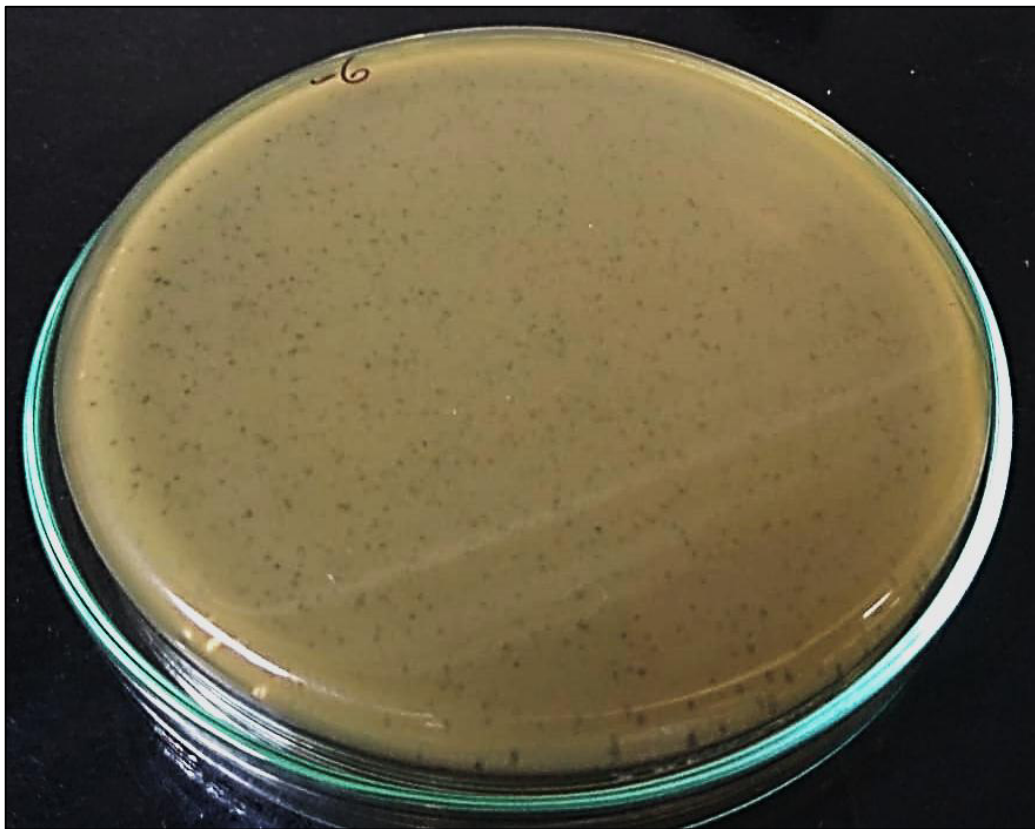
**Tabla 4.** Prueba de Tukey HSD de las medias del experimento de termoestabilidad.

| Experimentos | N | Subconjunto |         |
|--------------|---|-------------|---------|
|              |   | 1           | 2       |
| 24 °C        | 7 | 2.2671      |         |
| 35 °C        | 7 | 3.8263      |         |
| 4 °C         | 7 |             | 10.8143 |
| 45 °C        | 7 |             | 10.8714 |
| Sig.         |   | .705        | 1.000   |





**Figura 7.** Efecto de la temperatura sobre la concentración del bacteriófago ASCF1.



**Figura 8.** Placas de lisis formadas por el bacteriófago ASCF1 a 45°C.

### 5.6.2. Resistencia a la acidez y alcalinidad

El bacteriófago ASCF1 mostró tolerancia tanto al medio ácido como al medio alcalino (Figura 9). Se tomó como control del experimento la suspensión de bacteriófagos incubada a pH 7 con una concentración de  $6.7 \times 10^{11}$  UFP/mL (Figura 10). En la tabla 5, se observa un p-valor de 2.8245E-12 ( $p < 0.05$ ), siendo significativo hasta un nivel de significancia de 0.001, por lo que se asume que al menos una media de los recuentos de cada pH es diferente al resto.

La tabla 6 resume la comparación múltiple de medias, en la cual los experimentos que se encuentran en el mismo subconjunto (1, 2 o 3) no presentan diferencias significativas (son estadísticamente iguales), por lo tanto los experimentos que ejercen efectos estadísticamente iguales son a pH 4 y pH 5, donde se observó una ligera reducción en la concentración de partículas virales a comparación de la suspensión control, siendo  $6.83 \times 10^{10}$  UFP/mL a pH 4 y  $8.87 \times 10^{10}$  UFP/mL a pH 5 después de 1 hora de incubación.

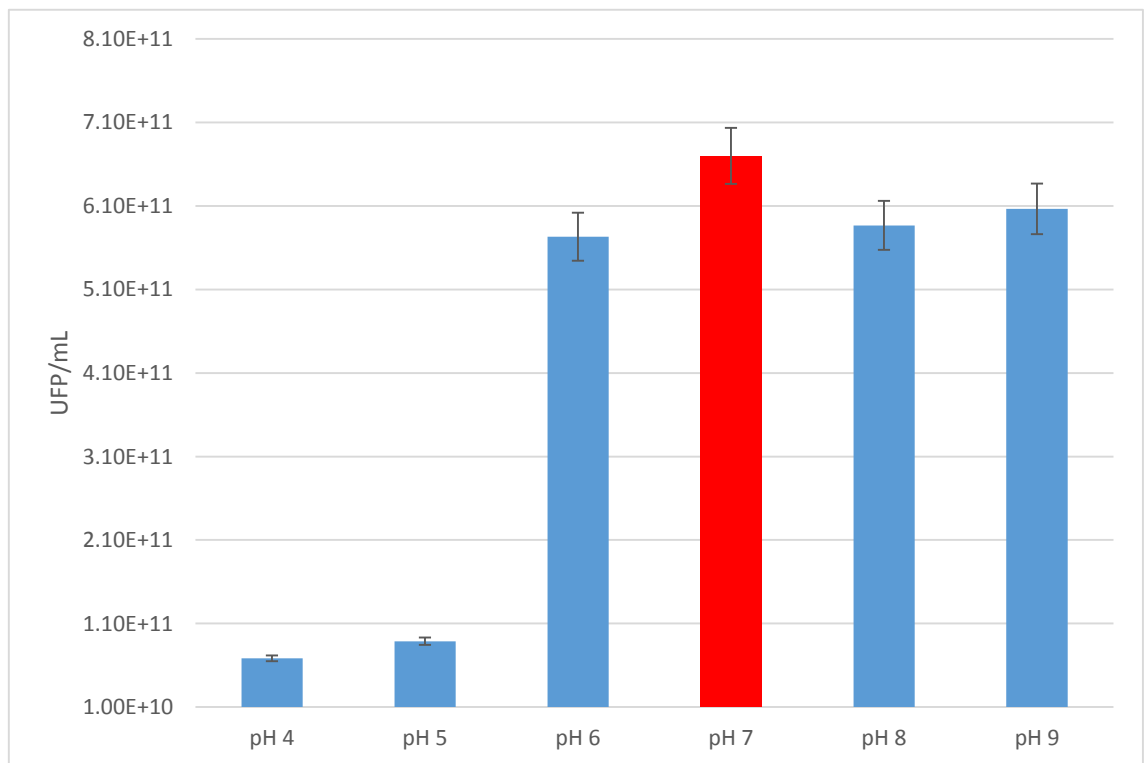
En el subconjunto 2 podemos observar que los experimentos a pH 6, pH 8 y pH 9 también ejercen efectos estadísticamente iguales, pues las concentraciones de fagos se mantuvieron en la misma escala logarítmica que la suspensión control después de 1 hora de incubación. Por otro lado, en el experimento a pH 9 se observó mayor concentración del bacteriófago ASCF1 ( $6.0667 \times 10^{11}$  UFP/mL en promedio). Estos experimentos no mostraron diferencias estadísticas entre ellos.

