



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



Universitat Autònoma de Barcelona

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE
BACTERIÓFAGOS DE *SALMONELLA* spp CON POTENCIAL
APLICACIÓN EN EL BIOCONTROL SOBRE SUPERFICIES**

RODRIGO HERNÁNDEZ SANTIAGO
TESIS DOCTORAL

DIRECTORES

Departament de Ciència Animal i dels Aliments
Facultat de Veterinària
Doctorado en Ciencias de los Alimentos
Bellaterra, Abril 2019



Universitat Autònoma de Barcelona

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE
BACTERIÓFAGOS DE *SALMONELLA* spp CON POTENCIAL
APLICACIÓN EN EL BIOCONTROL SOBRE SUPERFICIES**

TESIS DOCTORAL

MC. RODRIGO HERNANDEZ SANTIAGO _____

DIRECTORES

DIRECTOR

DR. ZACARÍAS JIMÉNEZ SALAS _____

PROFESOR TITULAR DEL DEPARTAMENTO
DE LABORATORIO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR,
FACULTAT DE SALUD PÚBLICA Y NUTRICION DE LA UANL

DIRECTORA

DRA. REYES PLA SOLER _____

CATEDRÁTICA DEL DEPARTAMENT
DE CIÈNCIA ANIMAL I DELS ALIMENTS,
FACULTAT DE VETERINÀRIA DE LA UAB

TUTORA

DRA. MANUELA HERNÁNDEZ HERRERO _____

PROFESORA TITULAR DEL DEPARTAMENT
DE CIÈNCIA ANIMAL I DELS ALIMENTS,
FACULTAT DE VETERINÀRIA DE LA UAB

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS
DEPARTAMENT DE CIÈNCIA ANIMAL I DELS ALIMENTS
FACULTAT DE VETERINÀRIA

Abril 2019

Dra. Reyes Pla Soler, catedrática de Tecnología dels Aliments del Departament de Ciència Animal i dels Aliments de la Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona

HACE CONSTAR:

Que la memoria titulada “Aislamiento y caracterización parcial de bacteriófagos de *Salmonella* spp con potencial aplicación en el biocontrol sobre superficies”, presentada por Rodrigo Hernández Santiago para optar el grado de doctor por la Universitat Autònoma de Barcelona, la cual ha sido realizada bajo su dirección y cumple con los requisitos para su defensa, autorizan su presentación para que sea juzgada por la comisión correspondiente.

Y para que conste a los efectos oportunos, firman el presente certificado en Bellaterra, a 22 abril de 2019.

Dra. Reyes Pla Soler

Dr. Zacarías Jiménez Salas, profesor titular de la Facultad de Salud Pública y Nutrición de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

HACE CONSTAR:

Que la memoria titulada “Aislamiento y caracterización parcial de bacteriófagos de *Salmonella* spp con potencial aplicación en el biocontrol sobre superficies”, presentada por Rodrigo Hernández Santiago para optar el grado de doctor por la Universitat Autònoma de Barcelona, la cual ha sido realizada bajo su dirección y cumple con los requisitos para su defensa, autorizan su presentación para que sea juzgada por la comisión correspondiente.

Y para que conste a los efectos oportunos, firman el presente certificado en Monterrey NL., a 22 de abril de 2019.

Dr. Zacarías Jiménez Salas

Si no puedes volar, corre.

Si no puedes correr, camina.

Si no puedes caminar, gatea.

Pero hagas lo que hagas, siempre sigue hacia adelante

Martin Luther King jr. (1929-1968)

DEDICATORIAS

Este trabajo se ha realizado gracias a la financiación aportada por el Programa de mejoramiento del profesorado (PROMEP) PROMEP/103.5/06/2037. UANL-326 de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL) dentro del programa de becas para la formación de investigadores y, a la Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo (Becas MAEC-AECID del Ministerio de Asuntos Exteriores y de Cooperación), Programa Extranjeros II-A, convocatoria 2010-2011, 0000521211.

A la Dra. Teresa de los Reyes Pla Soler por la confianza depositada en mí y darme la oportunidad de ser su estudiante, sin sus consejos no hubiera sido posible concluir esta tesis.

Al Dr. Zacarías Jiménez Salas por ser un guía durante mi formación como investigadora, por sus enseñanzas con palabras y el ejemplo y, por su apoyo en el aspecto profesional y personal.

Al Dr. José Juan Rodríguez Jerez por su gran apoyo académico, y por otorgarme desinteresadamente las instalaciones y equipo de laboratorio.

A la Dra Manuela Hernández Herreo, que es una gran persona, que me ha apoyado desde el principio de estos estudios.

A la Dra. Marta Capellas Puig, que me ha alentado todo el tiempo para terminar de buena manera.

A mis compañeros y amigos: Vanesa, Abel, Rita, Jacira, Kathy, Fabio Fontecha, Genaro, Fabio Poliselí, Dora Cecilia, Diana, Angela, Sonia, Dolores, Marco y Cristina por las convivencias durante mi estancia en España.

A mis compañeros Mirna, Patty, Letty, Tere, Adelita, Lulu, Betty, Marco, Arnoldo, José Luis, Gustavo, que compartimos buena cantidad de tiempo y muchos trabajos.

A mi señor padre Don Bartolomé Hernández Balbuena (†) y a mi señora madre Doña Lucía Santiago Santos, ya que ellos son fundamentales en mi vida.

A mi prometida Doña Rosa Salas Martínez, porque siempre está apoyándome en todas las cosas que he emprendido y que nos llevará a mejores cosas cada día.

A mis hermanos Flavio, Víctor Manuel, Guadalupe Hilda (†), porque siempre estuvieron allí alentándome en este trabajo.

A mi hija Gabriela Sarahi Hernández Flores, que espero vea en mi un ejemplo para sacar las cosas adelante.

Contenido

RESUMEN.....	xv
SUMMARY	xvii
RESUM.....	xix
I. ANTECEDENTES.....	1
Presentación del proyecto.....	2
Justificación	4
II. INTRODUCCIÓN	6
A. Las enfermedades transmitidas por los alimentos	9
A1. Problemática	11
A2. Infección del tracto digestivo: diarrea.....	12
B. Patógenos importantes en la industria alimentaria.....	14
B1. <i>Escherichia</i>	14
B2. <i>Campylobacter</i>	15
B3. <i>Enterobacter</i>	16
B4. <i>Listeria</i>	17
B5. <i>Salmonella</i>	18
B5.1 Origen	18
B5.2 Características de <i>Salmonella</i> spp.	19
B5.3 Manifestaciones clínicas	22
b5.4 Alimentos involucrados en la salmonelosis.....	23
C Crecimiento microbiano	25
C1 Crecimiento de los microorganismos	25
C1.2. Disponibilidad del agua.....	26
C1.3. Acidez y pH	26
C1.4. Oxígeno	27
C1.5. Temperatura.....	27
D Control del crecimiento microbiano.....	29
D1. Agentes físicos	29
D2. Agentes químico	30
E Bacteriófagos	31
E1. Antecedentes	31

E2. Características generales de los bacteriófagos	32
E3. Clasificación de los bacteriófagos	33
E4. Multiplicación de los bacteriófagos ADN bicatenarios: el ciclo lítico	34
E5. Adsorción del bacteriófago a la célula huésped y penetración.....	35
F Biofilm	36
G Microscopia electrónica	36
H Fagoterapia	38
III. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO	44
A Objetivo general	45
B Objetivos específicos.....	45
C Plan de trabajo	45
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	48
A Toma de muestras	49
B Obtención de bacteriófagos	50
B1. Protocolo de enriquecimiento para la obtención bacteriófagos	51
B2. Protocolo sin enriquecimiento para la obtención de bacteriófagos	52
B3. Puesta a punto de las entidades biológicas	52
B4. Activación y mantenimiento de cultivos	53
B5. Método de agar doble capa (ADC).....	54
B6. Modelo de infección	55
B7. Controles utilizados durante los ensayos	56
B8. Curva de crecimiento de <i>Salmonella</i> Typhimurium	57
C Concentración y purificación de bacteriófagos.....	58
D Preparación de muestras para microscopía electrónica.....	60
D1. Observación de bacteriófagos mediante microscopía de epifluorescencia directa (DEM, Direct epifluorescence microscopy)	61
D2 Formación del biofilm y observación al DEM	62
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	65
A. Sitios de recolección y número de muestras	66
B. Aislamiento de bacteriófagos de <i>Salmonella</i>	67
B1. Puesta a punto de la técnica de agar doble capa (ADC) mediante <i>S.</i> <i>Typhimurium</i>	67
B2. Puesta a punto del modelo de crecimiento de <i>Salmonella</i> spp.....	69
B3. Obtención de bacteriófagos contra de <i>Salmonella</i> spp.....	70

B4. Diferenciación de los bacteriófagos por la formación de halo de inhibición	70
C. Selección y purificación de los bacteriófagos	71
D. Identificación de los bacteriófagos por microscopia electrónica de transmisión .75	
D1. Evaluación de la formación de biofilms de <i>S. entérica</i> en superficies de acero inoxidable y comparación de métodos de conteo mediante microscopía de epifluorescencia directa (DEM).....	77
D2 Conteo por DEM en placas de acero inoxidable.....	80
VI. CONCLUSIONES.....	86
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	89

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tasa de incidencia de enfermedad diarreica aguda por entidad federativa en México.....	10	Error! Marcador no definido.
Figura 2. Factores de virulencia importantes en la patogenia por <i>Salmonella</i> spp.....	18	Error! Marcador no definido.
Figura 3. Clasificación de <i>Salmonella</i>	19	Error! Marcador no definido.
Figura 4. Adsorción del bacteriófago T4 e inyección del ADN.....	34	Error! Marcador no definido.
Figura 5. Diagrama general de trabajo.....	46	
Figura 6. Diagrama de flujo utilizado para realizar la infección bacteriófago-huésped.....	56	
Figura 7. Técnica que se emplea para la amplificación aplicando la técnica de agar doble capa (ADC).	59	
Figura 8. Césped bacteriano de <i>S. Enteritidis</i> infectado por bacteriófagos, con halos de inhibición de diferentes tamaños.	71	
Figura 9. Placas con desarrollo de halos líticos generados por la infección fago-bacteria	75	
Figura 10. Imagen de microscopia electrónica de transmisión del bacteriófago MRH6 (X100 000).	76	
Figura 11. Imágenes obtenidas por epifluorescencia de biofilms de <i>S. enterica</i> CECT 4138.....	78	
Figura 12. Crecimiento de <i>S. enterica</i> CECT 4138 sobre discos de acero inoxidable tipo 1.4301 incubados a temperatura ambiente.	78	
Figura 13. Secuencia de imágenes de epifluorescencia que ilustran la destrucción de <i>S. enterica</i> CECT 4138, sobre discos de acero inoxidable.	81	
Figura 14. Reducción de <i>Salmonella</i> enterica CECT 4138 por el bacteriófago MRH6.....	82	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características de algunas toxiinfecciones alimentarias.....	13
Tabla 2. Clasificación de <i>Salmonella</i> spp en serotipos.....	20
Tabla 3. Respuesta microbiana a factores ambientales.....	28
Tabla 4. Morfotipos y características básicas de las diferentes familias de fagos	34
Tabla 5 Principales lugares donde se pueden encontrar bacteriófagos: la naturaleza, lugares urbanizados y cuerpo humano.....	40
Tabla 6 Productos con bacteriófagos aprobados para aplicaciones de seguridad alimentaria	42
Tabla 7. Sitios de muestreo para la obtención de bacteriófagos	50
Tabla 8. Origen de las entidades biológicas y condiciones de conservación.....	53
Tabla 9 Sitios donde se obtuvieron las muestras de agua para obtener bacteriófagos	67
Tabla 10 Características finales de la técnica de ADC.....	68
Tabla 11. Identificación de la fase logarítmica de <i>S. Typhimurium</i>	69
Tabla 12. Determinación de la fase logarítmica de <i>S. Enteritidis</i>	70
Tabla 13. Rango de huesped de los bacteriófagos aislados contra serovariedades de <i>Salmonella</i> spp y de <i>E. coli</i>	73
Tabla 14. Frecuencia y distribución de cada tamaño de halo de inhibición, de <i>S. Enteritidis</i> en césped bacteriano.....	74

