

UNIVERSIDAD DE PANAMÁ

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES EXACTAS Y TECNOLOGÍA

ESCUELA DE BIOLOGÍA

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIÓFAGOS ESPECÍFICOS
 PARA CEPAS DE *Escherichia coli* y *Salmonella* spp. A PARTIR DE AGUAS
 RESIDUALES.**

POR:

Hall, Gina 3-738-2028

Ramírez, Alison 8-910-1488

Trabajo de graduación sometido a consideración por la Escuela de Biología, Facultad de Ciencias Naturales Exactas y Tecnología, como requisito parcial para optar por el título de Licenciado en Biología con especialización en Microbiología y Parasitología

PANAMÁ, REPÚBLICA DE PANAMÁ

2021



TRIBUNAL EXAMINADOR

Título:

“Aislamiento y caracterización de bacteriófagos específicos para cepas de *Escherichia coli* y *Salmonella* spp. a partir de aguas residuales.”

Por:

Alison D. Ramírez M.

8-910-1488

Gina M. Hall R.

8-910-1488

Trabajo de Graduación presentado a consideración de la Escuela de Biología como requisito parcial para optar por el título de Licenciatura en Biología con Orientación en Microbiología y Parasitología.

PROF. Alex O. Martínez T.

Tutor (preside)

PROF. Jordi Querol A.

Jurado

PROF. Fermín Mejía

Jurado

***DEDICATORIAS Y
AGRADECIMIENTOS***

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, agradecemos a Dios, por ser nuestra fortaleza en todos los momentos difíciles, por acompañarnos y ser nuestra guía a lo largo de esta hermosa carrera. Por brindarnos sabiduría, paciencia y entendimiento para lograr desarrollar con éxito este trabajo.

Agradecemos a nuestros profesores asesores, al Dr. Alex O. Martínez, Jordi Querol y Fermín Mejía, por la confianza depositada en nosotras, el apoyo y guía para la realización de este proyecto, pero, sobre todo, gracias por ayudarnos a iniciar el desarrollo de nuestro carácter profesional.

Infinitas gracias al CMgter. Máximo Antonio Montalvo Juárez, por su valiosa dirección, paciencia, minuciosidad, apoyo económico y motivación constante. Siempre estaremos agradecidas por todos los conocimientos compartidos con nosotras, sin tu apoyo, esto no hubiera sido posible.

Agradecemos también a nuestros familiares, por su apoyo y motivación en todo este tiempo, por darnos siempre palabras de aliento en los momentos más duros.

A todos los profesores, amigos, conocidos que desinteresadamente aportaron a que este trabajo de graduación fuera posible.

Agradecemos a la Secretaría Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (SENACYT) por el financiamiento económico de este proyecto a través de los fondos que el Licdo. Máximo Antonio Montalvo Juárez se ganó en la primera convocatoria de Nuevos Investigadores de 2018.

Finalmente, agradecemos a los Laboratorios de Microbiología Experimental y Aplicada (LAMEXA) y Microbiología de Aguas, Vicerrectoría de Investigación y Post-Grado, de la Universidad de Panamá por prestarnos sus instalaciones para poder llevar a cabo este trabajo de graduación.

DEDICATORIAS

Este trabajo está dedicado a personas muy especiales:

A mi familia, por ser ese pilar fundamental de mi vida. Mis padres Manuel y Adaris, por su apoyo económico y motivacional. Mis hermanos Carlos, Manuel y Valery y mi cuñada Sayuri por su colaboración en todo momento.

A mis sobrinas Karla V, Sara V y Lucía V, por su cariño y por siempre darme fuerzas.

A mi pareja Jonathan, por su incondicional apoyo en todo momento a lo largo de esta carrera. Por su paciencia y por siempre recordarme que por más difícil que se vea el camino, siempre podre lograrlo y alcanzar mis metas.

A Gina y Máximo, por ser unos excelentes amigos y compañeros de tesis, por haber compartido conmigo a lo largo de este proyecto, por luchar y motivarnos juntos para poder alcanzar esta meta.

Alison D. Ramírez M.

Dedico este trabajo a mis padres Rogelio y Rocio Hall por siempre alentarme a vencer los obstáculos y no rendirme hasta llegar a la meta, a mi hermana Ginneth Hall por motivarme a cada día ser mejor y enseñarme a creer en mi potencial.

A mi excelente compañera y amiga Alison por su ética impecable de trabajo que nos permitió avanzar en los momentos difíciles y a todos mis amigos por escucharme, entenderme, orientarme e impulsarme a perseverar y culminar con éxito mi trabajo de tesis.

A Máximo por todas las enseñanzas transmitidas, su dedicación conmigo y compromiso con este estudio.

Gina M. Hall R.

ÍNDICE

CONTENIDO

RESUMEN	2
ABSTRACT	4
INTRODUCCIÓN	7
ANTECEDENTES	9
JUSTIFICACIÓN	10
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	11
Bacteriófagos.....	12
Agua residual.....	17
Bacterias.....	18
Vitek 2.....	27
Resistencia microbiana	28
Medios y reactivos	30
OBJETIVOS	35
Objetivo general	35
Objetivos específicos.....	35
HIPÓTESIS	36
METODOLOGÍA	38
Puntos de muestreo.....	38
Colecta de muestra	38
Análisis en laboratorio.....	38
Bacteriófagos.....	38
Bacterias.....	42
RESULTADOS	47
Curva de crecimiento bacteriano de cepas ATCC.....	47
Aislamiento y purificación de los bacteriófagos	49
Propagación de bacteriófagos.....	49
Caracterización biológica de los bacteriófagos aislados.....	51
Sensibilidad al cloroformo	51
Efecto de la exposición a la luz UV.....	52
Efecto de la temperatura sobre el bacteriófago	59
Aislamiento e identificación fenotípica de cepas ambientales aisladas del agua residual de la PTAR	61
Análisis de sensibilidad a antibióticos de las cepas bacterianas ambientales aisladas	64
Determinación del rango de hospederos	66
DISCUSIÓN	70

CONCLUSIONES	76
RECOMENDACIONES	78
LITERATURA CITADA	80
ANEXOS	89
Metodología	89
Tablas de curva de crecimiento.	92
Tablas de efecto de la luz UV.	95
Tablas de resistencia de los bacteriófagos al pH.	97
Tablas efecto de la temperatura sobre el bacteriófago.	100
Información de sensibilidad	103

FIGURAS

Figura 1. Morfotipos y características básicas de las diferentes familias de fagos. Imagen obtenida del trabajo de tesis publicado por Dini, 2011.	13
Figura 2. Ciclos líticos y lisogénicos de los bacteriófagos.....	15
Figura 3. Las seis categorías reconocidas de E. coli diarreogénica.....	21
Figura 4. Principales características bioquímicas de E. coli.	23
Figura 5. Reacciones bioquímicas de Salmonella spp.	26
Figura 6. Dispositivo Vitek 2 compact.	27
Figura 7. Carrete con tarjetas GN para el análisis de bacilos Gram negativos y AST para para el análisis de la susceptibilidad antimicrobiana.....	28
Figura 8. Curva de crecimiento de E. coli ATCC 15597.....	47
Figura 9. Curva de crecimiento de E. coli ATCC 11229.	48
Figura 10. Curva de crecimiento de E. coli ATCC 8739.	48
Figura 11. Curva de crecimiento de Salmonella spp ATCC 9842.....	48
Figura 12. Curva de crecimiento de Salmonella spp ATCC 14028.....	49
Figura 13. Bacteriófagos por la técnica de doble capa de agar..	51
Figura 14. Bacteriófagos por la técnica de gota o spot test.....	51
Figura 15. Efecto del Cloroformo en los bacteriófagos de E. coli aislados.	52
Figura 16. Efecto del Cloroformo en los bacteriófagos de Salmonella spp. entéricas aislados.	52
Figura 17. Efecto de la luz UV sobre el bacteriófago 15597.	53
Figura 18. Efecto de la luz UV sobre el bacteriófago 11229.	54
Figura 19. Efecto de la luz UV sobre el bacteriófago 8739.	54

Figura 20. Efecto de la luz UV sobre el bacteriófago 9842.	55
Figura 21. Efecto de la luz UV sobre el bacteriófago 14028.	55
Figura 22. Resistencia del bacteriófago 15597 a los diferentes pH.	56
Figura 23. Resistencia del bacteriófago 11229 a los diferentes pH.	56
Figura 24. Resistencia del bacteriófago 8739 a los diferentes pH.	57
Figura 25. Resistencia del bacteriófago 9842 a los diferentes pH.	57
Figura 26. Resistencia del bacteriófago 14028 a los diferentes pH.	58
Figura 27. Efecto de la temperatura sobre la estabilidad del bacteriófago 15597.	59
Figura 28. Efecto de la temperatura sobre la estabilidad del bacteriófago 11229.	60
Figura 29. Efecto de la temperatura sobre la estabilidad del bacteriófago 8739.	60
Figura 30. Efecto de la temperatura sobre la estabilidad del bacteriófago 9842.	61
Figura 31. Efecto de la temperatura sobre la estabilidad del bacteriófago 14028.	61
Figura 32. Placa de lisis del bacteriófago 9842 en la cepa SIAR I14-3, ambos aislados de la misma agua residual.	67
Figura 33. Proceso de filtrado del enriquecimiento de muestra de agua residual para aislamiento de fagos.	89
Figura 34. Preparación de diluciones para titulación de stocks de bacteriófagos.	89
Figura 35. Enfrentamiento de bacteriófagos y cepa huésped para caracterización.	89
Figura 36. Estriado en agar XLD de muestras enriquecidas de agua residual para aislamiento de Salmonella spp.	90
Figura 37. Proceso de filtración al vacío de muestras de agua residual para aislamiento de bacterias ambientales.	90
Figura 38. Observación de tinción Gram, para confirmación de Enterobacterias.	90
Figura 39. Preparación de la suspensión bacteriana para análisis en el sistema automatizado Vitek 2.	91
Figura 40. Medición de absorbancia de las cepas bacterianas ambientales para la curva de crecimiento.	91
Figura 41. Ingreso de códigos al Vitek 2, para análisis de identificación y sensibilidad de las cepas ambientales aisladas.	91

TABLAS

Tabla 1. Cepas ambientales aisladas de aguas residuales.	45
--	----

Tabla 2. Titulación de lisados de bacteriófagos obtenidos por propagación en caldo para la caracterización biológica.....	50
Tabla 3. Aislamiento e identificación fenotípica de cepas ambientales de <i>E. coli</i> y <i>Salmonella</i> spp. aisladas del agua residual de la PTAR de la ciudad de Panamá.....	62
Tabla 4. Análisis de sensibilidad a antibióticos de las cepas bacterianas ambientales aisladas.	65
Tabla 5. Análisis de resistencia a antibióticos de las cepas bacterianas ambientales aisladas	65
Tabla 6. Determinación del rango de hospederos de los 3 bacteriófagos de <i>E. coli</i> aislados.	67
Tabla 7. Determinación del rango de hospederos de los 2 bacteriófagos de <i>Salmonella</i> sp. aislados.	68
Tabla 8. Curva de crecimiento de la cepa de <i>E. coli</i> ATCC 15597.	92
Tabla 9. Curva de crecimiento de la cepa de <i>E. coli</i> ATCC 11229.	92
Tabla 10. Curva de crecimiento de la cepa de <i>E. coli</i> ATCC 8739.	93
Tabla 11. Curva de crecimiento de la cepa de <i>Salmonella</i> spp. ATCC 9842.....	93
Tabla 12. Curva de crecimiento de la cepa de <i>Salmonella</i> spp. ATCC 14028.....	94
Tabla 13. Sensibilidad de los bacteriófagos aislados al cloroformo.	94
Tabla 14. Sensibilidad del bacteriófagos 15597 a la luz UV.....	95
Tabla 15. Sensibilidad del bacteriófagos 11229 a la luz UV.....	95
Tabla 16. Sensibilidad del bacteriófagos 8739 a la luz UV.....	96
Tabla 17. Sensibilidad del bacteriófagos 9842 a la luz UV.....	96
Tabla 18. Sensibilidad del bacteriófagos 14028 a la luz UV.....	97
Tabla 19. Resistencia del bacteriófago 15597 a los diferentes pH.	97
Tabla 20. Resistencia del bacteriófago 11229 a los diferentes pH	98
Tabla 21. Resistencia del bacteriófago 8739 a los diferentes pH.	98
Tabla 22. Resistencia del bacteriófago 9842 a los diferentes pH.	99
Tabla 23. Resistencia del bacteriófago 14028 a los diferentes pH.	99
Tabla 24. Efecto de la temperatura sobre la estabilidad del bacteriófago 15597	100
Tabla 25. Efecto de la temperatura sobre la estabilidad del bacteriófago 11229.	100
Tabla 26. Efecto de la temperatura sobre la estabilidad del bacteriófago 8739.	101
Tabla 27. Efecto de la temperatura sobre la estabilidad del bacteriófago 9842.	101
Tabla 28. Efecto de la temperatura sobre la estabilidad del bacteriófago 14028.	102

RESUMEN

RESUMEN

Los bacteriófagos son virus que infectan y lisan de manera específica a las bacterias, incluyendo a aquellas resistentes a los antimicrobianos las cuales se han convertido en una problemática de salud a nivel mundial. El objetivo principal de esta investigación fue aislar y caracterizar bacteriófagos competentes contra cepas ATCC de *E. coli*, y *Salmonella* spp. a partir de muestras de aguas residuales. Para ello, se aislaron cinco bacteriófagos procedentes de la Planta de Tratamiento de Agua Residuales (PTAR) de la Ciudad de Panamá, denominando a los aislados de *E. coli* fago 15597, 8739 y 11229 y a los de *Salmonella* spp. 14028 y 9842. Estos fueron caracterizados con respecto a su rango de hospederos, sensibilidad al cloroformo, estabilidad ante diferentes rangos de pH, temperatura y exposición a la luz UV; obteniendo como resultado que los 5 fagos son sensibles al cloroformo, se ven favorecidos de manera general en pH alcalinos y temperaturas ente 25° y 50°C; al ser expuestos a la luz UV, en la mayoría se observó una reducción significativa, sin embargo, en el 14028 se aumentó el número de placas de lisis. Paralelamente al aislamiento de estos bacteriófagos, se aislaron cepas ambientales de *Salmonella* spp. y *E. coli* de las mismas muestras de agua residual y se analizó su perfil de sensibilidad, obteniendo algunas cepas resistentes a distintos antibióticos. Finalmente logramos concluir que es posible aislar de las aguas residuales bacteriófagos con actividad lítica frente a cepas ATTC y cepas silvestres de *E. coli* y *Salmonella* spp. Este es el primer trabajo de aislamiento de bacteriófagos a partir de aguas residuales provenientes de la PTAR de la ciudad de Panamá que se realiza en el país. Los parámetros biológicos y la metodología evaluada en este trabajo, establecen las bases para futuros aislamientos de bacteriófagos en muestras de agua residual.

Palabras claves: bacteriófagos, *E. coli*, *Salmonella*, resistencia, antibióticos.

ABSTRACT

ABSTRACT

Bacteriophages are viruses that infect and specifically lyse bacteria, including those resistant to antimicrobials, which have become a worldwide health problem. The main objective of this research was to isolate and characterize bacteriophages competent against ATCC strains of *E. coli* and *Salmonella* spp. from wastewater samples. Five bacteriophages were isolated from the Panama City Wastewater Treatment Plant, calling the *E. coli* isolates phage 15597, 8739 and 11229 and the *Salmonella* sp. isolates 14028 and 9842. These were characterized with respect to their host range, sensitivity to chloroform, stability at different pH ranges, temperature and exposure to UV light; obtaining as a result that the 5 phages are sensitive to chloroform, are generally favored at alkaline pH and temperatures between 25° and 50°C; when exposed to UV light, a significant reduction was observed in most of them, however in 14028 the number of lysis beaches increased. Parallel to the isolation of these bacteriophages, environmental strains of *Salmonella* spp. and *E. coli* were isolated from the same wastewater samples and their sensitivity profile was analyzed, obtaining some strains resistant to different antibiotics. Finally, we were able to conclude that it is possible to isolate from wastewater bacteriophages with lytic activity against ATTC strains and wild strains of *E. coli* and *Salmonella* spp. This is the first work on the isolation of bacteriophages from wastewater from the Panama City WWTP in this country. The biological parameters and the methodology evaluated in this work establish the basis for future isolation of bacteriophages from wastewater samples.

Key words: bacteriophages, *E. coli*, *Salmonella*, resistance, antibiotics.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

Los bacteriófagos o fagos son virus que invaden las células bacterianas. Fueron descritos por primera vez por Frederick Twort en 1915 y posteriormente, en 1917, por Félix d'Herelle, quien propuso la palabra bacteriófago la cual proviene de “bacteria” y “fagein” (del griego comer o devorar) (Sulakvelidze *et al.*, 2001). Los bacteriófagos son los agentes biológicos más abundantes en la Tierra, estimados en un total de 10^{30} a 10^{32} partículas en todo el planeta y tienen un papel importante en la determinación del balance de los ecosistemas bacterianos (Goyal, 2006; Kutter y Sulakvelidze, 2004). Según Ackermann (2001), existen 13 familias de fagos que se clasifican de acuerdo a la naturaleza de su genoma y a sus características morfológicas.

Resino (2011) menciona algunas aplicaciones en base al uso de bacteriófagos, como, por ejemplo: la fagoterapia, el diagnóstico bacteriano por fagos, lisotipia y fagotipia, y análisis del índice de contaminación fecal de aguas y alimentos. Los bacteriófagos también han sido empleados como agentes de control biológico natural en problemas ambientales, como por ejemplo para el tratamiento de aguas residuales (Periasamy y Sundaran, 2013; Cartmell *et al.*, 2005) y el tratamiento de lodos (Sánchez, 2012).

La resistencia a los antimicrobianos se ha convertido en uno de los principales problemas de salud pública del siglo XXI, que amenaza la prevención y el tratamiento eficaz de una gama cada vez mayor de infecciones causadas por bacterias y virus que ya no son sensibles a los medicamentos habituales (Prestinaci *et al.*, 2015). Durante varias décadas, en diversos grados, las bacterias que causan infecciones comunes o graves han desarrollado resistencia a cada nuevo antibiótico que llega al mercado. Esto ocurre por diferentes mecanismos fisiológicos y moleculares que les permiten a estos microorganismos adaptarse rápidamente a condiciones adversas (Prada *et al.*, 2015).

En enero de 2017, la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó su primera lista de patógenos prioritarios resistentes a los antibióticos, en la que se incluyen las 12 familias de bacterias más peligrosas para la salud humana. En la lista se pone de relieve especialmente la amenaza que suponen las bacterias Gram negativas resistentes a múltiples antibióticos. Estas bacterias tienen la capacidad innata de encontrar nuevas formas de resistir a los tratamientos y pueden transmitir material genético que permite a otras bacterias hacerse farmacorresistentes. La lista de la OMS se divide en tres categorías con arreglo a la urgencia en que se necesitan los nuevos antibióticos: prioridad crítica, alta o media. El grupo de *Enterobacteriaceae*, en donde encontramos a la *E. coli*, que se halla en la categoría de prioridad crítica, siendo resistente a los carbapenémicos, las cefalosporinas de tercera generación, que son los mejores antibióticos

disponibles para tratar las bacterias multirresistentes y, además, son productoras de betalactamasas de espectro extendido (ESBL), enzimas que descomponen el antibiótico común. *Salmonella* por su parte, se encuentran en la categoría de prioridad media, siendo resistentes a las fluoroquinolonas.

Hay que tener en cuenta que la *E. coli* es una bacteria que presenta una gran variabilidad genética y existen variedades no patógenas que habitan normalmente en el intestino de mamíferos, y variantes patogénicas capaces de producir enfermedades entéricas o distintos tipos de infecciones extra intestinales en humanos y animales. Se pueden distinguir 6 variantes patogénicas o patotipos, capaces de producir enfermedades entéricas que difieren en los factores de virulencia que poseen y, en consecuencia, en el tipo de daño producido en el huésped (Doyle *et al.*, 2001). Por otro lado, los miembros del género *Salmonella* están ampliamente distribuidos en la naturaleza, se encuentran como comensales y patógenos en el tracto gastrointestinal de mamíferos domésticos y salvajes, reptiles, aves e insectos, causando un amplio espectro de enfermedades en sus hospederos, considerándose como la principal enterobacteria de importancia en salud pública (Selbitz *et al.*, 1995).

Todos los tipos de *Salmonella* se consideran patógenos humanos. Sin embargo, la gravedad de la enfermedad varía mucho según la cepa involucrada y la susceptibilidad del huésped. (US Centers for Disease Control and Prevention, 2007).

Diversos estudios han demostrado que los bacteriófagos son capaces de lisar bacterias multidrogorresistentes considerando que su mecanismo de acción es diferente al de los antibióticos (Segundo *et al.*, 2010).

Los fagos elegidos como agentes de biocontrol deben ser altamente infectivos en un amplio número de cepas del patógeno diana (amplio rango de huésped), deben ser fagos puramente líticos (no ser capaces de recombinarse con el ADN de la bacteria huésped como profagos) y no poseer genes de virulencia o de resistencia a antibióticos que puedan ser incorporados al genoma del huésped por transducción. Asimismo, el éxito del tratamiento con fagos depende de la elección de los fagos con las mejores características para la aplicación deseada, como, por ejemplo, para ser utilizados “*in vivo*”, ser inocuos para la flora comensal o para ser aplicados en forma oral, resistir el pasaje gastrointestinal y alcanzar la localización del patógeno en concentraciones suficientes como para que se produzca la infección (Dini, 2011). En Panamá no se han realizado trabajos sobre utilización de bacteriófagos, por lo que la presente investigación permitirá el desarrollo de una metodología base para el aislamiento y caracterización de bacteriófagos de aguas residuales para especies bacterianas de importancia en salud pública y ambiental.

ANTECEDENTES

Dalmasso *et al.* (2016), efectuaron un estudio cuyo objetivo era aislar y caracterizar nuevos bacteriófagos de *E. coli* del intestino humano, así como determinar sus propiedades antibacterianas por sí solos y en cócteles. Ellos lograron aislar tres nuevos colífagos e investigaron sus características fenotípicas y genómicas. Posteriormente, se puso a prueba su actividad lítica contra biopelículas y se probó el efecto de los fagos aislados en combinación con antibióticos como la ciprofloxacina. Al finalizar el estudio, se logró concluir que los nuevos fagos aislados de muestras de heces humanas, son prometedores como agentes antimicrobianos, especialmente cuando se usan en un cóctel para evitar el crecimiento de *E. coli* y la formación de biopelículas. Además, se concluyó que los colífagos pueden considerarse como tratamientos complementarios a los antibióticos, al ayudar a prevenir la aparición de mutantes resistentes.

Punil (2017), realizó su investigación teniendo por finalidad, aislar y caracterizar un bacteriófago lítico que infectara a cepas de *E. coli* aisladas de aguas residuales procedentes de la planta de tratamiento de “La Taboada” en Lima, Perú. En esta investigación, se aislaron 10 cepas ambientales de *E. coli* y un bacteriófago para estas bacterias. Al bacteriófago aislado, se le realizaron pruebas tanto fisicoquímicas como microbiológicas para caracterizarlo y conocer con qué tipo de fago se estaba trabajando. Se concluyó en esta investigación, que es posible aislar bacteriófagos a partir de aguas residuales y, además, que el fago aislado, denominado Φ GF1, presentaba un amplio rango de hospedero, infectando a cepas de *E. coli* y *Shigella sonnei*, lo que lo convierte en un buen candidato para reducir la contaminación por *E. coli*.

Flores (2017), realizó un estudio cuyo objetivo principal era caracterizar las propiedades biológicas y químicas de un bacteriófago específico de *Salmonella entérica*, aislado de muestras de intestinos de pollos en Lima, Perú. En este estudio, se logró aislar un bacteriófago, al cual se le denominó bacteriófago S6, en donde también se aislaron dos cepas de *S. entérica*. Se evaluó la estabilidad del bacteriófago sometándolo a diferentes temperaturas y pH. También, se determinó la sensibilidad al cloroformo y las características biológicas del mismo. Con estas pruebas, se logró concluir que el bacteriófago S6 era estable a pH entre 6.0 - 8.0 y temperaturas entre -80°C hasta 60°C . Además, presentaba características líticas solo para serovares de *Salmonella* como Typhimurium, Bispebjerg y Enteritidis. Todas estas características indican que puede ser empleado como una alternativa para la reducción de la población de *Salmonella entérica*.

Estos trabajos se relacionan con la investigación planteada, ya que demuestran el uso de bacteriófagos de *E. coli* y *Salmonella* spp. como posibles controles biológicos.

JUSTIFICACIÓN

Se analizó la presencia de bacteriófagos específicos para cepas de *Salmonella* spp. y *E. coli* en muestras de aguas residuales procedentes del Área Metropolitana de Panamá utilizando cepas ATCC.

Para la realización de este proyecto, se consideró de gran importancia la utilización de aguas residuales, debido a su naturaleza y el grado de contaminación que presentan, lo que posibilitó la obtención de una gran diversidad de bacterias y consecuentemente bacteriófagos que infecta a las mismas.

Se probaron diferentes técnicas que permitieron la estandarización de las metodologías para el aislamiento, purificación, concentración y caracterización de bacteriófagos. Paralelamente al aislamiento de estos bacteriófagos se aislaron cepas bacterianas ambientales de *Salmonella* spp. y *E. coli* de las mismas muestras de agua residual. Las cepas bacterianas ambientales aisladas, fueron analizadas para determinar su perfil de sensibilidad y brindar con estos datos, información sobre el tipo y características de las cepas de *Salmonella* spp. y *E. coli* de importancia en salud pública, circulantes en el Área Metropolitana de la Ciudad de Panamá

REVISIÓN
BIBLIOGRÁFICA

MARCO TEÓRICO

Bacteriófagos

Los bacteriófagos, conocidos también como fagos (del griego *phagein* que significa “comer”), son los virus más abundantes en todo el ambiente (agua, suelo y aire) (Kutateludze y Adamia, 2010), con una estimación total de población entre 10^{30} a 10^{32} (Balcazar, 2014) y están presentes desde hace 3 billones de años (Sulakuelidze, 2011). Se estima que, por cada bacteria, existen 10 partículas de bacteriófagos (Skurnik y Strauch, 2006). Existe un gran debate entre diversos autores acerca del descubrimiento de los bacteriófagos. Algunos consideran a Twort como quien los aisló por primera vez, aunque nunca lo logró comprobar. Es por eso que otros autores consideran a Félix d’Herelle como el descubridor “oficial” y quien bautizara a estos entes con el nombre de bacteriófagos, que literalmente significa “comedores de bacterias” (Weinbauer, 2004). Su actividad fágica es muy específica: atacan solo a bacterias sin afectar a otra microflora o células animales y vegetales, y en las bacterias, se replican y producen nuevas partículas fágicas (Talavera, 2017; Gil *et al.*, 2008).

Composición de los bacteriófagos

Aunque diferentes bacteriófagos pueden contener diferentes materiales, todos ellos contienen ácido nucleico y proteína. Dependiendo del fago, el ácido nucleico puede ser de ADN o ARN, pero no ambos y puede existir en varias formas. Los ácidos nucleicos de los fagos a menudo contienen bases raras o modificadas. Estas bases modificadas protegen a los ácidos nucleicos del fago de las endonucleasas que cortan los ácidos nucleicos del huésped durante la infección (Mayer, 2015).

El tamaño del genoma varía dependiendo del fago. Los fagos más simples sólo tienen suficiente ácido nucleico para codificar un promedio de 3-5 productos génicos, mientras que los fagos más complejos, pueden codificar para más de 100 productos génicos. El número de proteínas de diferentes clases y la cantidad de cada una de ellas en la partícula del fago variará dependiendo de la clase de fago que se trate. El fago más simple posee varias copias de sólo una o dos proteínas distintas, mientras que los más complejos podrían poseer muchos tipos de proteínas diferentes. La función de las proteínas durante la infección es proteger al ácido nucleico de las nucleasas de su medio ambiente (Mayer, 2015).

Estructura de los bacteriófagos

Los fagos clásicos poseen una estructura a manera de cabeza y varían en simetría y tamaño. Algunos presentan simetría icosaédrica o esférica y otros presentan simetría helicoidal o

filamentosa. En el interior de esta cápside se encuentra el ácido nucleico protegido. La mayoría de los fagos presentan una cola unida a la cápside. La cola es un tubo hueco a través del cual el genoma del virus se transfiere a la célula bacteriana durante la infección y su tamaño es variable en los fagos más complejos como el T4, donde la cola se rodea de una cortina proteica contráctil durante la infección. En el extremo de la cola, los fagos más complejos como T4, presentan una placa en la base y una o más fibras unidas a ella. Esta placa de base y las fibras de la cola están involucradas en la unión de los fagos a la célula bacteriana. No todos los fagos tienen placas de base ni fibras de la cola. En tales casos, existen otras estructuras que se ven asociadas en la unión de partícula del fago a la bacteria (Mayer, 2015).

Taxonomía

Según Ackermann (2001), existen 13 familias de fagos que se clasifican de acuerdo a la naturaleza de su genoma y a sus características morfológicas.

Tabla 1. Morfotipos y características básicas de las diferentes familias de fagos

Morfotipo	Forma	Ácido nucleico	Familia	Particularidades
A1 a A3	Fagos con cola	ADN dc, L	<i>Myoviridae</i>	Cola contráctil
B1 a B3			<i>Siphoviridae</i>	Cola larga, no contráctil
C1 a C3			<i>Podoviridae</i>	Cola corta
D1	Fagos poliédricos	ADN sc, C	<i>Microviridae</i>	Capsómeros sobresalientes
D3		ADN dc, C, S	<i>Corticoviridae</i>	Cápside compleja, lípidos
D4		ADN dc, L	<i>Tectiviridae</i>	Vesícula lipídica, pseudocola
E1		ARN sc, L	<i>Leviviridae</i>	
E2		ARN dc, L	<i>Cystoviridae</i>	Cubierta lipídica
F1	Fagos filamentosos	ADN sc, C	<i>Inoviridae</i>	a- filamentos largos b- bastones cortos
F2				
F3		ADN dc, L	<i>Lipothrixviridae</i>	Cubierta lipídica
F4		ADN dc, L	<i>Rudoviridae</i>	Similar al virus del mosaico del tabaco
G1	Fagos pleomórficos	ADN dc, C, S	<i>Plasmaviridae</i>	Cubierta lipídica, sin cápside
G2		ADN dc, C, S	<i>Fuselloviridae</i>	Cubierta lipídica, sin cápside, en forma de limón

Sc: simple cadena, dc: doble cadena, C: circular, S: superhelicoidal, L: lineal, seg.: segmentado. Imagen obtenida del trabajo publicado por H. W. Ackermann (2001).

Figura 1. Morfotipos y características básicas de las diferentes familias de fagos. Imagen obtenida del trabajo de tesis publicado por Dini, 2011.

Ackermann (2007), menciona que al menos 5568 fagos han sido examinados mediante microscopía electrónica desde 1959, donde el 96.2% (5360) de los fagos estudiados presentan cola y están asignados al único orden definido, el orden Caudovirales, que conforma tres familias: Myoviridae (24.5%) dónde pertenece el fago T4, Siphoviridae (61%) donde se encuentra el fago Lambda (fago λ) y Podoviridae (14%) dónde pertenece el bacteriófago Φ 29 (Talavera, 2017).