**Tabla 5.** ANOVA de los datos del experimento de resistencia a la acidez y alcalinidad.

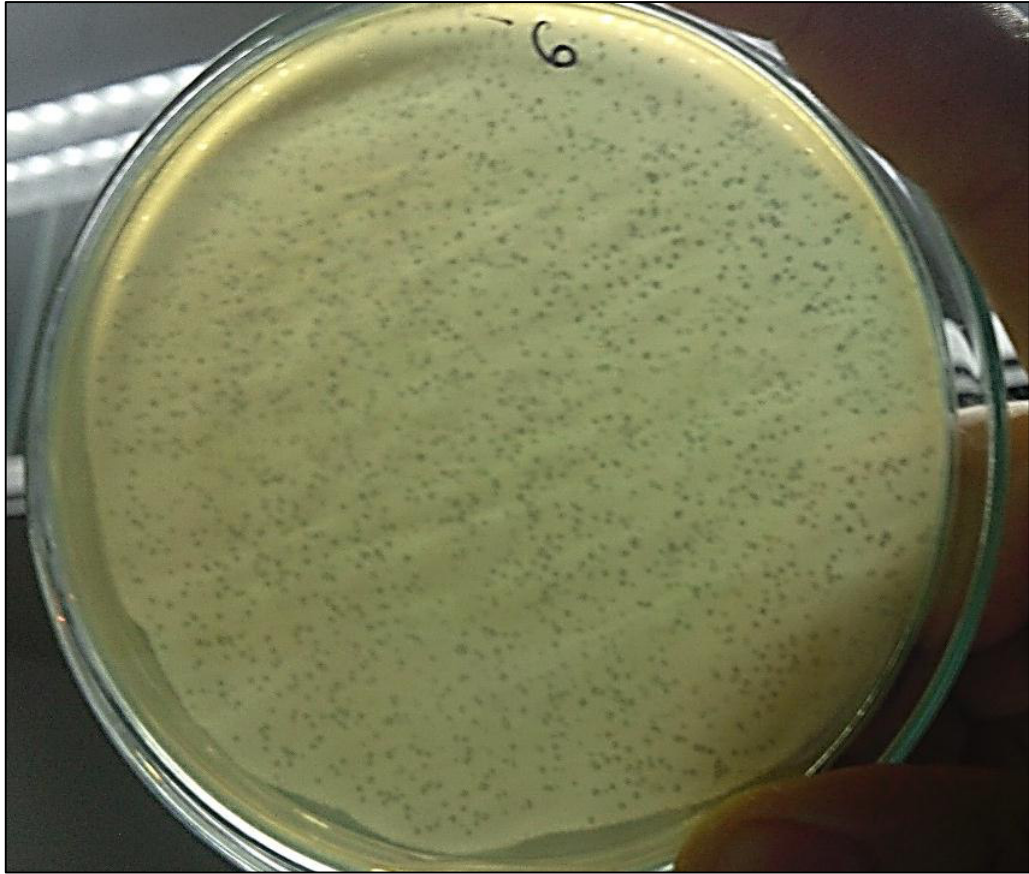
| Origen          | Tipo III de suma de cuadrados | gl | Cuadrático promedio | F       | Sig.              |
|-----------------|-------------------------------|----|---------------------|---------|-------------------|
| Experimentos    | 114.354                       | 5  | 22.871              | 312.894 | <b>2.8245E-12</b> |
| Error           | 0.877                         | 12 | 0.073               |         |                   |
| Total corregido | 115.231                       | 17 |                     |         |                   |

**Tabla 6.** Prueba de Tukey HSD de las medias del experimento de resistencia a la acidez y alcalinidad.

| Experimentos | N | Subconjunto |        |        |
|--------------|---|-------------|--------|--------|
|              |   | 1           | 2      | 3      |
| pH=4         | 3 | 0.6833      |        |        |
| pH=5         | 3 | 0.8867      |        |        |
| pH=6         | 3 |             | 5.7333 |        |
| pH=8         | 3 |             | 5.8667 |        |
| pH=9         | 3 |             | 6.0667 | 6.0667 |
| pH=7         | 3 |             |        | 6.7000 |
| Sig.         |   | 0.933       | 0.665  | 0.112  |



**Figura 9.** Efecto del pH sobre la concentración del bacteriófago ASCF1. La suspensión control a pH 7 se observa en rojo.



**Figura 10.** Placas de lisis formadas por el bacteriófago ASCF1 a pH 7.

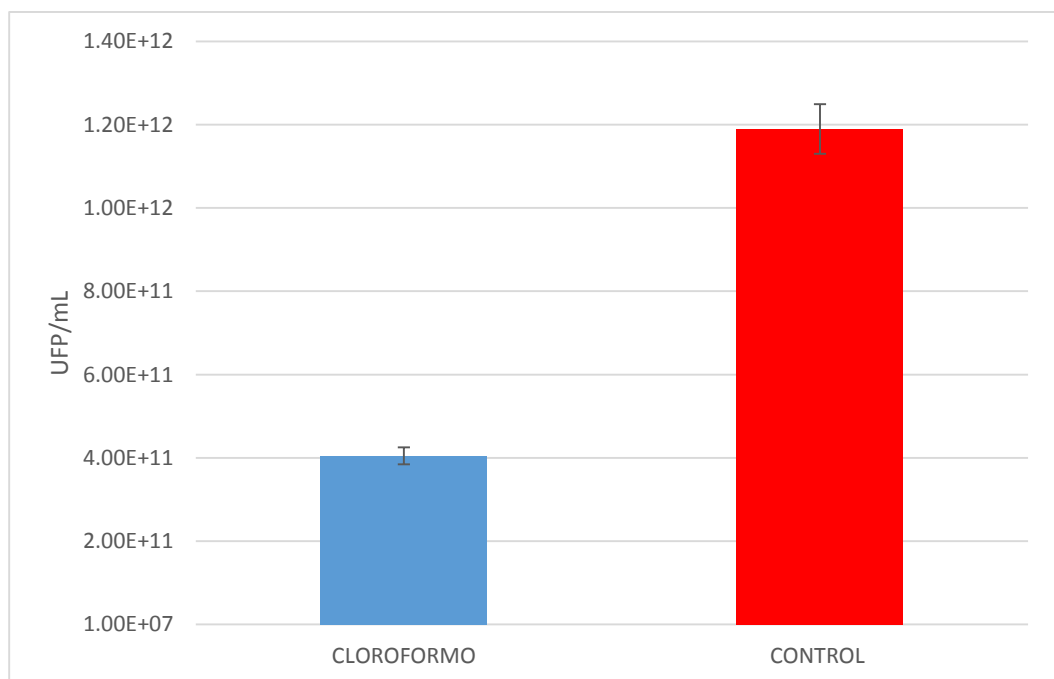
### **5.6.3. Resistencia al cloroformo**

La suspensión de bacteriófagos ASCF1 mostró sensibilidad al cloroformo después de 1 hora de exposición a este compuesto químico. En la tabla 7 se observa un p-valor de 0.008 ( $p < 0.05$ ), siendo significativo hasta un nivel de significancia de 0.01. Eso indica que la concentración del bacteriófago ASCF1 fue significativamente menor al exponerse al cloroformo  $4.05 \times 10^{11}$  UFP/mL (Figura 12) que en el control (solución salina).

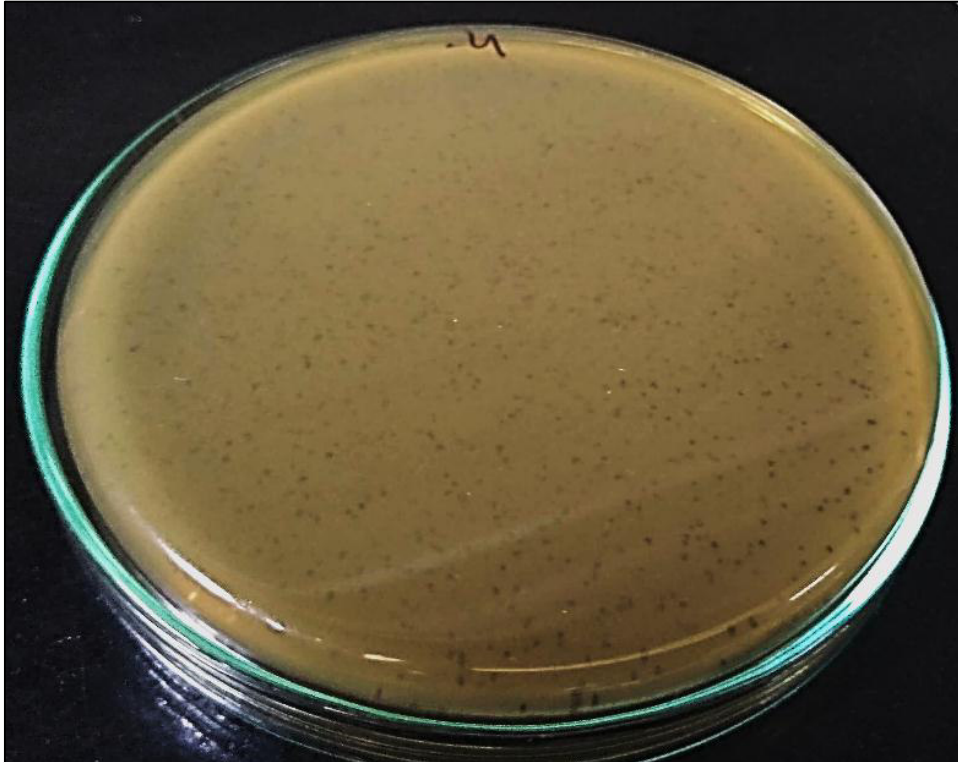
Se observó una reducción de 1 escala logarítmica en el recuento de la suspensión fágica que fue expuesta al cloroformo en comparación con la suspensión fágica control (Figura 11).

**Tabla 7.** Prueba t de Welch de los datos del experimento de resistencia al cloroformo.

|       |   | Prueba de Levene de<br>calidad de varianzas |                         | prueba t para la igualdad de medias |        |                     |                         |                                    |  |          |
|-------|---|---|-------------------------|-------------------------------------|--------|---------------------|-------------------------|------------------------------------|--|----------|
| Datos |   | F   | Sig.                    | t                                   | gl     | Sig.<br>(bilateral) | Diferencia<br>de medias | Diferencia<br>de error<br>estándar | 95% de intervalo de<br>confianza de la<br>diferencia |          |
|       |   |   |                         |                                     |        |                     |                         |                                    | Inferior   | Superior |
|       |   | <b>Se asumen<br/>varianzas iguales</b>      | 2707778946<br>59960.220 | 0.000                               | 11.670 | 2                   | 0.007                   | 0.78500                            | 0.06727  | 0.49557  |
|       | <b>No se asumen<br/>varianzas iguales</b> |   |                         | 11.670                              | 1.978  | <b>0.008</b>        | 0.78500                 | 0.06727                            | 0.49249  | 1.07751  |



**Figura 11.** Efecto del cloroformo sobre la concentración del bacteriófago ASCF1.



**Figura 12.** Placas de lisis formadas por el bacteriófago ASCF1 después de 1 hora de exposición al cloroformo.

## **5.7. Caracterización biológica de los bacteriófagos**

### **5.7.1. Rango de hospedero**

Se determinó el rango de hospedero para el bacteriófago ASCF1 mediante la técnica de goteo y los resultados se clasificaron según la intensidad del aclaramiento de la zona donde cayó la gota de suspensión de fagos.