LISTA DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ADC	Agar doble capa
AS	Agar suave
AECID	Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo
ATCC	American Type Culture Collection
APPCC	Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control
a_w	Actividad del agua
BGA	Brilliant Green Agar
BHI	Brain Heart Infusion
CCUG	Culture Collection University of Göteborg
CENAVECE	Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y de Control de Enfermedades
CETC	Colección Española de Cultivos Tipo
CINSP	Centro de Investigación en Nutrición y Salud Pública
<i>C. parvum</i>	<i>Cryptosporidium parvum</i>
EDTA	Etildiaminotetracético
DEM	Direct Epifluorescence Microscopic
EE.UU	Estados Unidos de Norteamérica
ETA	Enfermedades transmitidas por alimentos
FAO	Food and Agriculture Organization (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura)
FaSPyN	Facultad de Salud Pública y Nutrición, UANL
FAUANL	Facultad de Agronomía, UANL, Unidad Marín, NL
FCB	Facultad de Ciencias Biológicas, UANL
HACCP	Hazard Analysis and Critical Control Points (Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control)
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía de los Estados Unidos Mexicanos
n.d.	No descripción, aparente baja efectividad o halo difuso.
OMS	Organización Mundial de la Salud
Panalimentos	Instituto Panamericano de Protección de Alimentos y Zoonosis

PEG/NaCl	Polyethylene glycol
SDS	Dodecilsulfato sódico
SIRVETA	Sistema Regional de Información para la Vigilancia de las Enfermedades Transmitidas por Alimentos
SSF	Solución salina fisiológica
SUH o SHU	Síndrome urémico hemolítico
TEM	Transmission Electron Microscope
TSA	Trypticase soy agar
TSAYE	TSA con 0.6% de extracto de levadura
TSB	Trypticase soy broth (Caldo de soja trypticase)
UAB	Universidad Autónoma de Barcelona
UANL	Universidad Autónoma de Nuevo León
ZMM	Zona metropolitana de Monterrey

RESUMEN

La inocuidad alimentaria es un tema amplio y relevante que impacta directamente en todos los segmentos de la sociedad, involucra productores, desarrolladores, innovadores, consumidores y gobierno, además de diversos sectores como la industria, la ingeniería y hasta la educación. Sin embargo, las nuevas tecnologías en la cadena de producción provocan que ésta sea más larga y compleja.

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) causan alta morbilidad y varios casos de mortalidad. Entre los agentes infecciosos más comunes se encuentran *Salmonella* spp, *Campylobacter* spp, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Clostridium botulinum*, *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*.

Los bacteriófagos o fagos son virus bacterianos específicos de una célula huésped, en la cual se multiplican invadiendo su maquinaria de material genético. Son los sistemas biológicos más abundantes del planeta, se encuentran en el medio ambiente y se introducen y conviven en la flora intestinal de otros seres cuando éstos ingieren diversos alimentos, ya sean de tipo animal o vegetal.

El objetivo del presente trabajo fue aislar y probar la especificidad de una serie de bacteriófagos de *Salmonella* spp a partir de aguas residuales para lo cual se utilizaron muestras de agua recolectadas de diferentes localidades del área metropolitana de Monterrey, N. L., México. La purificación de bacteriófagos se llevó a cabo mediante la técnica de agar doble capa (ADC) hasta obtener placas líticas uniformes y se usaron diferentes cepas de referencia de *Salmonella* como cultivos indicadores.

Se aislaron un total de 15 bacteriófagos putativamente distintos, de los cuales, al pasar las pruebas de replicación, sólo uno logró mantener la capacidad lítica. Se seleccionó y purificó para realizar pruebas *in vitro* específicas para *Salmonella* (ATCC 19430). Se utilizó una concentración de bacteriófagos de 1×10^{12} UFP/ml para analizar al bacteriófago mediante su morfología por microscopía electrónica, la cual se identificó como miembro de la familia *Siphoviridae*. Así mismo, se probaron los bacteriófagos contra *Salmonella in situ* en discos de acero que simulan las superficies de trabajo, y para analizar el efecto de la

Resumen

infección del bacteriófago sobre *Salmonella* en los discos de acero inoxidable se utilizó el microscopio de epifluorescencia.

Para el conteo de bacteriófagos se utilizó los métodos LIVE/DEAD y el recuento en placa de agar, la correlación entre ambos métodos fue de $R^2=0.82$. Para finalizar, para evaluar la efectividad del bacteriófago MRH6 que resultó lítico en nuestro ensayo, se procedió a dar las condiciones necesaria para la formación del biofilm de *Salmonella* sobre superficies de acero inoxidable. El bacteriófago MRH6 fue capaz de disgregar los biofilms a temperatura ambiente. Las mayores reducciones de *Salmonella* en un menor tiempo se obtuvieron con concentraciones de fago mayores a 1×10^8 UFP/mL. El método de cultivo mostró reducciones del patógeno a niveles indetectables; sin embargo, la tinción vital reveló la presencia de células viables (coloración verde), que podría representar un riesgo de contaminación cruzada, estas pudieran también presentarse por la presencia de material orgánico. Este trabajo con un bacteriófago puede proporcionar una medida adyuvante para controlar la contaminación de superficies de acero inoxidable con biofilms de *Salmonella*. La DEM resultó ser una buena herramienta para evaluar rápida y adecuadamente por observación y posterior análisis el efecto de los bacteriófagos.

SUMMARY

Food safety is a broad and relevant issue that directly affects all aspects of society, involving producers, developers, innovators, consumers, and government, as well as various sectors such as industry, engineering, and even education. However, new technologies in the production chain cause it to be longer and more complex.

Foodborne diseases (ETA) cause high morbidity and several cases of mortality. Among the most common infectious agents are *Salmonella* spp, *Campylobacter* spp, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Clostridium botulinum*, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*.

Bacteriophages or phages are bacterial viruses specific to a host cell, in which they multiply by invading their machinery of genetic material. They are the most abundant biological systems on the planet, they can be found in the environment. In organisms, they enter and coexist in the intestinal flora of other beings when they ingest various foods, whether animal or vegetable.

The objective of this study was to isolate and test the specificity of a series of bacteriophages of *Salmonella* spp from wastewater for which water samples were collected from different locations in the metropolitan area of Monterrey, N. L., México. The purification of bacteriophages was carried out by means of the double layer agar technique (ADC) until uniform lithic plates were obtained and different *Salmonella* reference strains were used as indicator cultures.

A total of 15 putatively different bacteriophages were isolated, of which, upon passing the replication tests, only one managed to maintain the lytic capacity. It was selected and purified to perform specific in vitro tests for *Salmonella* (ATCC 19430). A bacteriophage concentration of 1×10^{12} PFU / ml was used to analyze the bacteriophage by means of its electron microscopy morphology, which was identified as a member of the *Siphoviridae* family. Likewise, the bacteriophages against *Salmonella* were tested in situ on steel discs simulating the work surfaces, and the epifluorescence microscope was used to analyze the

effect of bacteriophage infection on *Salmonella* on the stainless steel discs.

For the bacteriophage count, the LIVE / DEAD methods and the agar plate count were used, the correlation between both methods was $R^2 = 0.82$. Finally, in order to evaluate the effectiveness of the bacteriophage MRH6 that was lytic in our trial, the necessary conditions for the formation of the *Salmonella* biofilm on stainless steel surfaces were established. The bacteriophage MRH6 was able to disintegrate the biofilms at room temperature. The greatest reductions of *Salmonella* in a shorter time were obtained with phage concentrations greater than 1×10^7 PFU / mL. The culture method showed reductions of the pathogen to undetectable levels; however, vital staining revealed the presence of viable cells (green coloration), which could represent a risk of cross contamination, these could also be presented by the presence of organic material. This work with a bacteriophage can provide an adjuvant measure to control contamination of stainless steel surfaces with *Salmonella* biofilms. The DEM proved to be a dependable tool to quickly and adequately evaluate the effect of bacteriophages by observation and subsequent analysis.

RESUM

La innocuïtat alimentària és un tema ampli i rellevant que impacta directament en tots els segments de la societat, involucra productors, desenvolupadors, innovadors, consumidors i govern, a més de diversos sectors com la indústria, l'enginyeria i fins a l'educació. No obstant això, les noves tecnologies en la cadena de producció provoquen que aquesta sigui més llarga i complexa.

Les malalties transmeses per aliments (ETA) causen alta morbiditat i diversos casos de mortalitat. Entre els agents infecciosos més comuns es troben *Salmonella* spp, *Campylobacter* spp, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Clostridium botulinum*, *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*.

Els bacteriòfags o fags són virus bacterians específics d'una cèl·lula hoste, en la qual es multipliquen envaint la seva maquinària de material genètic. Són els sistemes biològics més abundants del planeta, es troben en el medi ambient i s'introdueixen i conviuen en la flora intestinal d'altres éssers quan aquests ingereixen diversos aliments, ja siguin de tipus animal o vegetal.

L'objectiu del present treball va ser aïllar i provar l'especificitat d'una sèrie de bacteriòfags de *Salmonella* spp a partir d'aigües residuals per a això es van utilitzar mostres d'aigua recollides de diferents localitats de l'àrea metropolitana de Monterrey, N. L., Mèxic. La purificació de bacteriòfags es va dur a terme mitjançant la tècnica d'agar doble capa (ADC) fins a obtenir plaques lítiques uniformes i es van usar diferents soques de referència de *Salmonella* com a cultius indicadors.

Es van aïllar un total de 15 bacteriòfags putativament diferents, dels quals, en passar les proves de replicació, només un va aconseguir mantenir la capacitat lítica. Es va seleccionar i va purificar per realitzar proves in vitro específiques per *Salmonella* (ATCC 19430). Es va utilitzar una concentració de bacteriòfags de 1×10^{12} UFP / ml per analitzar l'bacteriòfag mitjançant la seva morfologia per microscòpia electrònica, la qual es va identificar com a membre de la família *Siphoviridae*. Així mateix, es van provar els bacteriòfags contra *Salmonella* in situ en discos d'acer que simulen les superfícies de

Resumen

treball, i per analitzar l'efecte de la infecció del bacteriòfag sobre *Salmonella* en els discos d'acer inoxidable es va utilitzar el microscopi d'epifluorescència.

Per al recompte de bacteriòfags es va utilitzar els mètodes LIVE / DEAD i el recompte en placa d'agar, la correlació entre ambdós mètodes va ser de $R^2 = 0.82$. Per finalitzar, per avaluar l'efectivitat del bacteriòfag MRH6 que va resultar lític en el nostre assaig, es va procedir a donar les condicions necessària per a la formació del biofilm de *Salmonella* sobre superfícies d'acer inoxidable. El bacteriòfag MRH6 va ser capaç de disgregar els biofilms a temperatura ambient. Les majors reduccions de *Salmonella* en un menor temps es van obtenir amb concentracions de fag majors a 1×10^7 UFP / ml. El mètode de cultiu va mostrar reduccions del patogen a nivells indetectables; però, la tinció vital revelar la presència de cèl·lules viables (coloració verda), que podria representar un risc de contaminació creuada, aquestes poguessin també presentar-se per la presència de material orgànic. Aquest treball amb un bacteriòfag pot proporcionar una mesura adjuvant per controlar la contaminació de superfícies d'acer inoxidable amb biofilms de *Salmonella*. La DEM va resultar ser una bona eina per avaluar ràpida i adequadament per observació i posterior anàlisi l'efecte dels bacteriòfags.