Infección de las células huésped

Mayer (2015), hace referencia a cuatro simples etapas:

- La primera, es el **proceso de adsorción** del fago a la célula bacteriana. Este paso es reversible y está mediado por fibras de la cola o por alguna estructura análoga en aquellos fagos que carecen de las mismas. Las fibras de la cola se unen a receptores específicos en la célula bacteriana, los cuales pueden ser de distinta naturaleza. Los ejemplos incluyen proteínas sobre la superficie externa de la bacteria, LPS, pili y lipoproteínas. La bacteria utiliza estos receptores para otros propósitos y los fagos han evolucionado de manera que son capaces de usarlos para llevar a cabo la infección.
- **Unión irreversible:** la unión irreversible del fago a la bacteria está mediada por uno o más componentes de la placa de la base. Los fagos que carecen de placas de la base tienen otras formas de unirse estrechamente a la célula bacteriana.
- **Contracción de la cortina:** la unión irreversible del fago a la bacteria da como resultado la contracción de la cortina (para aquellos fagos que la presentan) y la fibra hueca, que es la cola, se ve empujada a través de la envoltura bacteriana. Los fagos que no tienen cortinas contráctiles usan otros mecanismos para introducir la partícula del fago al interior de la envoltura de bacteriana. Algunos fagos tienen enzimas digestivas que degradan varios componentes de la envoltura bacteriana.
- **Inyección del ácido nucleico:** cuando el fago ha logrado atravesar la envoltura bacteriana el ácido nucleico, que se encuentra en la cabeza, pasa a través de la cola hueca y penetra la célula bacteriana. Usualmente, el único componente del fago que realmente penetra la célula es el ácido nucleico. Los remanentes del fago permanecen en el exterior de la bacteria. Hay algunas excepciones para esta regla. Esto es diferente de los virus animales, en los cuales la mayoría de las partículas virales normalmente se introducen en la célula.

Ciclo de multiplicación del fago

Krylov (2001) presenta una clasificación no del todo tradicional, dividiendo a los bacteriófagos en cuatro tipos: los bacteriófagos virulentos (ciclo lítico), fagos atemperados (ciclo lisogénico), fagos con ciclo de desarrollo continuo y fagos pseudolisogénicos.

Ciclo lítico

En el ciclo lítico, el fago se multiplica dentro de la célula bacteriana, lisándola al final del ciclo para liberar nuevos fagos; la sucesiva liberación de nuevos fagos permite la infección a nuevos

hospederos de forma exponencial. La lisis es el resultado del daño en la pared celular bacteriana, causado por enzimas específicas del fago llamadas lisinas, que digieren el peptidoglucano bacteriano (Prada *et al.*, 2015).

Ciclo lisogénico

Los bacteriófagos del tipo lisogénico inyectan e insertan su ADN en el cromosoma bacteriano, donde se replica como parte del genoma del hospedero, pudiendo permanecer en estado de latencia (estado de profago) por períodos prolongados; en este estado, ya sea en forma espontánea o por factores ambientales, pueden ser inducidos a entrar en un ciclo lítico. Su uso no es recomendable ni como agentes terapéuticos ni como bio-controladores en alimentos, pues en algunos casos pueden portar genes que codifican para factores de virulencia o de resistencia a antimicrobianos, como es el caso de la Shiga toxina en *E. coli*, toxina eritrogénica de *Streptococcus pyogenes*, toxina de *Corynebacterium diphtheriae* y ciertas enterotoxinas de *S. aureus*, factores que además pueden ser transferidos de una bacteria a otra mediante transducción (Jorquera *et al.*, 2015).

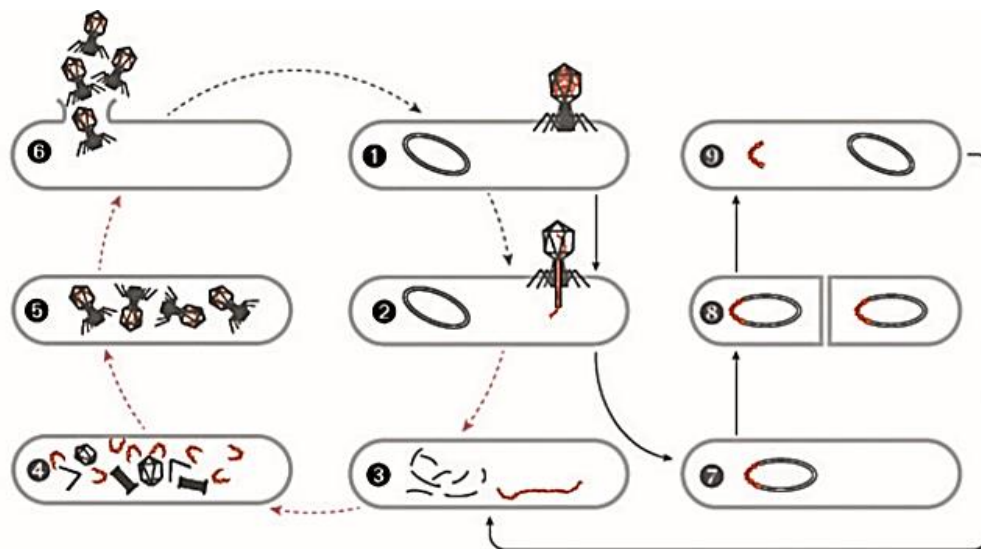


Figura 2. Ciclos líticos y lisogénicos de los bacteriófagos. La figura muestra dos de los ciclos de infección que pueden llevar a cabo los fagos: el ciclo lítico (pasos uno al seis) y el ciclo lisogénico (paso uno a dos y siete a nueve). Paso 1: el fago se une a la bacteria (Adsorción). Paso dos: el material genético del fago entra al citoplasma bacteriano (penetración). Paso tres: síntesis de proteínas tempranas del fago que permiten el inicio del ciclo reproductivo del virus y detienen el metabolismo bacteriano. Paso cuatro: síntesis de proteínas estructurales virales. Paso cinco: ensamblaje de estructuras virales. Paso seis: liberación de la progenie viral. Paso siete: formación del lisógeno, inserción del material genético del fago al cromosoma bacteriano. Paso ocho: multiplicación bacteriana con el profago en su genoma. Paso nueve: escisión del profago y activación del ciclo lítico. Imagen obtenida del artículo: Fagoterapia, alternativa para el control de las infecciones bacterianas. Perspectivas en Colombia (Prada *et al.*, 2015).

Algunos fagos no pueden asignarse a los verdaderos fagos virulentos o templados y en estos casos se habla de:

Desarrollo continuo

Estos fagos se forman permanentemente en la célula y se liberan a través de poros específicos. La maduración del fago, es decir, el recubrimiento de su ADN por una cubierta proteica, continúa durante su liberación. Un ejemplo es el fago filamentoso M13 (familia Inoviridae), ampliamente utilizado para la clonación génica y la expresión de diversas proteínas. Debido a la síntesis de bacteriófagos, la tasa de división de las células infectadas se reduce, lo que conduce a la formación de una "colonia negativa" visible (Krylov, 2001).

Pseudolisogénicos

Otra interacción poco estudiada entre bacterias y virus es la pseudolisogenia. Esta ha sido descrita como un fenómeno en el que hay una producción constante de fagos en presencia de una gran abundancia de células huésped. Es decir, la lisis del fago no produce la muerte del cultivo, sino más bien un estado en el que una gran abundancia de fagos coexiste con un crecimiento exponencial del huésped. Esto podría ser el resultado de una mezcla de células huésped sensibles y resistentes y/o una mezcla de fagos templados y virulentos. Después de la infección, el bacteriófago puede entrar en una fase intracelular inactiva o proceder a una infección lítica. A este respecto, la pseudolisogenia se asemeja a la verdadera lisogenia. Sin embargo, a diferencia de la verdadera lisogenia, el genoma del fago no se integra en los replicones celulares del huésped (Williamson, *et al.*, 2001).

Ripp y Miller (1998) sugirieron que la pseudolisogenia era una condición ambiental en la que las células bacterianas hambrientas coexisten en una relación inestable con los virus infecciosos. En estas condiciones, las células huésped no proporcionan suficiente energía para que el fago entre en una verdadera condición lisogénica o lítica. Los fagos se vuelven virulentos o templados con la adición de concentraciones suficientes de nutrientes.

Fagoterapia

El concepto de fagoterapia, es decir, el uso de fagos específicos de bacterias patógenas en el tratamiento de infecciones, fue planteado por primera vez por Félix d'Herelle en 1917, como un posible tratamiento de *Shigella dysenteriae* en el tratamiento de enfermos de difteria y es una práctica que se ha utilizado tradicionalmente desde principios del siglo XX en los países de Europa del Este (Dini, 2011).

El uso de los bacteriófagos para tratamiento o profilaxis tiene ventajas y desventajas. Entre sus ventajas se encuentra que tienen un impacto limitante: es decir, que, si bien se replican dentro de la bacteria, cuando ésta ya no está disponible, los fagos dejan de producirse y son

gradualmente eliminados por el organismo humano. Cuando se usa un cóctel de bacteriófagos, esto no solamente hace más efectivo el tratamiento, sino que también reduce la probabilidad de que las cepas se puedan volver resistentes a los fagos usados; además que, al replicarse, el fago también sufre mutaciones y mientras la bacteria evoluciona generando resistencia, los fagos coevolucionan junto con ellas. Otra ventaja es la alta especificidad de éstos, ya que, a diferencia de los antibióticos que generan un desbalance en la flora bacteriana y pueden ocasionar una infección secundaria, los fagos solo atacan a una bacteria específica evitando este desbalance bacteriano (Romero, 2015).

La fagoterapia también tiene desventajas como el poder usar solamente fagos líticos, ya que una gran parte de ellos también pueden ser lisogénicos, recombinando su material genético con el de las bacterias, dándoles un fenotipo diferente que muchas veces puede involucrar la producción “de novo” de toxinas como el caso de *Vibrio cholerae*. Otra desventaja es la aprobación para asegurar que estos fagos no generan un riesgo y poder comercializarlos, aunque ya hay algunos aprobados por la FDA y en la actualidad el campo de aplicación en la medicina aún está en fase experimental (Punil, 2017).

Control biológico

Definido como el uso de organismos para suprimir la densidad de población o el impacto de un organismo plaga específico, haciéndolo menos abundante de lo que sería si no se usaran dichos organismos (DeBach 1964).

En los últimos años, se han venido estudiando diferentes alternativas de control biológico para evitar el hecho de que microorganismos patógenos generen resistencia hacia otros métodos. Aquí es donde aparece la fagoterapia. Esta nace como una alternativa no convencional, pero con resultados prometedores (Chisavo *et al.*, 2020).

Agua residual

Las aguas residuales se pueden definir como aquellas que, por el uso del ser humano, representan un peligro y deben ser desechadas, porque contienen gran cantidad de sustancias y/o microorganismos (Espigares *et al.*, 1985).

Dentro del concepto de agua residual, se incluyen aguas con diversos orígenes, como, por ejemplo, aguas de origen doméstico, las cuales suelen contener una gran cantidad de materia orgánica y microorganismos, así como restos de jabones, detergentes, lejía y grasas. También, se incluyen las aguas blancas, que son aquellas de procedencia atmosférica o del riego y limpieza de lugares públicos. Además, se incluyen las aguas de origen agrícola y las aguas de

origen industrial, las cuales presentan una composición variable, dependiendo de las actividades industriales que se lleven a cabo (Espigares *et al.*, 1985).

Las aguas residuales, debido a la gran cantidad de sustancias (algunas de ellas tóxicas) y microorganismos que portan, pueden ser causa y vehículo de contaminación, en aquellos lugares donde son evacuadas sin un tratamiento previo (Espigares *et al.*, 1985).

Bacterias

E. coli

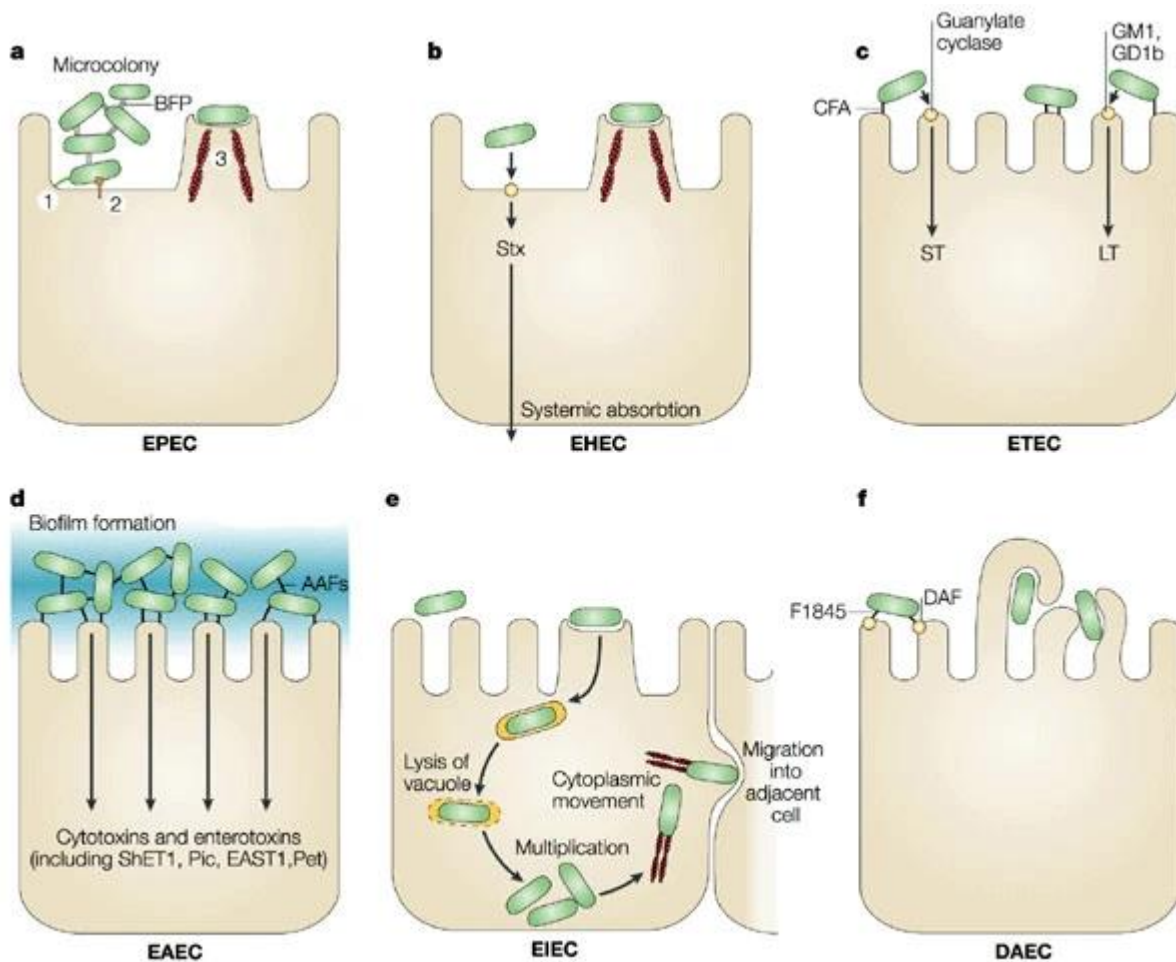
Es un bacilo Gram negativo de la familia *Enterobacteriaceae* que se encuentra principalmente en el tracto intestinal de humanos y animales de sangre caliente como parte de la flora natural (Kaper *et al.*, 2004). Esta bacteria coloniza el intestino humano pocas horas después del nacimiento y forma parte del microbioma natural, siendo necesaria para el correcto funcionamiento del tracto digestivo, además de producir vitamina B y K (Punil, 2017).

Pocas veces estas cepas causan enfermedad. Sin embargo, existen numerosas cepas de *E. coli* que pueden provocar patologías humanas y que presentan una virulencia marcada. Los principales patógenos intestinales, que se describen en función de los síntomas clínicos que generan y de los factores de patogenicidad que se expresan, que también son conocidos como patotipos, son los siguientes (Canet, 2016):

- *E. coli* enterotoxigénicas (ETEC): este patotipo es un importante agente causal de diarrea, responsable de numerosos casos y muertes en niños menores de cinco años de regiones del mundo con ingresos intermedios y bajos. Se estima que produce mil millones de casos de diarrea al año y la mortalidad atribuible en este grupo etario en 2015 fue de 23600 (9600 a 44300, 95% de intervalo de incertidumbre). La patogénesis de ETEC, requiere la colonización o infección y la posterior liberación de sus mediadores para que actúen sobre la célula del hospedero. ETEC se define por la producción de las toxinas termolábil (LT) y termoestable (ST), codificadas en plásmidos y cuya estructura y mecanismos de acción están bien establecidos. La adherencia de ETEC a los enterocitos está mediada por fimbrias, las cuales también están codificadas en plásmidos; en las cepas ETEC de humanos, estas fimbrias se denominan factores de colonización. Una vez que ETEC se une a la mucosa intestinal libera sus toxinas, lo que resulta en diarrea acuosa parecida a la del cólera, característica de este patógeno (Sahl *et al.*, 2017 Fleckenstein *et al.*, 2014).

- *E. coli* enteropatógenas (EPEC): es un patotipo importante dentro de las cepas diarrenogénicas de *E. coli* y se asocia a diarrea acuosa infantil, aguda o persistente, fundamentalmente en países en vías de desarrollo. Pertenece a la familia de patógenos bacterianos que a nivel intestinal causan lesiones de tipo adherencia y borramiento (A/E) que no producen toxinas tipo Shiga. Los cultivos de EPEC ‘típicos’ de origen humano presentan un plásmido de virulencia denominado *E. coli*-adherence-factor (EAF), mientras que las cepas EPEC ‘atípicas’ no poseen dicho plásmido y se han asociado a brotes y casos esporádicos de diarrea en seres humanos (Brinkley *et al.*, 2006; McDaniel *et al.*, 1997; Kaper, 1996; Knutton *et al.*, 1987).
- *E. coli* enteroagregativas (EAEC): es un patógeno que hasta el momento solo se ha identificado en humanos; se caracteriza por agruparse en forma de ladrillos apilados, ya sea sobre las células epiteliales o el cristal. Varios estudios han sugerido que la patogénesis de EAEC se divide en tres etapas: la primera etapa, es la adherencia a la mucosa intestinal mediada principalmente por las fimbrias de adherencia agregativa; la segunda etapa, es la liberación de enterotoxinas y citotoxinas; y la tercera etapa, es la inducción de la inflamación de la mucosa (Estrada *et al.*, 2012). Las características clínicas de la enfermedad causada por EAEC se han descrito básicamente a partir de estudios en voluntarios adultos, brotes y casos esporádicos; Estas cepas producen diarrea acuosa, frecuentemente con moco, con o sin sangre, fiebre, dolor abdominal, náuseas y vómito (Sánchez *et al.*, 2016; Estrada *et al.*, 2014).
- *E. coli* enterohemorrágicas (EHEC): producen una o más toxinas shigoides o verotoxinas Shiga. La toxina shigoide 1 es casi idéntica a la toxina Shiga producida por *Shigella dysenteriae* tipo 1. Se estima un periodo de incubación de 12 a 60 h, siendo la media de 48 h. La sintomatología se manifiesta con calambres abdominales seguida de diarreas acuosas y sanguinolentas. La fiebre es inexistente en la mayoría de los casos. Aproximadamente, en un 10% de los casos este cuadro leve puede derivar en complicaciones como el Síndrome Urémico-Hemolítico (SHU) o Púrpura Trombótica Trombocitopénica (PTT). Aunque en general, la colitis hemorrágica afecta a cualquier grupo de edad, las tasas de infección son máximas en niños menores de cinco años y van decreciendo con la edad (López *et al.*, 2002).

- *E. coli* enteroinvasivas (EIEC): el mecanismo de patogenicidad de EIEC es la invasión del epitelio del colon y para ello, el primer paso es la adherencia de la bacteria a las vellosidades de la mucosa requiriendo de mucinas y adhesinas, para después entrar por endocitosis a la célula, y posterior multiplicación de la EIEC dentro de la célula y diseminación a células sanas adyacentes (Nataro *et al.*, 1998; Rico *et al.*, 1995). Los síntomas característicos en personas infectadas por EIEC son diarrea acuosa, con sangre y moco, pero algunos casos sólo presentan diarrea y ésta en ocasiones es indistinguible de la que produce ETEC. Las cepas de EIEC se asocian más con brotes que con casos aislados, en los cuales la transmisión puede ser de persona a persona, por ingestión de alimentos y/o agua contaminada, convirtiéndose en un patógeno importante en niños mayores de seis meses (Eslava *et al.*, 1994; Snyder *et al.*, 1984).
- *E. coli* invasiva adherente (IAEC): es un patotipo que ha surgido recientemente, asociado con la enfermedad de Crohn (Punil, 2017). Las cepas de AIEC colonizan la mucosa intestinal adhiriéndose a las células epiteliales intestinales. También, son verdaderos patógenos invasivos, capaces de invadir las células epiteliales intestinales a través de un proceso similar a la macropinocitosis, y de sobrevivir y replicarse intracelularmente después de la lisis de la vacuola endocítica. Dentro de los macrófagos, las cepas de AIEC sobreviven y se replican ampliamente sin inducir la muerte de la célula huésped e inducen la liberación de altas cantidades de TNF α . Todas estas propiedades de virulencia designan a las AIEC como un posible patógeno potencialmente capaz de inducir inflamación intestinal persistente, cruzando y rompiendo la barrera intestinal, moviéndose a tejidos profundos y activando continuamente macrófagos (Darfeuille-Michaud, 2002).



Nature Reviews | Microbiology

Figura 3. Tomada de Nataro *et al.*, 1998. Cada una de las seis categorías reconocidas de *E. coli* diarregénica tiene características únicas en su interacción con las células eucariotas. Aquí, la interacción de cada categoría con una célula objetivo típica se representa esquemáticamente. Estas descripciones son en gran parte el resultado de estudios “in vitro” y pueden no reflejar completamente los fenómenos que ocurren en humanos infectados. A. Las EPEC se adhieren a los enterocitos del intestino delgado, pero destruyen la arquitectura microvillar normal, lo que induce la lesión característica de unión y borrado. Los trastornos del citoesqueleto van acompañados de una respuesta inflamatoria y diarrea. 1. Adhesión inicial, 2. Translocación de proteínas por secreción de tipo III, 3. Formación de pedestal. B. La ECEH también induce la lesión adherida y borrosa, pero en el colon. La característica distintiva de EHEC es la elaboración de la toxina Shiga (Stx), cuya absorción sistémica conduce a complicaciones potencialmente mortales. C. De manera similar, la ETEC se adhiere a los enterocitos del intestino delgado e induce diarrea acuosa por la secreción de enterotoxinas termolábiles (LT) y / o termoestables (ST). D. La EAEC se adhiere a los epitelios del intestino delgado y grueso en una biopelícula gruesa y elabora enterotoxinas secretoras y citotoxinas. E. La EIEC invade la célula epitelial del colon, lisa el fagosoma y se mueve a través de la célula nucleando microfilamentos de actina. Las bacterias pueden moverse lateralmente a través del epitelio por diseminación directa de célula a célula o pueden salir y volver a entrar en la membrana plasmática basolateral. F. La DAEC provoca un efecto característico de transducción de señales en los enterocitos del intestino delgado que se manifiesta como el crecimiento de proyecciones celulares largas en forma de dedos, que envuelven las bacterias. AAF, fimbrias de adherencia agregada; BFP, pilus formadores de haces; CFA, antígeno del factor de colonización; DAF, factor de aceleración de la descomposición; EAST1, *E. coli* ST1 enteroagregativa; LT, enterotoxina termolábil; ShET1, enterotoxina 1 de Shigella; ST, enterotoxina termoestable.

Identificación Bioquímica de *E. coli*

Entre los caracteres bioquímicos para la identificación de la *E. coli*, podemos mencionar, que es habitualmente fermentador de la lactosa, urea y citrato negativo, indol positivo y móvil (Algorta, 2006).

Cuadro I
IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA DE ESCHERICHIA COLI

<i>Prueba bioquímica</i>	<i>% de positividad</i>
Oxidasa	0
Producción de indol	98
Rojo de metilo	99
Voges-Proskauer	0
Citrato de Simmons	1
H ₂ S (TSI)	1
Hidrólisis de urea	1
Utilización de malonato	0
Acido de glucosa	100
Gas de glucosa	95
Fenilalanina desaminasa	0
Lisina descarboxilasa	90
Arginina dihidrolasa	17
Ornitina descarboxilasa	65
Movilidad a 36 °C	95
Hidrólisis de gelatina a 22 °C	0
KCN crecimiento en	3
Fermentación de lactosa	95
Fermentación de la sacarosa	50
Fermentación de D-manitol	98
Fermentación de D-sorbitol	94
Fermentación de mucato	95
Fermentación de dulcitol	60
Fermentación de salicina	40
Fermentación de adonitol	5
Fermentación de inositol	1
Fermentación de L-arabinosa	99
Fermentación de la rafinosa	50
Fermentación de L-ramnosa	80
Fermentación de maltosa	95
Fermentación de D-xilosa	95
Fermentación de trealosa	98

Fermentación de celobiosa	2
Fermentación de α -metil-D glucósido	0
Fermentación de eritritol	0
Hidrólisis de la esculina	35
Fermentación de melobiosa	75
Fermentación de D-arabitol	5
Fermentación de D-manosa	98
Fermentación de glicerol	75
Nitrato a nitrito	100
Tartrato de Jordán	95
Utilización de Acetato	90
Lipasa (aceite de maíz)	0
DNasa a 25 °C	0
ONPG	95

Modificado de: Farmer III JJ³

Figura 4. Principales características bioquímicas de *E. coli*. Imagen tomada del artículo “Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *E. coli*” (Rodríguez, 2002).

***Salmonella* spp.**

Salmonella spp., es la enterobacteria de mayor importancia a nivel de salud pública, por producir trastornos del tracto gastrointestinal y septicemia no solo en el ser humano, sino en todas las especies animales (Luján *et al.*, 2007; Selbitz *et al.*, 1995; Tumbull, 1979). El género *Salmonella* recibe su nombre en honor al microbiólogo americano Daniel Elmer Salmon quien, junto a Theobald Smith en 1885, descubrieron los gérmenes designados como salmonelas aislándolos de cerdos con cólera (Stanchi, 2007).

Su morfología corresponde a la de la familia *Enterobacteriaceae*. Se trata de bastones Gram negativos de 0,7 a 1,5 μm de largo, móviles por flagelos distribuidos en forma peritrica (únicamente dos especies son inmóviles: *S. gallinarum-pullorum*, responsables del tifus aviar y pullorosis, respectivamente). Son anaerobios facultativos y no formadores de esporas (Stanchi, 2007).

La *Salmonella* spp. es el grupo más complejo de todas las enterobacterias con más de dos mil cuatrocientos serotipos descritos en el esquema Kauffman White, determinados por la composición de los antígenos somáticos (O), flagelares (H), o de superficie Vi(k).

La *S. entérica* subespecie entérica comprende el 99% de los serotipos aislados de muestras clínicas (Popoff *et al.*, 1992).

Antes de 1983, se aceptaba taxonómicamente la existencia de múltiples especies de *Salmonella*. En la actualidad el género *Salmonella* consta de sólo dos especies, *S. entérica* y *S. bongori*; la primera está dividida a su vez en seis subespecies: *S. enterica* subespecie *enterica*, *S. enterica* subespecie *salamae*, *S. enterica* subespecie *arizonae*, *S. enterica* subespecie *diarizonae*, *S. enterica* subespecie *houtebae* y *S. enterica* subespecie *indica* (Popoff *et al.*, 1992).

La *S. entérica* agrupa a los patógenos de más interés para la salud pública. Como exponente de lo anterior, se considera la fiebre tifoidea causada por *S. Typhi*, una infección sistémica común en países en vías de desarrollo. En raras ocasiones *S. paratyphi* (A, B y C) puede producir un cuadro clínico similar, aunque de menor gravedad. Las demás subespecies de *S. entérica* y también *S. bongori* son habitantes del ambiente y se asocian con animales de sangre fría (Martelli *et al.*, 2012).

- *S. entérica* subespecie *entérica*: es responsable de la mayoría de las infecciones en animales de sangre caliente (homeotermos) y comprende más de 1580 serovares que se diferencian por distintas fórmulas somáticas (antígeno O del lipopolisacárido, LPS) y antigénicas flagelares (Issenhuth-Jeanjean *et al.*, 2014). Algunos de estos serovares están adaptados al hospedador, mientras que otros causan enfermedades en una amplia gama de hospedadores (Baumler *et al.*, 2013). Los serovares adaptados al hospedador se asocian con frecuencia con enfermedades sistémicas como la fiebre tifoidea. Por el contrario, la *Salmonella* no tifoidea (NTS) a menudo causa gastroenteritis en huéspedes inmunocompetentes. Las serovariedades NTS también se han relacionado con bacteriemia en individuos inmunodeprimidos e incluso inmunocompetentes (Keestra-Gounder *et al.*, 2015). Las NTS más comunes aisladas de pacientes humanos incluyen enteritidis, typhimurium, infantis y newport (Hendriksen *et al.*, 2011; Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria, 2018).
- *S. entérica* subespecie *salamae*: ha sido encontrada comúnmente en animales de sangre fría como reptiles y anfibios, pero ocasionalmente también se ha aislado de animales de sangre caliente como aves de corral, especialmente pollos de engorde (Lamas *et al.*, 2018; Chandry *et al.*, 2012). Esta subespecie rara vez causa infecciones en humanos y animales (Lamas *et al.*, 2018; Chandry *et al.*, 2012).

- *S. entérica* subespecie *arizonae*: los reptiles, particularmente las serpientes, son los reservorios naturales de *S. entérica* spp. *arizonae* (Libby *et al.*, 2002). Este organismo también ha sido responsable de brotes graves en pavos y ovejas (Chiodini, 1982). Aunque el organismo es raro, varios estudios sugieren que las serpientes y reptiles lo albergan y lo transmiten a los humanos, lo que resulta en gastroenteritis e infecciones sistémicas (Riley *et al.*, 1998; Hall *et al.*, 1992). Estos casos ocurren a menudo en adultos y niños pequeños inmunodeprimidos (Riley *et al.*, 1998). La mayoría de los casos se dan en niños menores de 5 años. Sin embargo, los bebés corren un riesgo particular (Sanyal *et al.*, 1997). Los reptiles son portadores asintomáticos de este patógeno y probablemente se infectan a través de agua, alimento o suelos contaminados (Sanyal *et al.*, 1997). Hallazgos anteriores indican que estas bacterias probablemente existen como flora comensal en el intestino del animal. La contaminación generalizada del entorno doméstico y un número significativo de casos se produce debido a los reptiles domésticos (Mermin *et al.*, 1997). A menudo, estas infecciones son invasivas y conducen a complicaciones como meningitis, septicemia y osteomielitis (Makin *et al.*, 1996).
- *S. entérica* subespecie *diarizonae*: se informa que las serpientes mascotas son un reservorio importante de *S. entérica* spp. *diarizonae* (Schroter *et al.*, 2004). Esta subespecie también se aísla a menudo de ovejas (Stokar-Regenscheit *et al.*, 2017; Alvseike *et al.*, 2004; Alvseike *et al.*, 2002; Davies *et al.*, 2001) y se asocia cada vez más con infecciones en humanos. Aunque en algunos de estos casos la fuente de la infección se podría rastrear a los reptiles como mascotas y al consumo de carne de oveja (Horvath *et al.*, 2016; Sorén *et al.*, 2015; Hervás *et al.*, 2012), y se desconoce si se producen transmisiones de persona a persona.
- *S. entérica* subespecie *houtenae*: se aisló originalmente de una cacatúa en 1978 y se ha recuperado de una variedad de animales, incluidos mamíferos, aves, reptiles y anfibios (Krawiec *et al.*, 2015; Lukac *et al.*, 2015; Junghanns *et al.*, 2013; Krautwald-Marin *et al.*, 2013, Phillips *et al.*, 1978). Curiosamente, también se informó que las zarigüeyas transportan el organismo asintóticamente en el tracto biliar (Runkel *et al.*, 1991). Las infecciones en pacientes veterinarios incluyen informes de osteomielitis en el cantil de Taylor de una hembra adulta (*Agkistrodon bilineatus taylori*) y granulomas bacterianos de ovario en un gecko de Duvaucel (*Hoplodactylus duvaucelii*) (Le Souëf

et al., 2015; Clancy *et al.*, 2016). Aunque se aísla con poca frecuencia de seres humanos, la *S. entérica* spp. *houtenae* se ha informado en asociación con meningitis o abscesos cerebrales principalmente en niños o adultos inmunodeprimidos (Nimir *et al.*, 2011; Tabarani *et al.*, 2010; Lourenço *et al.*, 2004; Wybo *et al.*, 2004; Ma *et al.*, 2003).