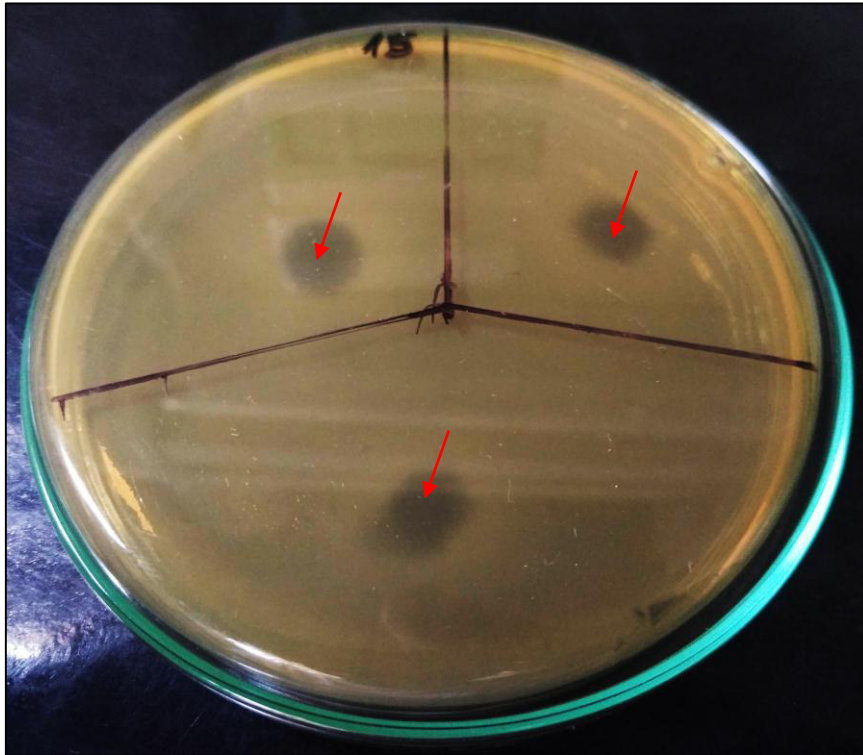
Los resultados del ensayo de rango de hospedero se resumen en la tabla 8. Se determinó la sensibilidad positiva de una cepa de *Listeria monocytogenes* procedente de aguas servidas de camales de la ciudad de Lima y de la cepa de *Listeria monocytogenes* ATCC 19115 (Figura 13). Las cepas de *Vibrio cholerae* ATCC "G" y *Salmonella typhimurium* ATCC 19028 mostraron sensibilidad positiva en menor grado (Figura 14 y 15). Todas las cepas restantes fueron resistentes al fago ASCF1 (Figura 16).

**Tabla 8.** Sensibilidad de las cepas bacterianas frente al fago ACSF1 mediante la técnica de goteo.

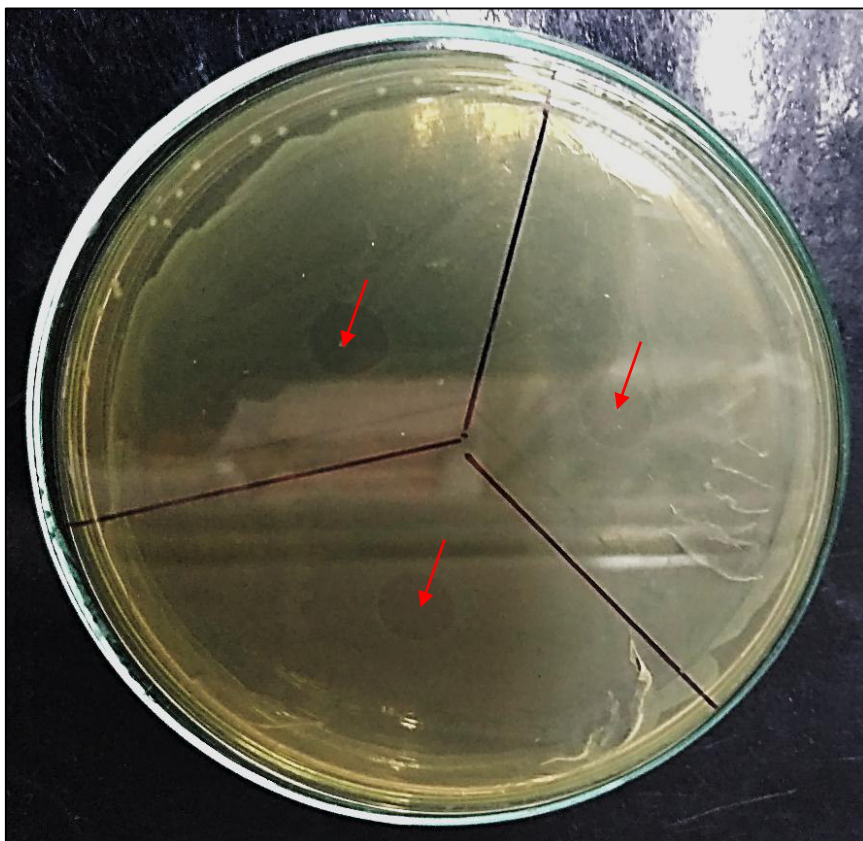
| <b>CODIGO</b> | <b>CEPA</b>                              | <b>SENSIBILIDAD</b> |
|---------------|--|---------------------|
| PCB 93        | <i>Listeria monocytogenes</i>            | (+++)               |
| PCB 94        | <i>Listeria monocytogenes</i>            | (-)                 |
| PCB 95        | <i>Listeria monocytogenes</i>            | (-)                 |
| PCB 96        | <i>Listeria monocytogenes</i>            | (-)                 |
| PCB 102       | <i>Listeria monocytogenes</i>            | (-)                 |
| PCB 159       | <i>Listeria monocytogenes</i>            | (-)                 |
| PCB 160       | <i>Listeria monocytogenes</i>            | (-)                 |
| PCB 162       | <i>Listeria monocytogenes</i>            | (-)                 |
| PCB 163       | <i>Listeria monocytogenes</i>            | (-)                 |
| PCB 165       | <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19115 | (+++)               |
| PCB 156       | <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15114 | (-)                 |
| PCB 31        | <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 19028 | (+)                 |
| PCB 33        | <i>Salmonella choleraesuis</i> ATCC      | (-)                 |
| PCB 137       | <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922       | (-)                 |
| S7B19         | <i>Proteus vulgaris</i> ATCC 6380        | (-)                 |
| S7B90         | <i>Escherichia coli</i> ATCC A           | (-)                 |
| S7B108        | <i>Escherichia coli</i> ATCC 25022       | (-)                 |
| S7B106        | <i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048 | (-)                 |
| S7B111        | <i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 12048 | (-)                 |
| S7B115        | <i>Escherichia coli</i> ATCC 25322       | (-)                 |
| S7B117        | <i>Escherichia coli</i> ATCC 13706       | (-)                 |
| S7B164        | <i>Vibrio cholerae</i> ATCC "G"          | (++)                |