I. ANTECEDENTES

Presentación del proyecto

Se realizó una revisión bibliográfica sobre las innovaciones en seguridad alimentaria en México la cual puso en evidencia la necesidad de analizar alternativas enmarcadas en el ámbito del uso de las tecnologías verdes, lo que presentó la posibilidad de desarrollar un trabajo innovador y que no se estuviera aplicando ya en el sector alimentario local o nacional. De esa manera se inician las actividades experimentales, que para este trabajo doctoral se dividieron en dos partes, la primera realizada en México y la segunda en España.

En primera instancia, se desarrolló un análisis en el Laboratorio de genética y biología molecular del Centro de Investigación en Nutrición y Salud Pública (CINSP), en el Campus Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL) y gracias al apoyo de Programa de mejoramiento del profesorado (PROMEP, número UANL-326) por medio de una beca se iniciaron los estudios y así se cumplió el primer propósito que fue obtener virus nativos contra cepas de *Salmonella* y purificarlos.

Posteriormente, para lograr los demás objetivos, que eran realizar la caracterización parcial de los bacteriófagos contra *Salmonella*, se solicitó una beca a la Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo (Becas MAEC-AECID del Ministerio de Asuntos Exteriores y de Cooperación, curso 2010-2011) con el fin de realizar una estancia de investigación y crear oportunidades de desarrollo aprovechando las tecnologías innovadoras disponibles en la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), considerando además que la alta reputación de la institución y la supervisión por parte de sus investigadores impactarían positivamente en el desarrollo del trabajo y en el *Curriculum Vitae* del investigador y, por consiguiente, en su futuro profesional como docente e investigador.

Otra finalidad de este proyecto fue dejar un buen referente al concluir la estancia, ya que ello ofrecería nuevas oportunidades para seguir forjando el perfil del investigador, cimentará cualquier trayectoria profesional y facilitaría optar por un plan postdoctoral en esta misma Universidad. De esta manera, se accedió a la beca del Programa Extranjeros II-A Convocatoria 2010-2011, Número 0000521211, del cual se cumplieron los objetivos establecidos y otros más, por ejemplo, conocer nuevas tecnologías.

Siendo ésta una línea de investigación relativamente reciente en México, se espera que impacte en las posibilidades laborales en diversos contextos y sé de utilidad para sentar precedentes para futuras líneas de trabajo en dicha área.

Justificación

En las últimas décadas, los cambios ocurridos en la producción y consumo de alimentos han tenido un impacto sobre la inocuidad alimentaria. La industria en la producción masiva de alimentos ha evolucionado de ser local a constituirse en otra donde la producción y/o el procesamiento están localizados en diferentes partes del país o del mundo. Por otra parte, la población está envejeciendo por lo que se vuelve más vulnerable a problemas de salud, además, los agentes patógenos son cada vez más virulentos (DeWaal y Barlow, 2014).

Los reportes sobre problemas gastrointestinales que recopila el centro nacional de vigilancia epidemiológica y de control de enfermedades (CENAVECE) indican que Nuevo León ha permanecido dentro de los primeros 12 lugares de casos de fiebre tifoidea y en los primeros 14 de fiebre paratifoidea y otras salmonelosis. A nivel nacional, las enfermedades infecciosas intestinales se ubican entre las primeras 10 causas de mortalidad de niños en edad escolar, entre los 5 y 14 años de edad (CENAVECE, 2007).

Los microorganismos del género *Salmonella* pertenecen a la familia Enterobacteriaceae. Son bacilos o cilindros con puntas redondeadas y se diferencian de las demás enterobacterias mediante reacciones bioquímicas y de aglutinación; existen más de 2500 serotipos, todos ellos patógenos. Actualmente, se considera una sola especie denominada *Salmonella* enterica, de la cual, según el esquema de Kauffmann-White, se clasifican nueve serogrupos. Esta especie tiene importancia clínica debido a que es la única capaz de infectar animales homeotermos; esta investigación se centra en cuatro serovariedades: *Salmonella* enterica serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*), *S. enterica* serovar Paratyphi (*S. Paratyphi*), *S. enterica* serovar Enteritidis (*S. Enteritidis*) y *S. enterica* serovar Typhi (*S. Typhi*); estos microorganismos se pueden aislar tanto de fuentes alimentarias (carne de res, pollo crudo, huevo fresco, carne de puerco, almejas, chorizos, vegetales, entre otros) como del medio ambiente (suelo, agua, materia fecal y superficies) (Nguendo, Y. 2018; Chlebicz, y Śliżewska, 2018)

En México, *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* son los microorganismos aislados con mayor frecuencia en las salmonelosis. Normalmente, *S. Enteritidis* habita en el intestino de los animales sin causar enfermedad, pero puede infectar a humanos y promover diarrea,

vómito, dolor abdominal, calambres y, ocasionalmente, insuficiencia renal y en los peores casos, la muerte (DeWaal y Barlow, 2014). La contaminación de alimentos por *Salmonella* spp se debe a una combinación de factores relacionados con la producción a gran escala o cambios en el manejo, almacenamiento, distribución y preparación de los mismos (Uribe y Suarez, 2006).

Por otra parte están los virus que pueden replicarse independientemente de los cromosomas de una célula, pero no sin su participación (Madigan y Martinko, 2006). El hecho de descubrir virus que pueden infectar y destruir bacterias fue recibido con optimismo por su posible aplicación en usos terapéuticos (McLaughlin *et al.*, 2006).

En un estudio realizado en diversos estados de México (Coahuila, Durango, Estado de México, Jalisco, Morelos, Oaxaca, Puebla y Querétaro) se ha fagotipado *Salmonella* spp proveniente de huevo, carne de pollo de engorde y gallinas progenitoras, reproductoras, de postura comercial y productoras (Mancera *et al.*, 2004). Además, diversas investigaciones han utilizado bacteriófagos líticos para reducir la contaminación por *Salmonella* en pollos (canal y piel), semillas germinadas y dulces de frutas cortadas (Goode *et al.*, 2003).

El uso de aditivos en los alimentos se ha reducido considerablemente debido al rechazo generalizado por parte de los consumidores, lo que podría repercutir en un incremento en los casos de intoxicaciones alimentarias. En este contexto, los bacteriófagos aportan ventajas sobre los desinfectantes conocidos y los métodos tradicionales de aplicación de frío o calor, ya que pueden actuar como agentes de detección y control biológico de bacterias patógenas en alimentos y su producción es relativamente rápida y económica (Atterbury *et al.*, 2003).

La utilidad de los bacteriófagos en el área de investigación es amplia; una posible utilidad es ser un instrumento para identificar cepas bacterianas específicas. También se han utilizado para el estudio de diversos fenómenos moleculares; el trabajo con estos virus permitió desarrollar ensayos de placas de lisis, conocer la naturaleza del ciclo de vida viral, los tipos de mutaciones genéticas y los genes como segmentos de ácido desoxirribonucleico (ADN) (Muniesa *et al.*, 2005).

Antecedentes

Las empresas dedicadas a la biotecnología (*Intralytix, Omnilytics*) se centran en desarrollar productos utilizando fagos específicos para eliminar las bacterias que causan ETA y estos productos comerciales de terapia fágica se distribuyen en diferentes presentaciones (Segundo, 2010). Los bacteriófagos han recibido mucha atención en los últimos años debido a sus características prometedoras como la de tomar un objetivo específico sin dañar la micro-flora en la que coexiste, baja toxicidad, robustez a los ambientes duros, distribución de esparcimiento, auto-replicación y producción relativamente barata y sencilla (Oh y Park, 2017).

En este sentido, el objetivo general de este estudio es aislar y caracterizar bacteriófagos contra *Salmonella* a partir de diversas fuentes para su uso potencial en el control biológico.

II. INTRODUCCIÓN

A. Las enfermedades transmitidas por los alimentos

A nivel internacional, la producción de alimentos y todos los mecanismos tecnológicos involucrados en su procesamiento implican, además de la optimización de los tiempos y de la calidad, un riesgo para la adquisición de enfermedades inherentes a la misma adopción de nuevas tecnologías (Weaver *et al.*, 2017).

La OMS estima que las enfermedades diarreicas son la segunda mayor causa de muerte de niños menores de cinco años, matan a 525 000 niños menores de cinco años cada año; una proporción significativa de las enfermedades diarreicas se puede prevenir mediante el acceso al agua potable y a servicios adecuados de saneamiento e higiene, además de que en todo el mundo se producen unos 1700 millones de casos de enfermedades diarreicas infantiles cada año (OMS, 2017).

Diferentes elementos propician las condiciones para el desarrollo de las ETA, como son (OMS, 2017):

- Biológicos: producidos por hongos o bacterias causantes de enfermedades, ya sea por sus metabolitos o toxinas, virus o huevecillos de parásitos, así como los venenos de algunos peces y plantas.
- Químicos: como productos de limpieza o desinfección, pesticidas, toxinas marinas, insecticidas o venenos.
- Físicos: cuando en la materia prima de los alimentos se encuentran objetos como vidrios, metal, piedras, grapas, barniz de uñas, joyería, cabellos o cualquier elemento extraño.

De acuerdo con el Sistema Regional de Información para la Vigilancia de las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (SIRVETA) –desarrollado por el Instituto Panamericano de Protección de Alimentos y Zoonosis (PANALIMENTOS)– ocurrieron 1,683 brotes de ETA en México, que ocasionaron 53,860 casos de enfermedades y provocaron 207 muertes; mientras que en los demás países de América Latina se produjeron durante el mismo período 6,324 brotes, que provocaron 228,579 casos y 314 muertes (Forsythe y Hayes, 2002). Cabe aclarar que éstos son sólo los brotes notificados por la autoridad

competente. El sistema utilizado internacionalmente para obtener alimentos inocuos es el APPCC (Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control) o HACCP (por sus siglas en inglés *Hazard Analysis and Critical Control Points*), que se puede implementar en cualquier tipo de industria y permite prevenir, controlar y eliminar cualquier peligro, antes de consumir los alimentos (Rodríguez Torrens *et al.*, 2015).

En México, el Distintivo H es un programa implementado por los servicios alimentarios oficiales mediante el cual se ofrece a los clientes alimentos seguros. El Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y de Control de Enfermedades de México (CENAVECE) advierte que uno de los problemas de salud más importantes lo constituyen los trastornos gastrointestinales, cuya mortalidad predomina entre los 5 y los 14 años. Entre 2006 y 2012 el Estado de Nuevo León ha permanecido entre los primeros 7 lugares de casos de diarrea (CENAVECE, 2018).

La figura 1 muestra la distribución de la incidencia en México, la cual está asociada a la densidad demográfica y la accesibilidad a servicios de salud que facilitan el registro, es así que son precisamente las entidades federativas con mayor población quienes registran números más altos.