- *S. entérica* subespecie indica: la divergencia de la subespecie indica se caracteriza por la pérdida de SPI-5 y utilización de D-sorbitol y L-ascorbato (Desai *et al.*, 2013), tiene 13 serotipos diferentes (Grimont y Weill, 2007) y solo existe un reporte de caso de infección humana debida a la subespecie indica (Snehalatha *et al.*, 1992).

Identificación Bioquímica de *Salmonella* spp.

Las *Salmonella* spp., poseen metabolismo fermentativo y oxidativo; fermentan glucosa con producción de ácido y gas (excepto *S. typhi*), también fermentan L-arabinosa, maltosa, D-manitol, D-manosa, L-ramnosa, D-sorbitol, trehalosa, D-xilosa y D-dulcitol (Terragno *et al.*, 2003). Son oxidasa negativa, catalasa positiva, indol y Voges- Proskauer (VP) negativo, rojo de metilo y citrato de Simmons positivo, producen H₂S, son urea negativa, lisina + ornitina y descarboxilasa positivo (Terragno *et al.*, 2003). Entre otras características bioquímicas se encuentran la reducción de nitratos a nitritos, no desaminan la fenilalanina y presentan actividad tetratonato reductasa (Pachón, 2009; Jawetz *et al.*, 2005).

Tabla 1. Reacciones bioquímicas de *Salmonella* sp.

Prueba o sustrato	Resultados		Reacción en especies de <i>Salmonella</i> ^(a)
	Positivo	Negativo	
Glucosa (TSI)	Fondo amarillo	Fondo rojo	+
Lisina decarboxilasa (LIA)	Fondo violeta	Fondo amarillo	+
H ₂ S (TSI, LIA y SIM)	Ennegrecimiento	no ennegrecimiento	+
Agar urea	Color rosado	Sin cambios de color	-
Prueba de Indol (SIM)	Color rosado en superficie	Color amarillo en superficie	-
Prueba de Voges-Proskauer	Color rojo a rosado	Sin cambios de color	-
Prueba de rojo metilo	Color rojo difuso	Color amarillo difuso	+
Citrato de Simmons	Crecimiento, color azul	Sin crecimiento, sin cambio de color	v
Agar fenilalanina	Sin cambios de color	Color verde	-
O.N.P.G.	Sin cambios de color	Color amarillo	-

^a +: 90% o más positivos en 1 o 2 días; -: 90% o más negativos en 1 o 2 días; v: variable (Salmonelas móviles positivo, salmonelas inmóviles negativo).

Figura 5. Reacciones bioquímicas de *Salmonella* spp. Tomado del libro Cama de pollo en Entre Ríos. Compilador: Juan Martín Gange y Aportes para su uso y manejo. Compilador: Gange, 2016.

Vitek 2

El sistema VITEK 2, es un sistema automatizado de identificación bacteriana y estudio de sensibilidad antimicrobiana (Figura 6). La identificación de las bacterias se basa en la inoculación de una suspensión de un cultivo puro de microorganismos en tarjetas con determinados paneles para el ensayo de diversas reacciones bioquímicas. La sensibilidad antimicrobiana, se lleva a cabo en forma similar a través de tarjetas que contienen diluciones estandarizadas de distintos antibióticos correspondientes a los puntos de corte de sensibilidad establecidos por NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) (Romeu *et al.*, 2010).



Figura 6. Dispositivo Vitek 2 compact. Imagen tomada de la página web Bimedis.com 30/6/2021.

Existen 4 tipos de tarjetas reactivas disponibles para la identificación de diferentes clases de organismos:

- GN – Bacilos Gram negativos fermentadores y no fermentadores.
- GP - Cocos y bacilos Gram positivos no formadores de esporas.
- YST – Levaduras y organismos levaduriformes.
- BCL – Bacilos Gram positivos formadores de esporas.

Las tarjetas tienen 64 pocillos que contienen, cada uno, un sustrato de prueba individual. Con estos sustratos se miden varias actividades metabólicas como acidificación, alcalinización, hidrólisis enzimáticas y desarrollo en presencia de sustancias inhibitoras. Las tarjetas están selladas en ambos lados por una película clara que evita el contacto entre las diferentes mezclas sustrato-microorganismo y a la vez, permite la transmisión del nivel de oxígeno apropiada. Cada tarjeta tiene un tubito de transferencia pre-insertado para la inoculación (Figura 7). Estas tarjetas tienen códigos de barras que contienen información sobre el tipo de producto, número de lote, fecha de caducidad y un identificador único que puede ser ligado a la muestra ya sea antes o después de cargar la tarjeta al sistema (Biomérieux, 2018).



Figura 7. Carrete con tarjetas GN para el análisis de bacilos Gram negativos y AST para para el análisis de la susceptibilidad antimicrobiana. Foto tomada por Gina Hall.

Resistencia microbiana

La resistencia a los antimicrobianos (o farmacoresistencia) se produce cuando los microorganismos, sean bacterias, virus, hongos o parásitos, sufren cambios que hacen que los medicamentos utilizados para curar las infecciones producidas por estos, dejen de ser eficaces. Los microorganismos resistentes a la mayoría de los antimicrobianos se conocen como ultrarresistentes o multirresistentes. El fenómeno es muy preocupante porque las infecciones por microorganismos resistentes pueden causar la muerte del paciente, transmitirse a otras personas y generar grandes costos tanto para los pacientes como para la sociedad (OMS, 2017). El incremento de la resistencia microbiana por la presión selectiva que representa la utilización de antibióticos a gran escala, sobre todo en nuestros hospitales o nosocomios, ha favorecido la aparición de cepas con mecanismos de resistencia que, en muchas ocasiones, nos dejan prácticamente sin alternativas para el tratamiento de las infecciones (Serra, 2017).

Los fenómenos de resistencia antimicrobiana son variados, destacando entre ellos cuatro mecanismos principales:

- **Enzimas hidrolíticas:** las bacterias sintetizan enzimas que hidrolizan al antimicrobiano, destruyendo su acción antibacteriana, sin tener posibilidad de actuar sobre el microorganismo. Las β -lactamasas son enzimas que hidrolizan la unión peptídica endocíclica del anillo beta-lactámico. La producción de β -lactamasas es el mecanismo más frecuente de resistencia antibiótica. Existen continuas mutaciones que producen expresión de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), manifestándose como resistencia a cefalosporinas de 3ra generación (ceftriaxona). Para combatir esta resistencia se utiliza un inhibidor enzimático que tiene mayor afinidad a la enzima e

impide la destrucción del antimicrobiano y de esta manera, permite su acción (Ácido clavulánico y sulbactam). Las BLEE se asocian a co-resistencia con aminoglicósidos y cotrimoxazol, dada la frecuencia de transferencia en el mismo plásmido (Viswanatha *et al.*, 2008).

- **Modificación del sitio activo:** la modificación de uno o varios aminoácidos genera un cambio en el centro de unión, lo que disminuye la afinidad por el antimicrobiano. Ej: la **modificación de PBP:** el PBP (penicillin-binding-protein) es un complejo enzimático que permite la síntesis del peptidoglicano, un compuesto de la pared celular en bacterias, principalmente en Gram positivas. Si se produce mutación del sitio de unión al antimicrobiano como los betalactámicos, éstos no pueden actuar y se genera resistencia a ellos.

Modificación ribosomal: los genes *erm A* y *erm B* producen modificación del sitio activo del ribosoma, mediante metilación. Este mecanismo es importante en la resistencia a macrólidos en *S. pneumoniae* y *S. pyogenes* (Wierzbowski *et al.*, 2005).

- **Disminución de la permeabilidad de la pared celular al ingreso del antimicrobiano:** cambios en el diámetro y/o número de porinas pueden bloquear el ingreso del antimicrobiano a la bacteria. Existe disminución de la expresión de porinas lo que disminuye la susceptibilidad a betalactámicos y fluoroquinolonas en *Pseudomonas* (Driscoll *et al.*, 2007).
- **Bombas de eflujo:** transporta al antimicrobiano hacia el exterior de la célula sin modificaciones, pero sin acción antimicrobiana. Existen bombas de eflujo multidrogas en la pared bacteriana que permiten la expulsión de fármacos como los antimicrobianos. Los genes involucrados son *mefA* (*S. pneumoniae*), *norA* (*S. aureus*) y *mex* (*P. aeruginosa*). Estos genes explican la resistencia a macrólidos y fluoroquinolonas en estos patógenos. Para combatir este tipo de resistencia, se encuentran en estudio la asociación de inhibidores de bombas de eflujo junto con el antimicrobiano (Zhanel *et al.*, 2004; Gotoh *et al.*, 2001).

La OMS publicó en enero de 2017 su primera lista de «patógenos prioritarios» resistentes a los antibióticos, en la que se incluyen las 12 familias de bacterias más peligrosas para la salud humana. En la lista se pone de relieve especialmente la amenaza que suponen las bacterias Gram negativas resistentes a múltiples antibióticos. Estas bacterias tienen la capacidad innata de encontrar nuevas formas de resistir a los tratamientos y pueden transmitir material genético que permite a otras bacterias hacerse farmacorresistentes.

La lista de la OMS se divide en tres categorías con arreglo a la urgencia en que se necesitan los nuevos antibióticos: prioridad crítica, alta o media. El grupo *Enterobacteriaceae* (*Klebsiella pneumoniae*, *E. coli*, *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Proteus* spp., *Providencia* spp., *Morganella* spp.) se encuentra en la categoría de prioridad crítica, siendo resistente a los carbapenémicos, las cefalosporinas de tercera generación que son los mejores antibióticos disponibles para tratar las bacterias multirresistentes y además, son productoras de BLEE (β -lactamasas de espectro extendido), enzimas que descomponen el antibiótico común. La *Salmonella*, se encuentran en la categoría de prioridad media, siendo resistentes a las fluoroquinolonas.

Medios y reactivos

Caldo LB

El medio LB, también conocido incorrectamente como medio Luria-Bertani, se usa ampliamente para cultivar cultivos bacterianos, principalmente porque es fácil de preparar y proporciona una amplia base de nutrientes (Garboza *et al.*, 2011). El caldo LB contiene por mL, 10 mg de triptona (una mezcla de péptidos formados por la digestión de la caseína con la enzima pancreática, tripsina), 5 mg de extracto de levadura (un autolisado de células de levadura) y 5 o 10 mg de NaCl. Fue formulado por Giuseppe Bertani en 1951 para estudiar la lisogenia en *E. coli*. Lo llamó "caldo de lisogenia" o LB. En particular, la formulación original incluía 1 mg/mL de glucosa, que se ha eliminado en tiempos más recientes. Este medio fue diseñado para trabajar a bajas densidades bacterianas. Se desaconseja el uso del medio LB en cualquier estudio en el que el estado fisiológico y las funciones metabólicas de la célula sean importantes (Nikaido, 2009).

Caldo nutritivo

Medio no selectivo, utilizado para procedimientos generales y el crecimiento de microorganismos con escasos requerimientos nutricionales. Contiene pluripeptona (una mezcla a partes iguales de peptona de carne y de caseína) y extracto de carne que constituye la fuente de carbono y nitrógeno necesarias para el adecuado desarrollo bacteriano. Puede ser utilizado, además, como pre-enriquecimiento en la búsqueda de *Salmonella* spp. a partir de alimentos, ya que permite recuperar células dañadas, diluir metabolitos tóxicos y sustancias inhibitorias (Ficha técnica Britania, 2015).

Caldo lauril sulfato

Se emplea para el recuento y detección de microorganismos coliformes en aguas, leches y productos alimenticios. También, se emplea en estudios del proceso de fermentación de la lactosa. Por la presencia de laurilsulfato de sodio, queda inhibida la práctica totalidad de la flora secundaria. El resto de los componentes constituyen los soportes nutritivo, energético, salino y regulador del pH necesarios para el buen desarrollo de los coliformes (Manual Básico de Microbiología, 2003).

Caldo tetracionato

Se emplea como medio de enriquecimiento selectivo para aislar *Salmonella* en gran diversidad de muestras. Por la presencia de las sales biliares, se inhibe el crecimiento de los microorganismos Gram positivos. El tetracionato se produce a partir del tiosulfato, cuando después de esterilizar el medio se añade asépticamente la solución yodo-yodurada; el tetracionato tiene un efecto inhibitor sobre los Coliformes y la mayor parte de las bacterias intestinales. Los *Proteus* y las *Salmonellas* pueden desarrollarse correctamente. A su vez el carbonato de calcio mantiene el pH del medio, al neutralizar el ácido sulfúrico producido por la reducción del tetracionato, de lo contrario el medio se iría acidificando y se detendría el crecimiento de todos los gérmenes. La mezcla de peptonas constituye el soporte nutritivo. La USP aconseja la adición de verde brillante que inhibe principalmente la flora Gram-positiva, sin embargo, a veces se desaconseja la adición del verde porque el medio es muy inhibitor (Manual Básico de Microbiología, 2003).

Caldo selenita cisteína

Se emplea para el enriquecimiento selectivo de *Salmonella*. La presencia del hidrógeno selenito de sodio inhibe el crecimiento de coliformes y enterococos, mientras que *Salmonella*, *Proteus* y *Pseudomonas* no son inhibidos. El efecto inhibitor del Selenito desaparece a partir de las 18-24 h de incubación y el crecimiento de la flora acompañante puede dificultar el crecimiento de *Salmonella*. La Cistina tiene un efecto positivo en el crecimiento de *Salmonella* (Manual Básico de Microbiología, 2003).

Caldo lactosado.

El caldo lactosado es un medio de cultivo líquido, no selectivo, utilizado principalmente como medio de pre-enriquecimiento en el aislamiento de cepas de *Salmonella* provenientes del análisis microbiológico realizado a alimentos procesados, productos lácteos o agua. Así lo recomienda la International Commission on Microbiological Specifications for Foods

(ICMPF). También, se puede utilizar para el análisis de coliformes totales y fecales en agua y alimentos. El medio contiene digerido enzimático de gelatina, extracto de carne y lactosa, sustancias necesarias para el crecimiento bacteriano. Además, la lactosa es un carbohidrato fermentable, y, por tanto, algunos coliformes son capaces de metabolizarlo con la producción de gas (Pascual *et al.*, 2000).

Agar Nutritivo.

El agar nutritivo es un medio de cultivo sólido no selectivo y no diferencial, donde crecen todo tipo de bacterias no exigentes desde el punto de vista nutricional. Es un medio simple, y a pesar de su nombre, contiene un valor nutritivo más bajo en comparación con otros medios similares, como por ejemplo el agar infusión cerebro corazón o el agar tripticasa soya.

Su utilidad en el laboratorio es muy variada. Principalmente sirve para el subcultivo de especies, mantenimiento de cepas, contaje de colonias, como base para preparar agar sangre, entre otras. Está compuesto principalmente de extracto de carne o extracto de levadura y peptonas o digerido pancreático de gelatina (representa las fuentes de carbono y minerales esenciales), agar-agar y cloruro de sodio (brinda al medio la osmolaridad necesaria para el desarrollo bacteriano) (Gil, 2018).

Agar-agar.

El agar es un elemento solidificante muy empleado para la preparación de medios de cultivo. Se licúa completamente a la temperatura de ebullición del agua y se solidifica al enfriarse por debajo de los 45° C. Con mínimas excepciones, no tiene efecto sobre el crecimiento de las bacterias y no es atacado por aquellas que crecen en él.

El agar está formado por la mezcla de dos tipos de polisacáridos: la agarosa y la agarpectina. La agarosa es el componente principal, representando alrededor del 70% del total. Tanto la agarosa como la agarpectina tienen la misma estructura básica, formada por unidades alternas de D-galactosa y 3,6-anhidro-L-galactopiranosas unidas por enlaces α -(1-3) y β -(1-4) (Calvo, 2014).

Agar XLD

Medio diferencial y selectivo utilizado para el aislamiento y diferenciación de bacterias enteropatógenas de muestras clínicas. Contiene azúcares y extracto de levadura como base nutritiva, desoxicolato sódico como agente selectivo y rojo fenol como indicador. La presencia de tiosulfato sódico y de citrato férrico amónico permite la detección de colonias productoras

de ácido sulfhídrico. La presencia de xilosa y lisina ayuda a la diferenciación de las colonias de *Shigella* y *Salmonella* spp. (Prats, 2005).

Agar EMB

El agar eosina azul de metileno (EMB de Levine), es un medio selectivo diferencial para bacterias Gram negativas no exigentes. Los colorantes contenidos en el medio inhiben el crecimiento de las bacterias Gram positivas, excepto el *Enterococo*. Con ello, se permite la diferenciación de las enterobacterias fermentadoras de la lactosa (color violeta intenso) de las no fermentadoras (grisácea). *E. coli* aparece violeta, como lactosa positiva, pero con un brillo verde metálico característico. También, permite el crecimiento de *Nocardia*, formando colonias típicas (Prats, 2005).

Agar MacConkey.

Es un medio diferencial y selectivo muy utilizado para el aislamiento e identificación de enterobacterias (bacilos Gram negativos). Lleva en su composición sales biliares y violeta cristal que inhiben el crecimiento de Gram positivos y hongos. Contienen también lactosa y rojo neutro como indicador de pH. Las bacterias fermentadoras de lactosa (lactosa+) acidifican el medio y adquieren un color rosado (por ej, *E. coli*), mientras que las no fermentadoras de lactosa (lactosa-) aparecen incoloras (por ej., *Salmonella*) (Barrero, 2016).

Buffer SM-Gelatina

El tampón SM se utiliza principalmente en el laboratorio de biología molecular. Se utiliza para la manipulación rutinaria de suspensiones de fagos. La gelatina en el tampón SM estabiliza las partículas de fago lambda durante el almacenamiento.

Para preparar 1 L de tampón SM con gelatina, debemos disolver 5.8 g de NaCl y 2 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ en 800 mL de H_2O ; luego agregamos 50 mL de Tris-Cl (1 M, pH 7,5) y 5 mL gelatina (2% p/v); ajustamos el volumen a 1 L con H_2O . Esterilizamos el tampón en autoclave durante 20 min a 15 psi ($1,05 \text{ kg/cm}^2$) en ciclo líquido. Una vez que la solución se haya enfriado, es recomendable dispensar en alícuotas de 50 mL en recipientes estériles y desechar cada alícuota después de su uso para minimizar la posibilidad de contaminación. El tampón SM con gelatina se puede almacenar indefinidamente a temperatura ambiente (Cold Spring Harbor Protocols, 2006).

Agua peptonada.

Es un medio de enriquecimiento no selectivo, que contiene peptona y cloruro de sodio. La peptona proporciona los nutrientes necesarios para el desarrollo microbiano y el cloruro de sodio mantiene el equilibrio osmótico. En los análisis de alimentos, permite recuperar células de enterobacterias dañadas por procesos fisicoquímicos a los que han sido sometidas. Además, puede ser utilizado como diluyente de muestras en reemplazo de solución fisiológica y como medio base para la fermentación de hidratos de carbono (Forbes *et al.*, 2009).

Cloruro de calcio (CaCl₂).

El cloruro de calcio es un compuesto químico, inorgánico, mineral utilizado como medicamento en enfermedades o afecciones ligadas al exceso o deficiencia de calcio en el organismo. Es una solución incolora.

Según la literatura científica, la presencia de Ca⁺² u otros iones divalentes (como el Mg⁺²) en algunos fagos, estabiliza al ADN enrollado en el interior de la cápside, mejora en forma visible la tasa de adsorción y controla la penetración eficiente del ADN en el interior de la bacteria. Al facilitar la adsorción de algunos fagos, se podría generar un aumento en el número de bacterias infectadas y, por lo tanto, una mayor cantidad de progenie de fagos (García *et al.*, 2018).

Cloroformo.

Es un líquido incoloro de olor dulce y agradable. Es una de las formas más usadas para la conservación de los lisados fágicos, ya que este impide la contaminación microbiana de los mismos. Sin embargo, se sabe que algunos bacteriófagos son sensibles a este reactivo (Wong, 1994).

OBJETIVOS

Objetivo general

Aislamiento y caracterización biológica de bacteriófagos, así como de cepas bacterianas de *E. coli* y *Salmonella* spp., a partir de aguas residuales de la planta de tratamiento de agua residual (PTAR) de la Ciudad de Panamá.

Objetivos específicos

- Aislar bacteriófagos para cepas de *E. coli* y *Salmonella* spp. a partir de muestras de aguas residuales procedentes de la PTAR de la Ciudad de Panamá, mediante la técnica de doble capa de agar.
- Purificar bacteriófagos para cepas de *E. coli* y *Salmonella* spp. mediante la técnica de doble capa de agar, para cepas de *E. coli* y *Salmonella* spp.
- Caracterizar biológicamente los bacteriófagos aislados para *E. coli* y *Salmonella* spp.
- Aislar cepas de *E. coli* y *Salmonella* spp. a partir de muestras de aguas residuales procedentes de la PTAR de la Ciudad de Panamá, mediante las técnicas de dispersado.
- Identificar y conocer el perfil de sensibilidad de las cepas aisladas de *E. coli* y *Salmonella* spp., a través de la plataforma automatizada para la identificación y test de sensibilidad antimicrobiana VITEK 2.

HIPÓTESIS

Ha: la detección de bacteriófagos confirma la presencia de cepas de *E. coli* y *Salmonella* spp. en las aguas residuales.

Ho: la detección de bacteriófagos no confirma la presencia de cepas de *E. coli* y *Salmonella* spp. en las aguas residuales.

CAPÍTULO II
METODOLOGÍA

METODOLOGÍA

Puntos de muestreo

Se seleccionó como único punto de muestreo la PTAR de la Ciudad de Panamá, ubicada en Juan Díaz, al sur del Corredor Sur y al Oeste de la desembocadura del río Juan Díaz. El terreno está rodeado de propiedades privadas, a pesar de que en su mayoría es manglar y pantanos salobres. Esto se debe a que las titulaciones se dieron años atrás cuando titular manglares era legal.

Las principales cuencas en donde se generan aguas residuales que serán transportadas al sistema de tratamiento de Juan Díaz, drenan un área de 306,43 km². Estas incluyen los ríos Tocumen, Tapia, Las Lajas, Mataznillo, Curundú, Río Abajo y la quebrada La Gallinaza (Martínez *et al.*, 2015).

Colecta de muestra

Se colectó un volumen de 100 mL de agua residual en envases estériles de tapa rosca de 100 mL, se transportó en cadena de frío desde la PTAR de la Ciudad de Panamá hasta los Laboratorios de Microbiología Experimental y Aplicada (LAMEXA) y Microbiología de Aguas (LAMA). Vicerrectoría de Investigación y Post-Grado, Universidad de Panamá.

Análisis en laboratorio

Curva de crecimiento

Para este procedimiento se tomó 300 µL de cultivo de la bacteria hospedera que mantenía 18-20 h de crecimiento, y se colocó en un matraz nefelométrico conteniendo 30 ml de caldo nutritivo estéril que se inoculó con una suspensión bacteriana en fase exponencial de crecimiento. Seguidamente, se analizó la evolución del crecimiento bacteriano midiendo su densidad óptica con un Espectrofotómetro.

Bacteriófagos

Aislamiento de bacteriófagos que infecten a cepas de *E. coli* y *Salmonella spp.*

Para realizar este procedimiento, se siguió la metodología utilizada por Jamalludeen *et al.* (2007), con ligeras modificaciones.

Preparación previa:

24 h antes, se cultivó la bacteria ATCC en 50 mL de caldo LB estéril contenido en un Erlenmeyer de 125 mL y pasadas las 24 h, se sembró nuevamente la bacteria huésped en 50 mL de caldo LB estéril en otro Erlenmeyer de 125 mL, hasta que alcanzó su fase logarítmica de crecimiento con una densidad óptica de al menos 5 McFarland.

Enriquecimiento

Se tomaron 2 mL del agua residual y se filtraron empleando filtros de jeringuilla de acetato de celulosa con poros de 0.45 μm y 0.22 μm . Una vez fue filtrado, se agregó a un tubo de cristal con tapa de rosca de 10 mL que contiene 2.5 mL de caldo nutritivo al doble de su concentración y 200 μL de un cultivo de la cepa ATCC seleccionada como hospedera que se encontraba en su fase logarítmica, en presencia de cloruro de calcio 10 mM. Seguidamente, se incubó a 37° C durante 24 h.

Aislamiento de fagos

Pasadas las 24 h, el volumen enriquecido se centrifugó a 8500 rpm durante 15 min en tubos cónicos de 15 mL, se recuperó el sobrenadante y se filtró utilizando filtros de jeringuilla de acetato de celulosa con poros de 0.22 μm . Posteriormente, se inocularon en un microtubo de 1.5 mL, 100 μL de un cultivo de cepas bacterianas ATCC (9842 de *Salmonella entérica* subespecie Entérica serovar Bispebjerg, 14028 de *Salmonella entérica* subespecie Entérica serovar Typhimurium, 8739 de *E. coli*, 11229 de *E. coli*, o 15597 de *E. coli*), con 300 μL del sobrenadante filtrado todo en presencia de cloruro de calcio 10 mM. Esta mezcla se incubó durante 30 min a temperatura ambiente (TA) y luego, esta se agregó a 3 mL de Top Agar (caldo nutritivo + agar-agar 0.75% precalentado a 50° C en baño María), se mezcló evitando formar burbujas, y se vertió sobre un plato Petri con agar nutritivo (12 mL) a una concentración normal, y esto se dejó solidificar, para luego ser incubado a 30° C durante 24 h.

Purificación de bacteriófagos

Según el protocolo de Jamalludeen *et al.* (2007), se inspeccionaron los platos Petri para verificar la presencia de placas de lisis. Seguidamente, empleando una punta de micropipeta estéril, se tomó una placa de lisis, se suspendió en 150 μL de buffer fago o buffer SM-Gelatina (NaCl y $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ Tris-Cl y gelatina), se mezcló vigorosamente con la micropipeta y se incubó durante 30 min a TA. En este tiempo, se homogenizó cada 10 min utilizando un vórtex por 5 s. Pasados los 30 min, se prepararon diluciones seriadas de base 10 desde 10^{-1} a 10^{-4} en buffer SM-Gelatina. Seguidamente, se hizo la infección en un microtubo de 1.5 mL, se tomaron 100 μL de cada dilución, 100 μL del cultivo de las cepas bacterianas hospedadoras (con un tiempo de crecimiento de 18-20 h aproximadamente) y 2 μL de cloruro de calcio a 10 mM, se incubaron por 30 min a TA. Al culminar los 30 min, se añadió el enfrentamiento a 3 mL de Top Agar (caldo nutritivo + agar-agar 0.75% precalentado a 50° C en baño María) y 30 μL de cloruro de calcio al 10 mM, esto se vertió en un plato Petri con Agar nutritivo de fondo con concentración normal (12 mL) y luego, se incubó manteniendo los platos Petri invertidas a 30° C durante 24 h hasta visualizar las placas de lisis o unidades formadoras de placa (UFP). Para

una mejor observación se tiñeron con Azul de metileno al 3% los platos Petri que mostraron crecimiento.

Se repitieron los pasos de la purificación hasta que la morfología de las placas de lisis de las muestras fuera homogénea (aproximadamente 4 a 5 veces) y se determinó su título (UFP/mL).

Determinación del título viral

La concentración o título del bacteriófago se determinó empleando la técnica de doble capa de agar, tomando como referencia la metodología utilizada por Jamalludeen *et al.* (2007) con ligeras modificaciones. Se tomaron 100 μ L de filtrado de bacteriófagos y se realizaron diluciones seriadas de base 10 desde 10^{-1} hasta 10^{-10} en microtubos de 1.5 mL que contenían 900 μ L de buffer SM-gelatina. Posteriormente, se tomaron 100 μ L de cultivo bacteriano con un tiempo de crecimiento de aproximadamente 18 – 20 h y luego, se enfrentaron con 100 μ L de cada dilución seriada en presencia de 2 μ L cloruro de calcio 10 mM. Este enfrentamiento se dejó incubando durante 30 min a TA. Después, del enfrentamiento se mezcló con 3 mL de top-agar y cloruro de calcio 10 mM.

Cada suspensión de esta mezcla se vertió sobre platos Petri de agar nutritivo con concentración normal (12 mL) y se extendió uniformemente por toda la superficie con ligeros movimientos circulares. Se mantuvo a TA hasta que el agar solidificara por completo y se incubaron los platos a 37° C durante 24 h. Pasadas las 24 h, se contaron los puntos claros donde no hubo crecimiento tomando a cada uno de ellos como una UFP, tomando en cuenta solo los platos con 30 a 300 UFP. El título viral se calculó empleando la siguiente fórmula:

$$\text{UFP/mL} = \text{Número de placas}/(\text{d})(\text{v})$$

Dónde: d= dilución, v= volumen de virus diluido añadido a la caja.

La concentración de bacteriófagos se expresó como unidades formadoras de placas por mililitro (UFP/mL).

Propagación de bacteriófagos

Una vez purificados los bacteriófagos y determinada su concentración, se procedió a su propagación para alcanzar una concentración adecuada de los mismos. Se mezcló 1 mL del cultivo bacteriano en fase exponencial con 100 μ L del bacteriófago purificado en un tubo de ensayo con 3 mL de agar blando (caldo nutritivo + agar-agar 0.75% precalentado a 50°C en baño María), se vertió en un plato Petri con Agar Nutritivo a la concentración normal (12 mL), se dejó reposar hasta que solidificara y posteriormente, se incubó a 37°C durante 24 h. Pasadas las 24 h de incubación, se verificó la presencia de placas de lisis. Se añadió una alícuota de 6 mL de buffer SM-gelatina a los platos Petri que muestran una gran cantidad de placas de lisis o calvas, estos platos Petri se dejaron en reposo toda la noche a 4°C y luego, se centrifugó el

eludido resultante a 10,000 x g durante 15 min, y se filtró con un filtro de membrana de 0.22 µm, se calculó la concentración obtenida y se almacenó a 4°C protegidos de la luz, para que no se inactivaran.

Caracterización biológica de los bacteriófagos

Propagación de bacteriófagos en medio líquido para la caracterización biológica

En un matraz de Erlenmeyer de 125 mL que contenía 10 mL de caldo LB, se inoculó 0.1 mL de un cultivo de entre 18 a 20 h de la cepa ATCC seleccionada como hospedera, *E. coli* 15597, 8739, 11229 y *Salmonella entérica* subespecie entérica serovar Bispebjerg 9842, *Salmonella entérica* subespecie Entérica serovar Typhimurium 14028, cada una en su respectivo erlenmeyer y 0.1 mL del lisado de bacteriófagos correspondiente para cada cepa, todo en presencia de cloruro de calcio 10 mM. Se agitó 8 h a 100 rpm entre 22° a 24°C y pasado este tiempo, la mezcla se centrifugó a 10,000 rpm durante 25 min, se colectó el sobrenadante y se filtró con filtros de jeringuilla de acetato de celulosa con poros de 0.22 µm. El filtrado se conservó en tubos cónicos de 15 mL a 4°C en la oscuridad hasta su uso.

Sensibilidad al cloroformo

Se utilizó como modelo el propuesto por Wong (1994). En un microtubo de 1.5 mL, que contiene 0.1 mL de cloroformo puro, se sirvieron 0.5 mL del lisado del bacteriófago, se agitó por 10 min a TA y luego, se procedió a centrifugar a 12,000 rpm por 5 min. Se determinó el título de los sobrenadantes de acuerdo a la metodología descrita (titulación en doble capa de agar). Como control, en lugar de cloroformo, se agregó a la suspensión de fagos solución Buffer SM-gelatina estéril. Este procedimiento se realizó por triplicado.