+++ : muy sensible; ++ : sensible; + : poco sensible; - : resistente



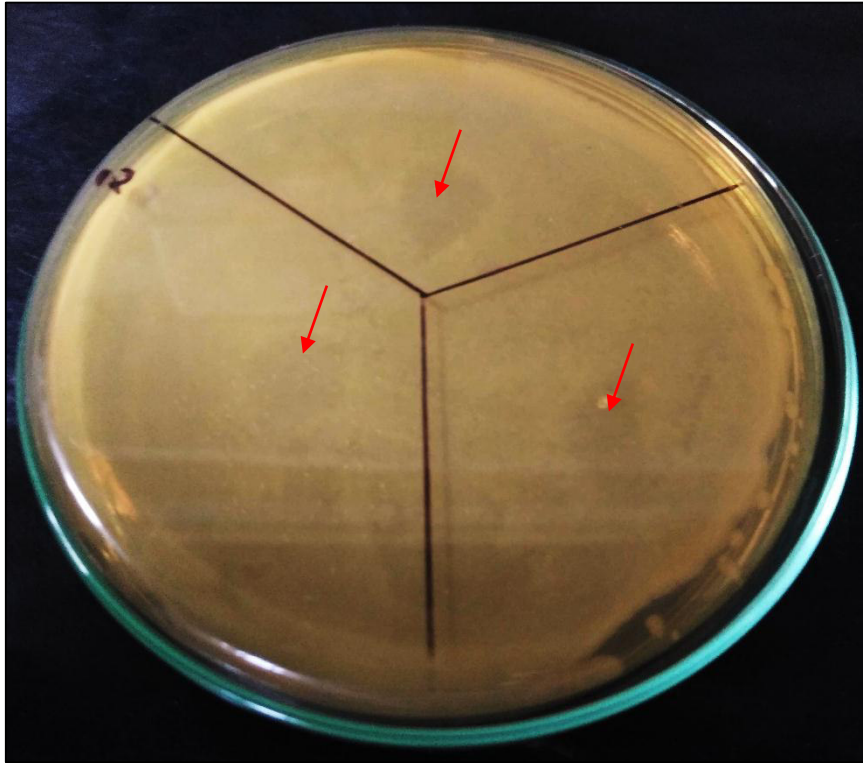


**Figura 13.** *Listeria monocytogenes* ATCC 19115 sensible (+++) al bacteriófago ASCF1.

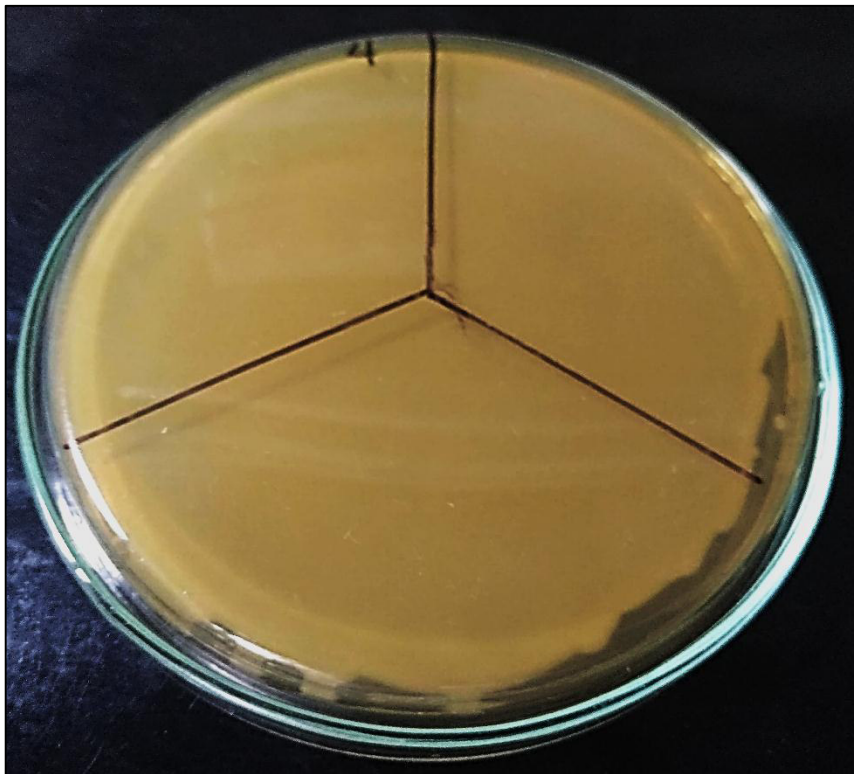


**Figura 14.** *Vibrio cholerae* ATCC "G" sensible (++) al bacteriófago ASCF1.





**Figura 15.** *Salmonella typhimurium* ATCC 19028 sensible (+) al bacteriófago ASCF1.



**Figura 16.** *Escherichia coli* ATCC 25922 resistente al bacteriófago ASCF1.

### 5.7.2. Cálculo de la Multiplicidad de infección (MOI)

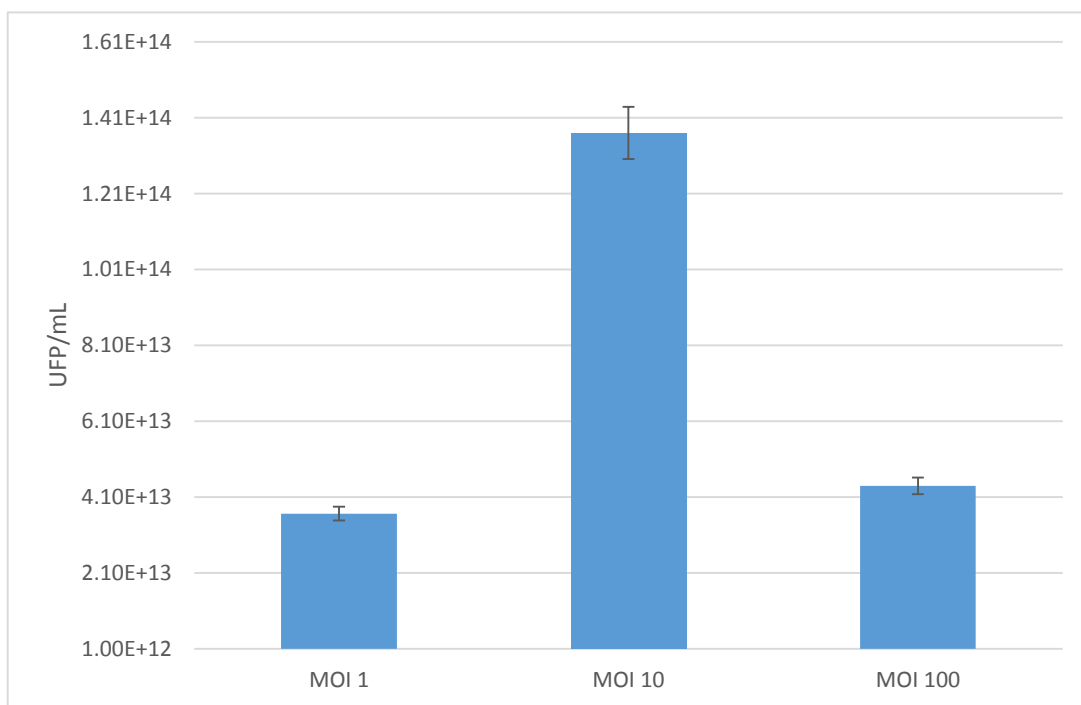
Para la determinación de la multiplicidad de infección (MOI) óptima del bacteriófago ASCF1, se utilizó una concentración inicial de fago de  $4.07 \times 10^{11}$  UFP/mL. Se observó un aumento en la concentración de partículas virales en las tres MOI evaluadas (1, 10, 100). En la tabla 9, se observa un p-valor de 0.000006 ( $p < 0.05$ ), siendo significativo hasta un nivel de significancia de 0.001, por lo que se asume que al menos una media de los recuentos de los experimentos para el cálculo de la MOI óptima es diferente al resto. La tabla 10 resume la comparación múltiple de medias, en la cual los experimentos que se encuentran en el mismo subconjunto (1 o 2) no presentan diferencias significativas (son estadísticamente iguales), los experimentos que ejercen efectos estadísticamente iguales son MOI 1 y MOI 100. Siendo el experimento de MOI 10 donde se observó mayor concentración viral ( $1.37 \times 10^{14}$  UFP/mL). Por lo tanto La MOI óptima para el bacteriófago ASCF1 fue de 10. Los resultados del ensayo de cálculo de la Multiplicidad de Infección (MOI) se resumen en la figura 17.

**Tabla 9.** ANOVA de los datos del experimento de cálculo de MOI óptima.

|                         | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F       | Sig.            |
|-------------------------|-------------------|----|------------------|---------|-----------------|
| <b>Entre grupos</b>     | 1.877             | 2  | 0.938            | 159.665 | <b>0.000006</b> |
| <b>Dentro de grupos</b> | 0.035             | 6  | 0.006            |         |                 |
| <b>Total</b>            | 1.912             | 8  |                  |         |                 |

**Tabla 10.** Prueba de Tukey HSD de las medias según tratamientos MOI.

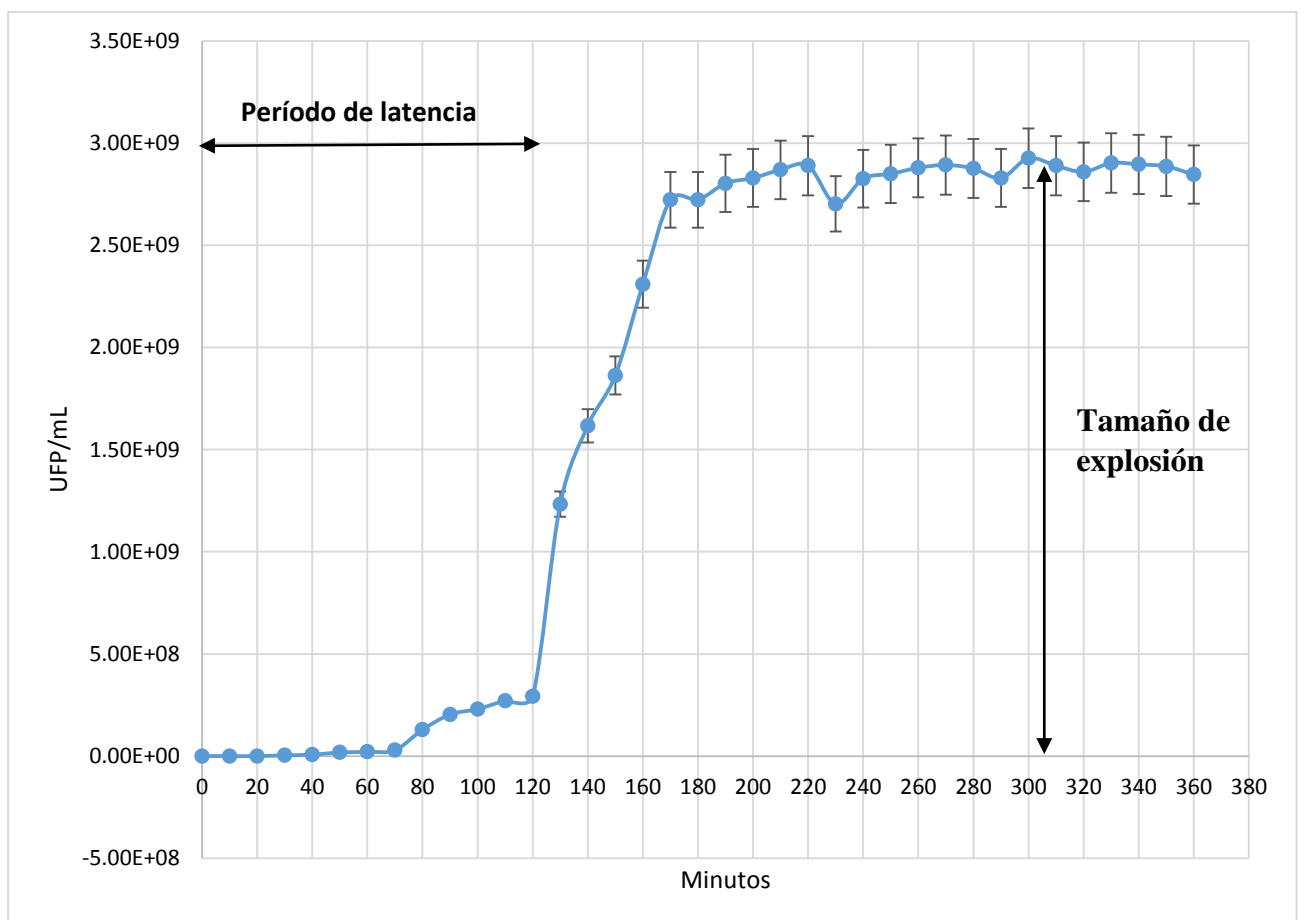
| Experimentos | N | Subconjunto para alfa = 0.05 |        |
|--------------|---|------------------------------|--------|
|              |   | 1                            | 2      |
| MOI 1        | 3 | 0.3667                       |        |
| MOI 100      | 3 | 0.4400                       |        |
| MOI 10       | 3 |                              | 1.3700 |
| Sig.         |   | .510                         | 1.000  |