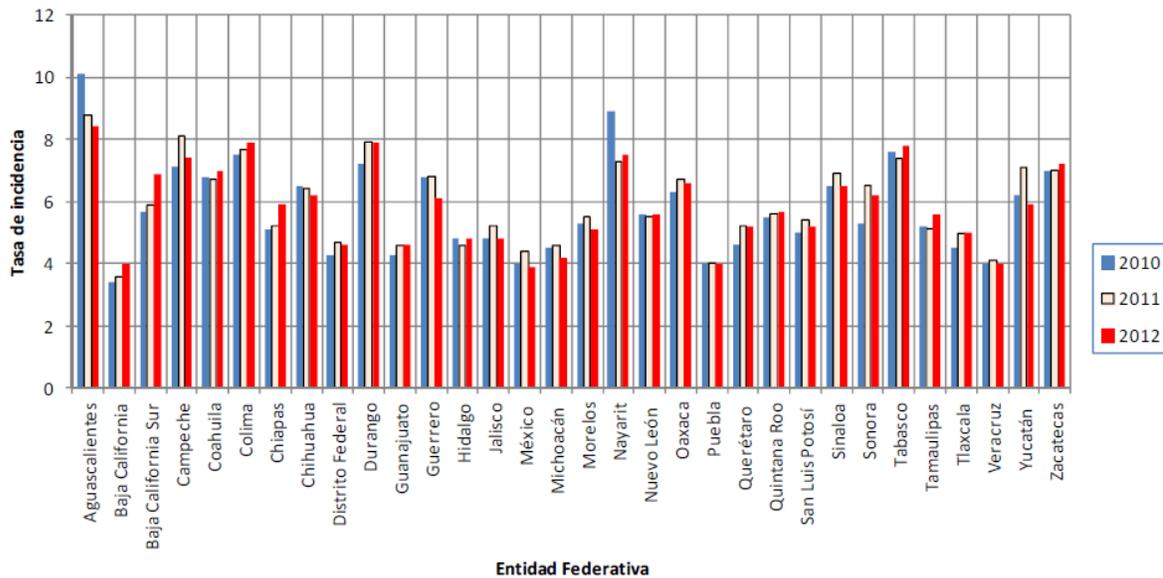


Figura 1. Tasa de incidencia de enfermedad diarreaica aguda por entidad federativa en México, 2010-2012 (CENAVECE, 2018).

A1. Problemática

La inocuidad alimentaria es una preocupación mundial que se refleja en el incremento de reportes y noticias relacionadas con la contaminación de los alimentos difundidos en diversos países; a su vez, estos productos son retirados del mercado, lo que provoca pérdidas por varios cientos de millones de dólares. El *Codex Alimentarius* indica que las ETA y los daños provocados por los alimentos son, en el mejor de los casos, desagradables, en el peor, fatales y pueden influir negativamente en el comercio y la confianza de los consumidores. Por consiguiente, es imprescindible un control eficaz de la higiene. Todos los eslabones de la cadena alimentaria –fabricantes, elaboradores, manipuladores y consumidores de alimentos– son responsables del control de los riesgos microbiológicos, desde la explotación agrícola o ganadera hasta el consumidor final. Desde esta óptica, el análisis de riesgos debería aplicarse dentro de un contexto estratégico, organizativo y operacional reconocido; si bien, en el proceso puede haber elementos comunes, establecer un nivel apropiado de protección en esos sectores puede representar las máximas diferencias (Atterbury *et al.*, 2003).

La OMS ha identificado siete microorganismos patógenos –*C. jejuni*, *C. perfringens*, *E. coli* 0157:H7, *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp, *S. aureus* y *T. gondii*– que causan entre 12.3 y 33 millones de casos de infección solamente en los EEUU, lo que representa pérdidas económicas de entre 5,500 y 34,900 millones de dólares. Además, resalta que su incidencia podría ser de 300 a 350 veces mayor de lo que indican las estadísticas, dado que sólo se notifica un número relativamente pequeño de casos de ETA. Se estima que 70% de los 1,500 millones de episodios de diarrea son causados por alimentos en mal estado. Es posible que en los países en desarrollo se notifique a las autoridades sanitarias una proporción de casos aún inferior, principalmente por pobreza y escasez de recursos a disposición de los servicios de gestión de la inocuidad alimentaria e inspección de alimentos (Van de Venter, 2000).

A2. Infección del tracto digestivo: diarrea

La OMS estima que el 88% de los casos de diarrea a nivel mundial son atribuibles al agua, el saneamiento y la higiene; todos los aspectos de inocuidad de los alimentos están relacionados con estos factores. En menor medida, la enfermedad se transmite a través de otras vías, por ejemplo, el aire, y alrededor del 94% de los casos son atribuibles al saneamiento ambiental; el total de fallecimientos se calcula en más de 1.5 millones, principalmente en niños, en los países desarrollados el promedio es ligeramente menor a 90%. La diarrea atribuible al agua y saneamiento inapropiado representa 5.3% de las muertes totales y 3.5% en niños europeos de 0-14 años y es, además, una de las causas principales de malnutrición (Prüss-Üstün y Corvalán, 2006).

Las enfermedades diarreicas constituyen un problema de salud pública en el mundo, especialmente en países en desarrollo. Su alta incidencia se debe en gran parte a la ingestión de alimentos contaminados con microorganismos patógenos como *Salmonella*, que causa episodios de diarrea aguda. *Salmonella* spp es uno de los patógenos entéricos más frecuentes, tanto en países desarrollados como subdesarrollados. Dependiendo de la especie, tamaño del inóculo, factores de virulencia expresados por la cepa, huésped involucrado, estado inmunológico del paciente e intervención médica puede ocasionar una infección gastrointestinal de media a severa hasta una infección sistemática que comprometa la vida del paciente (Fernández, 2008).

Otros microorganismos que también pueden contaminar el agua y los alimentos, como bacterias (*Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, *Campylobacter jejuni*, *Vibrio cholera*), virus (Norwalk, Rotavirus, Hepatitis A) y parásitos (*Entamoeba histolytica*, *Cryptosporidium parvum*, *Toxoplasma gondii*), pueden transmitirse también de una persona a otra como resultado de una higiene deficiente (Freedman *et al.*, 2015).

Estudios de empresas dedicadas exclusivamente a la crianza de cerdos, reportan epidemias como el virus de la diarrea porcina, la cual posteriormente se transmite a los consumidores de estas carnes contaminadas, ya sea por contacto con las heces o por consumo de carnes contaminadas, lo cual implica también una pérdida económica para la

industria alimentaria resaltando la necesidad de establecer medidas preventivas y correctivas según sea el caso (Huss *et al.*, 2017).

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO por sus siglas en inglés: *Food and Agriculture Organization*), las toxiinfecciones alimentarias son la segunda causa de morbilidad, pero muchas permanecen sin declarar, quizás por su mediana severidad y recuperación rápida, salvo el cólera. Los alimentos son susceptibles a contaminación de todo tipo, la fuente de agentes causales suele ser el tracto gastrointestinal de individuos reservorios o las heces de animales y humanos infectados, o bien agua corrompida que por deficiencias sanitarias contamina carne fresca, pescados, moluscos, pasteles de crema y leche no pasteurizada, entre otros productos (Ríos *et al.*, 2012), como se puede observar en la tabla 1.

Tabla 1. Características de algunas toxiinfecciones alimentarias (Ríos *et al.*, 2012).

Agente	Período de incubación	Síntomas iniciales	Fuente	Agente patógeno
<i>Salmonella</i> spp	8-24 h	Dolor abdominal, vómitos, diarrea, fiebre.	Aves, huevos, mascotas (tortugas, lagartos, pollos).	Bacteria y endotoxina
<i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica	24-72 h	Dolor abdominal, diarrea, disentería, fiebre.	Agua y alimentos contaminados.	Enterotoxina termoestable
<i>V. cholerae</i>	24-72 h	Dolor abdominal, vómitos, diarrea, fiebre.	Alimentos contaminados.	Enterotoxina termolábil
<i>Shigella</i> spp	24-72 h	Dolor abdominal, vómitos, diarrea, disentería, fiebre.	Agua y alimentos contaminados	Bacteria y endotoxina
<i>C. jejuni</i>	1-7 d	Dolor abdominal, vómitos, diarrea, disentería, fiebre.	Leche, aves de corral y agua no potable.	Bacteria Enterotoxina termolábil
<i>Yersinia</i> spp	1-7 d	Dolor abdominal, vómitos, diarrea, disentería, fiebre.	Carne de cerdo, leche.	Bacteria Enterotoxina

B. Patógenos importantes en la industria alimentaria

La historia referente a las toxiinfecciones alimentarias se comienza a documentar y legislar en el siglo X, con el botulismo en Bizancio, y documentos sobre el ergotismo en el siglo XVI. En el siglo XIX aparecen los alimentos enlatados y Louis Pasteur asocia el deterioro de los alimentos con las bacterias. En el siglo XX se produce un desarrollo espectacular de la microbiología de los alimentos, con el establecimiento de la etiología de las toxiinfecciones alimentarias, el comienzo de una nueva era de la química e ingeniería alimentaria. Aunado a los movimientos migratorios de las personas, la diversificación de alimentos, la producción masiva de alimentos y la facilidad de transporte desde puntos lejanos entre la producción y preferencia en el consumo de alimentos, aunadas a la capacidad que tienen los microorganismos para evolucionar y adaptarse a su medio ambiente hacen pensar en estos microorganismos como patógenos emergentes (DeWaal y Barlow, 2014).

B1. *Escherichia*

Las cepas de *E. coli* se pueden diferenciar serológicamente por los antígenos somáticos (O), flagelares (H) y capsulares (K). Además, pueden hallarse fimbrias y estructuras emparentadas que desempeñan un papel en la patogenia. Actualmente, se reconocen cinco grupos de *E. coli* causantes de diarrea en función del síndrome que provocan, cuyas diferencias están codificadas por plásmidos (Wright *et al.*, 2017).

- *E. coli* enteropatógeno (EPEC) es responsable de la diarrea acuosa en lactantes. Produce vómitos, fiebre y diarrea acuosa, con mocos, pero sin sangre. Coloniza las microvellosidades de todo el intestino, produciendo la lesión de “adhesión y erosión” en el ribete en cepillo de la membrana de la vellosidad. Afecta a adultos y niños menores de dos años, siendo este rango de edad el principal factor de riesgo.
- *E. coli* enterotoxigénico (ETEC) es el causante de la llamada vulgarmente “diarrea del viajero”, se manifiesta con diarrea acuosa, como agua de arroz, y poca fiebre. Coloniza la porción proximal del intestino delgado. Afecta a adultos y niños, son una causa frecuente de diarrea en lactantes de países en desarrollo, así como la causa

- más común de diarrea en individuos de países industrializados que viajan a zonas menos desarrolladas del mundo.
- *E. coli* enteroinvasor (EIEC) coloniza el colon, origina fiebre y diarrea profusa con heces que contienen mocos y estrías sanguinolentas. Presenta un plásmido de 120-140 mD, conocido como plásmido invasivo, que lleva todos los genes necesarios para la virulencia. Al igual que ETEC, pero afecta principalmente a adultos.
 - *E. coli* enterohemorrágico (EHEC) origina diarrea sanguinolenta, colitis hemorrágica, síndrome urémico hemolítico (SUH o SHU) y púrpura trombocitopénica. En este grupo se incluye *E. coli* verotoxigénico (VTEC), serotipos O157, O26, O111. Afecta principalmente a niños, el principal factor de riesgo es el consumo de carne sin la cocción adecuada.
 - *E. coli* enteroagregativo (EAaggEC) posee carácter clonal, diferenciándose dos clones relacionados (1 y 2). Dentro de cada grupo está presente una variedad concreta de antígenos O, mientras que los antígenos H se conservan.

En los reportes científicos sobre *E. coli*, se refieren a las plantas como otra fuente de infección, específicamente en la espinaca (*Spinacia oleracea*) y lechuga (*Lactuca sativa*). Se recomienda igualmente estudiar profundamente los cultivos y los tejidos vegetales y animales ya que se deben considerar como parámetros de riesgo para la inocuidad de los alimentos ((Fernández Ferran *et al.*, 2003; Wright *et al.*, 2017).