Efecto de la exposición a la luz UV

Se utilizó como modelo el propuesto por Wong (1994), con ligeras modificaciones. En una placa de dilución se colocó 1 mL del lisado fágico. Estos se expusieron a una lámpara de luz UV (onda corta), por diferentes intervalos de tiempo (20, 40, 60 y 90 s) a una distancia de 20 cm. Al cumplirse cada intervalo de tiempo de manera individual, se tomaron 0.1 mL del lisado fágico y se determinó la infectividad del bacteriófago así tratado sobre la cepa correspondiente. Como control de infección, se utilizó el lisado fágico sin exposición a luz UV. Y como control de no infección, se utilizó el Buffer SM-Gelatina estéril. Se determinó el título final de los bacteriófagos utilizando la técnica de doble capa (como se mencionó anteriormente). Los tratamientos fueron realizados por triplicado.

Resistencia al pH

Se utilizó como modelo el propuesto por Haq *et al.* (2012). 500 µL de solución de bacteriófagos, se dispensaron en tubos de ensayos los cuales contenían 5 mL de buffer PBS ajustado a pH de 3, 5, 7, 9, utilizando HCL o NaOH, durante 1 h. Culminado el tiempo, se determinó el título final de los bacteriófagos mediante la técnica de la doble capa (como se mencionó anteriormente). Los tratamientos se realizaron por triplicado.

Efecto de la temperatura

Se utilizó como modelo el propuesto por Haq *et al.*, (2012), con ligeras modificaciones. Un mL de solución fágica se dispensó en tubos de ensayo de 16 x 150 mm y se sometió a temperaturas de 25°, 37°, 50°, y 70°C en baño María por 1 h. Concluido el tiempo, se determinó el título final de los bacteriófagos mediante la técnica de doble capa. Los tratamientos se realizaron por triplicado.

Bacterias

Aislamiento e identificación de *E. coli* ambiental.

Para el aislamiento de esta enterobacteriácea se realizó el método de dilución en serie y esparcido superficial.

Dilución en serie

Se homogenizó la muestra de agua residual sin filtrar y se tomaron 10 mL que fueron diluidos en 90 mL de agua Peptonada (10^{-1}), se homogenizó esta dilución y se tomó 1 mL y se diluyó en 9 mL de agua Peptonada (10^{-2}), y se hizo seriadamente hasta la dilución 10^{-6} .

Aislamiento en agar EMB

Se tomaron 3 alícuotas de 0.1 mL de las diluciones 10^{-3} a 10^{-6} y se sembraron de manera individual, por esparcido en agar EMB. A continuación, se incubaron a $37.0^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24 h y luego, se revisaron y contabilizaron las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) resultantes. Después, se seleccionaron cinco colonias de las placas que se encontraron en un rango de 30 a 300 UFC, se sembraron las cinco UFC escogidas por estriado en agar EMB y se incubaron a $37.0^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24 h.

Identificación de *E. coli*

Se realizó tinción de Gram a las UFC aisladas para confirmar por morfología y criterio de Gram. Luego, se tomó 1 UFC y se transfirió a 10 mL de caldo LB y se incubó a temperatura ambiente (TA), en agitación constante entre 80 y 100 rpm, por un tiempo entre 18 y 20 h (para asegurarnos que esté en fase exponencial) para hacer alícuotas a partes iguales con glicerol al 40% y se almacenó en congelación a -80°C para el posterior análisis con VITEK 2.

Aislamiento e identificación de *Salmonella* ambiental

Para el aislamiento de esta enterobacteriácea se utilizó el método de filtración a través de membrana: cada 100 mL de muestra de agua residual se homogenizó y posteriormente, se filtró utilizando el método de filtración por gravedad con un papel filtro en forma cónica. Este procedimiento se realizó para eliminar la mayor cantidad de sedimento presente en las muestras.

A continuación, se realizó la técnica de filtración a través de membrana. Para ello se utilizó un sistema de filtración en donde se pasó cada muestra (previamente filtrada) a través de una membrana de nitrocelulosa de poro 0.45 μm . Se filtraron 50 mL de cada muestra por membrana, para así, evitar la saturación de la misma. Este procedimiento de filtrado se repitió hasta filtrar un total de 10 muestras de 100 mL cada una, haciendo un total de 1000 mL de agua residual. Todos estos procedimientos se realizaron con implementos estériles.

Pre-enriquecimiento no selectivo

Luego de filtrar los 100 mL de cada muestra, se cortaron en pedazos pequeños las membranas de nitrocelulosa de poro 0.45 μm con un bisturí estéril, se colocaron los trozos de cada membrana en tubos de ensayo con 10 mL de Caldo Lauril Sulfato que se incubaron a $37.0^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24 h. Al final se tendrá un total de 10 tubos de pre enriquecimiento.

Enriquecimiento selectivo.

Se transfirieron los caldos de pre enriquecimiento que presenten turbidez a matraces de 125 mL con 90 mL de caldo selenita o caldo tetracionato, estos se incubaron a $37.0^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24 h.

Aislamiento en medios selectivos y diferenciales

Las muestras enriquecidas en caldo selenita o tetracionato, se inocularon por estriado en agar XLD (Agar xilosa lisina desoxicolato). Se sembraron 5 platos de agar XLD por cada matraz de enriquecimiento. Estos platos se incubaron a $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24 h. Luego, se seleccionó una colonia por plato, se sembraron por estriado en otro plato de agar XLD y se incubó a $37.0^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24 h.

Identificación de *Salmonella* spp.

Se realizó tinción de Gram a las UFC aisladas para confirmación por morfología y criterio de Gram. Además, se realizaron pruebas bioquímicas SIM (Sulfuro-Indol-Movilidad), TSI (Agar Triple Azúcar de Hierro), Citrato de Simmons y MR-VP (Rojo Metilo- Voges Proskauer) a las UFC aisladas para confirmar que son *Salmonella* spp.

Después, se tomó 1 UFC y se transfirió a 10 mL de caldo LB y se incubó a TA, en agitación constante entre 80 y 100 rpm, por un tiempo entre 18 y 20 h (para asegurarnos que esté en fase

exponencial), se hicieron alícuotas a partes iguales con glicerol al 40% y se almacenaron en congelación a -80°C para el posterior análisis con VITEK 2.

Caracterización bioquímica de las cepas bacterianas

Se utilizó el sistema automatizado VITEK 2 para la identificación bacteriana y sensibilidad antimicrobiana de nuestros aislamientos bacterianos.

Previo a la identificación en el VITEK 2, se reactivaron todas las cepas ambientales aisladas y se le realizaron dos pases; primero a agar MacConkey (para las posibles *E. coli*), y agar XLD (para las posibles *Salmonellas*), y el segundo pase a Agar Nutritivo, todo esto para asegurar la pureza de las UFC aisladas.

Preparación de la suspensión

Se transfirieron, con un hisopo estéril, suficientes UFC aisladas provenientes de un cultivo puro de agar nutritivo con un crecimiento de 18-20 h, a un tubo de ensayo de poliestireno transparente de 12 x 75 mm, que contenía 3 mL de solución salina estéril, hasta alcanzar una densidad óptica de 0.50-0.63 McFarland. La densidad óptica se midió con un densitómetro "DensiChek" y luego, el tubo de ensayo que contenía la suspensión bacteriana se colocó dentro de la gradilla especial (cassette) y la tarjeta de identificación se colocó en la ranura cercana, insertando el tubo de transferencia dentro del tubo con la suspensión correspondiente. Al completar esta parte, se colocó el cassette con las muestras en el sistema VITEK 2.

Una vez dentro del equipo, las muestras se sometieron a los siguientes procesos de forma automática: inoculación, sellado e incubación de las tarjetas (todos los tipos de tarjetas se incuban en línea a $35.5^{\circ} \pm 1.0^{\circ}\text{C}$), y al final, lectura de las reacciones.

Determinación del rango de hospederos

Se utilizó la técnica modificada del "spot test" o "gota" según Flores (2017). 1 mL de un cultivo en caldo nutritivo (CN) overnight de cada cepa indicadora, se dispensó en tubos de ensayo de 16 x 150 mm conteniendo 3 mL de agar nutritivo semisólido (0.75 %) a 49°C y 40 μL de CaCl_2 . Esta mezcla se vertió sobre placas Petri conteniendo agar nutritivo con la finalidad de formar un césped bacteriano. Una vez solidificada la doble capa, se depositaron gotas de 15 μl del bacteriófago para cada una de las cepas indicadoras. Después se dejaron reposar las placas durante 30 min a TA dentro de la cámara de flujo, se incubaron a 30°C durante 24 h antes de comprobar la presencia de una zona clara en la placa que indicó la capacidad del fago para infectar las bacterias probadas.

Las 29 cepas indicadoras ensayadas fueron aisladas de las mismas aguas residuales: 17 *E. coli* y 12 *Salmonella* spp. (Tabla 1).

Tabla 1. Cepas ambientales aisladas de aguas residuales.

Cepas ambientales	
<i>E. coli</i>	<i>Salmonella spp.</i>
<i>EcAR A15-2</i>	<i>SIAR D14-1</i>
<i>EcAR B15-1</i>	<i>SIAR D14-3</i>
<i>EcAR B15-3</i>	<i>SIAR G14-4</i>
<i>EcAR C15-1</i>	<i>SIAR G14-5</i>
<i>EcAR C15-2</i>	<i>SIAR H14-3</i>
<i>EcAR B19-3</i>	<i>SIAR I14-3</i>
<i>EcAR B19-4</i>	<i>SIAR A22-5</i>
<i>EcAR C19-3</i>	<i>SIAR A22-7</i>
<i>EcAR A10-4</i>	<i>SIAR B22-1</i>
<i>EcAR C10-1</i>	<i>SIAR B22-3</i>
<i>EcAR B25-1</i>	<i>SIAR C22-3</i>
<i>EcAR B25-2</i>	<i>SIAR D22-4</i>
<i>EcAR B25-5</i>	
<i>EcAR B25-6</i>	
<i>EcAR C25-1</i>	
<i>EcARC25-4</i>	
<i>EcARC25-5</i>	

CAPÍTULO III
RESULTADOS

RESULTADOS

Curva de crecimiento bacteriano de cepas ATCC

Se midió la densidad óptica de las tres cepas ATCC de *E. coli* y dos cepas ATCC de *Salmonella* spp. para determinar su curva de crecimiento, especialmente la zona de crecimiento exponencial o logarítmica ya que en ella se realizan las infecciones del fago a la bacteria huésped. Esta información es necesaria para desarrollar la caracterización biológica de los bacteriófagos.

Este procedimiento se realizó por un período de 15 h, utilizando el espectrofotómetro a una longitud de onda de 525 nm. El experimento se desarrolló a una temperatura de 29°C.

No se halló el tiempo de muerte bacteriana, porque como se mencionó anteriormente, el objetivo del experimento solo fue determinar el inicio y final de la fase logarítmica para encontrar el tiempo de duplicación de cada cepa (Figura 28– 32).

La curva de crecimiento de las cepas ATCC de *E. coli* reveló, como se observa en las Figuras 28, 29 y 30, que la fase exponencial de dichas bacterias dio inicio a las 3 h y culminó a las 11 h. En la Figura 32 de la cepa de *Salmonella* Bispebjerg ATCC 9842 la fase logarítmica dio inicio a las 6 h, finalizando a las 14 h. En el caso de la cepa de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, observamos en la Figura 14 que su fase exponencial inició a las 5 h alcanzando la fase estacionaria a las 12 h.

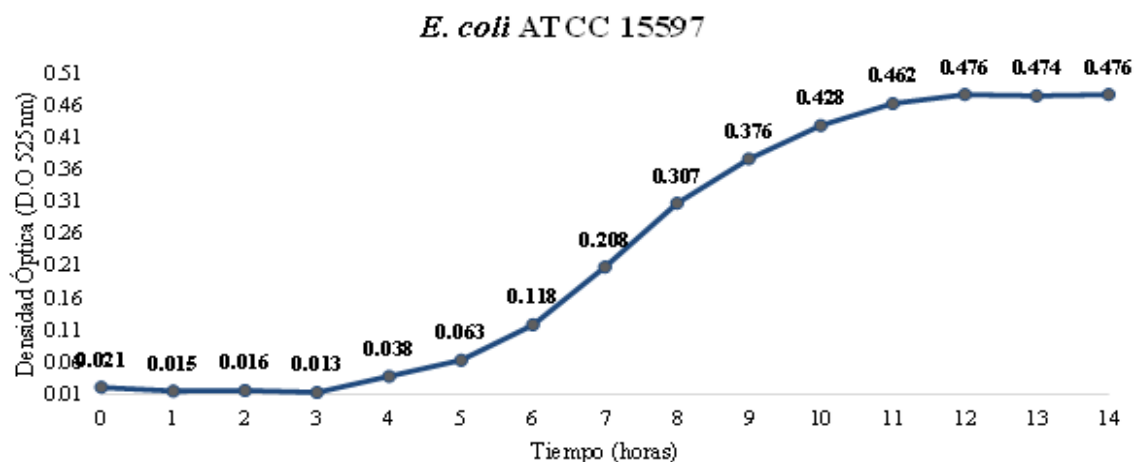


Figura 8. Curva de crecimiento de *E. coli* ATCC 15597, correlacionando la densidad óptica (D.O) del cultivo versus el tiempo de crecimiento (h).

E. coli ATCC 11229

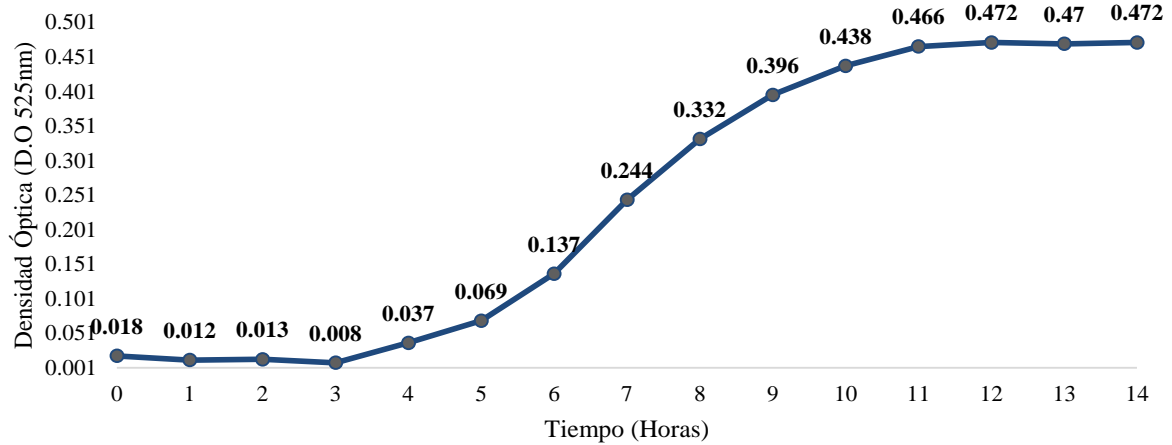


Figura 9. Curva de crecimiento de *E. coli* ATCC 11229, correlacionando la densidad óptica (D.O) del cultivo versus el tiempo de crecimiento (h).

E. coli ATCC 8739

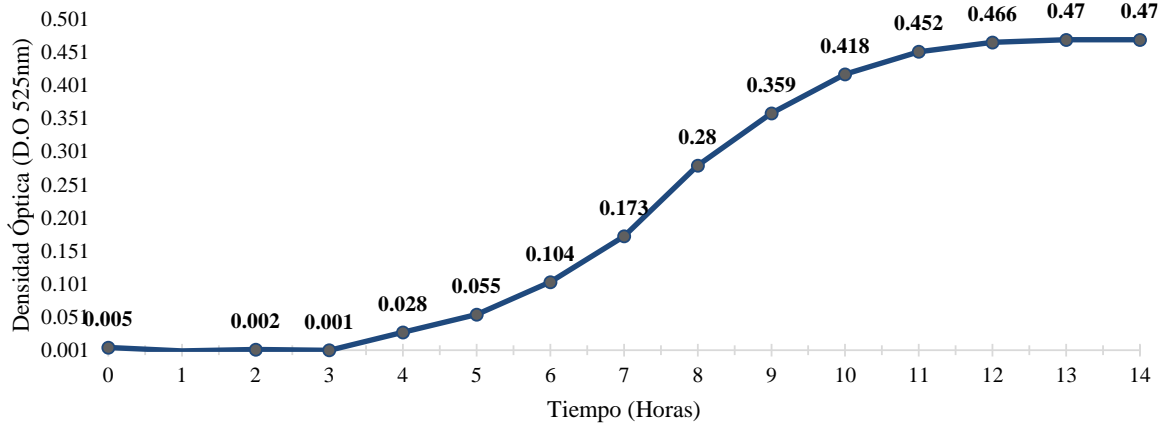


Figura 10. Curva de crecimiento de *E. coli* ATCC 8739, correlacionando la densidad óptica (D.O) del cultivo versus el tiempo de crecimiento (h).

Salmonella Bispbejerg ATCC 9842

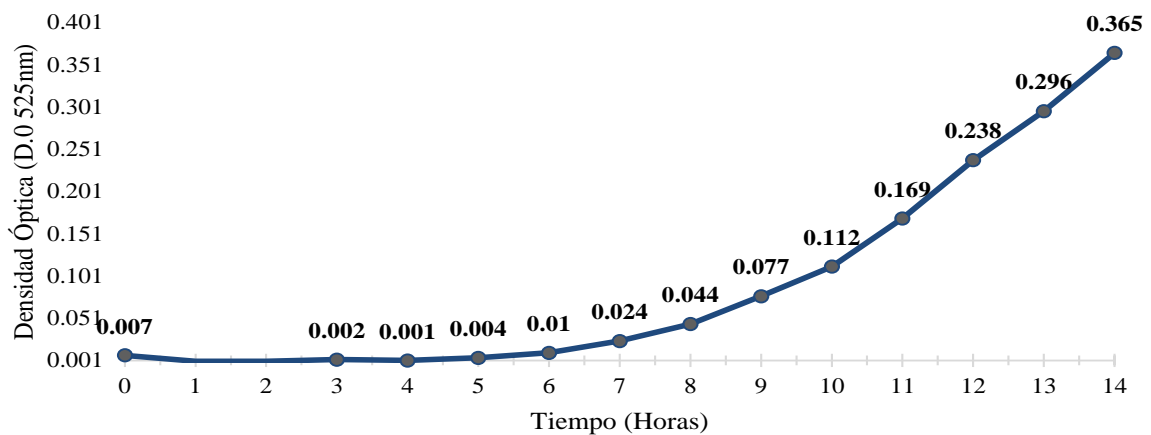


Figura 11. Curva de crecimiento de *Salmonella* spp ATCC 9842, correlacionando la densidad óptica (D.O) del cultivo versus el tiempo de crecimiento (h).

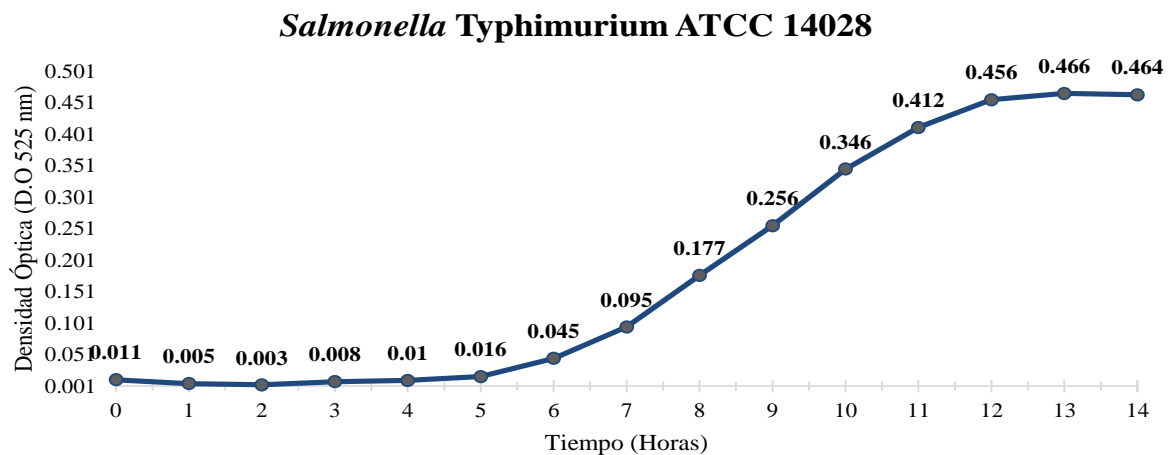


Figura 12. Curva de crecimiento de *Salmonella* spp ATCC 14028, correlacionando la densidad óptica (D.O) del cultivo versus el tiempo de crecimiento (h).

Aislamiento y purificación de los bacteriófagos

Para desarrollar esta investigación se procedió a aislar los bacteriófagos para *E. coli* y *Salmonella* spp., de las muestras obtenidas de la PTAR de la Ciudad de Panamá y para ello, se procedió a filtrar las muestras de agua con filtros de jeringa de poro 0.45 μm y 0.22 μm , y luego, enriquecer la muestra filtrada por 24 h, centrifugar y enfrenar las mismas con cepas hospederas ATCC de *E. coli* (ATCC 15597, ATCC 11229, ATCC 8739) y *Salmonella* spp. (ATCC entérica subespecie entérica serovar typhimurium 14028 y ATCC entérica subespecie entérica serovar bispebjerg 9842) para obtener los fagos por el método de doble capa de agar. Una vez observadas las placas de lisis, se procedió a purificar los fagos obtenidos, repitiendo el proceso de infección y plaqueo hasta obtener placas de lisis uniformes (aproximadamente 5 pasajes).

Como resultado de ambos procedimientos se lograron obtener 5 bacteriófagos en total, es decir, uno para cada una de las cepas ATCC antes mencionadas, los cuales fueron llamados con el mismo nombre de la cepa de la cual se aislaron: bacteriófago 15597, bacteriófago 11229, bacteriófago 8739, bacteriófago 14028 y bacteriófago 9842.

Propagación de bacteriófagos

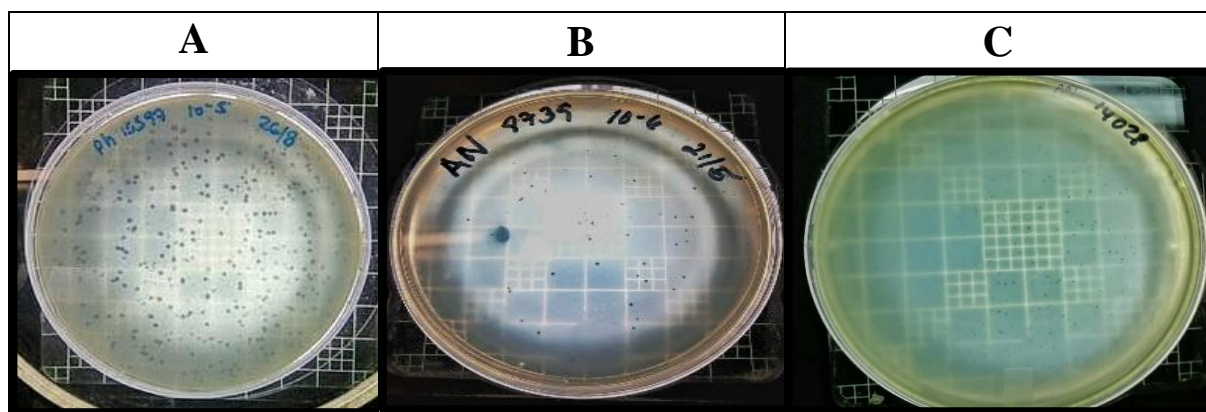
Para realizar las caracterizaciones biológicas de los bacteriófagos, se procedió a propagar los fagos en medio líquido. Para ello, se inoculó en 10 mL de caldo LB, 0.1 mL del cultivo de entre 18 a 20 h de la cepa hospedera junto a 0.1 mL del lisado del bacteriófago correspondiente a la cepa, todo esto en presencia de cloruro de calcio 10 Mm. Esta solución se agitó por 8 h, se centrifugó durante 25 min y se filtró hasta obtener 50 mL de stock de cada bacteriófago con

los títulos que se presentan en la tabla 2, dónde se logra observar que el título más bajo para los bacteriófagos de *E. coli*, el cual fue de 3.7×10^6 para el fago 8739 y el más alto fue de 1.22×10^{10} para el fago 15597. En el caso de los bacteriófagos de *Salmonella* spp., el título más bajo se obtuvo para el fago 9842 el cual fue de 9.8×10^8 , a diferencia del fago 14028 que se obtuvo un título de 4.3×10^9 .

Tabla 2. Titulación de lisados de bacteriófagos obtenidos por propagación en caldo para la caracterización biológica.

Titulación de lisados de bacteriófagos obtenidos por propagación en caldo para la caracterización biológica				
Código	Cepa	Dilución	UFP	Concentración
15597	<i>E. coli</i>	-5	300	3.0×10^8
		-7	122	1.22×10^{10}
11229	<i>E. coli</i>	-5	51	5.1×10^7
		-5	44	4.4×10^7
8739	<i>E. coli</i>	-4	37	3.7×10^6
		-6	99	9.9×10^8
9842	<i>Salmonella entérica</i> subespecie entérica serovar Bispebjerg	-6	98	9.8×10^8
14028	<i>Salmonella entérica</i> subespecie entérica serovar Typhimurium	-7	43	4.3×10^9

Se observa que el título más bajo obtenido fue de 3.7×10^6 para la cepa ATCC de *E. coli* 8739 y el más alto fue de 1.22×10^{10} para la cepa ATCC de *E. coli* 15597.



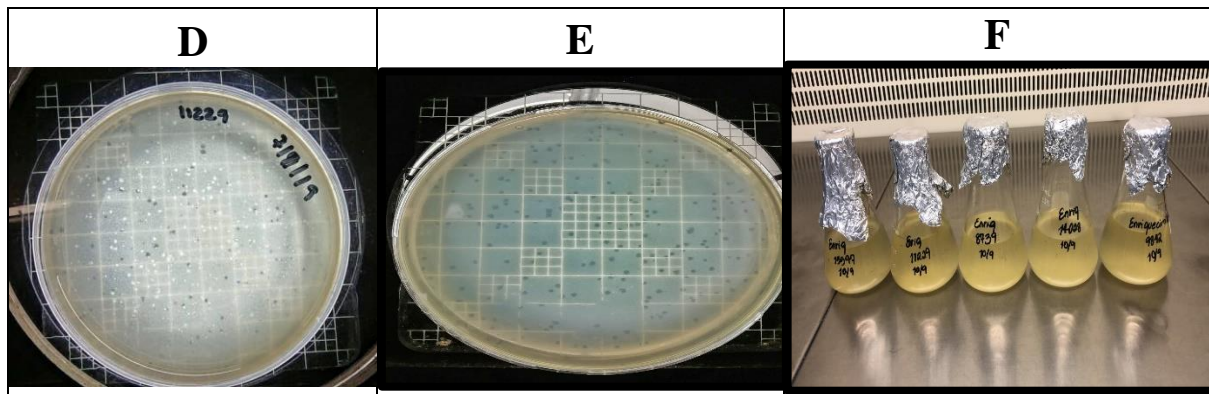


Figura 13. Bacteriófagos por la técnica de doble capa de agar. (A) Bacteriófago 15597, (B) Bacteriófago 8739, (C) Bacteriófago 14028, (D) Bacteriófago 11229, (E) Bacteriófago 9842, (F) Enriquecimientos de Stocks de Fagos.

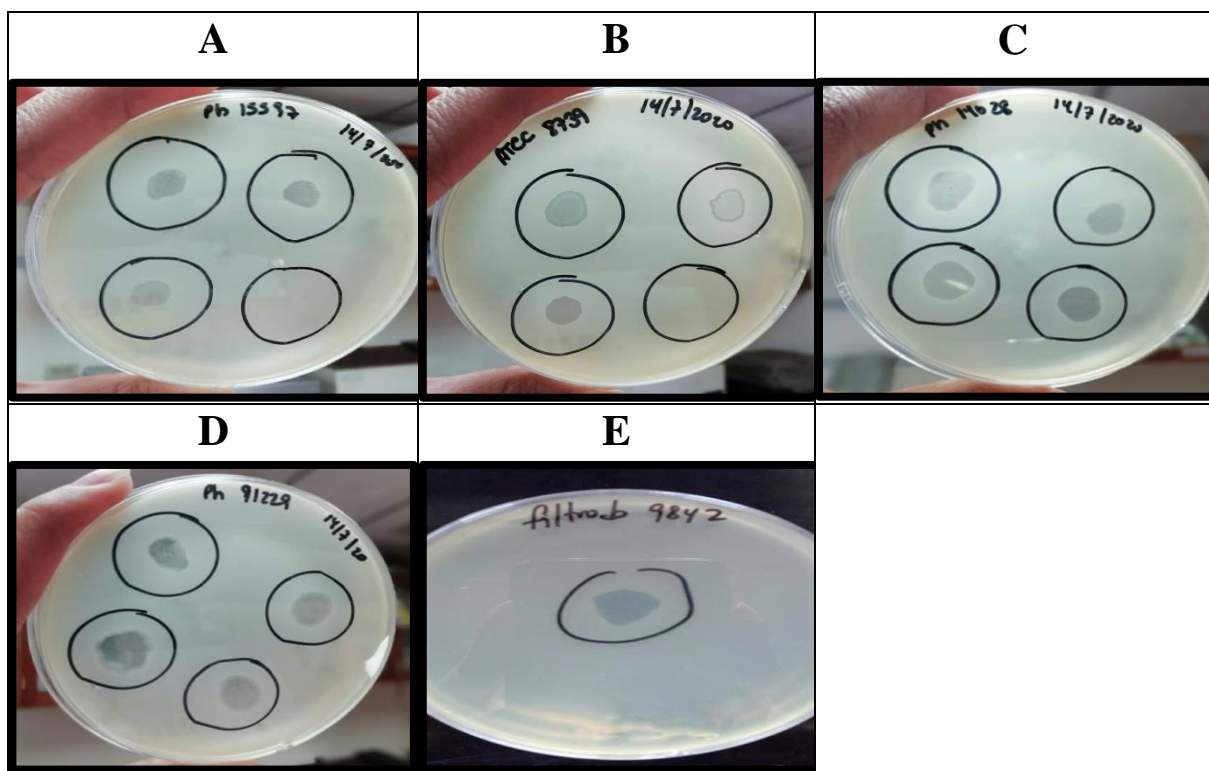


Figura 14. Bacteriófagos por la técnica de gota o spot test. (A) Bacteriófago 15597, (B) Bacteriófago 8739, (C) Bacteriófago 14028, (D) Bacteriófago 11229, (E) Bacteriófago 9842.

Caracterización biológica de los bacteriófagos aislados

Sensibilidad al cloroformo

Para conocer la reacción de los bacteriófagos frente al cloroformo, agregamos 0.1 mL de cloroformo puro a 0.5 mL de lisado fágico, agitamos la solución por 10 min a TA y centrifugamos por 5 min y finalmente, se tituló los sobrenadantes como se ha descrito anteriormente. Los resultados evidenciaron que todos los bacteriófagos son sensibles a la exposición al cloroformo. El fago 15597 de *E. coli* evidenció un aumento de 1 orden de

magnitud respecto a la muestra no tratada como se observa en la Figura 10. Los bacteriófagos 8739 y 11229 de *E. coli*, como se observa en la Figura 10 y 14028 de *Salmonella*, como se observa en la Figura 11, mostraron un ligero aumento en la infectividad del fago manteniéndose en la misma escala logarítmica con respecto a la muestra no tratada; a diferencia del bacteriófago 9842 de *Salmonella*, que se aprecia en la Figura 11, que, expuesto a las mismas condiciones, reflejó una disminución de 1 orden de magnitud en su capacidad para generar placas de lisis con respecto a la muestra no tratada.