**Figura 17.** Ensayo de cálculo de la Multiplicidad de Infección (MOI) optima.

### 5.7.3. Curva de crecimiento de un paso

La figura 18 describe el desarrollo del número de unidades formadoras de placa (UFP/mL) en función al tiempo (minutos) durante la curva de crecimiento de un paso del bacteriófago ASCF1. Se observa un aumento en el número de fagos a partir del minuto 120 alcanzando el máximo número de fagos en el minuto 300, el período de latencia fue de 120 minutos y el promedio del tamaño de explosión fue de 9.72 unidades formadoras de placa (UFP) por célula infectada.



**Figura 18.** Curva de crecimiento de un paso del bacteriófago ASCF1.

## VI. DISCUSIÓN

La mejor fuente para aislar cepas bacterianas patógenas son las aguas servidas (Sundar et al., 2009), así que, esta es la misma fuente donde encontraremos bacteriófagos específicos para dichas bacterias. De las 9 cepas de *Listeria monocytogenes* aisladas de aguas servidas de camales de la ciudad de Lima, la cepa PCB 93 fue la única sensible al bacteriófago ASCF1, por lo que esta fue la cepa elegida para el aislamiento y caracterización del fago. Después de un primer enfrentamiento entre el fago y la bacteria, se procedió a propagar dicho fago en medio sólido hasta obtener placas de lisis aisladas, se observó placas de lisis con características diferentes, tales como: diámetro, tipo de borde y translucidez. Esta diversidad de placas de lisis nos indica que es posible que exista, en estos filtrados iniciales, una gran variedad de fagos con la capacidad de lisar no solo cepas de *L. monocytogenes*, sino también otras bacterias presentes en aguas servidas como: *E. coli* y otros microorganismos de géneros como *Salmonella* sp., *Shigella* sp., *Enterococcus* sp. *Enterobacter* sp. y *Vibrio* sp (Sundar et al., 2009). Al obtener placas de lisis uniformes se observó que el bacteriófago ASCF1 formó placas de lisis con un promedio de diámetro de 0.0446 mm, a simple vista tienen borde regular y son totalmente translúcidas. Existen reportes en los que el diámetro de las placas de lisis suelen medir entre 1.0 mm a 8 mm (Meza, 2016), las placas de lisis formadas por el fago ASCF1 son particularmente pequeñas encontrándose por debajo del rango característico de la interacción fago – bacteria y podría estar relacionado con las condiciones fisiológicas de *L. monocytogenes*. Sin embargo, después de varios ensayos sucesivos de amplificación (aumento de la concentración de partículas virales), se obtuvo una concentración final de  $4.07 \times 10^{11}$  UFP/mL. Esta concentración de bacteriófagos puede considerarse alta, ya que, por lo general las concentraciones de fagos aislados de aguas servidas se encuentran en el rango de  $10^8$  UFP/mL y  $10^{10}$  UFP/mL.

El bacteriófago ASCF1 fue sometido a diferentes temperaturas (4°C, 24°C, 35°C y 45°C), que corresponden al rango de temperatura de crecimiento de *Listeria monocytogenes* (desde 4°C hasta 45°C). Los resultados indican que el fago ASCF1 es estable a las temperaturas evaluadas, y por lo tanto su capacidad infectiva no se ve disminuida por influencia de la temperatura en la que su célula hospedera se pudiera encontrar, lo que coincide con los resultados obtenidos por Arachchi (2013), quien evaluó la efectividad de tres bacteriófagos líticos (LiMN4L, LiMN4p y LiMN17) frente a *Listeria monocytogenes* bajo condiciones similares a las que se encuentran en ambientes de procesamiento de alimentos de origen marino, los tres fagos provocaron la lisis de las cepas de *L. monocytogenes* a 15°C pero mostraron inestabilidad a los 60°C. Del mismo modo, Lee et al., (2017) evaluaron el efecto lítico de los bacteriófagos de *Listeria*, LMP1 y LMP7, estos bacteriófagos fueron capaces de inhibir el crecimiento de cepas de *L. monocytogenes* a 4°C, 10°C y 30°C. Los bacteriófagos están adaptados a sus hospederos, por lo tanto son estables a temperaturas cercanas a la temperatura óptima de su hospedero, temperaturas de 70°C y 80°C inactivan a los fagos que tienen como hospedero a bacterias mesófilas, mientras que existen fagos como ΦYS40 que son menos estables a temperaturas menores a 55°C y mayores a 78°C, esto se debe a que su hospedero *Thermus thermophilus* es una bacteria termófila y su temperatura óptima de crecimiento es de 65°C (Punil, 2017). Una de las propiedades que contribuyen a que *L. monocytogenes* esté ampliamente distribuida en ambiente de producción y almacenamiento de alimentos, es que se trata de un microorganismo psicrótrofo, es decir, que puede desarrollarse a baja temperatura (Jay, 1994); el fago ASCF1 mostró ser bastante estable a temperatura de refrigeración (4°C) y al mismo tiempo mostró una alta tolerancia a temperaturas de hasta 45°C sin que su capacidad infectiva se vea afectada. Esto demuestra una buena adaptación del bacteriófago ASCF1 al rango de temperatura de crecimiento de *L. monocytogenes*.

*Listeria monocytogenes* tiene una alta incidencia en productos lácteos como quesos y yogurt, esto gracias a su amplio rango de tolerancia al pH (entre 4,1 y 9,6), por lo que, al igual que en el caso de la tolerancia a la temperatura, los bacteriófagos que infecten a esta bacteria deberán también adaptarse para ser capaces de infectar a su célula hospedera en este rango de pH. El fago ASCF1 no mostró disminución significativa en su concentración después de ser incubado durante 60 minutos tanto a pH ácido (4, 5, 6) y a pH alcalino (8 y 9), demostrando, una vez más, una buena adaptación a las condiciones de crecimiento de su célula hospedera. Sin embargo, las condiciones ambientales, y su efecto sobre la fisiología celular, pueden afectar la eficacia de las estrategias de detección y control de patógenos bacterianos transmitidos por los alimentos; se ha demostrado que los ensayos de detección que involucran reacciones con la superficie del patógeno como los sistemas basados en anticuerpos, varían en eficacia cuando *L. monocytogenes*, está expuesta a diferentes condiciones, del mismo modo, la eficiencia de algunos desinfectantes se ve afectada por las condiciones de crecimiento que influyen en la carga superficial y la hidrofobicidad de *L. monocytogenes* (Denes y Wiedmann, 2014). La acidez del ambiente, tiene un efecto en el éxito del tratamiento con fagos (Strydom y Witthuhn, 2015), por lo que se esperaría que a mayor acidez del medio, haya menor efecto de los fagos sobre *L. monocytogenes*. Estos resultados coinciden con los de Komora et al., (2018) quienes evaluaron la estabilidad de la solución fágica Listex™ P100 combinada con altas presiones hidrostáticas en alimentos con diferentes valores de pH; ellos observaron una mejor actividad del fago P100 a presiones hidrostáticas menores a 300 MPa y que la viabilidad del fago fue dependiente de la matriz donde fue evaluada, pues observaron una acentuada inactivación de los fagos en matrices con pH ácido como el zumo de manzana (pH 3,41) y néctar de naranja/zanahoria (pH 3.54) mientras que los fagos se mantuvieron estables hasta por 28 días en matrices con pH menos ácidos como leche entera UHT (pH 6.73), queso (pH 5.66) y salchicha de carne (pH 6.07). Oliveira et al., (2014) demostraron

que las concentraciones de fagos disminuyen rápidamente en el ambiente ácido del jugo de manzana (pH 3.7) en comparación con el jugo de melón y pera (pH 4.6 a 5.9), además, no observaron efecto de los fagos en rodajas de manzana (pH 4.4), mientras que el tratamiento con fagos en melones y peras (pH mayor a 4.4), redujo el conteo de *L. monocytogenes*.