B2. Campylobacter

Campylobacter spp es un bacilo delgado, gram negativo (0.5-0.8 μm x 0.2-0.5 μm) y microaerófilo (necesita 3-5% de O_2 y 2-10% de CO_2). Su morfología puede variar entre vibriónica (bacilos curvados), espirilar, en forma de rosquilla, de S y cocoide, de tal forma que en fase logarítmica de crecimiento las células tienen forma espiral o curvada, pero a medida que los cultivos envejecen adquieren formas esféricas. Móvil, con un único flagelo polar que presenta de dos a tres veces el largo de la célula. Aunque hay diversas especies de *Campylobacter* causantes de enfermedades, *C. jejuni*, *C. coli* y *C. lari* son las especies que se aíslan con mayor frecuencia en casos de gastroenteritis humana, siendo *C. jejuni* la responsable de la mayoría de las toxiinfecciones alimentarias: 89-93% de las toxiintoxicaciones (OMS, 2017)

Las especies *C. coli* y *C. lari* son semejantes a *C. jejuni*, su diferencia se basa en pruebas bioquímicas: *C. coli* no es capaz de hidrolizar el piruvato y *C. lari* es capaz de crecer en presencia de 30 microgramos de ácido nalidíxico (Haddad *et al.*, 2013). La movilidad, la quimiotaxis y los flagelos son factores importantes en la virulencia, pues de ellos depende la colonización del epitelio intestinal. *Campylobacter* produce una enterotoxina parecida a la toxina colérica, que también juega un papel importante en la patogenia (Nichols, 2005). *C. jejuni* puede sobrevivir de 2 a 4 semanas en condiciones de baja humedad, oxigenación y temperaturas de 4°C, superando muchas veces el tiempo de vida útil del producto. Asimismo, puede perdurar de 2 a 5 meses a -20°C, pero a temperatura ambiente apenas dura algunos días (Khan, *et al.*, 2013).

C. jejuni y *C. coli* son sensibles a diversos agentes antimicrobianos, como los macrólidos, los aminoglucósidos, el cloranfenicol y la tetraciclina. La eritromicina ha sido el antibiótico de elección para tratar las infecciones del tracto intestinal. Al igual que en *Salmonella*, el control de *Campylobacter* se debe realizar tanto en el sector agropecuario como en los establecimientos alimentarios, por lo que los controles especificados para *Salmonella* podrían extrapolarse a este microorganismo. Un aspecto importante de su control reside en la refrigeración de las aves, ya que la baja temperatura, junto con la desecación superficial que se produce, reduce significativamente la incidencia y los recuentos de *Campylobacter* viables, incluso en canales altamente contaminadas (Fernández, 2008).

B3. Enterobacter

Conocido antiguamente como *Cronobacter* spp incluye varias especies de patógenos emergentes relacionados con brotes de meningitis, septicemia y enterocolitis necrotizante, especialmente en neonatos y niños. La tasa de mortalidad de estos brotes es alta, entre 20 y 80%, y los supervivientes suelen sufrir severos desórdenes neurológicos (Grimont y Grimont, 2006).

E. sakazakii es un bacilo móvil, no esporulado, gram negativo que ha sido encontrado en alimento para bebés, es más resistente a los cambios osmóticos y a la sequía que otros miembros de la familia *Enterobacteriaceae* y se asocia con casos esporádicos de sepsis, meningitis, cerebritis y enterocolitis necrotizante. La mayoría de las infecciones se observan en bebés con bajo peso al nacer y que son alimentados de forma insalubre. La mortalidad ha

disminuido a menos de 20% en los últimos años. Este microorganismo no se ha encontrado presente en la fórmula láctea, tampoco existe evidencia de la transmisión de persona a persona o un medio general de difusión ambiental (Vanegas *et al.*, 2009).

B4. Listeria

L. monocytogenes está muy difundida en la naturaleza, en la que suele adoptar un ciclo saprofitico en estrecha relación con el suelo. Además, se ha encontrado en aguas continentales, sedimentos marinos, material vegetal en descomposición, forrajes, heces humanas y animales y aguas residuales de explotaciones animales, entre otros ambientes, lo que explica su presencia en alimentos crudos. Epidemiológicamente se caracteriza por su ubicuidad, sobreviviendo en tierra húmeda hasta 500 días en función de la temperatura. En heces o aguas residuales mantenidas a temperatura de refrigeración sobrevive más de seis años, este periodo se reduce si se mantiene a temperatura ambiente (Guenther *et al.*, 2009).

Listeria spp son bacilos gram positivos de forma regular y con forma de vara corta. Algunas veces pueden tener forma cocoide, apareciendo como células individuales o en cadenas cortas. Son móviles entre 20-25°C, pero no a 37°C. Existen seis especies de listeria descritas: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. grayi* y *L. ivanovii* subespecie *ivanovii* y subespecie *londoniensis*. Las cepas patógenas de *L. monocytogenes* producen la listeriolisina O, responsable de la hemólisis- β y de la destrucción de las células fagocitarias, es una hemolisina que segrega la bacteria a causa de la disminución de pH (Liu, 2006).

L. monocytogenes tolera y se multiplica en concentraciones altas de NaCl, contando con la posibilidad de sobrevivir durante un año en ambientes con una concentración de 16%, su tolerancia aumenta al disminuir el pH o la temperatura del medio. Los tratamientos para su inactivación son de 61.7°C/35min, 70°C/20min, 78°C/15min u 80°C/5min, favoreciendo su resistencia al calor con la presencia de grasas. Se multiplica entre 0 y 4°C, las temperaturas bajas ejercen un efecto protector, de tal manera que en condiciones de acidez su inactivación es más lenta en refrigeración que a temperatura ambiente (Leverentz *et al.*, 2003). La acidez influye en la capacidad de *Listeria* para sobrevivir a la congelación (temperaturas inferiores a -4.7°C) y almacenamiento a menos de -18°C en carne, mostrando una disminución en la recuperación de células viables que han sido dañadas por el frío (Wu *et al.*, 2015).

B5. Salmonella

B5.1 Origen

Salmonella tiene su origen principal es el tracto intestinal de animales, fundamentalmente las aves y los porcinos y pueden acabar contaminando las carnes crudas, el pollo crudo, los productos marinos crudos o el huevo, Los brotes de *Salmonella* están asociados al consumo de alimentos elaborados con huevo crudo siguen siendo frecuentes a pesar de conocerse el riesgo que representa su consumo, de las medidas legales adoptadas y de los programas de educación sanitaria dirigidos a disminuir su incidencia. Este género pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, fue descrito a principios del siglo XX por el bacteriólogo estadounidense Theobald Smith (Zaidi *et al.*, 2006). En la figura 2 se muestran los factores de virulencia; y en la figura 3 se presenta la clasificación de *Salmonella* entérica con las diferentes subespecies y serovares que se aíslan más frecuentemente.

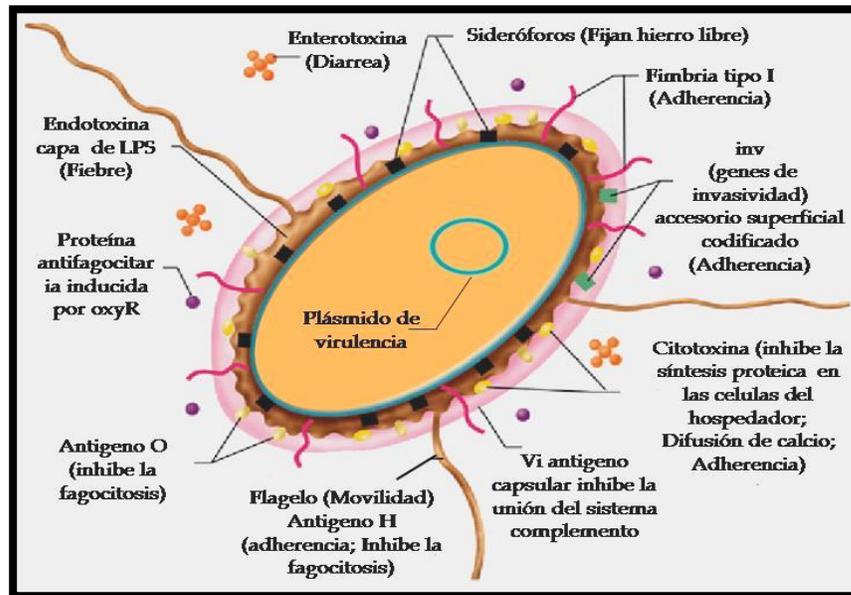


Figura 2. Factores de virulencia importantes en la patogenia por *Salmonella* spp. (Brenner *et al.*, 2000)

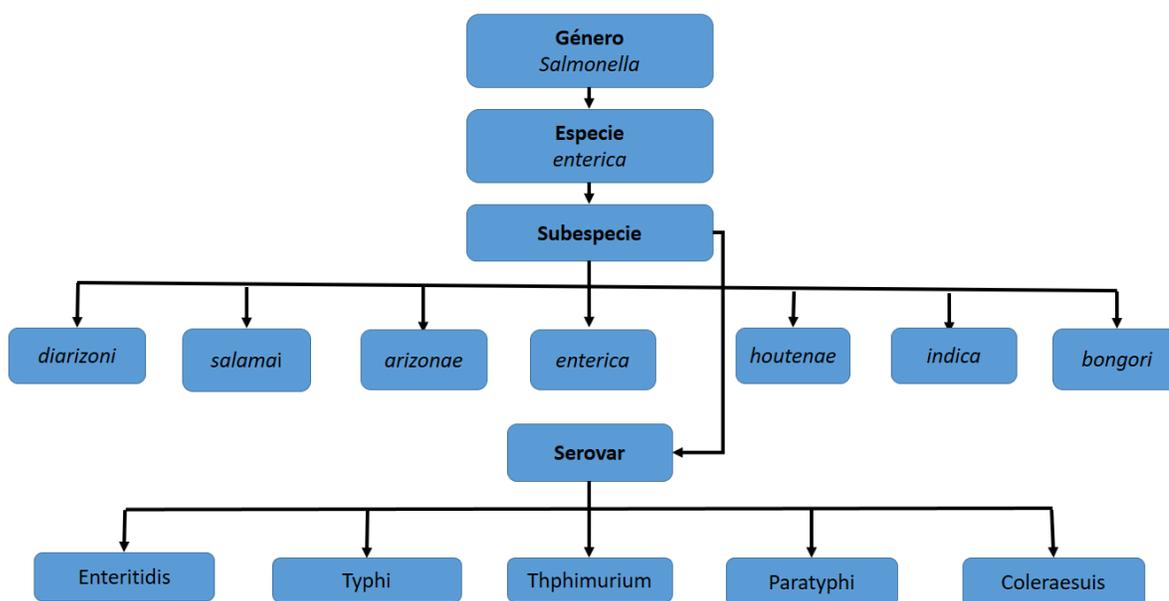


Figura 3. Clasificación de *Salmonella* (Brenner *et al.*, 2000)

B5.2 Características de *Salmonella* spp.

La mayoría de los miembros de este género se encuentra en el tracto intestinal del hombre y los animales como bacterias patógenas o comensales. Está integrado por bacilos gram negativos, anaerobios facultativos y no esporulados. La mayor parte de los serotipos conocidos son móviles, mediante flagelos peritricos. Se conocen más de 2,460 serotipos, muchos de ellos patógenos para el ser humano (Chlebicz, y Śliżewska, 2018)

Son bacterias invasoras, enterotoxigénicas y están ampliamente diseminadas en todo el mundo, su temperatura ideal de sobrevivencia entre los 15 y los 35°C (mesófilas) y en una amplitud de pH de 4.5 a 9. Los microorganismos de este género se distribuyen en seis grupos, se han definido mediante biotipado, hibridación DNA-DNA, análisis de la secuencia del RNA ribosomal 16S, y por “*multilocus enzyme electrophoresis*” (MLEE) (Brenner *et al.*, 2000). La serotipificación se utiliza para diferenciar más allá del nivel de subespecie, como puede observarse en la tabla 2.