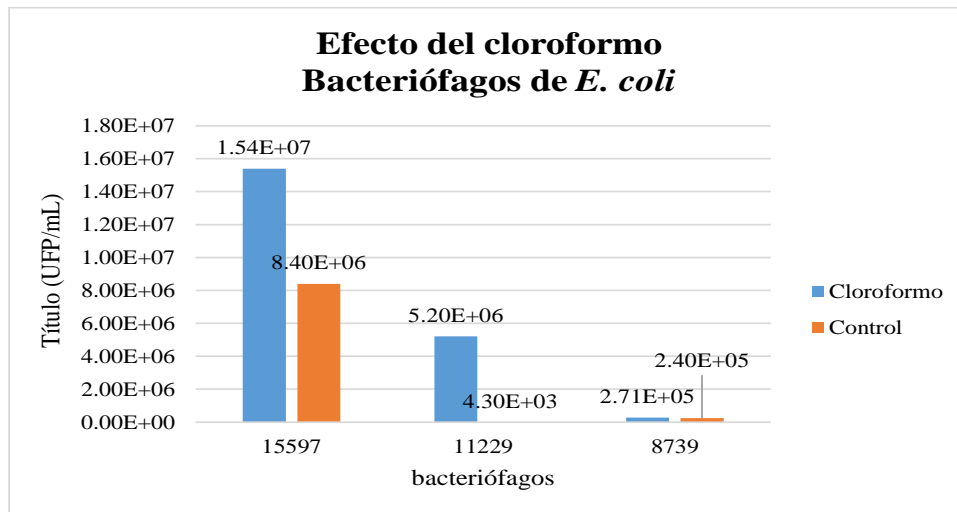


Figura 15. Efecto del Cloroformo en los bacteriófagos de *E. coli* aislados.

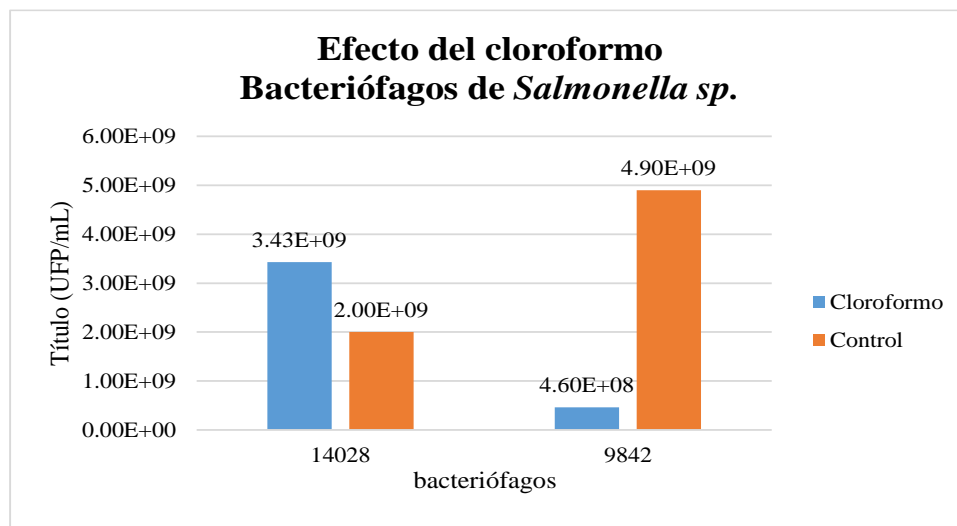


Figura 16. Efecto del Cloroformo en los bacteriófagos de *Salmonella* spp. entéricas aislados.

Efecto de la exposición a la luz UV

Las muestras de fagos fueron expuestas a luz UV de onda corta durante un periodo de tiempo corrido (20, 40, 60 y 90 s respectivamente) para conocer si son afectados y comprobar si esto influye directamente en la viabilidad del fago.

El efecto de la exposición a la luz UV sobre la viabilidad de los cinco bacteriófagos analizados fue muy variable: en el caso de los bacteriófagos de *E. coli*, el 15597 con respecto al control aumentó su viabilidad en 1 orden de magnitud a los 20 s del ensayo, transcurridos 40 s su viabilidad se mantiene en la misma escala y lo mismo ocurre a los 60 s. Sin embargo, a los 90 s, esta presentó nuevamente un aumento en 1 orden de magnitud con respecto al título a los 60 s (Figura 12). Al bacteriófago 11229 con respecto al control disminuyó su viabilidad en 1 orden de magnitud a los 20 s de exposición, transcurridos los 40 s esta siguió disminuyendo en 4 órdenes de magnitud, a los 60 s el fago mostró una reducción del 100% de su viabilidad presentando una disminución de 9 órdenes de magnitud y mostró el mismo comportamiento a los 90 s (Figura 13). El bacteriófago 8739 con respecto al control mantuvo su viabilidad en la misma escala a los 20 s, esta disminuyó en 5 órdenes de magnitud a los 40 s al igual que a los 60 s de exposición y a los 90 s la misma aumentó en 1 orden de magnitud con respecto a el título a los 60 s (Figura 14).

En los bacteriófagos de *Salmonella spp.*, para el fago 9842 con respecto a la muestra no tratada la viabilidad se mantuvo en la misma escala a los 20 s, la misma aumentó en 1 orden de magnitud a los 40 s de exposición y se mantuvo de la misma forma a los 60 s. Sin embargo, a los 90 s esta disminuyó 1 orden de magnitud con respecto a los 60 s de exposición. (Figura 15). Sin embargo, el bacteriófago 14028 mostró un comportamiento distinto a todos los fagos ya que su viabilidad con respecto al control se mantiene en la misma escala a los 20 s, a los 40 s aumentó 1 orden de magnitud y se mantuvo en la misma escala a los 60 s y 90 s (Figura 16).

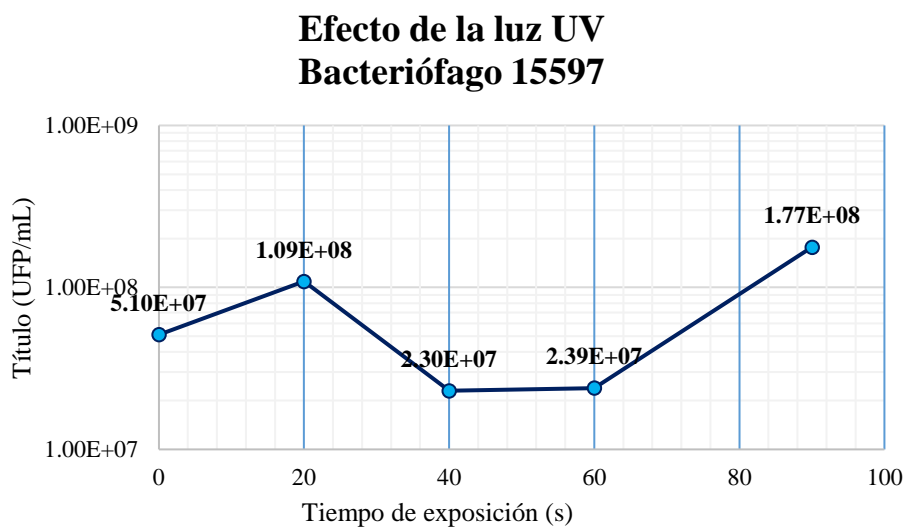


Figura 17. Efecto de la luz UV sobre el bacteriófago 15597.

Efecto de la luz UV Bacteriófago 11229

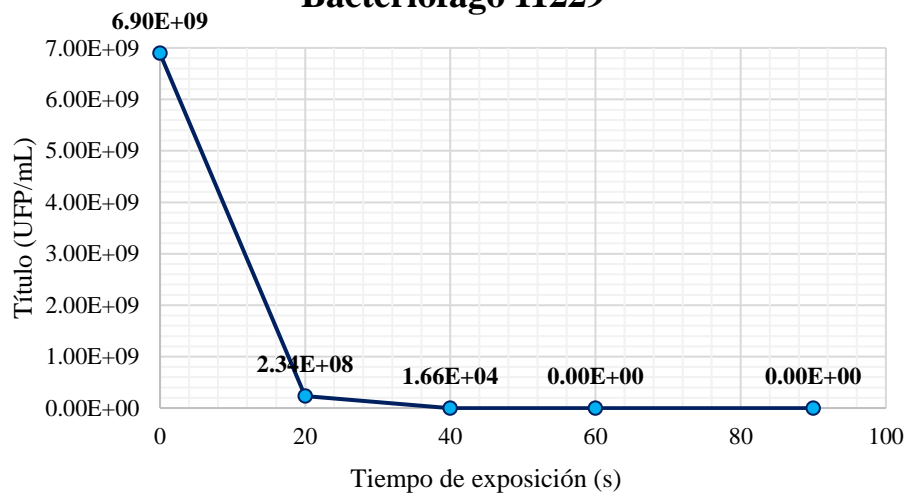


Figura 18. Efecto de la luz UV sobre el bacteriófago 11229.

Efecto de la luz UV Bacteriófago 8739

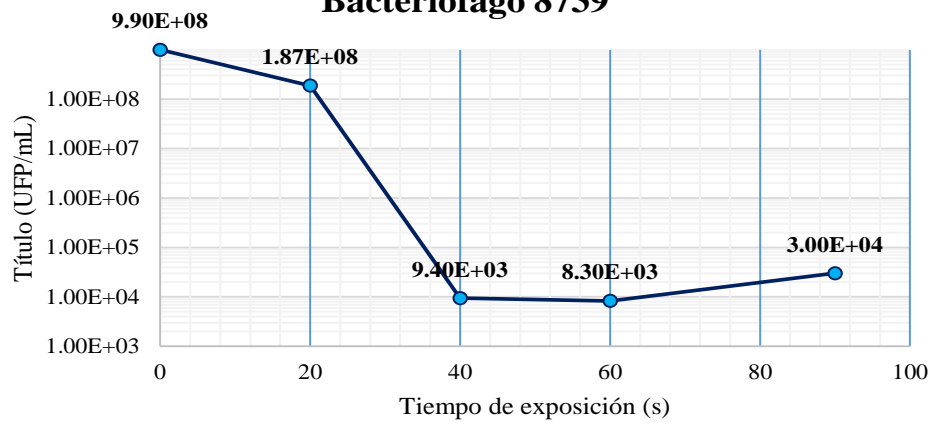


Figura 19. Efecto de la luz UV sobre el bacteriófago 8739.

Efecto de la luz UV Bacteriófago 9842

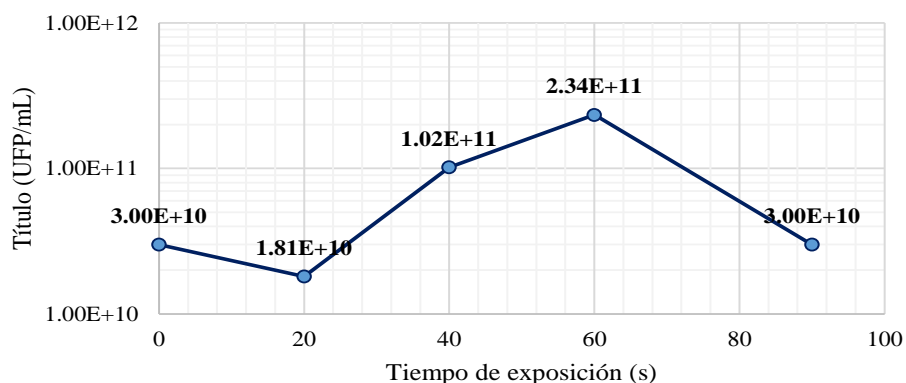


Figura 20. Efecto de la luz UV sobre el bacteriófago 9842.

Efecto de la luz UV Bacteriófago 14028

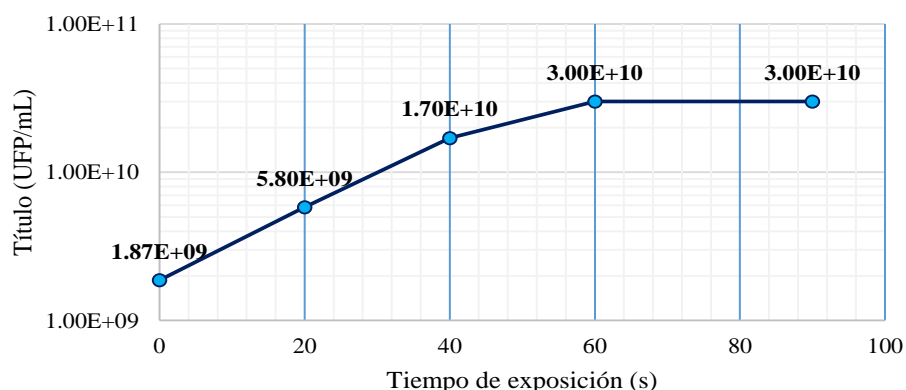


Figura 21. Efecto de la luz UV sobre el bacteriófago 14028.

Resistencia de los bacteriófagos al pH

Es importante conocer a qué condiciones de pH la infectividad de los bacteriófagos se ve afectada. Para ello, se añadió 500 μ L del lisado de bacteriófagos a 5 mL de buffer PBS ajustado a pH de 3, 5, 7 y 9 durante 1 h.

En los fagos de *E. coli*, el fago 15597 mostró una mejor viabilidad a pH 9, alcanzando un título de 2.8×10^8 , a diferencia del pH 7 donde se ve una disminución de 2 órdenes de magnitud del título; en el caso de los pH 5 y pH 3 se mantiene en la misma escala del pH anterior mostrando ligeras disminuciones (Figura 17). El fago 11229, mostró también una mejor viabilidad a pH 9, reflejando un título de 4.9×10^8 , disminuyendo 1 orden de magnitud a pH 5 y 2 órdenes a pH 3 con respecto al mayor título (Figura 18). En el caso del fago 8739, se aprecia una mejor infectividad a pH 9, disminuyendo en pH 7 el 100% de su infectividad; sin embargo, a pH 5 se

puede apreciar un título de 4.1×10^3 , aumentando 5 órdenes de magnitud a pH 3 con respecto a este último (Figura 19).

En los fagos de *Salmonella* spp., el fago 9842 reflejó una mayor infectividad a pH 9 dando un título de 2.37×10^9 , disminuyendo 1 orden de magnitud a pH 7 y en comparación a este último se aprecia una disminución de 1 orden de magnitud en pH 5 y pH 3 (Figura 20). El fago 14028, a diferencia de todos los anteriores, reflejó una mayor viabilidad a pH 5 mostrando un título de 3.0×10^{10} , en pH 7 se observa una disminución de 1 orden de magnitud, a pH 9 disminuye 2 órdenes y a pH 3 se puede notar una disminución de 3 órdenes de magnitud con respecto al título más alto (Figura 21).

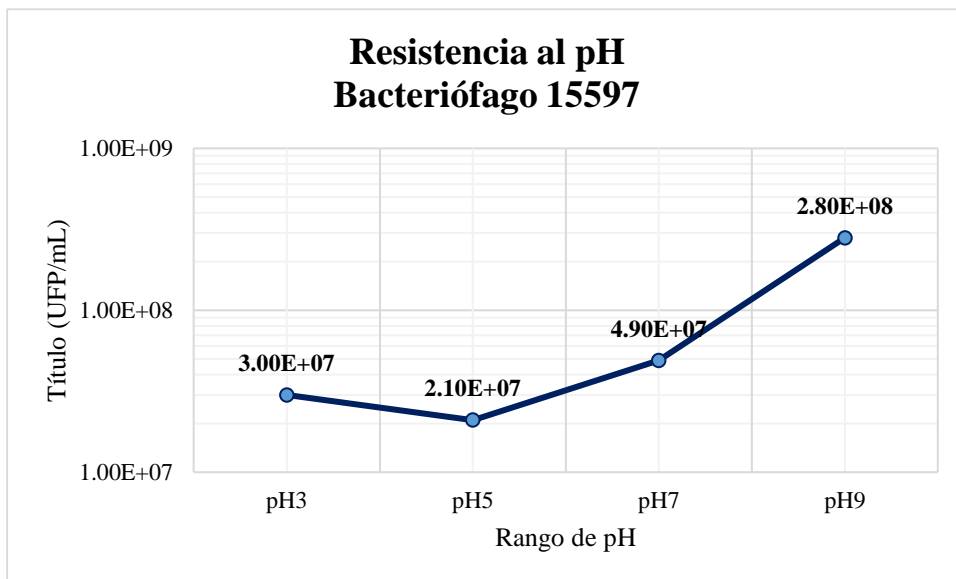


Figura 22. Resistencia del bacteriófago 15597 a los diferentes pH.

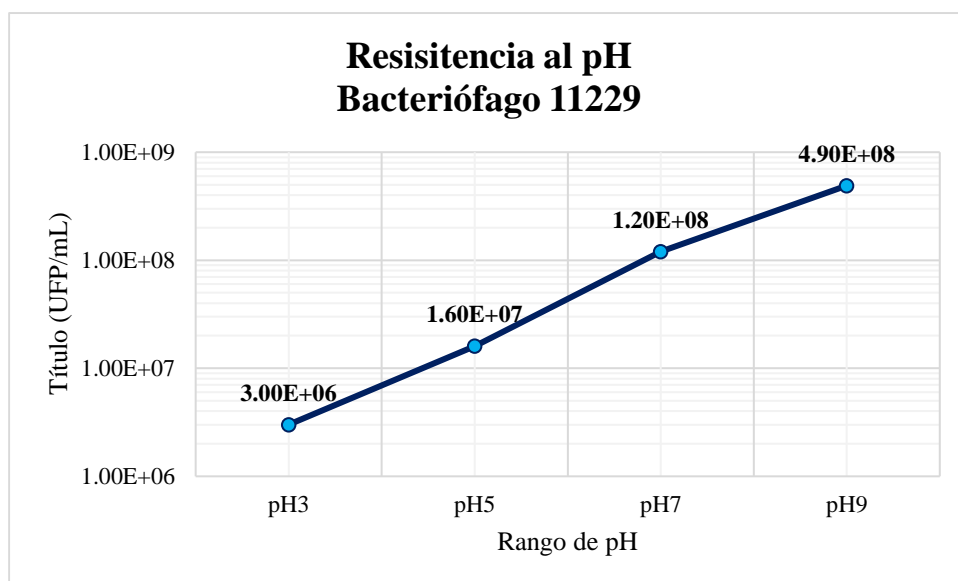


Figura 23. Resistencia del bacteriófago 11229 a los diferentes pH.

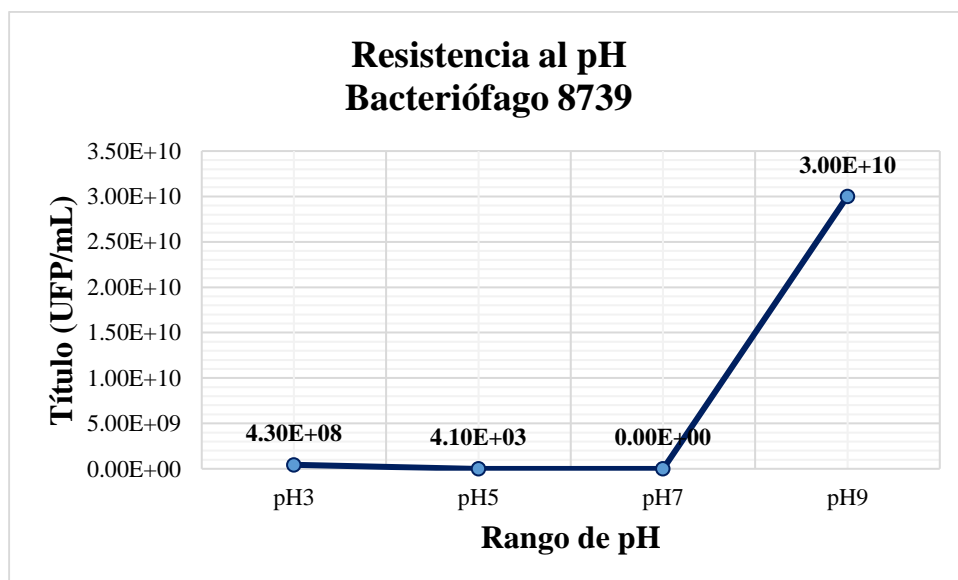


Figura 24. Resistencia del bacteriófago 8739 a los diferentes pH.

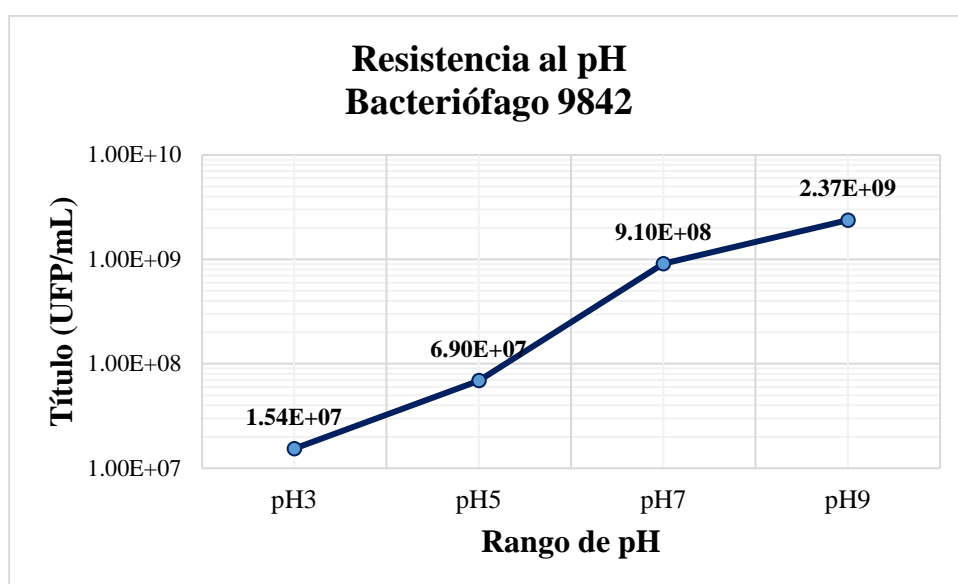


Figura 25. Resistencia del bacteriófago 9842 a los diferentes pH.

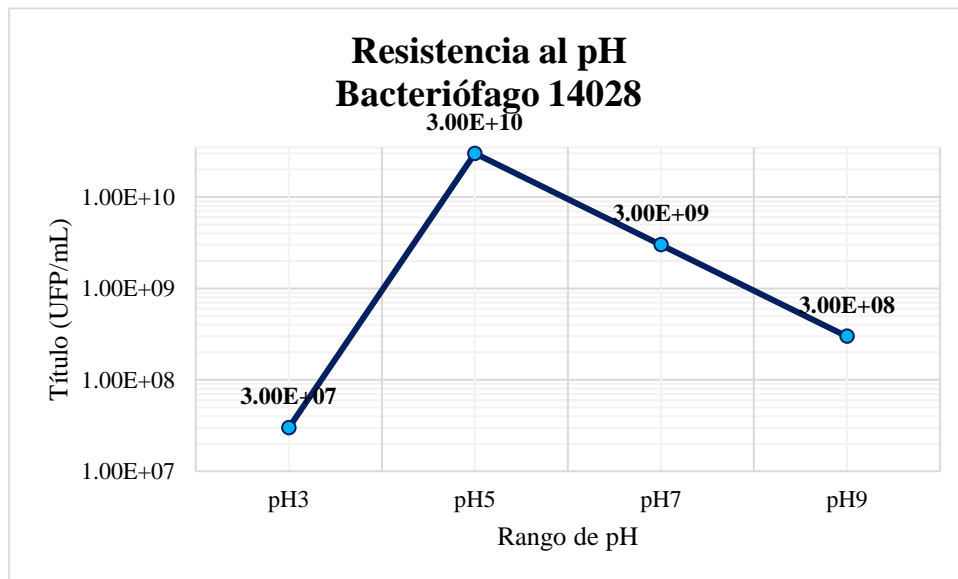


Figura 26. Resistencia del bacteriófago 14028 a los diferentes pH.

Efecto de la temperatura sobre el bacteriófago

Para analizar la resistencia al calor de los bacteriófagos estudiados y ver cómo afecta a su viabilidad se realizó la prueba de estabilidad térmica, donde se sometió 1 mL del lisado fágico a temperaturas de 25°C, 37°C, 50°C y 70°C por un lapso de 60 min.

En los bacteriófagos de *E. coli*, el bacteriófago 15597 al aumentar la temperatura disminuye su viabilidad: a 25°C presentando un título de 1.2×10^{10} , a 37°C disminuyó 2 órdenes de magnitud, con respecto a la temperatura anterior, a 50°C disminuyó 1 orden de magnitud y a 70°C disminuyó 3 órdenes de magnitud (Figura 22). En cambio, la viabilidad del bacteriófago 11229, fluctúa dependiendo de la temperatura: a 25°C presentó un título de 4.4×10^7 , a 37° y 50°C se mantuvo a la misma escala y a 70°C disminuyó 3 órdenes de magnitud con respecto a la temperatura anterior (Figura 23). Lo mismo ocurre con el bacteriófago 8739 que a 25°C presentó un título de 9.9×10^8 , con respecto a la temperatura anterior, a 37°C se mantuvo en la misma escala, a 50°C disminuyó 1 orden de magnitud y a 70°C disminuyó 1 orden de magnitud (Figura 24).

En los bacteriófagos de *Salmonella* spp., el bacteriófago 9842 a 25°C presentó un título de 3.6×10^9 con respecto a la temperatura anterior, a 37°C la viabilidad se mantuvo en la misma escala al igual que 50°C y a 70°C, disminuyó 4 órdenes de magnitud (Figura 25). En cambio, el bacteriófago 14028, a 25°C presentó un título de 4.5×10^9 , a 37°C la viabilidad aumentó 1 orden de magnitud y a 50°C la misma disminuyó 1 orden de magnitud con respecto a la temperatura anterior y a 70°C, disminuyó 6 órdenes de magnitud con respecto a la temperatura anterior (Figura 26).

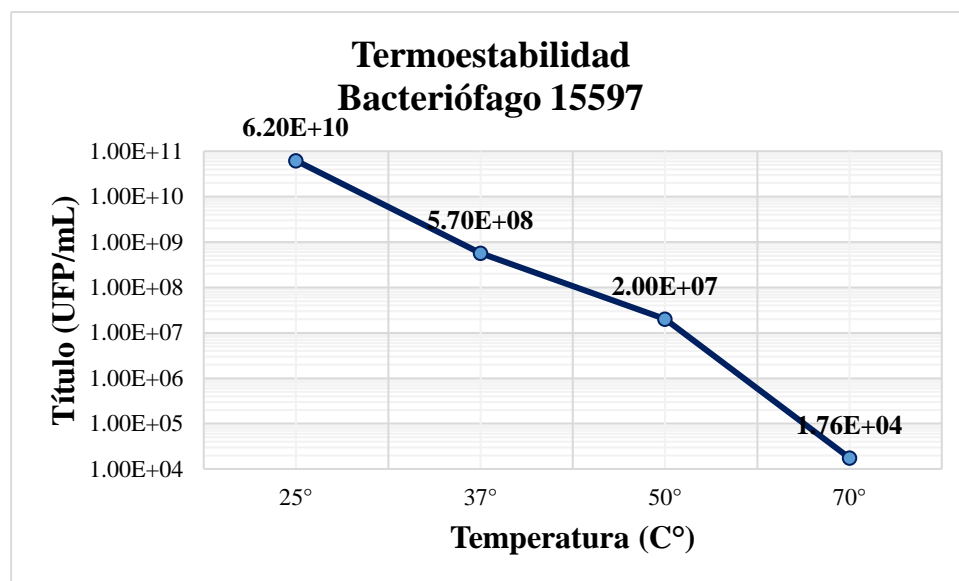


Figura 27. Efecto de la temperatura sobre la estabilidad del bacteriófago 15597.

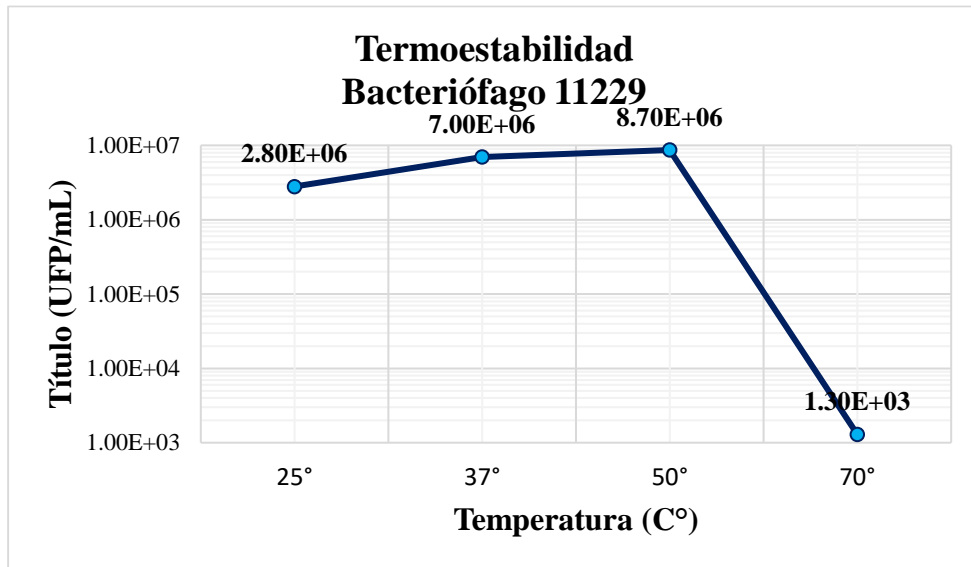


Figura 28. Efecto de la temperatura sobre la estabilidad del bacteriófago 11229.

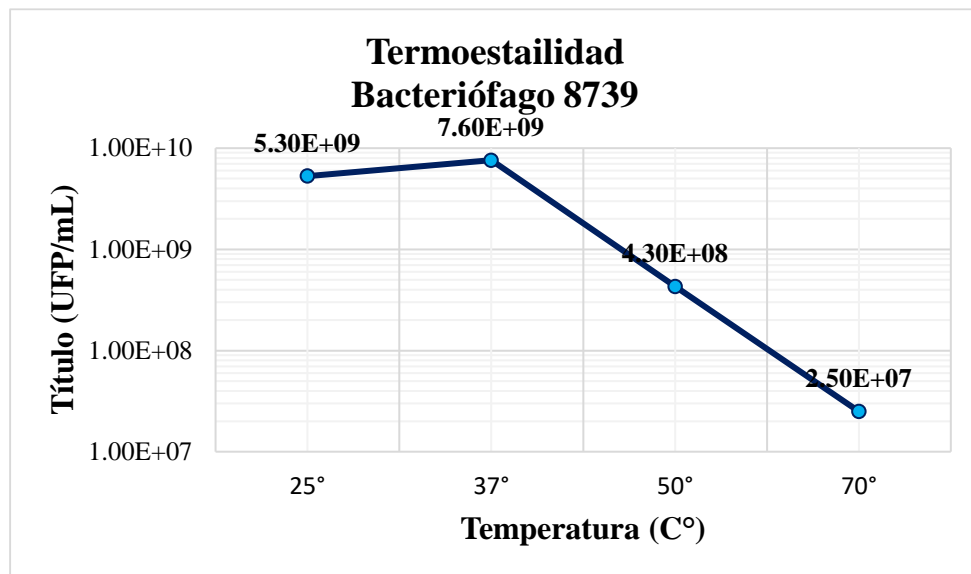


Figura 29. Efecto de la temperatura sobre la estabilidad del bacteriófago 8739.