El bacteriófago ASCF1 fue sensible al cloroformo. Este compuesto químico es utilizado como parte de los tratamientos de esterilización y conservación de fagos; sin embargo, existen fagos cuya envoltura posee lípidos en su estructura, estos fagos son sensibles al cloroformo y la concentración de fagos en una suspensión expuesta a este compuesto puede reducirse significativamente (Chénard et al., 2015; Bonilla et al., 2016). Además, a pesar de que los fagos que poseen cola normalmente no presentan lípidos en la estructura de su envoltura proteica, aproximadamente un tercio de los fagos con cola y ausencia de lípidos son sensibles al cloroformo (Ackermann, 2006).

Las aplicaciones de los bacteriófagos van a depender en gran medida de su rango de hospedero. Los fagos que se usan como agentes terapéuticos en animales o humanos, deben tener un rango de hospedero estrecho, lisando solo a las cepas patogénicas a tratar y no a las cepas no patogénicas, pues de lo contrario, se originaría un desbalance en la microbiota intestinal normal; en cambio aquellos fagos que presenten un amplio rango de hospedero pueden ser usados para la descontaminación de superficies, aditivos alimenticios o en el tratamiento de infecciones superficiales (Punil, 2017). De las 9 cepas de *L. monocytogenes* procedentes de aguas servidas de camales de la ciudad de Lima, el bacteriófago ASCF1 fue capaz de provocar lisis solo a *L. monocytogenes* PCB 93, lo que podría deberse a condiciones fisiológicas particulares de cada cepa (estrés bacteriano, presencia de mecanismos de resistencia o falta de receptores específicos en la superficie celular). Está bien establecido que la estructura y composición de la superficie de la célula bacteriana se encuentra en un estado constante de flujo, el



primer paso de la infección por fagos requiere el reconocimiento de un receptor de superficie específico; sin embargo, no se comprende bien cómo los cambios en la fisiología del hospedero pueden afectar la susceptibilidad de las células a la infección por fagos (May et al., 2013; Denes y Wiedmann, 2014). Aunque aún no se ha definido el efecto de regulación de las condiciones fisiológicas bacterianas en la susceptibilidad de las células a los fagos en las especies Gram positivas, en organismos Gram negativos se ha demostrado que la expresión de las proteínas de superficie que funcionan como receptores de fagos son dependientes de las condiciones fisiológicas bacterianas y afecta la susceptibilidad de las células a la infección por fagos. Por ejemplo, la regulación de la expresión del receptor del fago  $\lambda$ , (LamB) es baja cuando *E. coli* se expone a la señal de *quorum sensing* N-acil-L-homoserina (AHL), lo que resulta en una disminución de la tasa de adsorción del fago y un aumento de la posibilidad de supervivencia de la bacteria durante la incubación con profago  $\lambda$ , del mismo modo, el fago  $\chi$ , que se adsorbe al flagelo, tiene menos eficiencia de adsorción a *E. coli* cuando la bacteria es expuesta a AHL (Høyland-Kroghsbo et al., 2013). El bacteriófago ASCF1 también fue capaz de provocar lisis de una cepa de *L. monocytogenes* de la colección ATCC. Tanto la cepa *Listeria monocytogenes* PBC 93 como la cepa *Listeria monocytogenes* ATCC 19115 mostraron una alta sensibilidad al fago ASCF1. Además las cepas *Vibrio cholerae* ATCC "G" y *Salmonella typhimurium* ATCC 19028 fueron sensible y poco sensible, respectivamente, por lo que podemos deducir que el bacteriófago ASCF1 tiene un amplio rango de hospedero, pues es capaz de provocar lisis a cepas de otros géneros además de *Listeria*, esto se debe, probablemente a la presencia de receptores similares en la superficie de estas bacterias, lo que permite el reconocimiento y la adsorción del fago. Existen fagos que dependen de los plásmidos para su infección, y por lo tanto tienen el potencial de seguir los plásmidos promiscuos entre diferentes géneros bacterianos, en comparación con los fagos para los cuales no se ha demostrado la dependencia del plásmido, por

ejemplo, el fago PRD1 que puede infectar bacterias de los géneros *Acinetobacter*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Salmonella* y *Vibrio* y el fago PR5 que puede infectar a bacterias de los géneros *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Salmonella* y *Serratia*, mientras que los fagos no dependientes de plásmidos son capaces de infectar bacterias Gram negativas en numerosas combinaciones que incluyen, por ejemplo, *Actinobacillus* y *Pasteurella*. (Ackermann y Dubow, 1987). Sin embargo, los autores advierten que la identificación errónea o la clasificación errónea de las bacterias es una preocupación constante en este tipo de estudios.

La sensibilidad de las cepas *Vibrio cholerae* ATCC "G" y *Salmonella typhimurium* ATCC 19028 en la presente investigación fue menor que la sensibilidad de las cepas de *L. monocytogenes*. Estos resultados indican que el bacteriófago ASCF1 podría ser utilizado para la descontaminación de superficies, aditivos alimenticios o en el tratamiento de infecciones superficiales (cutáneas), su efecto se puede potenciar si se aplica en un cóctel junto con fagos específicos de otros géneros, especialmente en el tratamiento de *biofilms* bacterianos, ya que existen investigaciones que indican que los fagos pueden eliminar eficazmente su hospederos en *biofilms* formados por sus hospederos y otras especies bacterianas (Geredew et al., 2019), por ejemplo, Sillankorva et al., (2010) demostraron la eficacia lítica del fago fIBB-SL58B, específico de *S. lentus*, y del fago fIBB-PF7A específico de *P. fluorescens* contra sus células hospederas en el tratamiento de *biofilms* de doble especie formado por *P. fluorescens* y *S. lentus*. Así mismo Kay et al. (2011) respaldaron estos hallazgos, ellos evidenciaron la eficacia de los fagos contra bacterias en *biofilms* de multi especies al evaluar los efectos del fago  $\lambda$ W60, específico de *Escherichia coli*, y del fago PB-1, específico de *Pseudomonas aeruginosa*, en cultivos de *biofilms* de mono y multi especies de *E. coli* y *P. aeruginosa*. Este estudio encontró que los fagos lograron una mayor concentración (UFP/mL) y eliminaron su población bacteriana hospedera de manera más efectiva

en los *biofilms* de multi especies que en los tratamientos de *biofilms* de una sola especie.

La Multiplicidad de Infección (MOI) óptima es aquella que permite obtener un mayor incremento en la concentración de partículas virales tras la propagación (Herrero, 2013). A pesar que la MOI de 1 y la MOI de 100 lograron un incremento en la concentración de partículas virales en 2 órdenes de magnitud, la MOI de 10 logró un incremento de la concentración de fagos de 3 órdenes de magnitud, por lo que 10 es la MOI óptima para el fago ASCF1. Lee et al. (2017), evaluaron MOI de 10 y de 100 para bacteriófagos aislados a partir de heces de gallinas y determinó que a una MOI de 100, el fago LMP1 mostró mejor inhibición que el fago LMP7 contra las cepas de *Listeria monocytogenes* ATCC 19114 y ATCC 7644. El fago LMP1 mostró una reducción de hasta 3 escalas logarítmicas en el conteo de células viables de *L. monocytogenes* ATCC 7644. Por otro lado, Herrero (2013) determinó MOI óptimas de 0,2 y 0,4 para los fagos FWLLm3 y FWLLm1 respectivamente. Cuando se evaluó al fago ASCF1 a MOI menores que 1 fue imposible hacer el recuento de las placas de lisis y se perdió la concentración de partículas virales.

La curva de un paso sirvió para graficar el ciclo lítico del bacteriófago ASCF1 y medir el periodo de latencia y el tamaño de explosión del fago utilizando a *Listeria monocytogenes* PCB 93 como hospedero. El período de latencia del fago ASCF1 fue de 120 minutos a 35°C, muy cerca de los periodos de latencia calculados por Arachchi (2013) para los listeriófagos LiMN4L y LiMN4p, ambos fagos a 35°C tuvieron un periodo de latencia de 130 minutos; a 25°C los listeriófagos LiMN4L, LiMN4p y LiMN17 tuvieron un periodo de latencia de 90 minutos. Loessner et al. (1995) reportaron periodos de latencia similares para los listeriófagos A511 y A118 que fueron de 55 y 65 minutos respectivamente a 30°C. Denes et al. (2015) calcularon los periodos de latencia para el listeriófago LP-048 entre 55 y 60 minutos y entre 50 y 55 minutos para el listeriófago LP-125 ambos a 30°C y son casi la mitad del periodo de latencia del fago ASCF1. Estos resultados, sumados a la estabilidad

del fago ASCF1 a temperaturas menores a los 25°C sugieren que el fago ASCF1 podría tener características psicotróficas y que a menores temperaturas puede presentar un periodo de latencia menor. El tamaño de explosión del bacteriófago ASCF1 fue de 9.72 unidades formadoras de placa por célula infectada, muy cercano a los tamaños de explosión de los listeriófagos LiMN4L y LiMN4p de 5 y 4 unidades formadoras de placa por célula infectada respectivamente a 35°C (Arachchi, 2013). El tamaño de explosión del listeriófago LP-048 es 13.6 unidades formadoras de placa por célula infectada a 30°C, similar al fago ASCF1 pero el tamaño de explosión de listeriofago LP-125 fue mayor (21.3 unidades formadoras de placa por célula infectada) a 30°C (Denes et al., 2015). El amplio periodo de latencia y el bajo tamaño de explosión del fago ASCF1 podrían estar relacionados con las condiciones de crecimiento y el estado fisiológico de la bacteria hospedera tal como lo señala Middelboe (2000), quien reportó una reducción del tamaño de explosión de fagos marinos de *Pseudoalteromonas sp.* Cuando la tasa de dilución del cultivo bacteriano hospedero decrecía así como un efecto sobre el periodo de latencia. Además Kokjohn et al. (1991) observaron una disminución en el tamaño de explosión del fago al enfrentarlo a células hospederas con estrés nutricional y un efecto menos pronunciado en el aumento del periodo de latencia.