Tabla 2. Clasificación de *Salmonella* spp en serotipos (Brenner *et al.*, 2000)

Grupo	Microorganismo
A	S. Paratyphi A1
B	S. Typhimurium, S. Bredeney
C1	S. Choleraesuis, S. Montevideo, S. Oranienburg
C2	S. Newport
D	S. Typhi, S. Enteritidis, S. Dublin, S. Gallinarum
E	S. Butantan, S. Anatum, S. Give

Salmonella serotipo Typhi es la causante de la fiebre tifoidea, presentando síntomas como son fiebre de intensidad variable, cefalea, diarrea, estreñimiento, tos, náuseas y vómitos, anorexia, dolor abdominal y escalofríos. Mientras que los demás serotipos considerados no tifoídicos presentan un estado asintomático. En el año 2000, los serotipos aislados con mayor frecuencia en EE.UU fueron S. Typhimurium, S. Enteritidis y S. Newport (Dunkley *et al.*, 2009). En México, los serotipos de *Salmonella* spp identificados con mayor frecuencia en los servicios de salud fueron S. Typhimurium (20.4%) y S. Enteritidis (18.3%) (Guenther *et al.*, 2009).

La salmonelosis se produce por la ingestión de alimentos o bebidas contaminados por *Salmonella*, se manifiesta como una enterocolitis aguda y se caracteriza por presentar síndromes febriles asociados a manifestaciones gastrointestinales o sistémicas, con frecuencia severas (Figuroa y Verdugo, 2005; Fernández, 2008). El cuadro clínico se localiza básicamente en el íleo terminal y el intestino grueso. La enfermedad se manifiesta a través de diferentes fases. En la primera fase, la infección se limita a la mucosa intestinal; en la siguiente, la bacteria invade el tejido linfático local y le sigue una fase de bacteriemia, durante la cual la mayoría de las bacterias son fagocitadas por macrófagos del hígado y el bazo (Calva *et al.*, 2006).

Con frecuencia, el médico hace un diagnóstico basándose en el cuadro clínico del paciente, pero sin contar con los estudios microbiológicos necesarios para establecer un diagnóstico certero, cuando se presenta infección por *Salmonella* inicia una fase de crecimiento bacteriano intracelular, el cual, después de varios días, provoca la liberación de gran cantidad de patógenos al torrente sanguíneo. (Zaidi *et al.*, 2006).

La salmonelosis es una enfermedad aguda de distribución mundial. Afecta a todos los grupos de edad, con mayor incidencia en los extremos de la vida, provocando infecciones en forma endémica o en brotes epidémicos de intoxicación alimentaria que en ocasiones abarcan amplias zonas geográficas debido a las extensas cadenas de distribución de alimentos existentes hoy en día (Fernández, 2008).

Para la salud pública la salmonelosis tiene un impacto socioeconómico tanto en los países en desarrollo, como en los países desarrollados. Además, al no recibir tratamiento, puede ser causante del síndrome de Reiter, el cual se manifiesta por dolor en articulaciones, irritación en los ojos, dolor al orinar y puede durar meses o años, desencadenándose una artritis crónica (CFSPH, 2005). Desde la década de los ochenta, la incidencia de salmonelosis de origen alimentario ha aumentado considerablemente en México. Este incremento es resultado de una combinación de factores, como la calidad del agua utilizada para riego y el manejo, almacenamiento, distribución y preparación de los alimentos (Zaidi *et al.*, 2006).

Un meta-análisis (revisión sistemática en la cual se combinan matemáticamente los resultados de varios estudios para contestar una misma pregunta) realizado recientemente, confirma que *Salmonella* resiste a antibióticos empleados en los alimentos de origen animal, ya que pueden estar contaminados con este microorganismo; es resistente a 3 antibióticos, como la amoxicilina, las sulfonamidas y las tetraciclinas, ya que son ampliamente usados en producción animal (Mebrat Ejo *et al.*, 2016).

B5.3 Manifestaciones clínicas

El cuadro clínico normalmente es de 2 a 5 días, aunque en ocasiones persiste varias semanas. La gravedad de los síntomas varía considerablemente, siendo mayor en niños y ancianos. Si el microorganismo pasa desde el intestino a la corriente sanguínea y llega a otras partes del cuerpo, puede ocasionar la muerte si la persona afectada no es tratada rápidamente. La mayoría de las muertes causadas por esta bacteria han ocurrido entre ancianos que viven en residencias. La tasa de mortalidad es baja, inferior a 1% en países desarrollados, pero suelen producirse de 40-50 muertes al año, especialmente entre niños, ancianos o personas inmunodeprimidas. Las excretas de los enfermos contienen gran cantidad de la especie de *Salmonella* implicada al comienzo de la enfermedad, la cifra inicial decrece según transcurre el tiempo (DeWaal y Barlow, 2014).

El estado de portador se refiere a la condición en que las personas curadas pueden eliminar *Salmonella* en sus heces durante meses. La mitad de los individuos afectados excretan este patógeno de 2-4 semanas posteriores a su curación clínica, entre 10 y 20% continúan durante 4-8 semanas, unos pocos durante 3 meses y, en raras ocasiones, se prolonga hasta 6 meses. El microorganismo puede eliminarse también por la orina. La dosis infectante capaz de desencadenar la salmonelosis humana es alrededor de 1×10^5 UFC/mL, dependiendo de factores como tipo de alimento, virulencia de la cepa involucrada y susceptibilidad del individuo. Entre las especies altamente virales, se encuentran la *S. Dublin* y, sobre todo, *S. Enteritidis* (Callaway *et al.*, 2008).

El incremento del serotipo de *S. Enteritidis* en los casos de salmonelosis humana, al contrario de otras del género *Salmonella*, representa un importante problema de salud pública en muchos países, ya que este serotipo infecta a gallinas aparentemente sanas que posteriormente transmiten las enfermedades al hombre. Si se consumen huevos crudos o poco cocidos, el microorganismo podría causar la enfermedad. El número de casos de salmonelosis se incrementa durante el verano (Parra *et al.*, 2002; Callaway *et al.*, 2008; Fernández, 2008).

b5.4 Alimentos involucrados en la salmonelosis

Gran parte de las salmonelosis se deben al consumo de alimentos de origen animal (carnes de abasto, pollo, mariscos, pescado, leche y huevos, así como ovoproductos y productos lácteos no pasteurizados), o de origen vegetal que se contaminan con productos en malas condiciones de salubridad o mal manipulados. Muchos alimentos, sobre todo los de origen animal o contaminados con aguas residuales, han servido como vehículos en brotes de salmonelosis. La carne de matadero está contaminada habitualmente con *Salmonella*; su incidencia es mayor en las canales de ganado y otros animales, debido, por ejemplo, a la contaminación por el contenido intestinal de la res viva, cuyas heces manchan su piel, pelo y patas al llegar al matadero. Las canales de cerdo se contaminan durante las operaciones de escaldado y pelado. La contaminación entre las mismas canales y de éstas a utensilios, superficies de trabajo y manos de los que las manipulan es fácil. Otro de los principales reservorios de *Salmonella* es la carne de aves de corral. La contaminación de las canales de pollo y otras aves procede, igualmente, del tracto intestinal o del material fecal de los animales que manchan sus patas y plumas. Las etapas críticas de la contaminación de las canales aviares están en el desplumado y la evisceración; también es común la contaminación cruzada a través de las manos de los operarios, equipo y utensilios utilizados en la preparación y troceado de las canales (Marcus *et al.*, 2004).

Son raras las salmonelosis adquiridas directamente de carnes bien cocinadas, la mayoría de los brotes se deben a una cocción insuficiente o por contaminación posterior a su preparación. Las carnes elaboradas mediante fermentación (salami, chorizo y salchichón) pueden ser causa de brotes de salmonelosis, teniendo en cuenta que las especies que integran este género pueden sobrevivir al proceso de fermentación (Forsythe y Hayes, 2002).

Como se mencionó anteriormente, otro alimento que se asocia con frecuencia a *Salmonella* es el huevo. La contaminación se produce por dos vías: a través de la cáscara contaminada y por vía transovárica en aves infectadas (gallina, pata, pava). En el primer caso, la superficie de la cáscara se contamina siempre a su paso por la cloaca o cuando el huevo está en un ambiente fecal, los huevos rotos o manchados constituyen un peligro en la propagación de especies de *Salmonella* (EFSA, 2014).

La contaminación partiendo de la cáscara se produce si ésta mantiene un grado de humedad apropiado y existe una temperatura diferencial significativa entre el contenido del huevo y el ambiente. La diferencia de temperaturas entre el huevo, más elevada, y el ambiente, favorece la absorción de los microorganismos, como *Salmonella*. También se transmite sobre la cáscara por contaminación cruzada, a través de los manipuladores que han tenido contacto con superficies infectadas, durante el transporte y almacenamiento de los mismos en lugares con precarias condiciones de higiene (Mebrat Ejo *et al.*, 2016). *Salmonella* es causal de graves enfermedades que son transmitidas por productos derivados de huevo contaminado, y la asociación entre la infección del tracto reproductivo de los pollos fue un fuerte incentivo para desarrollar programas de prevención (Jawale y Lee, 2014).

La leche cruda puede albergar *Salmonella* y ser causa de brotes de salmonelosis, se contamina a través del pezón y por las manos del ordeñador; la pasteurización elimina la presencia de la bacteria. Entre los productos lácteos, se han identificado como causa de brotes de salmonelosis la leche en polvo, el queso, los helados y, más raramente, la mantequilla, todos ellos por fallos en su elaboración. *Salmonella* se destruye o inactiva durante la fermentación de alta acidez, como el yogur y el queso de pH inferior a 4.5. En el caso del queso poco ácido (pH superior a 4.9), la *Salmonella* puede desarrollarse en cualquier etapa de su elaboración (Mastroeni y Maskell, 2006).

Entre las verduras, cualquiera puede contener *Salmonella* cuando se cultivan con aguas residuales contaminadas o son fertilizadas con abonos de origen animal. Algunos vegetales, como los berros, han sido causa de brotes de salmonelosis. Por otro lado, los mariscos se contaminan con *Salmonella* cuando se crían en aguas residuales contaminadas, por lo que han sido la causa de numerosos brotes en todo el mundo, la depuración es la medida preventiva adecuada. Diferentes alimentos se han identificado como portadores de *Salmonella*, entre ellos coco, cebada, harina de cereales, pimienta blanca y negra, pasta, cacao en polvo y chocolate (Fernández, 2008), La FDA (2017) reportó el aumento de las pruebas de las cuales ha identificado papayas de dos granjas que resultaron positivas para las cepas de *Salmonella* que coinciden con enfermedades no relacionadas con este brote.

C Crecimiento microbiano

El crecimiento microbiano puede definirse como un incremento en los constituyentes celulares que ocasiona un aumento del número de células en /de?? los microorganismos que se multiplican por gemación y fisión binaria. En el último caso, las células individuales se agrandan y dividen para originar dos células hijas de un tamaño aproximadamente igual (Atlas y Bartha, 2002).

C1 Crecimiento de los microorganismos

Todos los mamíferos, incluyendo los seres humanos, se adaptan a la vida del mundo microbiano. Louis Pasteur, Robert Koch, Élie Metchnikoff y Theodor Escherich, entre otros investigadores, sentaron las bases conceptuales sobre las interacciones microbio-huésped. Pasteur postuló que los microbios eran necesarios para la vida humana y Metchnikoff afirmó que la composición de la flora microbiana era esencial para el bienestar del huésped. Igualmente, Escherich estaba convencido de que el conocimiento preciso de la flora endógena era esencial no sólo para la comprensión de la fisiología de la digestión, sino para la comprensión de la patología y terapia de enfermedades microbianas intestinales. A pesar de estas primeras ideas, sólo recientemente los científicos han desarrollado métodos que permiten caracterizar directamente los mecanismos moleculares que subyacen a la creación y mantenimiento de diversos ecosistemas microbianos (Falk *et al.*, 1998).