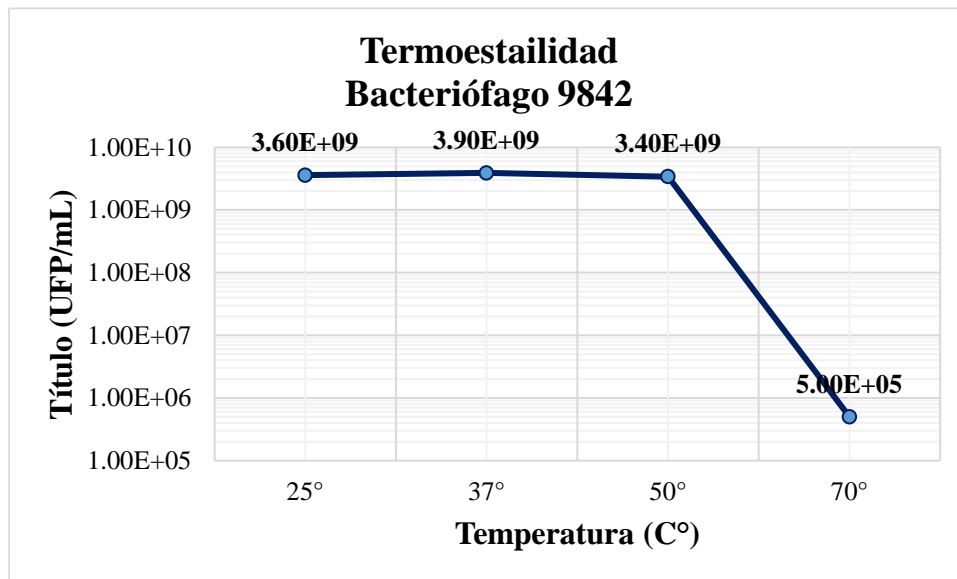


Figura 30. Efecto de la temperatura sobre la estabilidad del bacteriófago 9842.

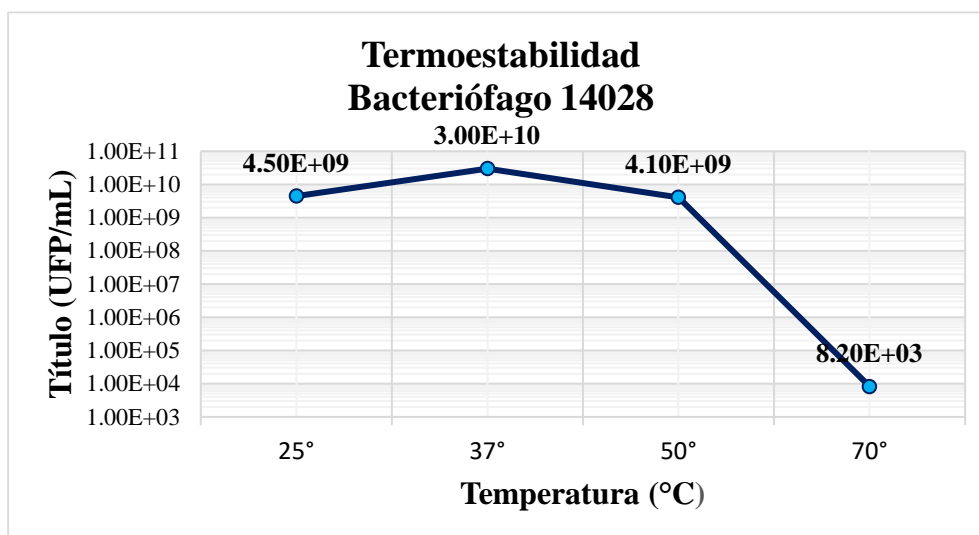


Figura 31. Efecto de la temperatura sobre la estabilidad del bacteriófago 14028.

Aislamiento e identificación fenotípica de cepas ambientales aisladas del agua residual de la PTAR

Para conocer la efectividad en cuanto a infección de los bacteriófagos en el rango de hospederos, se procedió a aislar cepas ambientales de *E. coli* y *Salmonella* spp. a partir de las muestras obtenidas de la PTAR de la ciudad de Panamá, utilizando dos métodos; el método de dilución seriada de base 10 y esparcido superficial para las *E. coli*, y el método de filtración de membrana y enriquecimiento de las muestras para las *Salmonella* spp. Se lograron aislar 73 cepas presuntivas de *E. coli* y *Salmonella* spp. (Tabla 5), que luego de someterlas a identificación mediante el VITEK 2, se lograron identificar 17 cepas de *E. coli* y 12 cepas de

Salmonella spp., junto a otras cepas las cuales no eran objeto de este estudio, como lo son *Klebsiella* sp., *Citrobacter freundii*, *Cronobacter sakazakii* group y *Proteus mirabilis*.

Tabla 3. Aislamiento e identificación fenotípica de cepas ambientales de *E. coli* y *Salmonella* spp. aisladas del agua residual de la PTAR de la ciudad de Panamá.

IDENTIFICACIÓN BACTERIANA			
Cepa	Gram (+/-)	Fecha de muestreo	Especie
EcAR A15-1	-	13/2/2019	Sin identificación
EcAR A15-2	-	13/2/2019	<i>E. coli</i>
EcAR B15-1	-	13/2/2019	<i>E. coli</i>
EcAR B15-2	-	13/2/2019	<i>K. pneumoniae neumonía</i>
EcAR B15-3	-	13/2/2019	<i>E. coli</i>
EcAR C15-1	-	13/2/2019	<i>E. coli</i>
EcAR C15-2	-	13/2/2019	<i>E. coli</i>
EcAR C15-3	-	13/2/2019	<i>Kluyvera ascorbata</i>
EcAR A19-1	-	19/2/2019	Sin identificación
EcAR B19-1	-	19/2/2019	<i>Klebsiella oxytoca</i>
EcAR B19-2	-	19/2/2019	Sin identificación
EcAR B19-3	-	19/2/2019	<i>E. coli</i>
EcAR B19-4	-	19/2/2019	<i>E. coli</i>
EcAR B19-5	-	19/2/2019	Sin identificación
EcAR C19-2	-	19/2/2019	Sin identificación
EcAR C19-3	-	19/2/2019	<i>E. coli</i>
EcAR A28-1	-	26/2/2019	<i>K. pneumoniae pneumoniae</i>
EcAR A28-2	-	26/2/2019	<i>Cronobacter sakazakii</i> group
EcAR B28-1	-	26/2/2019	<i>Enterobacter cloacae</i> complex
EcARC19-R	-	19/2/2019	Sin identificación
EcAR A10-3	-	10/4/2019	Sin identificación
EcAR A10-4	-	10/4/2019	<i>E. coli</i>
EcAR B10-1	-	10/4/2019	<i>Enterobacter cloacae</i> complex
EcAR B10-2	-	10/4/2019	<i>Citrobacter freundii</i>
EcAR B10-3	-	10/4/2019	<i>Enterobacter cloacae</i> complex

EcAR B10-5	-	10/4/2019	<i>Sin identificación</i>
EcAR C10-1	-	10/4/2019	<i>E. coli</i>
EcAR C10-3	-	10/4/2019	<i>Sin identificación</i>
EcAR C10-4	+	10/4/2019	<i>Sin identificación</i>
EcAR C10-5	-	10/4/2019	<i>Sin identificación</i>
EcAR A25-1	-	25/4/2019	<i>Citrobacter freundii</i>
EcAR A25-2	-	25/4/2019	<i>Citrobacter freundii</i>
EcAR A25-3	-	25/4/2019	<i>K. pneumoniae pneumoniae</i>
EcAR A25-4	-	25/4/2019	<i>Citrobacter freundii</i>
EcAR A25-5	-	25/4/2019	<i>K. pneumoniae pneumoniae</i>
EcAR B25-1	-	25/4/2019	<i>E. coli</i>
EcAR B25-2	-	25/4/2019	<i>E. coli</i>
EcAR B25-3	-	25/4/2019	<i>Citrobacter freundii</i>
EcAR B25-4	-	25/4/2019	<i>Citrobacter freundii</i>
EcAR B25-5	-	25/4/2019	<i>E. coli</i>
EcAR B25-6	-	25/4/2019	<i>E. coli</i>
EcAR C25-1	-	25/4/2019	<i>E. coli</i>
EcAR C25-2	-	25/4/2019	<i>K. pneumoniae ozaenae</i>
EcARC25-3	-	25/4/2019	<i>Citrobacter freundii</i>
EcARC25-4	-	25/4/2019	<i>E. coli</i>
EcARC25-5	-	25/4/2019	<i>E. coli</i>
SIAR D14-1	-	06/6/2019	<i>Salmonella spp.</i>
SIAR D14-2	+	06/6/2019	<i>Sin identificación</i>
SIAR D14-3	-	06/6/2019	<i>Salmonella spp.</i>
SIAR G14-4	-	06/6/2019	<i>Salmonella spp.</i>
SIAR G14-5	-	06/6/2019	<i>Salmonella spp.</i>
SIAR H14-1	-	06/6/2019	<i>Proteus mirabilis</i>
SIAR H14-3	-	06/6/2019	<i>Salmonella spp.</i>
SIAR I14-1	-	06/6/2019	<i>Proteus mirabilis</i>
SIAR I14-3	-	06/6/2019	<i>Salmonella spp.</i>
SIAR A22-1	-	22/8/2019	<i>Proteus mirabilis</i>
SIAR A22-3	-	22/8/2019	<i>Proteus mirabilis</i>

SIAR A22-5	-	22/8/2019	<i>Salmonella</i> spp.
SIAR A22-6	-	22/8/2019	<i>Proteus mirabilis</i>
SIAR A22-7	-	22/8/2019	<i>Salmonella</i> spp.
SIAR B22-1	-	22/8/2019	<i>Salmonella</i> spp.
SIAR B22-2	-	22/8/2019	<i>Proteus mirabilis</i>
SIAR B22-3	-	22/8/2019	<i>Salmonella</i> spp.
SIAR C22-3	-	22/8/2019	<i>Salmonella</i> spp.
SIAR D22-4	-	22/8/2019	<i>Salmonella</i> spp.
SIAR E22-3	-	22/8/2019	<i>Proteus mirabilis</i>
SIAR G22-2	-	22/8/2019	<i>Proteus mirabilis</i>
SIAR H22-3	-	22/8/2019	<i>Proteus mirabilis</i>
SIAR I22-1	-	22/8/2019	<i>Proteus mirabilis</i>
SIAR I22-2	-	22/8/2019	Sin identificación
SIAR I22-3	-	22/8/2019	<i>Proteus mirabilis</i>
SIAR I22-4	-	22/8/2019	<i>Proteus mirabilis</i>
SIAR I22-6	-	22/8/2019	<i>Proteus mirabilis</i>

Se lograron aislar 73 cepas, de las cuales se confirmaron 17 *E. coli*, 12 *Salmonella* spp, 6 *Klepsiella* spp, 13 *Proteus mirabilis*, 7 *Citrobacter freundii*, 3 *Enterobacter cloacae* complex, 1 *Cronobacter sakazakii*, 1 *Kluyvera ascorbata*, 9 Sin identificación.

Análisis de sensibilidad a antibióticos de las cepas bacterianas ambientales aisladas

Con la creciente problemática a nivel mundial de resistencia de las bacterias a los antibióticos, se decidió evaluar el nivel de sensibilidad de las bacterias ambientales aisladas frente a distintos antibióticos y para ello, se analizó el perfil de sensibilidad a través del sistema automatizado Vitek 2 de las 17 cepas de *E. coli* y 12 cepas de *Salmonella* spp. aisladas. Para este análisis se utilizaron las tarjetas AST-N249, específicas para bacilos aerobios clínicamente significativos frente a determinados antimicrobianos. Los resultados obtenidos de sensibilidad se pueden apreciar en la tabla 6 y el de resistencia, en la tabla 7, donde se representan en números naturales y en porcentajes la cantidad de cepas de cada especie que resultaron ya sea sensible o resistente a cada uno de los antibióticos. De manera general, las cepas de *Salmonella* spp. resultaron menos sensibles, ya que, de los 16 antibióticos probados, sólo 8 lograron afectarles, a diferencia de las cepas de *E. coli*, a las cuales les afectaron 14 de los 16 antibióticos. El porcentaje de resistencia más alto para las *E. coli* se pudo apreciar en los antibióticos cefuroxima y cefuroxima axetil, mientras que el porcentaje más alto de sensibilidad se mostró con el

antibiótico tigeciclina. En el caso de las cepas de *Salmonella*, se obtuvieron porcentajes altos de resistencia con los antibióticos cefazolina, cefuroxima, cefuroxima axetil, cefotaxima, ceftazidina, cefepima, ampicacina y gentamicina; mientras que con tigeciclina y trimetoprima/sulfametoxazol se obtuvieron los porcentajes más bajos de resistencia.

Tabla 4. Análisis de sensibilidad a antibióticos de las cepas bacterianas ambientales aisladas.

PERFIL DE SENSIBILIDAD				
Antibióticos	<i>Salmonella</i> spp.		<i>E. coli</i>	
	Cepas ambientales		Cepas ambientales	
	#/12	%	#/17	%
Ampicilina/Sulbactam	3/12	25	3/17	18
Piperaciclina/Tazobactam	6/12	50	3/17	18
Cefazolina	0/12	0	2/17	12
Cefuroxima	0/12	0	0/17	0
Cefuroxima Axetil	0/12	0	0/17	0
Cefotaxima	0/12	0	4/17	23
Ceftazidima	0/12	0	2/17	12
Cefepima	0/12	0	4/17	23
Ertapenem	8/12	67	10/17	59
Imipenem	8/12	67	10/17	59
Meropenem	8/12	67	10/17	59
Amicacina	0/12	0	2/17	12
Gentamicina	0/12	0	11/17	65
Ciprofloxacino	7/12	58	14/17	82
Tigeciclina	12/12	100	17/17	100
Colistina	-	-	-	-
Trimetoprima/Sulfametoxazol	12/12	100	14/17	82

#: Número de cepas sensibles al antibiótico. /12 - /17: Total de cepas por especie analizadas. %: Porcentaje de cepas sensibles al antibiótico.

Tabla 5. Análisis de resistencia a antibióticos de las cepas bacterianas ambientales aisladas

PERFIL DE RESISTENCIA		
Antibióticos	<i>Salmonella</i> spp.	<i>E. coli</i>

	Cepas ambientales		Cepas ambientales	
	#/12	%	#/17	%
Ampicilina/Sulbactam	7/12	58.3	13/17	76.4
Piperaciclina/Tazobactam	2/12	16.6	9/17	52.9
Cefazolina	12/12	100	15/17	88.2
Cefuroxima	12/12	100	17/17	100
Cefuroxima Axetil	12/12	100	17/17	100
Cefotaxima	12/12	100	13/17	76.4
Ceftazidima	12/12	100	13/17	76.4
Cefepima	12/12	100	13/17	76.4
Ertapenem	0/12	0	0/17	0
Imipenem	0/12	0	0/17	0
Meropenem	0/12	0	0/17	0
Amicacina	12/12	100	0/17	0
Gentamicina	12/12	100	5/17	29.4
Ciprofloxacino	5/12	41.6	3/17	17.6
Tigeciclina	0/12	0	0/17	0
Colistina	-	-	-	
Trimetoprima/Sulfametoxazol	0/12	0	3/17	17.6

#: Número de cepas resistentes al antibiótico. /12 - /17: Total de cepas por especie analizadas. %: Porcentaje de cepas resistentes al antibiótico.

Determinación del rango de hospederos

Para precisar la especificidad y espectro de hospederos de los bacteriófagos 15597,11229,8739, 14028 y 9842, se infectaron las 29 cepas bacterianas ambientales, 17 corresponden a *E. coli* y 12 a *Salmonella* spp., todas aisladas de las muestras de aguas residuales anteriormente mencionadas.

De las 17 cepas de *E. coli* ambientales probadas, EcAR B19-4 fue sensible al bacteriófago 15597, las cepas EcAR B19-4 y EcAR C10-1 fueron sensibles al bacteriófago 11229 y las cepas EcAR B19-4, EcAR C10-1, EcAR C15-2 y EcAR B25-1 fueron sensibles al bacteriófago 8739. Todas las cepas presentaron placas de lisis tenues en presencia del bacteriófago (Tabla 3).

En el caso de las 12 cepas de *Salmonella* spp. ambientales probadas, al bacteriófago 9842 solamente resultaron sensibles las cepas SLAR I14-3 y SIAR A22-7 que presentaron placas de

lisis tenues en presencia del bacteriófago. Al bacteriófago 14028 fueron sensibles las cepas SIAR C22-3 y SIAR A22-7 que presentaron placas de lisis tenues en presencia del mismo y la cepa SIAR I14-3 también fue sensible (Figura 27), pero a diferencia de las dos anteriores presentó una placa de lisis bien marcada (Tabla 4).



Figura 32. Placa de lisis del bacteriófago 9842 en la cepa SIAR I14-3, ambos aislados de la misma agua residual.

Tabla 6. Determinación del rango de hospederos de los 3 bacteriófagos de *E. coli* aislados.

Cepas de <i>E. coli</i> ambientales	Bacteriófagos		
	11229	15597	8739
EcAR A15-2	-	-	-
EcAR C15-1	-	-	-
EcAR B19-4	+	+	+
EcAR C10-1	+	-	+
EcAR B25-5	-	-	-
EcAR C25-4	-	-	-
EcAR B15-1	-	-	-
EcAR C15-2	-	-	+
EcAR C19-3	-	-	-
EcAR B25-1	-	-	+
EcAR B25-6	-	-	-
EcAR C25-5	-	-	-
EcAR B19-3	-	-	-
EcAR A10-4	-	-	-
EcAR B25-2	-	-	-

EcAR C25-1	-	-	-
EcAR B15-3	-	-	-

(+) = Sensible (-) = Resistente. **Cepas sensibles:** EcAR B19-4, EcAR C10-1, EcAR C15-2, EcAR B25-1. **Cepas resistentes:** EcAR A15-2, EcAR C15-1, EcAR B25-5, EcAR C25-4, EcAR B15-1, EcAR C19-3, EcAR B25-6, EcAR C25-5, EcAR B19-3, EcAR A10-4, EcAR B25-2, EcAR C25-1, EcAR B15-3.

Tabla 7. Determinación del rango de hospederos de los 2 bacteriófagos de *Salmonella sp.* aislados.

Cepas de <i>Salmonella sp.</i> ambientales	Bacteriófagos	
	9842	14028
SIAR D14-1	-	-
SIAR D14-3	-	-
SIAR G14-4	-	-
SIAR G14-5	-	-
SIAR H14-3	-	-
SIAR I14-3	+	+
SIAR A22-7	+	+
SIAR A22-5	-	-
SIAR B22-1	-	-
SIAR B22-3	-	-
SIAR C22-3	-	+
SIAR D22-4	-	-

(+) = Sensible (-) = Resistente. **Cepas sensibles:** SIAR I14-3, SIAR A22-7, SIAR C22-3. **Cepas resistentes:** SIAR D14-1, SIAR D14-3, SIAR G14-4, SIAR G14-5, SIAR H14-3, SIAR A22-5, SIAR B22-1, SIAR B22-3, SIAR D22-4.

CAPÍTULO IV
DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

En este estudio las bacterias que fueron aisladas e identificadas pertenecen a la familia *Enterobacteriácea* a excepción de *Proteus* que pertenece a la familia *Morganellaceae*. A pesar de seguir al pie de la letra la metodología y usar medios selectivos y diferenciales, fueron aisladas otras cepas que no eran objeto de nuestro estudio. Según Gorski y Liang (2010) al aislar *Salmonella* spp., aunque se utilice una batería de diferentes medios selectivos y diferenciales, *Citrobacter* y *Proteus* tienen la capacidad de causar falsos positivos. Lo mismo sucede al aislar *E. coli*, donde *Citrobacter* puede causar falsos positivos tanto en EMB como en Agar MacConkey.

Aislamiento y purificación de bacteriófagos

En esta investigación se aislaron cinco bacteriófagos procedentes de la PTAR de la ciudad de Panamá, capaces de lisar e infectar cepas de colección ATTC 14028 y 9842 de *Salmonella*, y ATCC 15597, 11229, 8739 de *E. coli*, y también cepas salvajes procedentes de la misma planta. Según Gaviria *et al.* (2012), por el grado de contaminación que presentan las aguas residuales, se pueden encontrar una gran cantidad de bacterias de diferentes especies y se espera encontrar también los bacteriófagos que infectan estas mismas bacterias, ya que estos últimos constituyen un control biológico para las UFC, por esto se utiliza las aguas residuales para este estudio. Además, Akhtar *et al.* (2014) mencionan que, de las aguas residuales se puede obtener una gran cantidad de bacteriófagos líticos y con capacidad de infectar a muchos huéspedes en comparación de otras muestras.

La purificación de los bacteriófagos obtenidos se realizó mediante la técnica de doble capa de agar, lo que permitió obtener placas de lisis claras. Este procedimiento fue de suma importancia, debido a que como sugiere Gaviria *et al.* (2012), la purificación del bacteriófago potencia su acción lítica en las bacterias que tiene como anfitrión.

Todos estos procedimientos se realizaron añadiendo CaCl_2 (10 mM) para optimizar el proceso de infección, ya que como menciona Jamal *et al.* (2017), el Ca^{2+} estabiliza el proceso de adsorción de algunos bacteriófagos al hospedador e incluso para mejorar la formación de placas de lisis en el medio con agar. Esto último, haciendo referencia al estudio realizado por Guglielmotti (2003), en donde los bacteriófagos autóctonos de *Lactobacillus delbrueckii* estudiados, sólo presentaron placas de lisis nítidas en los medios con la adición de Ca^{2+} .

Caracterización biológica

Al probar la viabilidad de los bacteriófagos frente al cloroformo, se observó que los bacteriófago 15597, 11229 y 8739 de *E. coli* no presentaron un efecto negativo o de inactivación al ser expuestos al cloroformo, e incluso manifestaron un pequeño incremento en la producción de placas de lisis. Algo similar a lo expuesto por Punil (2017), en donde el bacteriófago ΦGF1 específico de *E. coli*, resultó resistente al cloroformo, ya que no mostró ningún efecto al ser expuesto.

En el caso de los bacteriófagos para *Salmonella*, el 14028 tampoco resultó afectado negativamente y también manifestó un ligero incremento en el número de placas de lisis. Se podría entonces considerar que estos cuatro fagos no presentan lípidos en su superficie, ya que, tradicionalmente, como menciona Gadaleta (1995), se ha considerado la sensibilidad al cloroformo como un indicativo de la presencia de lípidos en la partícula viral. Incluso un fago con cola, ya que según Ackermann *et al.* (1978), el cloroformo tiene poco efecto en la mayoría de los fagos de cola. En el caso del fago 9842, se observó una afectación de manera negativa, ya que se redujo ligeramente su número de placas de lisis al ser expuesto. Este último resultado se puede comparar con el obtenido por Flores (2017), donde el fago S6 de *Salmonella* también redujo su título fágico al ser expuesto al cloroformo, en su caso se redujo un 85%.

Se determinó también el efecto de la luz UV sobre la viabilidad de los cinco bacteriófagos purificados, donde se observó distintos comportamientos. El bacteriófago 15597 manifestó una disminución de su viabilidad a los 40 s, sin embargo, mostró un incremento a los 90 s de exposición. Similar comportamiento se registró en el bacteriófago 14028, donde se apreció una estimulación en la producción de placas de lisis a medida que aumentaba el tiempo de exposición, manteniéndose constante en los 60 s y 90 s. Estos comportamientos podrían analizarse en futuras investigaciones, para determinar el porqué de dichos resultados. Podría deberse a una reparación de su material genético, proceso conocido como fotoreparación, pero no se puede por el momento asegurar que sea este el proceso que causa este comportamiento. En el caso del bacteriófago 9842, se observó un aumento en la producción de placas de lisis. Sin embargo, a los 90 s manifestó un descenso, mostrando su mayor punto de producción de placas de lisis a los 60 s.

El bacteriófago 11229 demostró ser sensible a la luz UV ya que, a los 60 s de exposición, redujo al 100% su viabilidad. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Flores (2017), donde el bacteriófago Vf1 con actividad lítica para *Vibrio fluvialis* manifestó una reducción de su viabilidad al 100% a los 90 s de exposición. Otro bacteriófago sensible fue el fago 8739, quien a medida que transcurría la exposición a la luz UV, disminuía su viabilidad; en este caso, no se

redujo al 100%. Esto fue similar a lo observado por Wong (1994), donde el fago μ B-19, específico de *Bacillus thuringiensis*, fue sensible a la luz UV, ya que, a un tiempo de exposición de 90 s, su infectividad se redujo en un 60%. Estos resultados son comprensibles, como menciona Born *et al.* (2015), ya que la luz de amplio espectro, es decir, UVB (280-320 nm) y > 320 nm, tiene un impacto negativo en el ADN del fago, debido a la formación de dímeros de pirimidina (principalmente timina) en el ADN, causada por la absorción directa de la luz UV.

Los cinco bacteriófagos fueron sometidos a distintos rangos de pH (pH 3, pH 5, pH 7 y pH 9) para analizar su estabilidad en cada uno de ellos. En el caso de los fagos 15597 y 11229 de *E. coli*, se pudo observar una estabilidad significativa en los distintos rangos de pH, mostrando una mayor producción de placas de lisis a pH 9, indicando que se ven favorecidos en ambientes alcalinos. Estos resultados concuerdan parcialmente con los obtenidos por Jamalludeen *et al.* (2007), donde se analizó la estabilidad a rangos de pH desde 1 a 11 de 9 bacteriófagos de *E. coli* O149 enterotoxigénica y allí se pudo observar la supervivencia de los fagos a lo largo de los rangos analizados, sin embargo, se notó una mejor viabilidad de todos a pH entre 5-9. Jamalludeem *et al.* (2007), indican que la habilidad para sobrevivir bien en el rango de pH 5-9 es una característica común a la mayoría de los fagos, pero muchos son también estables a pH 3 o 4. En el caso del bacteriófago 8739 de *E. coli*, se pudo observar mejor estabilidad en los pH 3 y pH 9, siendo pH 9 donde se produjeron mayor cantidad de placas de lisis, algo similar a lo sucedido en el estudio de Manohar *et al.* (2018), donde el fago myPSH1131 de *Escherichia* resultó ser tolerante a condiciones ácidas y básicas. Sin embargo, en este fago 8739, se vio mayormente afectada su viabilidad a pH 5 y pH 7.

Con respecto a los bacteriófagos de *Salmonella* spp., el fago 9842, no mostró una gran afección a su estabilidad lo largo de los distintos pH, pero se vio mayormente favorecido a pH 9, donde se dio la mayor producción de placas de lisis, resultados similares a los obtenidos por Flores (2017), donde el fago S6 de *Salmonella* spp. se mantuvo viable a pH entre 6 a 8, siendo susceptible a pH ácidos. En el caso del fago 14028, mostró una mayor producción de placas de lisis a pH 5, a diferencia de pH 3, donde se pudo observar su estabilidad más baja en comparación a los otros rangos. En el estudio realizado por Spricigo (2011), el fago UAB_Phi78 de *Salmonella* spp, resultó estable a los de rangos de pH entre 4 y 9, pero muy inestable a pH por debajo de 2. Caso similar fue observado por Rahaman *et al.* (2014), donde el fago SAL-PG específico para *Salmonella pullorum* y *Salmonella gallinarum*, mostró una mayor estabilidad en los rangos de pH entre 4 y 9.

Aunque los cambios en los valores obtenidos son ligeramente susceptibles, se pudo observar de manera general que los pH alcalinos no afectan intensamente a la concentración de los bacteriófagos como sí ocurre con los pH más ácidos. Se debe tener presente como indica Hazem (2002), que a menudo los fagos son bastante sensibles a la desnaturalización de proteínas en los ambientes ácidos, lo que puede resultar en una pérdida de viabilidad del fago.

Otro parámetro importante que se analizó fue la viabilidad de los bacteriófagos a diferentes temperaturas. En los bacteriófagos de *E. coli*, el fago 15597 mostró una mayor actividad lítica a los 25°C, sin embargo, decayó drásticamente a los 70°C. El fago 11229, se mantuvo estable entre los 25° y 50°C, decayendo a los 70°C. Estos resultados concuerdan con los de Punil (2017), dónde el fago ΦGF1 resultó estable a las temperaturas de 40° y 50°C hasta por 60 min de exposición, mientras que a los 5 y 15 min de exposición a 60°, 70° y 80°C, ya se observaba una reducción significativa en la concentración de fagos. En el caso del fago 8739, también se observó una relativa estabilidad en las temperaturas a las que fue expuesto e incluso fue el único bacteriófago que se vio menos afectado a los 70°C. Autores como Coffey *et al.* (2011), encontraron que fagos de *E. coli* O157:H7 permanecen viables después de la exposición a un rango amplio de temperaturas, a saber, entre -22 y 60°C. Hay que tener presente como menciona Punil (2017), que la termoestabilidad de los bacteriófagos depende mucho de la estabilidad a la temperatura de su hospedero. En el caso de *E. coli*, puede crecer a temperaturas que oscilan entre 7° y 50°C, con una temperatura óptima de 37°C (OMS, 2018).

Ambos bacteriófagos de *Salmonella* spp. (9842 y 14028), se mantuvieron estables a temperaturas entre los 25 y 50°C, decayendo su número de placas de lisis a los 70°C. Resultados parecidos se observaron en el estudio de Ahmadi *et al.* (2016), dónde el fago PSE de *Salmonella entérica* serovar Enteritidis, se mantuvo relativamente estable al calor hasta 60 min a temperaturas entre 30 y 70°C, mostrando una rápida disminución de sus placas de lisis arriba de los 70°C. Esta disminución a los 70°C también se observó en el trabajo realizado por Rahaman *et al.* (2014), donde el fago SAL-PG resultó ser inestable luego de ser expuesto por 1 h a 70°C. En el caso del fago S1 de *Salmonella entérica*, del estudio de Segundo *et al.* (2017), el bacteriófago resultó estable a 30 y 40°C, pero perdió una unidad log en su título, al ser expuesto a 50°C y de dos a ocho unidades log a temperaturas de 60 y 80°C, respectivamente. En ambos bacteriófagos (9842 y 14028), se observó que la temperatura en que más se vieron favorecidos fue a 37°C. Esto es comprensible debido a que esta bacteria se desarrolla en un amplio rango de temperaturas como indica Flores (2017), que oscilan entre 7 y 48°C, siendo su temperatura óptima 37°C.

Al analizar la capacidad de infección de los 5 bacteriófagos frente a cepas salvajes de *E. coli* y *Salmonella* spp. que se lograron aislar de la PTAR de la Ciudad de Panamá, se logró observar que los mismos no lograron lisar de manera efectiva a las cepas a las cuales se expusieron. Todos mostraron una lisis muy ligera o tenue. Se debe tener presente lo que menciona Gaviria (2012), que la especificidad que tienen los fagos depende de los receptores específicos situados en la superficie de la bacteria, y la multiplicación del fago solo ocurre cuando estos receptores de la bacteria y el fago coinciden.

En el caso de los bacteriófagos de *E. coli*, al fago 11229 resultaron sensibles 2 cepas de *E. coli*, al 15597 sólo 1 cepa de *E. coli* y al fago 8739, resultaron sensibles 5 cepas de *E. coli*. Este último fago, fue el único que presentó un amplio rango de hospedero. En el trabajo realizado por (Punil 2017), el bacteriófago de *E. coli* Φ GF1, infectó 2 cepas ATCC de *E. coli* y 3 cepas silvestres aisladas que denominaron GF1, GF2 y EC3. De la familia de las enterobacterias, el fago Φ GF1 infectó a la cepa *Shigella sonnei* ATCC 25931, lo que confirmó su amplio rango de hospedero.

En los bacteriófagos de *Salmonella* spp., el fago 9842 logró infectar a dos cepas de *Salmonella* spp. El fago 14028 también fue capaz de infectar a dos cepas de *Salmonella* spp. y fue el único fago que mostró una lisis completa sobre una cepa ambiental, en este caso la cepa SIAR I14-3. Resultados distintos a Carey *et al.* (2006), dónde el fago FGCSSa1 fue lítico en seis de los ocho hospedadores de *Salmonella* spp. a los cuales fue enfrentado, mientras que el fago FGCSSa2, fue lítico en solo tres de los ocho hospedadores de *Salmonella* spp. a los que fue expuesto.