## VII. CONCLUSIONES

1. Se logró aislar y caracterizar un bacteriófago lítico de *Listeria monocytogenes*, el fago ASCF1, a partir de filtrados de aguas servidas de camales de la ciudad de Lima, Perú.
2. El bacteriófago ASCF1 alcanzó una concentración de  $4.07 \times 10^{11}$  UFP/mL, su estructura proteica se mantiene estable en un amplio rango de temperaturas (desde 4°C hasta 45°C) y es tolerante a un amplio rango de pH (desde 4 hasta 9), características compatibles con su célula hospedera *Listeria monocytogenes*.
3. El bacteriófago ASCF1 presenta un amplio rango de hospedero, este fago es capaz de provocar la lisis en cepas de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* y *Vibrio cholerae*.
4. El bacteriófago ASCF1 tiene una multiplicidad de infección (MOI) óptima de 10, un periodo de latencia de 120 minutos, un tamaño de explosión promedio de 9.72 unidades formadoras de placa por célula infectada.
5. Debido a sus características biológicas y fisicoquímicas, el bacteriófago ASCF1 puede ser aplicado para la descontaminación de superficies y alimentos.

## VIII. RECOMENDACIONES

1. Visualizar al bacteriófago ASCF1 por microscopía electrónica de transmisión para evaluar la morfología de la cápside.
2. Hacer el análisis genómico del bacteriófago ASCF1 para evaluar la naturaleza del ácido nucleico y el tamaño del genoma viral.
3. Hacer el análisis por técnicas de biología molecular para descartar la presencia de genes de lisogenia y/o genes de resistencia a antibióticos.
4. Evaluar la capacidad del bacteriófago ASCF1 para reducir poblaciones de *Listeria monocytogenes* en alimentos y superficies.

## IX. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ACKERMANN, Hans-W. Classification of bacteriophages. *The bacteriophages*, 2006, vol. 635, p. 8-16.
- ACKERMANN, Hans-W. Frequency of morphological phage descriptions in the year 2000. *Archives of virology*, 2001, vol. 146, n° 5, p. 843-857.
- ACKERMANN, Hans-W., DUBOW, Michael S. *Viruses of Prokaryotes, Vol. I: General Properties of Bacteriophages*. CRC Press. 1ra edición. Boca Raton, FL: H.-W. Ackermann and M. S. DuBow, Eds., 1987. 202 p. ISBN-13: 978-0849360565.
- ADAMS, M. H. *Bacteriophages*. Interscience Publishers. 1959. New York, p 27.
- ALCAYAGA, Sergio; HOTT, Bárbara. *Listeria* y listeriosis: un desafío de los nuevos tiempos. *Revista Chilena de Salud Pública*, 2008, vol. 12, n° 3, p. 188-195.
- ALLEN, Kevin J., et al. *Listeria monocytogenes* – an examination of food chain factors potentially contributing to antimicrobial resistance. *Food Microbiology*, 2016, vol. 54, p. 178-189.
- ARACHCHI GANEGAMA, Geevika J. “A study of natural lytic *Listeria* phages with decontaminating properties for use in seafood processing plants”. Tesis de Doctorado. Massey University, Auckland, New Zealand. 2013.
- CAPITA, R., et al. El pollo como alimento. *Alimentación Equipos y Tecnología*, 1999, vol. 18, p. 101-110.
- CARTER, John B.; SAUNDERS, Venetia A. *Virology: principles and applications*. John Wiley & Sons, 2007.
- CENTURIÓN PUMA, Mabel Susana; TAKAJARA SANTANDER, Milagros Elisabeth. “Determinación de la incidencia de *Listeria monocytogenes* en pollos frescos y verduras frescas obtenidos en mercados y centros de abastecimiento

de Lima Metropolitana”. Asesores: Benedicta Carmen, López Flores. Tesis de Título Profesional. UNMSM, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Lima 2004.

- CHARPENTIER, Emmanuelle; COURVALIN, Patrice. Antibiotic Resistance in *Listeria* spp. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 1999, vol. 43, n° 9, p. 2103-2108.
- CHÉNARD, C., CHAN, A. M., VINCENT, W. F., et al. Polar freshwater cyanophage S-EIV1 represents a new widespread evolutionary lineage of phages. *The (International Society for Microbial Ecology) ISME journal*, 2015. p. 1-13.
- CHERUBIN, Charles E., et al. Epidemiological spectrum and current treatment of listeriosis. *Reviews of infectious diseases*, 1991, vol. 13, n° 6, p. 1108-1114.
- CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION, et al. Guidelines on the application of general principles of food hygiene to the control *Listeria monocytogenes* in foods. *CAC/GL 61*, 2007.
- CONSULTA DE EXPERTOS, F. A. O. OMS. Consultas de expertos ad hoc sobre la evaluación de riesgos asociados a los peligros microbiológicos en los alimentos. *Informe de la Consulta Mixta FAO/OMS de Expertos sobre la Evaluación de Riesgos Asociados a los Peligros Microbiológicos en los Alimentos*, 2000.
- CÓRDOBA, J., et al. Incidencia, prevalencia y detección de *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo. *Facultad de Veterinaria. Universidad de Extremadura*, 2015, p. 1-10.
- CORPAS, E.; SALAZAR, S. Estimación de *Listeria monocytogenes* en leche cruda y pasteurizada en una empresa de lácteos de la ciudad de Manizales durante el 2007. Informe Científico de la Universidad Católica de Manizales, 2007.



- CRESPO, María del Pilar, et al. Aislamiento de *Listeria monocytogenes* en un hospital de tercer nivel. *Colombia Médica*, 1999, vol. 30, n° 2, p. 89-98.
- DENES, Thomas, et al. Selection and characterization of phage-resistant mutant strains of *Listeria monocytogenes* reveal host genes linked to phage adsorption. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2015, vol. 81, n° 13, p. 4295-4305.
- DENES, Thomas; WIEDMANN, Martin. Environmental responses and phage susceptibility in foodborne pathogens: implications for improving applications in food safety. *Current opinion in biotechnology*, 2014, vol. 26, p. 45-49.
- DÍAZ, María; CHÁVEZ, Milciades; SAUCEDA, Elmo. *Listeria monocytogenes* en leche y queso fresco como vehículo transmisor de listeriosis humana en la Provincia de Trujillo, Perú. *Revista CIENCIA Y TECNOLOGÍA*, 2013, vol. 9, n° 2, p. 23-38.
- DINI, Cecilia. “Aislamiento y caracterización molecular de bacteriófagos de bacterias enteropatógenas para biocontrol de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA)”. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de La Plata, Facultad de Ciencias Exactas, La Plata, 2011.
- DOYLE, M. Ellin. “Virulence characteristics of *Listeria monocytogenes*”. University of Wisconsin, Food Research Institute, Department Food Microbiology & Toxicology, Madison, 2001.
- DREXLER, Klaus, et al. Single mutations in a gene for a tail fiber component of an *Escherichia coli* phage can cause an extension from a protein to a carbohydrate as a receptor. *Journal of molecular biology*, 1991, vol. 219, n° 4, p. 655-663.
- ELLIS, Emory L.; DELBRÜCK, Max. The growth of bacteriophage. *The Journal of general physiology*, 1939, vol. 22, n° 3, p. 365-384.
- FLORES ESCOBAR, Gloria Isabel. “Caracterización de bacteriófagos líticos de *Salmonella enterica* aislados de muestras de pollos”. Asesor: Enrique Walter

Mamani Zapana. Tesis de Título Profesional. UNMSM, EAP Microbiología y Parasitología, Lima 2017.

- GARCÍA SALAZAR, Ivone Alexandra; PORRAS NICHU, Mauricio Yvan. “Aislamiento de bacteriófagos de *Pseudomonas aeruginosa* multidrogo–resistente en aguas de tres ríos de la provincia de Lima-Perú”. Asesor: Julio Reynaldo Ruiz Quiroz. Tesis de Título Profesional. UNMSM, EP Farmacia y Bioquímica, Lima 2018.
- GARCÍA, Pilar, et al. Food biopreservation: promising strategies using bacteriocins, bacteriophages and endolysins. *Trends in food science & technology*, 2010, vol. 21, n° 8, p. 373-382.
- GEREDUW KIFELEW, Legesse; MITCHELL, James G.; SPECK, Peter. Mini-review: efficacy of lytic bacteriophages on multispecies biofilms. *Biofouling*, 2019, p. 1-10.
- GUTTMAN, Burton; RAYA, Raul; KUTTER, Elizabeth. Basic phage biology. *Bacteriophages: Biology and applications*, 2005, vol. 4.
- HARAKEH, Steve, et al. Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolated from dairy-based food products. *Science of the Total Environment*, 2009, vol. 407, n° 13, p. 4022-4027.
- HARRIS, Linda J. *Listeria monocytogenes* Class Notes PHR 150. University of California, Department of Food Science and Technology. Davis, 2006.
- HERMOSO, Juan A.; GARCÍA, José L.; GARCÍA, Pedro. Taking aim on bacterial pathogens: from phage therapy to enzybiotics. *Current opinion in microbiology*, 2007, vol. 10, n° 5, p. 461-472.
- HERRERO SÁNCHEZ, María Esther. “Evaluación de bacteriófagos y bacteriocinas para la eliminación de *Listeria monocytogenes*”. Asesores: Ana Rodríguez, Pilar García. Tesis de Maestría. Universidad de Oviedo, Master Universitario en Biotecnología Alimentaria, España 2013.