El crecimiento de una población resulta de la suma de ciclos celulares de todos sus individuos y suele ser asincrónico, puesto que cada microorganismo se encuentra en un punto diferente del ciclo celular. Por consiguiente, en un momento determinado, en una población se encuentran células que acaban de dividirse, otras están replicando su ADN y elongándose y otras están iniciando la división celular (Melbinger *et al.*, 2015).

El aislamiento de bacterias a partir de muestras naturales se realiza, en la mayoría de los casos, mediante la producción de colonias aisladas en cultivos sólidos. El crecimiento explosivo de las bacterias produce un gran número a partir de una única célula inicial de forma que tras un período de tiempo de incubación en las condiciones ambientales

adecuadas se produce una colonia de individuos iguales. Para que un microorganismo crezca necesita nutrientes que le aporten energía y elementos químicos para la síntesis de sus constituyentes celulares. De acuerdo a la fuente de carbono que utilizan, los microorganismos se clasifican en autótrofos si es el CO₂ atmosférico (microorganismos que fotosintetizan), y heterótrofos si utilizan carbono orgánico (Ouyang y Li, 2013).

C1.2. Disponibilidad del agua

El agua es un factor importante para el crecimiento microbiano, se requiere para crecer y llevar a cabo las funciones metabólicas, de lo contrario los microorganismos se deshidratan o mueren. La actividad del agua (en inglés, *water activity*, *aw*) depende de la concentración de solutos y de la cantidad de agua disponible en el medio ambiente. La mayoría de las bacterias y hongos necesitan valores entre 0.98 y 0.995 de *aw* para su pleno desarrollo (Madigan y Martinko, 2006).

Una membrana plasmática permanentemente selectiva separa el contenido citoplasmático del microorganismo de su ambiente, por ello, las alteraciones en la concentración osmótica del medio extracelular pueden afectar incluso la viabilidad de los mismos. Si se coloca un microorganismo en una solución isotónica, el agua entrará en la célula y causará su estallido, salvo que la propia célula desarrolle alguna estrategia para evitarlo; por ejemplo, reducir la concentración osmótica del citoplasma gracias a los cuerpos de inclusión. Los procariotas también pueden contener canales sensibles a la presión osmótica que se abren para permitir la salida de solutos cuando la osmolaridad del entorno se vuelve más baja que la del citoplasma (Madigan y Martinko, 2006).

C1.3. Acidez y pH

El pH intracelular debe permanecer cercano a la neutralidad, entre 5 y 8, para impedir la destrucción de las macromoléculas hábiles en condiciones ácidas o alcalinas. Los ácidos fuertes (inorgánicos) y los ácidos débiles (orgánicos) disminuyen el pH externo, posteriormente se disocian en el interior de la célula inhibiendo la actividad enzimática y el transporte de nutrientes, por lo tanto, los microorganismos no pueden generar energía de almacenamiento y ocurre la muerte celular (Brooks *et al.*, 1992).

C1.4. Oxígeno

El oxígeno molecular (O_2) influye en el metabolismo de los microorganismos. Durante el proceso de reducción del O_2 se crean formas reactivas, como peróxido de hidrógeno (H_2O_2), superóxidos (O_2^-) y radicales hidroxilos (OH^-), que producen daño celular por la oxidación de compuestos orgánicos e incluso macromoléculas (Prescott *et al.*, 1999).

C1.5. Temperatura

La temperatura afecta el desarrollo y la supervivencia de los microorganismos. En bajas temperaturas la velocidad de crecimiento de algunos microorganismos disminuye y los períodos de latencia se alargan. Por otro lado, las temperaturas elevadas aceleran las reacciones enzimáticas (antes de los $40^\circ C$), pero si se intensifica el calor en algunos casos provocan la desnaturalización de las proteínas y, por consiguiente, la lisis celular (Brooks *et al.*, 1992).

Es importante considerar que cada microorganismo tiene una temperatura de desarrollo adecuada, a mayor temperatura se produce un incremento lineal de la velocidad de crecimiento hasta alcanzar el clima perfecto a velocidad máxima. Por encima de esta temperatura óptima la velocidad de crecimiento decae bruscamente y se produce la muerte celular (Atlas y Bartha, 2002). En la tabla 3 se presentan algunas condiciones ambientales para el desarrollo de los microorganismos.

Tabla 3. Respuesta microbiana a factores ambientales (Madigan et al., 2006; Falk et al., 2009; Lu et al., 2006).

Factor	Tipo de microorganismo	Características	Microorganismo representativo
NaCl	Osmotolerante	Capaz de crecer en un amplio rango de actividad del agua o presión osmótica.	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Saccharomyces rouxii</i>
	Halófilo	Requiere altas concentraciones de cloruro sódico para crecer, normalmente por encima de 0.2 M.	<i>Halobacterium</i> , <i>Dunaliella</i> , <i>Ectohiorhodospira</i>
pH	Acidófilo	Óptimo de crecimiento entre pH 0 y 5.5.	<i>Sulfolobus</i> , <i>Picrophilus</i> , <i>Ferroplasma</i> , <i>Acontium</i> , <i>Cyanidium caldarium</i> .
	Neutrófilo	Óptimo de crecimiento entre pH 5.5 y 8.0.	<i>Escherichia</i> , <i>Euglena</i> , <i>Paramecium</i> .
	Alcalófilo	Óptimo de crecimiento entre pH 8.5 y 11.5.	<i>Bacillus alcalophilus</i> , <i>Natronobacterium</i> .
Temperatura	Psicrófilo	Crece bien a 0°C y tiene una temperatura óptima de 15°C o inferior.	<i>Bacillus psychrophilus</i> , <i>Chlamydomonas nivalis</i> .
	Psicrótrofo	Puede crecer a 0-7°C; óptima entre 20 y 30°C.	<i>Listeria monocytogenes</i> .
	Mesófilo	Temperatura máxima alrededor de 35°C. Temperatura óptima alrededor de 20-45°C.	<i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Neisseria gonorrhoeae</i> , <i>Trichomonas vaginalis</i> .
	Termófilo	Puede crecer a 55°C o superior; temperatura óptima a menudo entre 55 y 65°C.	<i>Geobacillus stearothermophilus</i> , <i>Thermus aquaticus</i> , <i>Cyanidium caldarium</i>
	Hipertermófilo	Temperatura óptima entre 80 y 113°C.	<i>Chaetomium thermophile</i> , <i>Sulfolobus</i>
Atmósfera	Aerobio obligado	Completamente dependiente del O ₂ para crecer.	<i>Pseudomonas</i> , <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
	Anaerobio facultativo	No requiere O ₂ para crecer, pero crece mejor en su presencia.	<i>Micrococcus luteus</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> .
	Anaerobio aerotolerante	Crece bien en presencia o en ausencia de O ₂ .	<i>Lactobacillus</i> .
	Anaerobio obligado	No tolera el O ₂ y muere en su presencia.	<i>Clostridium botulinum</i> , <i>C. perfringens</i> .
	Microaerófilo	Requiere niveles de O ₂ por debajo de 2-10% para crecer, y es dañado por el O ₂ atmosférico (20%).	<i>Campylobacter fetus</i> .

D Control del crecimiento microbiano

Los microorganismos toleran determinados factores ambientales. Así, unas bacterias pueden tener condiciones para su desarrollo y estas condiciones pueden ser nocivas para una especie bacteriana. El crecimiento de una población microbiana se estudia analizando la curva de crecimiento de un cultivo. La curva del crecimiento microbiano representa la evolución del número de células viables presente en un cultivo microbiano líquido a lo largo del tiempo de estudio. Se estudia el número de células viables por mililitro de un cultivo de volumen limitado y con una cantidad de nutrientes limitada, como por ejemplo un medio de cultivo líquido en un matraz que ha sido inoculado con una cantidad inicial de microorganismos o inóculo (Hunter-Cevera y Belt, 1996). Para llevar a cabo estos estudios se distingue tres niveles entre los modelos de microbiología predictiva: los que describen los cambios en el número de microorganismos con respecto al tiempo; con respecto al efecto de las condiciones ambientales y los que combinan los dos aspectos anteriores (Larcher y Cattaneo., 2006)

Se considera el crecimiento de las bacterias en función de su fondo genético, en relación con los nutrientes, y en unas hipotéticas condiciones ideales (óptimas). Sin embargo, el trabajo experimental con microorganismos ha de tener en cuenta los factores ambientales, es decir, una serie de agentes físicos y químicos. El análisis de la curva de crecimiento bacteriano es muy importante para determinar el potencial de una técnica de control específica (Lee *et al.*, 2016).

Al igual que las bacterias, los bacteriófagos al forman una interacción con su bacteria huésped, se necesita determinar una cuantificación del número de copias que se generan por la infección a esta condición se le conoce como fase de eclipse, siendo el momento idóneo para realizar la infección fago-bacteria.

D1. Agentes físicos

La temperatura es uno de los parámetros ambientales más importantes que condicionan el crecimiento y la supervivencia de los microorganismos. La temperatura

afecta a la velocidad de crecimiento y, por lo tanto, al tiempo de generación. Cada bacteria es diferente y esto se puede observar en una curva de tasa de crecimiento en función de la temperatura. Si se suele utilizar calor, en combinación con otros agentes físicos (filtración, presión y radiación). Al aplicar temperaturas altas se refleja desnaturalización e inactivación de proteínas enzimáticas esenciales, colapsamiento de la membrana citoplásmica y a veces lisis térmica de la bacteria, esta condición se presenta rápidamente cuando se aplica presión, la cual se utiliza para esterilizar objetos, como lo demuestra el uso universal de la autoclave en todos los laboratorios de microbiología (Madigan y Martinko, 2006). El calor es aún uno de los métodos más comunes para destruir microorganismos, se puede aplicar húmedo o seco (Salgado-Nava y Jiménez-Munguía, 2012). Por otro lado, además de aplicar calor, si a las bacterias se le extrae el calor del medio de manera intensa recurrir a la congelación con fines de conservación de microorganismos por largos períodos si se realiza apropiadamente, numerosos laboratorios disponen de congeladores a -30 o -70°C para la conservación de colecciones de cultivos microbianos (Shafiei *et al.*, 2014).

D2. Agentes químico

Aunque los objetos se desinfectan a veces con agentes físicos, también las sustancias químicas se utilizan con mucha frecuencia, por ejemplo los quimioterápicos son sustancias con actividad antimicrobiana (microbicida o microbiostática). En estas sustancias se busca que sea efectivo contra un amplio espectro de microorganismos. Pero no existe (hasta estos momentos) un solo agente capaz de inhibir a todos los microorganismos. Por otro lado, existen quimioterápicos de espectro estrecho, pero muy selectivos contra ciertas bacterias que son patógenas importantes. Muchos factores influyen en la eficacia de los desinfectantes, hay que considerar la cepa de microorganismos presentes, la concentración y naturaleza del desinfectante y la duración del tratamiento. Asimismo, es imprescindible que las superficies sucias se limpien antes de aplicar un desinfectante. El uso apropiado de los agentes químicos es esencial para la seguridad en los laboratorios y hospitales, estos mismos productos se utilizan también para evitar el crecimiento microbiano en los alimentos (Prescott *et al.*, 1999).

E Bacteriófagos

E1. Antecedentes

Los virus son agentes infecciosos submicroscópicos que pueden replicarse independientemente de los cromosomas de una célula, pero no independientemente de ella. A fin de multiplicarse deben penetrar la célula donde puedan replicarse, a la cual se le denomina huésped. Presentan una forma infecciosa madura que es típicamente extracelular. Pueden infectar a diferentes seres vivos, por lo que existen virus de animales, de plantas y, de forma particular, los llamados virus bacterianos o fagos (Madigan y Martinko, 2006).