Observar que los fagos infectan a más de una cepa bacteriana, sugiere, como dice Kalatzis (2016), que reconocen estructuras idénticas o muy similares como receptores en su hospedador. Por lo general, la estrechez de los rangos de hospedadores de fagos (unas pocas cepas, unas pocas especies), limitará en un mínimo el tratamiento presuntivo; es decir, esta característica podría dificultar la opción de utilizar un mismo fago para disminuir la contaminación causada por bacterias de especies diferentes, o en algunos casos, incluso de serotipos diferentes (Loc-Carrillo *et al.*, 2011).

Según Adams y Park (1956), los fagos tienen enzimas de polisacárido despolimerasa (PDE) que se encargan de degradar el exopolisacárido bacteriano (EPS), reconociendo de forma específica las proteínas que conforman el EPS, donde los fagos, mediante este mecanismo, logran unirse a la bacteria. Esto podría explicar porque los fagos aislados en este estudio, se unen a un número reducido de las bacterias aisladas, a pesar que ambos fueron aislados de la misma agua residual (PTAR).

CONCLUSIÓN

CONCLUSIONES

- Fue posible aislar bacteriófagos con actividad lítica frente a cepas ATCC de *E. coli* y *Salmonella* spp., y cepas bacterianas silvestres de la PTAR, de la Ciudad de Panamá que presentan sensibilidad a algunos antibióticos.
- La técnica de doble capa de agar, fue efectiva para aislar cinco bacteriófagos de las cepas ATCC 8739, 11229, 15597 de *E.coli*, ATCC 9842 de *Salmonella entérica* Bispebjerg y ATCC 14028 de *Salmonella entérica* Typhimurium, que fueron purificados y caracterizados de manera exitosa.
- Los cinco bacteriófagos aislados en este estudio, fueron sensibles al cloroformo, observándose que el 8739, 11229, 15597 y 14028, manifestaron un ligero aumento en su actividad lítica, mientras que el 9842, fue el único que redujo su actividad lítica.
- Los cinco bacteriófagos aislados en este estudio, fueron sensibles a la luz UV. Sólo el fago 11229, se logró observar una inhibición completa a los 60 s de exposición. Los otros aumentaron su actividad lítica, como fue el caso del 15597 y 14028.
- La viabilidad de los fagos frente a diferentes pH, fue favorecida por los pH alcalinos.
- Los cinco bacteriófagos fueron estables en un rango de temperatura entre 25 y 50°C. Sin embargo, se observó una gran afectación a temperaturas de 70°C en adelante en todos los bacteriófagos estudiados.
- Los bacteriófagos aislados no presentaron un amplio rango de hospederos.

RECOMENDACIONES

RECOMENDACIONES

- Procurar siempre utilizar una metodología estándar para el aislamiento de cepas bacterianas.
- Mantener medios y reactivos siempre a pH adecuados. Además, siempre realizar controles de calidad tanto a cepas como medios.
- Mantener todas las variables controladas, para evitar posibles errores en los resultados.
- Utilizar una colección más amplia de *E. coli* y *Salmonella* spp. para el rango hospedero, con cepas de diferentes serotipos, multirresistentes a los antibióticos y que provengan de muestras ambientales y muestras clínicas.
- Hacer cocteles con estos bacteriófagos provenientes del mismo género, para ver si aumenta la capacidad de inhibir a las cepas ambientales y clínicas, y así lograr ver placas de lisis claras.
- Para emplear estos bacteriófagos como posibles controles biológicos y fagoterapia, es necesario conocer el tamaño y la secuencia de su genoma.

***REFERENCIAS
BIBLIOGRÁFICAS***

LITERATURA CITADA

1. Ackermann H., Audurier, A., Berthiaume, L., Jones, A., Mayo, J., Vidaver, A. K. (1978). Guidelines for bacteriophage characterization. *Advances in virus research*. 23:1–24.
2. Ackermann H. (2001). Frequency of morphological phage descriptions in the year 2000. Brief review. *Archives of virology*. 146(5):843–857.
3. Ackermann H. (2007). 5500 Phages examined in the electron microscope. *Archives of virology*. 152(2):227–243.
4. Adams, M. H., & Park, B. H. (1956). An enzyme produced by a phage - host cell system: II. The properties of the polysaccharide depolymerase. *Virology*. 2(6):719–736. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(56\)90054-X](https://doi.org/10.1016/0042-6822(56)90054-X)
5. Ahmadi, M., Karimi M., Rahimi, S., y Dennehy, J. (2016). Prophylactic Bacteriophage Administration More Effective than Post-infection Administration in Reducing *Salmonella enterica* serovar Enteritidis Shedding in Quail. *Frontiers in Microbiology*. 7:1253. doi: 10.3389/fmicb.2016.01253
6. Akhtar, M., Viazis, S., Diez-González, F. (2014). Isolation, identification and characterization of lytic, wide host range bacteriophages from waste effluents against *Salmonella enterica* serovars. *Food control*. 38:67-74.
7. Algorta, G., Schelotto, F. (2006). Principales grupos de bacilos Gramnegativos no exigentes. En *Temas de Bacteriología y Virología Médica*. 2da Edición. Capt. 19. pp. 317.
8. Almada, N.; Araujo, S.; Arias, N.; Bernigaud, I.; Bueno, D.; De Battista, J.; Duarte, S.; Federico, F.; Ferrer, J.; Gallinger, C.; Gange, J.; García, A.; Genta, G.; Procura, F.; Pulido, D.; Ré, A.; Rodríguez, F.; Soria, M. (2016). Cama de pollo en Entre Ríos. Aportes para su uso y manejo. Ediciones INTA, EEA Concepción del Uruguay.
9. Alvseike, O. y Skjerve, E. (2002). Prevalencia de una subespecie de *Salmonella diarizonae* en rebaños de ovejas noruegos. *Medicina veterinaria preventiva*. 52(3-4):277-285.
10. Alvseike, O., Vardund, T., Lindstedt, B., Heir, E., Eriksson, E., & Kapperud, G. (2004). Molecular epidemiology and population genetics of *Salmonella* subspecies diarizonae in sheep in Norway and Sweden. *Epidemiology & Infection*. 132(2):253-261.
11. Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y Centro Europeo para la Prevención y el Control de Enfermedades (EFSA y ECDC). (2018). Informe resumido de la Unión Europea sobre tendencias y fuentes de zoonosis, agentes zoonóticos y brotes transmitidos por alimentos en 2017. *EFSA Journal*. 16(12):e05500.
12. Balcazar JL. (2014). Bacteriophages as Vehicles for Antibiotic Resistance Genes in the Environment. *PLoS Pathogens*. 10(7):1-4.
13. Barrero, L. (2016). *Microbiología Clínica*. Editorial Síntesis. Capítulo 2. Pp 43-48.
14. Bäumlér, A. y Fang, FC (2013). Especificidad del hospedador de patógenos bacterianos. *Perspectivas de Cold Spring Harbor en medicina*. 3(12):a010041.
15. Biomérieux. (2018). Vitek 2. Consultado el 11/9/2019 en <https://www.biomerieux.es/microbiologia-industrial/vitekr-2-compact-0>
16. Brinkley, C., Burland, V., Keller, R., Rose, D. J., Boutin, A. T., Klink, S. A., Blattner, F. R., Kaper, J. B. (2006). Nucleotide sequence analysis of the enteropathogenic *Escherichia coli* adherence factor plasmid pMAR7. *Infection and immunity*. 74(9):5408–5413.
17. Born, Y., Bosshard, L., Duffy, B., Loessner, MJ y Fieseler, L. (2015). Protección del bacteriófago Y2 de *Erwinia amylovora* del daño inducido por los rayos UV por compuestos naturales. *Bacteriófago*. 5(4):e1074330.
18. Calvo, M. (2014). *Bioquímica de los alimentos*. Temario de la asignatura de Química y Bioquímica de los Alimentos del grado de ciencia y tecnología de los alimentos en la Universidad de Zaragoza España. Información disponible en: <http://milksci.unizar.es/bioquimica/temas/azucares/agar.html>

19. Canet, J. (2016). *Escherichia coli*: características, patogenicidad y prevención (I). Recuperado el 11 de sept. 2019 de <http://www.betelgeux.es/blog/2016/01/19/escherichia-coli-caracteristicas-patogenicidad-y-prevencion-i/>.
20. Carey, G., Billington, C., Cornelius, A., Andrew, J., Heinemann, J. (2006). Aislamiento y caracterización de bacteriófagos que infectan a *Salmonella* spp. *Cartas de microbiología de FEMS*. 258(2):182–186.
21. Chandry, P., Gladman, S., Moore, S., Seemann, T., Crandall, K., Fegan, N. (2012). A Genomic Island in *Salmonella* enterica ssp. *salamae* provides new insights on the genealogy of the locus of enterocyte effacement. *PLoS One*. 7(7):e41615. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041615>.
22. Chiodini, R. J. (1982). Transovarian passage, visceral distribution, and pathogenicity of *Salmonella* in snakes. *Infection and immunity*. 36(2):710-713.
23. Chisavo, A., Husserl, J. (2020). Control Biológico De Enterobacterias En Aguas Residuales Mediante Bacteriófagos Líticos: Revisión Bibliográfica. Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia.
24. Clancy, M., Newton, A., Sykes, J. (2016). Manejo de la osteomielitis causada por *Salmonella* entérica subsp. *houtenae* en un cantil de Taylor (*Agkistrodon bilineatus taylori*) utilizando amikacina administrada a través de una bomba osmótica. *Revista de Medicina del Zoológico y la Vida Silvestre*. 47(2):691-694.
25. Coffey, B., Rivas, L., Duffy, G., Coffey, A., Ross, R., McAuliffe, O. (2011). Evaluación de *Escherichia coli* O157: bacteriófagos específicos de H7 e11 / 2 y e4 / 1c en caldo modelo y entornos de piel. *Revista Internacional de Microbiología de los Alimentos*. 147 (3):188-194.
26. Dalmasso, M., Strain, R., Neve, H., Franz, Ch., Cousin, F., Ross, R., Hill, C. (2016). Three New *Escherichia coli* Phages from the Human Gut Show Promising Potential for Phage Therapy. *Plos One*. 11(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156773>
27. Darfeuille-Michaud, A. (2002). Adherent-invasive *Escherichia coli*: a putative new *E. coli* pathotype associated with Crohn's disease. *International Journal of Medical Microbiology*. 292(3-4):185–193. doi:10.1078/1438-4221-00201
28. Davies, R., Evans, S., Preece, B., Chappell, S., Kidd, S., Jones, Y. (2001). Aumento de *Salmonella* entérica subespecie *diarizonae* serovar 61: k: 1, 5, (7) en ovejas. *The Veterinary Record*. 49(18):555-557.
29. DeBach, P. (1964). *Biological control of insect pests and weeds*. Chapman and Hall.
30. Desai, P., Porwollik, S., Long, F., Cheng, P., Wollam, A., Clifton, S., Weinstock, G., McClelland, M. (2013). Evolutionary genomics of *Salmonella* enterica subspecies. *MBio*, 4(2):e00579-12.
31. Dini, C. (2011). Aislamiento y caracterización molecular de bacteriófagos de bacterias enteropatógenas para biocontrol de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA). Tesis de Doctorado. Universidad Nacional de la Plata.
32. Driscoll J., Brody S., Kollef M. (2007). The epidemiology, pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs*. 67(3):351-368.
33. Eslava C., Mateo J., Cravioto A. (1994). Cepas de *Escherichia coli* relacionadas con la diarrea. En: diagnóstico de laboratorio de infecciones gastrointestinales. Giono S, Escobar A, Valdespino JL. Secretaria de Salud. México. Pp. 251.
34. Espigares, M., Pérez, J. (1985). Aspectos sanitarios del estudio de las aguas. Granada. Universidad de Granada, Servicio de publicaciones.
35. Estrada T, Navarro F. (2012). Enteroaggregative *Escherichia coli* pathotype: a genetically heterogeneous emerging foodborne enteropathogen. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 66(3):281-298.

36. Estrada T, Pérez I, Bernal R, Zaidi M. (2014). Enteroaggregative *Escherichia coli*: a pathogen bridging the north and south. *Current Tropical Medicine Reports*. 1(2):88-96.
37. Ficha técnica de medios Britania. (2015). Nutritivo caldo. Consultado vía web el 13/9/19. https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_5a2844b49b1c6.pdf
38. Fleckenstein J, Sheikh A, Qadri F. (2014). Novel antigens for enterotoxigenic *Escherichia coli* vaccines. *Expert Review of Vaccines*. 13(5):631-639.
39. Flores, G. (2017). Caracterización de bacteriófagos líticos de *Salmonella entérica* aislados de muestras de pollos. Tesis. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima Perú.
40. Flores, V. (2017). Aislamiento y caracterización de un bacteriófago con actividad lítica para *Vibrio fluvialis*. Tesis de maestría. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima Perú.
41. Forbes, B; Sahm, D; Weissfeld, A. (2009). Diagnóstico Microbiológico de Bailey & Scott. 12 ed. Editorial Panamericana S.A. Argentina.
42. Gadaleta, P. (1995). Aislamiento, caracterización, y relaciones filogenéticas de un bacteriófago de *Kluyvera sp.* Tesis Doctoral. Buenos Aires, Argentina.
43. Garboza, F., Frontado, R., Noguera, N., Ávila, H., Ojeada, L., Ramírez, N., Triana, J., Triana, F. (2011). Uso de medios alternativos a base de hidrolizado de caseína y extracto de *Aspergillus niger* y su efecto sobre la expresión genética de una cepa de *Escherichia coli*. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*. 31(2):138-143. Caracas, Venezuela. Disponible en <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=199422818010>
44. García I; Porras, M. (2018). Aislamiento de bacteriófagos de *Pseudomonas aeruginosa* multidrogo resistente en aguas de tres ríos de la Provincia de Lima-Perú. Tesis. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Perú.
45. Gil F, Catalão M, Moniz J, Leandro P, McNeil M, Pimentel M, (2008). The lytic cassette of mycobacteriophage Ms6 encodes an enzyme with lipolytic activity. *Microbiology*. 154(Pt5):1364-1371.
46. Gil, M. (2018). Agar nutritivo: fundamento, preparación y usos. Mini review. Universidad de Carabobo, Venezuela.
47. Gorski, L., Liang, A. (2010). Effect of enrichment medium on real-time detection of *Salmonella enterica* from lettuce and tomato enrichment cultures. *Journal of food protection*. 73(6):1047-1056.
48. Gotoh N. (2001). Antibiotic resistance caused by membrane impermeability and multidrug efflux systems. *Nippon Rinsho. Japanese journal of clinical medicine*. 59(4):712-718.
49. Grimont, P., Weill, F., (2007). Antigenic Formulae of the *Salmonella* Serovars, ninth ed. WHO Collaborating Center for Reference and Research on *Salmonella*. Institut Pasteur, Paris. Pp. 1-166.
50. Guglielmotti, D. (2003). Fagos autóctonos de *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*: caracterización y descripción de su interacción con sus cepas sensibles. Tesis de Maestría. Universidad Nacional del Litoral. Argentina.
51. Hall, M., Rowe, B. (1992). *Salmonella arizonae* in the United Kingdom from 1966 to 1990. *Epidemiology & Infection*. 108(1):59-65.
52. Haq, I., Chaudhry, W., Andleeb, S., Qadri, I. (2012). Isolation and Partial Characterization of a Virulent Bacteriophage IHQ1 Specific for *Aeromonas punctata* from Stream Water. *Microbial Ecology*. 63(4):954-963. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s00248-011-9944-2>
53. Hazem A. (2002). Effects of temperatures, pH-values, ultra-violet light, ethanol and chloroform on the growth of isolated thermophilic *Bacillus* phages. *The new microbiologica*. 25(4):469-476.
54. Hendriksen, R., Vieira, A., Karlsmose, S., Lo Fo Wong, D., Jensen, A., Wegener, H., Aarestrup, F. (2011). Global monitoring of *Salmonella* serovar distribution from the World

- Health Organization Global Foodborne Infections Network Country Data Bank: results of quality assured laboratories from 2001 to 2007. *Foodborne Pathogens and Disease*. 8(8):887-900.
55. Hervás, J., Rosell, A., Hervás, D., Rubio, R., Dueñas, J., Mena, A. (2012). Reptile Pets–associated *Salmonella* enterica Subspecies diarizonae Gastroenteritis in a Neonate. *The Pediatric infectious disease journal*. 31(10):1102-1103.
 56. Horvath, L., Kraft, M., Fostiropoulos, K., Falkowski, A., Tarr, P. (2016). *Salmonella* enterica subspecies diarizonae maxillary sinusitis in a snake handler: first report. In *Open Forum Infectious Diseases*. Oxford University Press. 3(2):66.
 57. Issenhuth-Jeanjean, S., Roggentin, P., Mikoleit, M., Guibourdenche, M., de Pinna, E., Nair, S., Weill, FX (2014). Suplemento 2008-2010 (núm. 48) del esquema blanco-Kauffmann-Le minor. *Investigación en microbiología*. 165(7):526-530.
 58. Jamal, M., Andleeb, S., Jalil, F., Imran, M., Nawaz, M., Hussain, T., Ali, M., Das, R. (2017). Isolation and characterization of a bacteriophage and its utilization against multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*-2995. *Life sciences*. 190:21–28.
 59. Jamalludeen, N., Johnson, R., Friendship, R., Kropinski, A., Lingohr, E., Gyles, C. (2007). Isolation and characterization of nine bacteriophages that lyse O149 enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Veterinary Microbiology*. 124(1-2):47–57. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113507001459?via%3Dihub>
 60. Jawetz, E; Melnick, J; Adelberg, E. (2005). *Microbiología médica*. Editado por: Brooks, G; Butel, J; Ornston, N. Editorial El manual Moderno 18a edición. México.
 61. Jorquera, D., Galarce, N., Borie, C. (2015). El desafío de controlar las enfermedades transmitidas por alimentos: bacteriófagos como una nueva herramienta biotecnológica. *Revista Chilena de Infectología*. 32(6):678-688. Versión electrónica consultada el 23/5/2019 en <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182015000700010> Versión electrónica consultada el 23/5/2019 en <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182015000700010>
 62. Kalatzis P, Bastías R, Kokkari C, Katharios P. (2016). Aislamiento y caracterización de dos bacteriófagos líticos, ϕ St2 y ϕ Grn1; Aplicación de terapia de fagos para el control biológico de *Vibrio alginolyticus* en alimentos vivos de acuicultura. *PLoS ONE*. 11(3): e0151101.
 63. Kaper, J., Nataro, J., Mobley, H. (2004). *Escherichia coli* patógena. *Nature Reviews Microbiology*. 2(2):123–140.
 64. Keestra-Gounder, A., Tsolis, R., Bäumlér, A. (2015). Ahora me ves, ahora no: la interacción de *Salmonella* con los receptores inmunes innatos. *Nature Reviews Microbiology*. 13(4):206-216.
 65. Knutton S., Lloyd D., McNeish A. (1987). Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to human intestinal enterocytes and cultured human intestinal mucosa. *Infection and Immunity*. 55(1): 69-77.
 66. Krautwald-Junghanns, M., Stenkat, J., Szabo, I., Ortlieb, F., Blindow, I., Neul, A., Schmidt, V. (2013). Characterization of *Salmonella* isolated from captive and free-living snakes in Germany. *Berliner Und Munchener Tierarztliche Wochenschrift*. 126(5-6):209-215.
 67. Krawiec, M., Kuczkowski, M., Kruszewicz, A., Wieliczko, A. (2015). Prevalence and genetic characteristics of *Salmonella* in free-living birds in Poland. *BMC veterinary research*. 11(1):1-10.
 68. Krylov, V. (2001). Phage Therapy in Terms of Bacteriophage Genetics: Hopes, Prospects, Safety, Limitations. *Russian Journal of Genetics*. 37(7):715–730.
 69. Kutateludze M, Adamia R. (2010). Bacteriophages as potential new therapeutics to replace or supplement antibiotics. *Trends Biotechnology*. 28(12):591-595.

70. Lamas, A., Miranda, J., Regal, P., Vázquez, B., Franco, C., Cepeda, A. (2018). A comprehensive review of non- enterica subspecies of *Salmonella* enterica. Microbiological Research. 206:60–73. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.09.010>.
71. Le Souëf, A., Barry, M., Brunton, D., Jakob-Hoff, R., Jackson, B. (2015). Ovariectomía como tratamiento para granulomas bacterianos de ovario en un gecko de Duvaucel (*Hoplodactylus duvaucelii*). Revista veterinaria de Nueva Zelanda. 63(6):340-344.
72. Libby, S., Lesnick, M., Hasegawa, P., Kurth, M., Belcher, C., Fierer, J., Guiney, D. (2002). Characterization of the spv locus in *Salmonella* enterica serovar Arizona. Infection and immunity. 70(6):3290-3294.
73. Loc-Carrillo, C., Abedon, S. (2011). Pros y contras de la terapia con fagos. Bacteriófago. 1(2):111-114. <https://doi.org/10.4161/bact.1.2.14590>
74. López, W., Guevara, J. (2002). Infección por *Escherichia coli* enterohemorrágica. Revista de la Facultad de Medicina de la Universidad Ricardo Palma. 3(1):38-41.
75. Lourenço, M., Reis, E., Valls, R., Asensi, M., Hofer, E. (2004). *Salmonella* entérica subsp houtenae serogrupo O: 16 en un paciente VIH positivo: reporte de caso. Revista del Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. 46(3):169-170.
76. Luján, M., Blas, G. (2007). *Salmonella*. Microbiología Veterinaria. Primera edición. Editorial Intermedica. Buenos Aires - República Argentina. 549 Pp.
77. Lukac, M., Pedersen, K., Prukner-Radovic, E. (2015). Prevalence of *Salmonella* in captive reptiles from Croatia. Journal of Zoo and Wildlife Medicine. 46(2):234-240.
78. Ma, J., Chen, P., Lau, Y., Chi, C. (2003). Absceso cerebral causado por *Salmonella* entérica subespecie houtenae en un paciente con enfermedad granulomatosa crónica. Revista de microbiología, inmunología e infección. 36(4):282-284.
79. Manohar, P., Tamhankar, A. J., Lundborg, C. S., Ramesh, N. (2018). Isolation, characterization and in vivo efficacy of *Escherichia* phage myPSH1131. PloS one. 13(10):e0206278.
80. Manual Básico de Microbiología CULTIMED. (2003). Panreac Química. S.A. 4ta Edición. Cap. 1.
81. Marin, C., Ingesa, S., González, S., Marco, F., Vega, S. (2013). Free-living turtles are a reservoir for *Salmonella* but not for *Campylobacter*. PLoS One. 8(8):e72350.
82. Martelli F, Davies R. (2012). *Salmonella* serovars isolated from table eggs: an overview. Food Research International. 45(2):745–754. Disponible en: <https://www.deepdyve.com/lp/elsevier/Salmonella-serovars-isolatedfrom-table-eggs-an-overview-p07oGdibsp>
83. Martínez, G., Bocco, M., Velásquez, M, Perroni, A., Soares, F., García, L. Munoz, R., Cartin, I., Jiménez, P., Cambiasso, E., Dugand, J., Arosemena, A., Grau, J., Carías, M., Olivera, M. (2015). ProGramma de Saneamiento de la Ciudad y la Bahía de Panamá II PN-L1109 (ANÁLISIS AMBIENTAL Y SOCIAL). República de Panamá.
84. Mayer, G. (2015). Bacteriophage. Recuperado el 29 de junio del 2019, de <http://www.microbiologybook.org/mayer/phage.htm>
85. Mermin, J., Hoar, B., Angulo, F. (1997). Iguanas and *Salmonella* marina infection in children: a reflection of the increasing incidence of reptile-associated salmonellosis in the United States. Pediatrics. 99(3):399-402.
86. Nataro J., Kaper J. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. Una revisión completa de la patogénesis, epidemiología, diagnóstico y aspectos clínicos de la *E. coli* diarreogénica. Clinical Microbiology Reviews. 11(1):142-201.
87. Nikaido, H. (2009). The Limitations of LB Medium. Small things considered. The Microbe Blog. Consultado el 13/9/2019 en <https://schaechter.asmblog.org/schaechter/2009/11/the-limitations-of-lb-medium.html>

88. Nimir, A., Ibrahim, R., Ibrahim, I. (2011). Meningitis por *Salmonella* en un paciente pediátrico causada por *Salmonella* entérica serotipo Houtenae. Informes de casos, 2011, bcr0420114096.
89. Organización Mundial de la Salud. (2017). ¿Qué es la resistencia a los antimicrobianos? Consultado vía web el 29/10/19 en <https://www.who.int/features/qa/75/es/>
90. Organización Mundial de la Salud. (2018). *E. coli*. Consultado vía web el 16/2/2021. En <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/e-coli>
91. Pascual, M., Calderon, V. (2000). Microbiología alimentaria: Metodología analítica para alimentos y bebidas. 2da edición. Pp 49-62.
92. Phillips Jr, WE y Hatkin, JM (1978). Aislamiento de *Salmonella* houtenae de una cucaracha. Enfermedades aviares. 350-353.
93. Popoff, M. Y., & Le Minor, L. (1992). Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars.
94. Prada, C., Holguín, A., González, A., Vives, M. (2015) Fagoterapia, alternativa para el control de las infecciones bacterianas. Perspectivas en Colombia. Universitas Scientiarum. 20(1):43-60.
95. Prats G. (2005). Microbiología Clínica. Editorial Médica Panamericana. 1era Edición. Pp. 29-30.
96. Punil, R. (2017). Caracterización de un bacteriófago específico de *Escherichia coli* aislado de aguas residuales de “La Taboada”. Tesis. Universidad Nacional Mayor de Man Marcos.
97. Rahaman, M. Rahman, M., Rahman, M., Khan, M., Hossen, M., Parvej, M., Ahmed, S. (2014). Poultry *Salmonella* specific bacteriophage isolation and characterization. Bangladesh Society for Veterinary Medicine. 12(2):107-114.
98. Rico G. (1995). Biología molecular en la patogenia de Shigella sp y Escherichia coli enteroinvasiva. Revista Latinoamericana de Microbiología. 37(1):367-385.
99. Riley, K., Antoniskis, D., Maris, R., Leedom, J. (1988). Rattlesnake Capsule—Associated *Salmonella* Arizona Infections. Archives of internal medicine. 148(5):1207-1210.
100. Ripp, S., Miller, R. (1998). Dynamics of the pseudolysogenic response in slowly growing cells of *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiology. 144(1) :2225-2232.
101. Rodríguez, G. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. Salud Pública de México. 44(5):464-475.
102. Romero, J. (2015). Fagoterapia: alternativa para el control de enfermedades bacterianas. Mini review. Universidad de Chile.
103. Romeu, B., Salazar, P., Navarro, A., Lugo, D., Hernández, U., Rojas, N., Eslava, C. (2010). Utilidad del sistema VITEK en la identificación y determinación de la susceptibilidad antimicrobiana de bacterias aisladas de ecosistemas dulceacuícolas Revista CENIC (Centro Nacional de Investigación de Cuba). Ciencias Biológicas. 41(1):1-9.
104. Runkel, N., Rodríguez, L., Moody, F., LaRocco, M., Blasdel, T. (1991). Infección por *Salmonella* del tracto biliar e intestinal de las zarigüeyas salvajes. Ciencias de los animales de laboratorio. 41(1):54-56.
105. Sahl J., Sistrunk J., Baby N., Begum Y., Luo Q., Sheikh A., Qadri, F., Fleckenstein J., Rasko, D. (2017). Insights into enterotoxigenic *Escherichia coli* diversity in Bangladesh utilizing genomic epidemiology. Scientific Reports. 7:3402.
106. Sánchez E., Esparza M., Parashar U., Richardson V. (2016). Sustained reduction of childhood diarrhea-related mortality and hospitalizations in Mexico after rotavirus vaccine universalization. Clinical Infectious Diseases. 62(2):133-139.
107. Sanyal, D., Douglas, T., Roberts, R. (1997). *Salmonella* infection acquired from reptilian pets. Archives of disease in childhood. 77(4):345-346.
108. Schröter, M., Roggentin, P., Hofmann, J., Speicher, A., Laufs, R., Mack, D. (2004). Las serpientes mascota como reservorio de *Salmonella* entérica subsp. diarizonae (serogrupo IIIb): un estudio prospectivo. Microbiología aplicada y ambiental. 70(1):613-615.

109. Segundo, N., Gómez, J., Flores, K., Duque, B., López, E., Baltzar, E., Torres, O. (2017). Caracterización parcial del bacteriófago S1, lítico contra *Salmonella* entérica, con posible uso farmacéutico. *Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas*. 48(2):36-48.
110. Serra, M. (2017). La resistencia microbiana en el contexto actual y la importancia del conocimiento y aplicación en la política antimicrobiana. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*. 16(3):402-419. Versión electrónica consultada el 1/11/2019 en <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=77224>
111. Skurnik, M., Strauch, E. (2006). Phage therapy: Facts and fiction. *International Journal of Medical Microbiology*. 296:5–14.
112. Snehalatha, S., Mathai, E., Jayasheela, M., Chandy, M., Lalitha, M., John, T. (1992). *Salmonella choleraesuis* subsp. indica serovar bornheim causing urinary tract infection. *Journal of clinical microbiology*. 30(9):2504-2505.
113. Snyder J., Wells J., Yashuk J., Puhr N., Blake P. (1984). Outbreak of invasive *Escherichia coli* gastroenteritis on a cruise ship. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 33(2): 281–284.
114. Sörén, K., Lindblad, M., Jernberg, C., Eriksson, E., Melin, L., Wahlström, H., Lundh, M. (2015). Changes in the risk management of *Salmonella* enterica subspecies diarizonae serovar 61:(k): 1, 5, (7) in Swedish sheep herds and sheep meat due to the results of a prevalence study 2012. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 57(1):6.
115. Spricigo, D. (2011). La desinfección basada en bacteriófagos como herramienta de biocontrol de *Salmonella* en alimentos. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona.
116. Stanchi, O. (2007). *Microbiología Veterinaria*. Primera edición. Editorial Intermedica. Buenos Aires - República Argentina. p. 210-214.
117. Stokar-Regenscheit, N., Overesch, G., Giezendanner, R., Roos, S., Gurtner, C. (2017). *Salmonella* enterica subsp. diarizonae serotype 61: k: 1, 5, (7) associated with chronic proliferative rhinitis and high nasal colonization rates in a flock of Texel sheep in Switzerland. *Preventive veterinary medicine*. 145:78-82.
118. Sulakuelidze A. (2011). The challenge of Bacteriophage Therapy. *European Industrial Pharmacy* 10:14-18.
119. Tabarani, C., Bennett N, Kiska, D., Riddell, S., Botash, A., Domachowske, J. (2010). Empiema de hemorragia subdural preexistente causada por una especie rara de *Salmonella* después de la exposición a dragones barbudos en un hogar de acogida. *Revista de pediatría*. 156(2):322-323.
120. Talavera, J. (2017). Detección de genes de resistencia a antibióticos en bacteriófagos. Tesis de maestría. Universidad Autónoma del Estado de México.
121. Terragno, R; Caffer, M; Bruna, S; Binsztein, N. (2003). Manual de procedimientos. *Salmonella*: Parte I. Aislamiento, Identificación y Serotipificación. Instituto nacional de Enfermedades Infecciosas, Global Salm - Surv y CDC. Buenos Aires - Argentina
122. Viswanatha T., Marrone L., Goodfellow V., Dmitrienko G. (2008). Assays for beta-lactamase activity and Inhibition. *Methods in molecular medicine*. 142:239–260.
123. Weinbauer M. (2004). Ecology of prokariotic viruses. *FEMS Microbiology Reviews*, 28(2):127-181.
124. Wierzbowski A., Hoban D., Hisanaga T., Decorby M., Zhanel G. (2005). The Use of Macrolides in Treatment of Upper Respiratory Tract Infections. *Current Infectious Disease Reports*. 7(3):175-84.
125. Williamson, S., McLaughlin, M., Paul, J. (2001). Interaction of the Φ HSIC Virus with Its Host: Lysogeny or Pseudolysogeny. *Applied and Environmental Microbiology*. 67(4):1682-1688. doi: [10.1128/AEM.67.4.1682-1688.2001](https://doi.org/10.1128/AEM.67.4.1682-1688.2001)

126. Wong. A. (1994). Purificación y caracterización biológica del bacteriófago uB19 específico de *Bacillus thuringiensis*. Tesis de maestría. Universidad Autónoma de Nuevo León, México.
127. Wybo, I., Potter, D., Plaskie, K., Covens, L., Collard, J., Lauwers, S. (2004). *Salmonella* entérica subespecie houtenae serotipo 44: z4, z23: - como causa poco frecuente de meningitis. *Acta Clinica Belgica*. 59(4):232-234.
128. Zhanel G., Hoban D., Schurek K., Karlowsky J. (2004) Role of efflux mechanisms on fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal Antimicrobial Agents*. 24(6):529-35.