- HØYLAND-KROGHSBO, Nina M.; MÆRKEDAHL, Rasmus B.; SVENNINGSSEN, Sine Lo. A quorum-sensing-induced bacteriophage defense mechanism. *MBio*, 2013, vol. 4, n° 1, p. e00362-12.
- INAMDAR, Mandar M.; GELBART, William M.; PHILLIPS, Rob. Dynamics of DNA ejection from bacteriophage. *Biophysical journal*, 2006, vol. 91, n° 2, p. 411-420.
- INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. (ICMSF). *Ecología Microbiana de los Productos Alimentarios 6*. Zaragoza: Acribia, 2001.
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO). Microbiology of the food chain—horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and of *Listeria* spp.—Part 2: Enumeration method. ISO 11290-2: 2017. 2017.
- JAY, James M. *Microbiología moderna de los alimentos*. 4ta ed. Zaragoza: Acribia, 1994, p. 804.
- JEYASANTA, K. Immaculate; PATTERSON, Jamila. Prevalence of antibiotic resistant *Listeria monocytogenes* in sea foods of Tuticorin Coast, Southeastern India. *European Journal of Applied Sciences*, 2016, vol. 8, n° 6, p. 356-364.
- KATHARIOU, Sophia. *Listeria monocytogenes* virulence and pathogenicity, a food safety perspective. *Journal of food protection*, 2002, vol. 65, n° 11, p. 1811-1829.
- KAY, Matthew K., et al. Bacteriophage ecology in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* mixed-biofilm communities. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2011, vol. 77, n° 3, p. 821-829.
- KOKJOHN, Tyler A.; SAYLER, Gary S. Attachment and replication of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages under conditions simulating aquatic environments. *Microbiology*, 1991, vol. 137, n° 3, p. 661-666.

- KOMORA, Norton, et al. The protective effect of food matrices on *Listeria* lytic bacteriophage p100 application towards high pressure processing. *Food microbiology*, 2018, vol. 76, p. 416-425.
- KUTTER, Elizabeth and SULAKVELIDZE, Alexander (ed.). *Bacteriophages: biology and applications*. CRC Press, 2005, p. 510. ISBN 0-8493-1336-8.
- KUTTER, Elizabeth. Phage host range and efficiency of plating. *Bacteriophages: Methods and Protocols, Volume 1: Isolation, Characterization, and Interactions*, 2009, p. 141-149.
- LEE, Sunhee, et al. Isolation and characterization of *Listeria* phages for control of growth of *Listeria monocytogenes* in milk. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 2017, vol. 37, n° 2, p. 320.
- LETELLIER, Lucienne, et al. Main features on tailed phage, host recognition and DNA uptake. *Front Biosci*, 2004, vol. 9, n° 1, p. 1228-1339.
- LOESSNER, Martin J.; WENDLINGER, Günther; SCHERER, Siegfried. Heterogeneous endolysins in *Listeria monocytogenes* bacteriophages: a new class of enzymes and evidence for conserved holin genes within the siphoviral lysis cassettes. *Molecular microbiology*, 1995, vol. 16, n° 6, p. 1231-1241.
- LÓPEZ, V., et al. *Listeria monocytogenes* en alimentos: ¿son todos los aislamientos igual de virulentos?. *Revista argentina de microbiología*, 2006, vol. 38, n° 4, p. 224-234.
- LOZANO, Sonia. Félix D'Herelle: Aportes a biografía de un pasteurizado en México (1904-1911). *Revista Electrónica Latinoamericana de Estudios Sociales, Históricos y Culturales de la Ciencia y la Tecnología*, 2006, vol. 1, no 1, p. 1-15.
- LWOFF, Andre; GUTMANN, Antoinette. Recherches sur un *bacillus-megatherium* lysogene. En *Annales de l'institut pasteur*. 21 street Camille

Desmoulins, Issy, 92789 Mouligneaux cedex 9, France: masson editeur, 1950.  
p. 711-739.

- MAY, John F.; GROISMAN, Eduardo A. Conflicting roles for a cell surface modification in *Salmonella*. *Molecular microbiology*, 2013, vol. 88, n° 5, p. 970-983.
- MEZA PACHECO, Adriana Paula. “Aislamiento y caracterización de bacteriófagos para cepas nosocomiales de *Acinetobacter baumannii* de Lima e Iquitos, Perú 2014-2015”. Tesis de Título Profesional. Universidad Católica de Santa María, EP Ingeniería Biotecnológica, Arequipa 2016.
- MICHANIE, Silvia. *Listeria monocytogenes*: la bacteria emergente de los '80. *Ganados y Carnes*. 2004, vol 4, n° 18, p. 34-37.
- MIDDELBOE, Mathias. Bacterial growth rate and marine virus–host dynamics. *Microbial Ecology*, 2000, vol. 40, n° 2, p. 114-124.
- MIDDELBOE, Mathias; CHAN, Amy; BERTELSEN, Sif Koldborg. Isolation and life-cycle characterization of lytic viruses infecting heterotrophic bacteria and cyanobacteria. En *Manual of Aquatic Viral Ecology*. ASLO. ASLO, 2010.
- MONTAG, Dirk, et al. Receptor-recognizing proteins of T-even type bacteriophages: constant and hypervariable regions and an unusual case of evolution. *Journal of molecular biology*, 1987, vol. 196, n° 1, p. 165-174.
- MUÑOZ, Ana Isabel. Distribución de serotipos de *Listeria monocytogenes* aislados de alimentos, Colombia, 2000-2009. *Biomédica*, 2012, vol. 32, n° 3, p. 408-417.
- MUÑOZ, Ángela Bibiana, et al. *Listeria monocytogenes* en manipuladores de alimentos: un nuevo enfoque para tener en cuenta en los peligros de la industria alimentaria. *Biomédica*, 2013, vol. 33, n° 2, p. 283-91.

- OLIVEIRA, M., et al. Effectiveness of a bacteriophage in reducing *Listeria monocytogenes* on fresh-cut fruits and fruit juices. *Food microbiology*, 2014, vol. 38, p. 137-142.
- PUNIL LUCIANO, Renzo Jonás. “Caracterización de un bacteriófago específico de *Escherichia coli* aislado de aguas residuales de “La Taboada””. Asesor: Miguel Ángel Talledo Rivera. Tesis de Título Profesional. UNMSM, EAP Genética y Biotecnología, Lima 2017.
- ROSSI, M. L., et al. *Listeria monocytogenes* outbreaks: a review of the routes that favor bacterial presence. *Revista chilena de infectología: órgano oficial de la Sociedad Chilena de Infectología*, 2008, vol. 25, n° 5, p. 328-335.
- SÁNCHEZ VELÁZQUEZ, Francisco Javier, et al. Incidencia de especies de *Listeria* en una planta productora de alimentos congelados. *Ciencia UANL*, 2006, vol. 9, n° 1, p. 51.
- SCHÖBITZ, Renate; CIAMPI, Luigi; NAHUELQUIN, Yanina. *Listeria monocytogenes* un peligro latente para la industria alimentaria. *Agro sur*, 2009, vol. 37, n° 1, p. 1-8.
- SEGUNDO-ARIZMENDI, Nallelyt, et al. Los bacteriófagos como una alternativa en el tratamiento de enfermedades infecciosas Bacterianas (Fagoterapia). *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 2010, vol. 41, n° 3, p 17.
- SILLANKORVA, Sanna; NEUBAUER, Peter; AZEREDO, Joana. Phage control of dual species biofilms of *Pseudomonas fluorescens* and *Staphylococcus lentus*. *Biofouling*, 2010, vol. 26, n° 5, p. 567-575.
- SOMOLINOS, Maria, et al. Relationship between sublethal injury and microbial inactivation by the combination of high hydrostatic pressure and citral or tert-butyl hydroquinone. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2008, vol. 74, n° 24, p. 7570-7577.

- STRYDOM, Amy; WITTHUHN, Corli R. *Listeria monocytogenes*: a target for bacteriophage biocontrol. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2015, vol. 14, n° 6, p. 694-704.
- SULAKVELIDZE, Alexander; ALAVIDZE, Zemphira; MORRIS, J. Glenn. Bacteriophage therapy. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2001, vol. 45, n° 3, p. 649-659.
- SUNDAR, Mahadevan M., et al. Isolation of host-specific bacteriophages from sewage against human pathogens. *Asian J Biotechnol*, 2009, vol. 1, n° 4 p. 163-170.
- TALLEDO, Miguel, et al. Detección, cuantificación y caracterización morfológica de bacteriófagos indicadores de *Vibrio cholerae*. *Revista peruana de Biología*, 1998, vol. 5, n° 2, p. 090-097.
- TAMARIZ, Jesús H.; LEZAMETA, Lizet; GUERRA, Humberto. Fagoterapia frente a infecciones por *Staphylococcus aureus* meticilino resistente en ratones. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 2014, vol. 31, n° 1, p. 69-77.
- TAN, Zheng Huan. "Biosorption of Heavy Metals onto the Surface of Bacteriophage T4" Asesor: Karrie A. Weber. Master of Science thesis. University of Nebraska, Nebraska 2014.
- TORRES, Kirvis, et al. Pathogenesis of *Listeria monocytogenes*, microorganism zoonotic emergent. *Revista MVZ Córdoba*, 2005, vol. 10, n° 1, p. 511-543.