ANEXOS

ANEXOS

Metodología



Figura 33. Proceso de filtrado del enriquecimiento de muestra de agua residual para aislamiento de fagos.



Figura 34. Preparación de diluciones para titulación de stocks de bacteriófagos.



Figura 35. Enfrentamiento de bacteriófagos y cepa huésped para caracterización.



Figura 37. Proceso de filtración al vacío de muestras de agua residual para aislamiento de bacterias ambientales.



Figura 36. Estriado en agar XLD de muestras enriquecidas de agua residual para aislamiento de *Salmonella* spp.



Figura 38. Observación de tinción Gram, para confirmación de Enterobacterias.

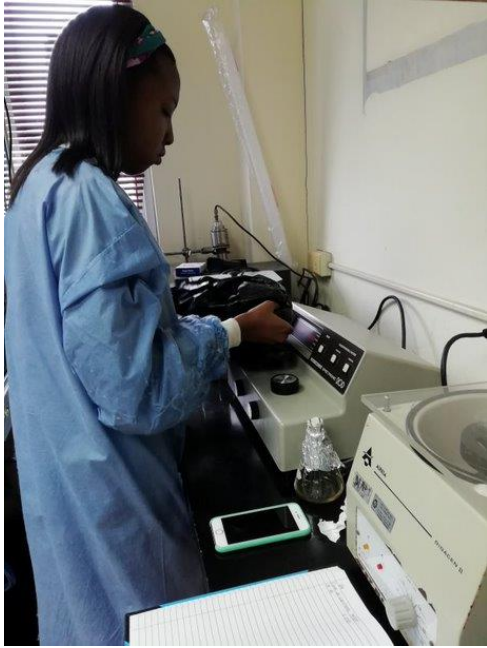


Figura 40. Medición de absorbancia de las cepas bacterianas ambientales para la curva de crecimiento.

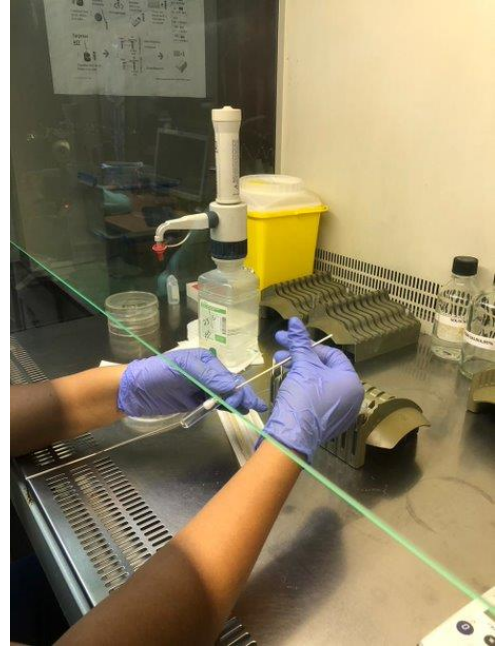


Figura 39. Preparación de la suspensión bacteriana para análisis en el sistema automatizado Vitek 2.

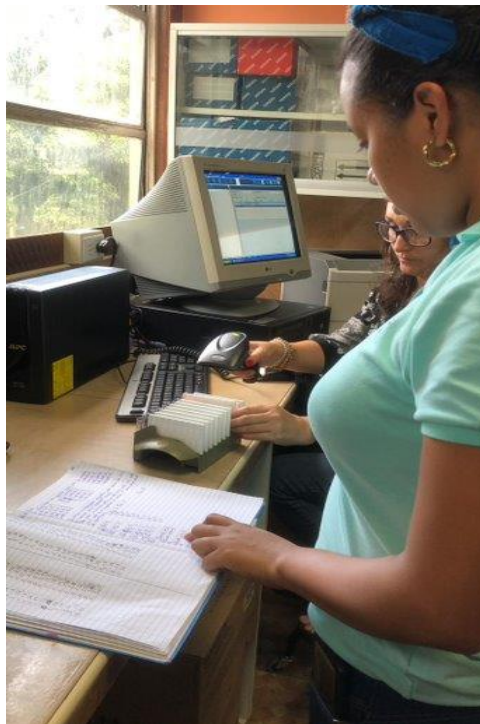


Figura 41. Ingreso de códigos al Vitek 2, para análisis de identificación y sensibilidad de las cepas ambientales aisladas.

Tablas de curva de crecimiento.

Tabla 8. Curva de crecimiento de la cepa de *E. coli* ATCC 15597.

<i>E. coli</i> ATCC 15597	
Tiempo (Horas)	Densidad Óptica (D.O 525nm)
6:31	0.021
7:31	0.015
8:31	0.016
9:31	0.013
10:31	0.038
11:31	0.063
12:31	0.118
13:31	0.208
14:31	0.307
15:31	0.376
16:01	0.406
17:01	0.450
18:01	0.472
18:31	0.476
19:01	0.474
19:31	0.474
20:01	0.474
20:31	0.476

Tabla 9. Curva de crecimiento de la cepa de *E. coli* ATCC 11229.

<i>E. coli</i> ATCC 11229	
Tiempo (Horas)	Densidad Óptica (D.O 525nm)
6:32	0.018
7:32	0.012
8:32	0.013
9:32	0.008
10:32	0.037
11:32	0.069
12:32	0.137
13:02	0.180
13:32	0.244
14:02	0.291
14:32	0.332
15:32	0.396
16:32	0.438
17:32	0.466
18:32	0.472
19:32	0.470
20:02	0.472

20:32	0.472
-------	-------

Tabla 10. Curva de crecimiento de la cepa de *E. coli* ATCC 8739.

<i>E. coli</i> ATCC 8739	
Tiempo (Horas)	Densidad Óptica (D.O 525nm)
6:35	0.005
7:35	0
8:35	0.002
9:35	0.001
10:35	0.028
11:35	0.055
12:35	0.104
13:35	0.173
14:35	0.28
15:35	0.359
16:35	0.418
17:35	0.452
18:35	0.466
19:35	0.47
20:05	0.472
20:35	0.47

Tabla 11. Curva de crecimiento de la cepa de *Salmonella* spp. ATCC 9842.

<i>Salmonella</i> spp. ATCC 9842	
Tiempo (Horas)	Densidad Óptica (D.O 525nm)
6:37	0.007
7:37	0.000
8:37	0.000
9:37	0.002
10:37	0.001
11:37	0.004
12:37	0.010
13:37	0.024
14:37	0.044
15:37	0.077
16:37	0.112
17:37	0.169
18:37	0.238
19:37	0.296
20:37	0.365

Tabla 12. Curva de crecimiento de la cepa de *Salmonella* spp. ATCC 14028.

<i>Salmonella</i> spp. ATCC 14028	
Tiempo (Hora)	Densidad Óptica (D.O 525nm)
6:36	0.011
7:36	0.005
8:36	0.003
9:36	0.008
10:36	0.010
11:36	0.016
12:36	0.045
13:36	0.095
14:36	0.177
15:36	0.256
16:36	0.346
17:36	0.412
18:36	0.456
19:36	0.466
20:36	0.464

Tabla 13. Sensibilidad de los bacteriófagos aislados al cloroformo.

Sensibilidad de bacteriófagos al cloroformo.						
Bacteriófago	Título original	Réplica	Número de dilución	Número UFP	Título final	Promedio título final.
Ph. 15597	3.00 x 10 ⁸	A	-4	171	1.71 x 10 ⁷	1.54 x 10 ⁷
		B	-4	167	1.67 x 10 ⁷	
		C	-4	124	1.24 x 10 ⁷	
		Control	-4	84	8.4 x 10 ⁶	8.4 x 10 ⁶
Ph. 11229	4.90 x 10 ⁷	A	-4	55	5.5 x 10 ⁶	5.2 x 10 ⁶
		B	-4	41	4.1 x 10 ⁶	
		C	-4	61	6.1 x 10 ⁶	
		Control	-4	43	4.3 x 10 ⁶	4.3 x 10 ⁶
Ph. 8739	3.7 x 10 ⁶	A	-2	245	2.45 x 10 ⁵	2.71 x 10 ⁵
		B	-2	284	2.84 x 10 ⁵	
		C	-2	284	2.84 x 10 ⁵	
		Control	-2	237	2.37 x 10 ⁵	2.37 x 10 ⁵
Ph. 14028	4.3 x 10 ⁹	A	10 ⁻⁶	290	2.90 x 10 ⁹	3.43 x 10 ⁹
		B	10 ⁻⁷	44	4.4 x 10 ⁹	
		C	10 ⁻⁶	300 (*)	3.00 x 10 ⁹	
		Control	10 ⁻⁶	201	2.01 x 10 ⁹	2.01 x 10 ⁹

Ph. 9842	9.8×10^8	A	-6	41	4.1×10^8	4.6×10^8
		B	-6	48	4.8×10^8	
		C	-6	51	5.1×10^8	
		Control	-7	49	4.9×10^9	4.9×10^9

(*) Los valores obtenidos fueron mayores a 300, dificultando su conteo. Se coloca 300 para poder obtener un título representativo.

Tablas de efecto de la luz UV.

Tabla 14. Sensibilidad del bacteriófago 15597 a la luz UV.

BACTERIOFAGO 15597						
Tiempo de exposición	título original	Réplica	Número de dilución	Número de UFP	Título final	Promedio Título final.
0 s	5.1×10^7	CONTROL	-5	51	5.1×10^7	5.1×10^7
20 s	5.1×10^7	A	-5	46	4.6×10^7	1.09×10^8
		B	-5	119	1.19×10^8	
		C	-5	163	1.63×10^8	
40 s	5.1×10^7	A	-5	70	7.0×10^7	2.3×10^7
		B	-2	76	7.6×10^4	
		C	-3	37	3.7×10^5	
60 s	5.1×10^7	A	-5	105	1.05×10^7	2.39×10^7
		B	-5	61	6.1×10^7	
		C	-3	24	2.4×10^5	
90 s	5.1×10^7	A	-5	263	2.63×10^8	1.77×10^8
		B	-5	97	9.7×10^7	
		C	-5	171	1.71×10^8	

Tabla 15. Sensibilidad del bacteriófagos 11229 a la luz UV

BACTERIOFAGO 11229						
Tiempo de exposición	Título original	Réplica	Número de dilución	Número de UFP	Título final	Promedio Título final.
0 s	6.9×10^9	CONTROL	-6	69	6.9×10^9	6.9×10^9
20 s	6.9×10^9	A	-5	259	2.59×10^8	2.34×10^8
		B	-5	234	2.34×10^8	
		C	-5	210	2.10×10^8	
40 s	6.9×10^9	A	-1	32	3.2×10^3	1.66×10^4
		B	-1	220	2.20×10^4	
		C	-1	247	2.47×10^4	

60 s	6.9X10 ⁹	A	0	0	0	0
		B	0	0	0	
		C	0	0	0	
90 s	6.9X10 ⁹	A	0	0	0	0
		B	0	0	0	
		C	0	0	0	

Tabla 16. Sensibilidad del bacteriófagos 8739 a la luz UV.

BACTERIÓFAGO 8739						
Tiempo de exposición	Título original	Réplica	Número de dilución	Número de UFP	Título final	Promedio Título final.
0 s	9.9 x 10 ⁸	CONTROL	-6	99	9.9 x 10 ⁸	9.9 x 10 ⁸
20 s	9.9 x 10 ⁸	A	-5	170	1.70 x 10 ⁸	1.87 x 10 ⁸
		B	-5	164	1.64 x 10 ⁸	
		C	-5	227	2.27 x 10 ⁸	
40 s	9.9 x 10 ⁸	A	-1	91	9.1 x 10 ³	9.4 x 10 ³
		B	-1	118	1.18 x 10 ⁴	
		C	-1	73	7.3 x 10 ³	
60 s	9.9 x 10 ⁸	A	-1	80	8.0 x 10 ³	8.3 x 10 ³
		B	-1	88	8.8 x 10 ³	
		C	-1	83	8.3 x 10 ³	
90 s	9.9 x 10 ⁸	A	-1	300 (*)	3.00 x 10 ⁴	3.00 x 10 ⁴
		B	-1	300(*)	3.00 x 10 ⁴	
		C	-1	300(*)	3.00 x 10 ⁴	

(*) Los valores obtenidos fueron mayores a 300, dificultando su conteo. Se coloca 300 para poder obtener un título representativo.

Tabla 17. Sensibilidad del bacteriófagos 9842 a la luz UV.

BACTERIÓFAGO 9842						
Tiempo de exposición	Título original	Réplica	Número de dilución	Número de UFP	Título final	Promedio Título final.
0 s	9.8 x 10 ⁸	CONTROL	-7	300(*)	3.00 x 10 ¹⁰	3.00 x 10 ¹⁰
20 s	9.8 x 10 ⁸	A				1.81 x 10 ¹⁰
		B	-7	181	1.81 x 10 ¹⁰	
		C				
40 s	9.8 x 10 ⁸	A				1.02 x 10 ¹¹
		B	-8	102	1.02 x 10 ¹¹	
		C				

60 s	9.8 x 10 ⁸	A				2.34 x 10 ¹¹
		B	-8	234	2.34 x 10 ¹¹	
		C				
90 s	9.8 x 10 ⁸	A				3.00 x 10 ¹⁰
		B	-7	300(*)	3.00 x 10 ¹⁰	
		C				

(*) Los valores obtenidos fueron mayores a 300, dificultando su conteo. Se coloca 300 para poder obtener un título representativo.

Tabla 18. Sensibilidad del bacteriófagos 14028 a la luz UV.

BACTERIÓFAGO 14028						
Tiempo de exposición	Título original	Réplica	Número de dilución	Número de UFP	Título final	Promedio Título final.
0 s	4.3 x 10 ⁹	CONTROL	10 ⁻⁶	187 UFP	1.87 x 10 ⁹	1.87 x 10 ⁹
20 s	4.3 x 10 ⁹	A	10 ⁻⁷	55	5.5 x 10 ⁹	5.8 x 10 ⁹
		B	10 ⁻⁷	79	7.9 x 10 ⁹	
		C	10 ⁻⁷	40	4.0 x 10 ⁹	
40 s	4.3 x 10 ⁹	A	10 ⁻⁷	209	2.09 x 10 ¹⁰	1.70 x 10 ¹⁰
		B	10 ⁻⁷	191	1.91 x 10 ¹⁰	
		C	10 ⁻⁷	112	1.12 x 10 ¹⁰	
60 s	4.3 x 10 ⁹	A	10 ⁻⁷	300(*)	3.00 x 10 ¹⁰	3.00 x 10 ¹⁰
		B	10 ⁻⁷	300(*)	3.00 x 10 ¹⁰	
		C	10 ⁻⁷	300(*)	3.00 x 10 ¹⁰	
90 s	4.3 x 10 ⁹	A	10 ⁻⁷	300(*)	3.00 x 10 ¹⁰	3.00 x 10 ¹⁰
		B	10 ⁻⁷	300(*)	3.00 x 10 ¹⁰	
		C	10 ⁻⁷	300(*)	3.00 x 10 ¹⁰	

(*) Los valores obtenidos fueron mayores a 300, dificultando su conteo. Se coloca 300 para poder obtener un título representativo.

Tablas de resistencia de los bacteriófagos al pH.

Tabla 19. Resistencia del bacteriófago 15597 a los diferentes pH.

BACTERIÓFAGO 15597						
pH	Título original	Réplica	Número de dilución	Número de UFP	Título final	Promedio Título final.
pH 3	1.2 x 10 ¹⁰	A	-4	257	2.57 x 10 ⁷	3.0 x 10 ⁷
		B	-5	35	3.5 x 10 ⁷	
		C	-5	30	3.0 x 10 ⁷	

pH 5	1.2 x 10 ¹⁰	A	-4	34	3.4 x 10 ⁶	2.1 x 10 ⁷
		B	-4	300(*)	3.00 x 10 ⁷	
		C	-4	300(*)	3.00 x 10 ⁷	
pH 7	1.2 x 10 ¹⁰	A	-5	87	8.7 x 10 ⁷	4.9 x 10 ⁷
		B	-4	294	2.94 x 10 ⁷	
		C	-5	32	3.2 x 10 ⁷	
pH 9	1.2 x 10 ¹⁰	A	-5	300(*)	3.00 x 10 ⁸	2.8 x 10 ⁸
		B	-5	275	2.7 x 10 ⁸	
		C	-5	266	2.7 x 10 ⁸	

(*) Los valores obtenidos fueron mayores a 300, dificultando su conteo. Se coloca 300 para poder obtener un título representativo.

Tabla 20. Resistencia del bacteriófago 11229 a los diferentes pH

BACTERIÓFAGO 11229						
pH	Título original	Réplica	Número de dilución	Número de UFP	Título final	Promedio Título final.
pH 3	6.9 x 10 ⁹	A	-3	148	1.5 x 10 ⁶	3.0 x 10 ⁶
		B	-3	241	2.4 x 10 ⁶	
		C	-4	50	5.0 x 10 ⁶	
pH 5	6.9 x 10 ⁹	A	-4	131	1.3 x 10 ⁷	1.6 x 10 ⁷
		B	-4	247	2.5 x 10 ⁷	
		C	-4	97	9.7 x 10 ⁶	
pH 7	6.9 x 10 ⁹	A	-5	117	1.2 x 10 ⁸	1.2 x 10 ⁸
		B	-5	64	6.4 x 10 ⁷	
		C	-4	173	1.7 x 10 ⁸	
pH 9	6.9 x 10 ⁹	A	-6	121	1.2 x 10 ⁹	4.9 x 10 ⁸
		B	-5	163	1.6 x 10 ⁸	
		C	-5	122	1.2 x 10 ⁸	

Tabla 21. Resistencia del bacteriófago 8739 a los diferentes pH.

BACTERIÓFAGO 8739						
pH	Título original	Réplica	Número de dilución	Número de UFP	Título final	Promedio Título final.
pH 3	9.90 x 10 ⁸	A	-6	9	9 x 10 ⁷	4.3 x 10 ⁸
		B	-6	19	1.9 x 10 ⁸	
		C	-6	22	2.2 x 10 ⁸	
pH 5	9.90 x 10 ⁸	A	-1	22	2.2 x 10 ³	4.1 x 10 ³
		B	-1	3	3 x 10 ²	

		C	-1	3	3×10^2	
pH 7	9.90×10^8	A	-7	0	0	0
		B	-7	0	0	
		C	-7	0	0	
pH 9	9.90×10^8	A	-7	300(*)	3.00×10^{10}	3.00×10^{10}
		B	-7	300(*)	3.00×10^{10}	
		C	-7	300(*)	3.00×10^{10}	

(*) Los valores obtenidos fueron mayores a 300, dificultando su conteo. Se coloca 300 para poder obtener un título representativo.

Tabla 22. Resistencia del bacteriófago 9842 a los diferentes pH.

BACTERIÓFAGO 9842						
pH	Título original	Réplica	Número de dilución	Número de UFP	Título final	Promedio Título final.
pH 3	9.8×10^8	A				1.54×10^7
		B	-4	154	1.54×10^7	
		C				
pH 5	9.8×10^8	A				6.9×10^7
		B	-5	69	6.9×10^7	
		C				
pH 7	9.8×10^8	A				9.1×10^8
		B	-6	91	9.1×10^8	
		C				
pH 9	9.8×10^8	A				2.37×10^9
		B	-6	237	2.37×10^9	
		C				

Tabla 23. Resistencia del bacteriófago 14028 a los diferentes pH.

BACTERIÓFAGO 14028						
pH	Título original	Réplica	Número de dilución	Número de UFP	Título final	Promedio Título final.
pH 3	4.3×10^9	A	-4	300(*)	3.00×10^7	3.00×10^7
		B	-4	300(*)	3.00×10^7	
		C	-4	300(*)	3.00×10^7	
pH 5	4.3×10^9	A	-7	0	0	2.0×10^{10}
		B	-7	300(*)	3.00×10^{10}	
		C	-7	300(*)	3.00×10^{10}	
pH 7	4.3×10^9	A	-6	300(*)	3.00×10^9	2.0×10^9
		B	-6	300(*)	3.00×10^9	

		C	-6	0	0	
pH 9	4.3 x 10 ⁹	A	-5	300(*)	3.00 x 10 ⁸	3.00 x 10 ⁸
		B	-5	300(*)	3.00 x 10 ⁸	
		C	-5	300(*)	3.00 x 10 ⁸	

(*) Los valores obtenidos fueron mayores a 300, dificultando su conteo. Se coloca 300 para poder obtener un título representativo.

Tablas efecto de la temperatura sobre el bacteriófago.

Tabla 24. Efecto de la temperatura sobre la estabilidad del bacteriófago 15597

BACTERIÓFAGO 15597						
Temperatura	Título original	Réplica	Número de dilución	Número de UFP	Título final	Promedio Título final.
25° C	1.2 x 10 ¹⁰	A	-8	54	5.4 x 10 ¹⁰	6.2 x 10 ¹⁰
		B	-8	37	3.7 x 10 ¹⁰	
		C	-7	98	9.8 x 10 ⁹	
37° C	1.2 x 10 ¹⁰	A	0	0	0	5.7 x 10 ⁸
		B	0	0	0	
		C	-6	57	5.7 x 10 ⁸	
50° C	1.2 x 10 ¹⁰	A	-5	259	2.59 x 10 ⁷	2.20 x 10 ⁷
		B	-5	136	1.36 x 10 ⁷	
		C	-5	267	2.67 x 10 ⁷	
70° C	1.2 x 10 ¹⁰	A	-1	199	1.99 x 10 ⁴	1.76 x 10 ⁴
		B	-1	122	1.22 x 10 ⁴	
		C	-1	208	2.08 x 10 ⁴	

Tabla 25. Efecto de la temperatura sobre la estabilidad del bacteriófago 11229.

BACTERIÓFAGO 11229						
Temperatura	Título original	Réplica	Número de dilución	Número de UFP	Título final	Promedio Título final.
25° C	4.4 x 10 ⁷	A	-4	31	3.1 x 10 ⁶	2.8 x 10 ⁶
		B	-4	22	2.2 x 10 ⁶	
		C	-4	32	3.2 x 10 ⁶	
37° C	4.4 x 10 ⁷	A	-4	47	4.7 x 10 ⁶	7.0 x 10 ⁶
		B	-4	77	7.7 x 10 ⁶	
		C	-4	85	8.5 x 10 ⁶	
50° C	4.4 x 10 ⁷	A	-4	70	7.0 x 10 ⁶	8.67 x 10 ⁶
		B	-4	170	1.7 x 10 ⁷	
		C	-3	203	2.03 x 10 ⁶	

70° C	4.4 x 10 ⁷	A	-1	18	1.8 x 10 ³	1.3 x 10 ³
		B	-1	7	7 x 10 ²	
		C	-1	15	1.5 x 10 ³	

Tabla 26. Efecto de la temperatura sobre la estabilidad del bacteriófago 8739.

BACTERIÓFAGO 8739						
Temperatura	Título original	Réplica	Número de dilución	Número de UFP	Título final	Promedio Título final.
25° C	9.9 x 10 ⁸	A	-7	33	3.3 x 10 ⁹	5.3 x 10 ⁹
		B	-7	75	7.5 x 10 ⁹	
		C	-7	51	5.1 x 10 ⁹	
37° C	9.9 x 10 ⁸	A	-7	70	7.0 x 10 ⁹	7.6 x 10 ⁹
		B	-7	76	7.6 x 10 ⁹	
		C	-7	83	8.3 x 10 ⁹	
50° C	9.9 x 10 ⁸	A	-6	64	6.4 x 10 ⁸	4.3 x 10 ⁸
		B	-6	38	3.8 x 10 ⁸	
		C	-6	28	2.8 x 10 ⁸	
70° C	9.9 x 10 ⁸	A	-5	26	2.6 x 10 ⁷	2.5 x 10 ⁷
		B	-5	23	2.3 x 10 ⁷	
		C	-5	26	2.6 x 10 ⁷	

Tabla 27. Efecto de la temperatura sobre la estabilidad del bacteriófago 9842.

BACTERIÓFAGO 9842						
Temperatura	Título original	Réplica	Número de dilución	Número de UFP	Título final	Promedio Título final.
25° C	9.8 x 10 ⁸	A				3.6 x 10 ⁹
		B	-7	36	3.6 x 10 ⁹	
		C				
37° C	9.8 x 10 ⁸	A				3.9 x 10 ⁹
		B	-7	39	3.9 x 10 ⁹	
		C				
50° C	9.8 x 10 ⁸	A				3.4 x 10 ⁹
		B	-7	34	3.4 x 10 ⁹	
		C				
70° C	9.8 x 10 ⁸	A				5.0 x 10 ⁵
		B	-3	50	5.0 x 10 ⁵	
		C				

Tabla 28. Efecto de la temperatura sobre la estabilidad del bacteriófago 14028.

BACTERIÓFAGO 14028						
Temperatura	Título original	Réplica	Número de dilución	Número de UFP	Título final	Promedio Título final.
25° C	4.3 x 10 ⁹	A	-7	33	3.3 x 10 ⁹	4.5 x 10 ⁹
		B	-7	41	4.1 x 10 ⁹	
		C	-7	62	6.2 x 10 ⁹	
37° C	4.3 x 10 ⁹	A	-7	104	1.0 x 10 ¹⁰	3.0 x 10 ¹⁰
		B	-7	90	9.0 x 10 ⁹	
		C	-7	106	1.1 x 10 ¹⁰	
50° C	4.3 x 10 ⁹	A	-7	39	3.9 x 10 ⁹	4.1 x 10 ⁹
		B	-7	34	3.4 x 10 ⁹	
		C	-7	49	4.9 x 10 ⁹	
70° C	4.3 x 10 ⁹	A	-1	71	7.1 x 10 ³	8.2 x 10 ³
		B	-1	76	7.6 x 10 ³	
		C	-1	98	9.8 x 10 ³	

Información de sensibilidad

IDENTIFICACION			INFORMACION DE SENSIBILIDAD																		
Cepa	Gram (+/-)	Fecha de muestreo	Especie	BLEE	Ampicilina /Subactam	Piperacilina /meritazobactam	Ceftazidima	Ceftoxima	Cefturoxima Axetil	Cefturoxima	Ceftazidima	Cefepima	Ertapenem	Imipenem	Meropenem	Amicadina	Gentamicina	Ciprofloxacino	Tigeciclina	Colistina	Trimetoprima/Sulfametoxazol
EoAR A15-2	-	13 de febrero de 2019	<i>Escherichia coli</i>	Positivo	S	I	R	R	R	R	R	R	S	S	S	I	R	S	S	*	S
EoAR B15-1	-	13 de febrero de 2019	<i>Escherichia coli</i>	Positivo	R	S	R	R	R	R	R	R	S	S	S	I	S	S	S	*	S
EoAR B15-3	-	13 de febrero de 2019	<i>Escherichia coli</i>	Negativo	R	R	R	R	R	R	R	R	I	I	I	I	R	S	S	*	R
EoAR C15-1	-	13 de febrero de 2019	<i>Escherichia coli</i>	Negativo	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	I	I	I	S	S	*	R
EoAR C15-2	-	13 de febrero de 2019	<i>Escherichia coli</i>	Negativo	R	R	R	R	R	R	R	S	I	S	S	I	S	S	S	*	S
EoAR B19-3	-	19 de febrero de 2019	<i>Escherichia coli</i>	Positivo	R	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	*	R
EoAR B19-4	-	19 de febrero de 2019	<i>Escherichia coli</i>	Positivo	S	I	R	R	R	R	R	R	S	S	S	I	R	S	S	*	S
EoAR C19-3	-	19 de febrero de 2019	<i>Escherichia coli</i>	Positivo	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	I	I	S	S	S	*	S
EoAR A10-4	-	10 de abril de 2019	<i>Escherichia coli</i>	Negativo	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	*	S
EoAR C10-1	-	10 de abril de 2019	<i>Escherichia coli</i>	Positivo	I	I	R	R	R	R	R	R	S	S	S	I	S	S	S	*	S
EoAR B25-1	-	25 de abril de 2019	<i>Escherichia coli</i>	Positivo	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	I	I	R	R	S	*	S
EoAR B25-2	-	25 de abril de 2019	<i>Escherichia coli</i>	Negativo	R	R	R	R	R	R	S	I	S	S	S	I	S	R	S	*	S
EoAR B25-5	-	25 de abril de 2019	<i>Escherichia coli</i>	Negativo	R	R	R	R	R	R	R	R	I	I	I	I	S	S	S	*	S
EoAR B25-6	-	25 de abril de 2019	<i>Escherichia coli</i>	Negativo	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	I	I	S	S	S	*	S
EoAR C25-1	-	25 de abril de 2019	<i>Escherichia coli</i>	Positivo	R	I	R	R	R	R	R	R	S	S	S	I	S	R	S	*	S
EoARC25-4	-	25 de abril de 2019	<i>Escherichia coli</i>	Positivo	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	I	S	S	S	*	S
EoARC25-5	-	25 de abril de 2019	<i>Escherichia coli</i>	Positivo	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	I	I	R	S	S	*	S

Cepa	Gram (+/-)	Fecha de muestreo	Especie	BLEE	Ampicilina/ Sulbactam	Piperacilina/Tazobactam	Cefazolina	Cefuroxima	Cefuroxima Axetil	Cefotaxima	Ceftazidim	Cefepima	Ertapenem	Impenem	Meropenem	Amicacina	Gentamicina	Ciprofloxacino	Tigeciclina	Colistina	Trimetoprima/Sulfametoxazol
SIAR D14-1	-	06 junio de 2019	Salmonella spp	*	R	*	R	R	R	R	R	R	I	I	I	R	R	R	S	*	S
SIAR D14-3	-	06 junio de 2019	Salmonella spp	*	I	S	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	S	S	*	S
SIAR G14-4	-	06 junio de 2019	Salmonella spp	*	R	I	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	R	S	*	S
SIAR G14-5	-	06 junio de 2019	Salmonella spp	*	S	S	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	R	S	*	S
SIAR H14-3	-	06 junio de 2019	Salmonella spp	*	R	*	R	R	R	R	R	R	I	I	I	R	R	R	S	*	S
SIAR I14-3	-	06 junio de 2019	Salmonella spp	*	R	R	R	R	R	R	R	R	I	I	I	R	R	R	S	*	S
SIAR A22-7	-	22 de agosto de 2019	Salmonella spp	*	R	R	R	R	R	R	R	R	I	I	I	R	R	S	S	*	S
SIAR B22-1	-	22 de agosto de 2019	Salmonella spp	*	R	S	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	S	S	*	S
SIAR B22-3	-	22 de agosto de 2019	Salmonella spp	*	S	S	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	S	S	*	S
SIAR C22-3	-	22 de agosto de 2019	Salmonella spp	*	R	S	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	S	S	*	S
SIAR A22-5	-	22 de agosto de 2019	Salmonella spp	*	S	I	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	R	S	*	S