Los bacteriófagos o fagos (del griego φαγετον, *pagüento* “alimento/ingestión”) son agentes virales de las bacterias, su descubrimiento se atribuye, por un lado, al bacteriólogo inglés F. W. Twort, que en 1915 mencionó el aclaramiento de un cultivo sólido de *Micrococcus* provocado por un agente desconocido. Por otro lado, en 1917, el francocanadiense F. d'Herelle descubrió un grupo de entidades biológicas en medios de cultivo que se propagaban a expensas de las bacterias, a los cuales les denominó bacteriófagos y dentro de sus investigaciones definió su potencial uso e importancia clínica. Esto se refuerza a partir de 1940 con el desarrollo del microscopio electrónico, con el que se demuestra la naturaleza viral de los bacteriófagos y que la forma de estudiarlos es mediante procedimientos microbiológicos convencionales, facilitando su manejo y estudio (Grabow, 2001).

La última variedad de bacteriófagos se descubrió durante la Primera Guerra Mundial; los tipos ya conocidos eran los virus que afectaban a vegetales y animales, fue entonces que se pensó en que su aplicación para eliminar bacterias podría ser utilizada para la prevención y el tratamiento de enfermedades bacterianas, pero no resultó (Cerril *et al.*, 1996). Sin embargo, los bacteriófagos resultaron tener otros beneficios, especialmente como modelos o sustitutos de los virus en humanos en la investigación genética básica, así como en la evaluación de la calidad del agua. Además, demostraron ser una herramienta valiosa en la mayoría de las investigaciones sobre los virus, ya que en comparación con los humanos, animales, vegetales e incluso los insectos anfitriones de otros virus, los

bacteriófagos son fácil y rápidamente reproducibles en el laboratorio y no son particularmente exigentes con respecto al espacio, instalaciones y equipos. El trabajar con bacteriófagos requiere la separación y purificación y las dos principales tareas para realizar esto es utilizar métodos químicos, en los cuales se utilizan solutos como buffer, glicerol, bromuro de potasio, cloruro de cesio y tartrato de potasio, aunque el más común es la sacarosa, además involucra la precipitación con sulfato de amonio, polietilenglicol o cloruro de cesio, y los métodos físicos que implican la centrifugación a diferentes velocidades y gradientes de densidad y, con menor frecuencia, la cromatografía de partición (Sambrook y Russell, 2001).

La investigación sobre las propiedades básicas de los bacteriófagos se desarrolla en la biología molecular, que permitió avances sin precedentes en toda la biología y ciencias médicas; La concentración y purificación es un factor determinante para llevar a cabo la infección eficientemente, sin embargo, existe un período de adaptación por parte de los bacteriófagos antes que se desarrollen y se logren títulos apreciables en células cultivadas (Sambrook y Russell, 2001; Breeuwer *et al.*, 2003)

E2. Características generales de los bacteriófagos

Los virus son parásitos intracelulares obligados, no tienen metabolismo intrínseco y requieren la maquinaria metabólica codificada por los cromosomas de célula que puedan infectar y reproducirse en ella, denominada huésped. Su tamaño oscila entre 20 y 200 nm, y consiste de un núcleo de ácido nucleico (ARN o ADN de cadena simple o doble) rodeado por una cubierta proteica (cápside) y en algunos casos, una cubierta de lípidos. Los microbiólogos que investigan la presencia de virus en hábitats marinos y han detectado su presencia creen que son diez veces más numerosos que las bacterias marinas. En la superficie de los mares se encuentran entre 10^6 y 10^9 partículas víricas por mililitro y se estima que en la capa superficial (1 mm) de los océanos se encuentran unas 3×10^{30} partículas víricas (Grabow, W. 2001; Atterbury *et al.*, 2003).

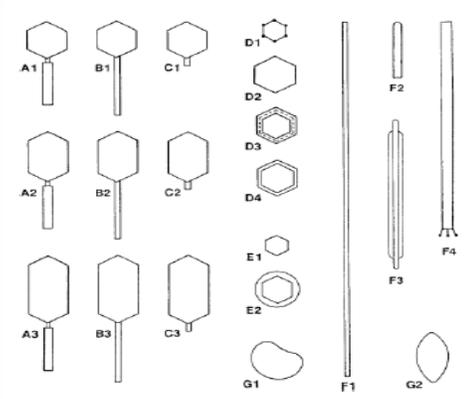
E3. Clasificación de los bacteriófagos

Las variaciones en los bacteriófagos se presentan en forma estructural como apéndices en la cabeza, cuello y las fibras de la cola o espigas, además del genoma que varía en cada orden. En 1962, André Lwoff, junto a otros investigadores, propuso una clasificación basada en la morfología y el tipo de ácido nucleico. Los nombraron de la siguiente manera: los urovirales que presentaban cola pronunciada, los inoviridae eran los filamentosos y los microviridae los tipo ϕ X. Posteriormente, Bradley (1967) considero la morfología y el tipo de ácido nucleico, y agrupó a los bacteriófagos en seis morfotipos básicos denominados de la A a la F. posteriormente se clasifico en bacteriófagos básicos: los de cola, los filamentosos y los icosaédricos con ADN de cadena sencilla o RNA de cadena simple Los fagos han sido investigados debido a su rol como agentes de biocontrol para el desarrollo de la seguridad alimentaria. En el presente, varios miles de fagos en contra de varios objetivos han sido aislados de varios entornos y alimentos. Aproximadamente el 96% de los fagos aislados eran con cola y del tipo líticos en una de las tres familias: myoviridae (24.5%) Siphoviridae (61%) podoviridae (14%) en el orden de los caudovirales (Atterbury *et al.*, 2003; Oh y Park, 2017).

En 1971, el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV por sus siglas en inglés) clasificó en 6 géneros, de los cuales 5 corresponden a la clasificación propuesta por Bradley, los grupos T4, λ , ϕ X174, MS2 y fd. Los bacteriófagos pueden tener cola larga y flexible, no contráctil (*Siphoviridae*), cola larga y contráctil (*Myoviridae*) o cola corta (*Podoviridae*) como se observa en la tabla 4. Para la clasificación de los bacteriófagos se aplican propiedades como el rango de huéspedes y las relaciones inmunológicas; sin embargo, las más importantes son su morfología y las características de su ácido nucleico el cual se adsorbe a componentes de la superficie celular que actúan como receptores específicos. La zona de adsorción del virus es complementaria al receptor celular, por lo tanto, un determinado fago sólo puede infectar un número limitado de cepas celulares que contengan a un determinado receptor. La naturaleza de la zona de adsorción varía con el tipo de fago. En el T4 se localiza en el extremo de la cola, en donde se encuentran la placa basal, las espículas y las fibras de la cola. Las formas más complejas corresponden a los bacteriófagos con colas contráctiles (Atterbury *et al.*, 2003).

Tabla 4. Morfotipos y características básicas de las diferentes familias de fagos (Ackermann, 2003)

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, seg.	<i>Cystoviridae</i>	Cubierta lipídica
F1	Fagos filamentosos	ADN sc, C	<i>Inoviridae</i>	a- filamentos largos
F2				b- bastones cortos
F3		ADN dc, L	<i>Lipothrixviridae</i>	Cubierta lipídica
F4		ADN dc, L	<i>Rudiviridae</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



E4. Multiplicación de los bacteriófagos ADN bicatenarios: el ciclo lítico

La multiplicación de los bacteriófagos (figura 4) ADN produce la destrucción de la célula huésped mediante lisis, lo que provoca su liberación. El ciclo vital de un bacteriófago, que culmina con el estallido de la célula huésped y la liberación de viriones, recibe el nombre de ciclo lítico. Los acontecimientos que tienen lugar durante el ciclo lítico se revisarán en esta sección, con especial atención a los bacteriófagos T-par de *E. coli*. Estos son bacteriófagos de ADN bicatenario con colas contráctiles complejas, de la familia *Myoviridae*; son algunos de los virus más complejos conocidos (Fernández, 2008).



Figura 4. Adsorción del bacteriófago T4 e inyección del ADN (Leverentz *et al.*, 2003).

Los bacteriófagos podrían infectar hasta un 70% de la población de procariotas marinos y ser responsables de la tercera parte de la mortalidad bacteriana acuática. También se han detectado virus que infectan diatomeas y otras algas importantes del fitoplancton marino, lo cual es de gran trascendencia ecológica, ya que la multiplicación de bacterias marinas supera la capacidad de reproducción de los protozoos. La lisis por virus de células procariotas y de algas puede también contribuir enormemente en los ciclos del carbono y nitrógeno en las cadenas tróficas marinas, incluso, podría reducir el nivel de productividad marina, como la de moluscos y peces (Muniesa *et al.*, 2005).

E5. Adsorción del bacteriófago a la célula huésped y penetración

Los bacteriófagos no se unen al azar a la superficie de una célula huésped; por el contrario, se fijan a receptores específicos. La naturaleza de estos receptores varía de acuerdo al bacteriófago, pueden ser lipopolisacáridos y proteínas de la pared celular, ácidos teicoicos, flagelos y pili. Los bacteriófagos T-par de *E. coli*, en particular, utilizan lipopolisacáridos o proteínas de la pared celular como receptores. Las variaciones en las propiedades del receptor son parcialmente responsables de las preferencias del bacteriófago por el huésped (Muniesa *et al.*, 2005; Leeuw *et al.*, 2017).

La adsorción de bacteriófagos T-par está relacionada con diversas estructuras del tallo. La fijación del bacteriófago comienza cuando una fibra del tallo establece contacto con los receptores adecuados; a medida que más fibras contactan con los receptores, la placa basal se asienta en la superficie. La unión se debe probablemente a interacciones electrostáticas y se ve influida por el pH y por la presencia de iones, como Mg^{+2} y Ca^{+2} . Una vez que la placa basal está firmemente asentada en la superficie celular, se producen cambios conformacionales en ella y en la vaina del tallo. Esta última se reorganiza de tal forma que se contrae, pasando de una conformación en cilindro de 24 anillos a otra de 12 anillos de longitud, más corta y ancha, es entonces cuando el tubo central es empujado a través de la pared celular bacteriana. Finalmente, el ADN es extruido de la cabeza, pasa a través del tubo del tallo y penetra en la célula huésped. Parece ser que el tubo interacciona con la membrana plasmática para formar un poro a través del cual pasa el ADN; los mecanismos de penetración de otros bacteriófagos difieren a menudo de los bacteriófagos T-par, aunque no se han estudiado en detalle (Leverentz *et al.*, 2003).

F Biofilm

Las bacterias existen en la naturaleza bajo dos formas o estados: a) bacterias planctónicas, de libre flotación, y b) bacterias biofilm, en colonias de microorganismos sésiles (Nazar, 2007). Un biofilm se define como una agrupación de comunidades sésiles microbianas que se fijan a superficies, las células están incrustadas en una matriz autoproducida que actúa como protección química y mecánica del entorno, así, estas bacterias presentan mayor resistencia a desinfectantes y el secado (Vestby *et al.*, 2009). Las bacterias pueden crear condiciones para formar biofilms casi en cualquier ambiente líquido. La interfase sólido-líquido entre una superficie y un medio acuoso (vgr: leche) proporciona un entorno ideal para la fijación y crecimiento de microorganismos (Fakruddin *et al.*, 2014).

G Microscopia electrónica

Los microscopios electrónicos se usan habitualmente para el estudio detallado de estructuras celulares (Bradley, 1967). Para analizar las estructuras internas, es esencial el microscopio electrónico de transmisión MET (en inglés TEM, *Transmission Electron Microscope*). En el MET se utilizan electrones en lugar de rayo de luz, las lentes son electromagnéticas y, se opera en todo momento a alto vacío (Ackermann, 2003). El poder de resolución del microscopio electrónico es mucho mayor que el del microscopio óptico, incluso pueden observarse estructuras moleculares como proteínas y ácidos nucleicos. Sin embargo, los haces de electrones tienen escaso poder de penetración y una célula aislada es demasiado gruesa para poder visualizarse directamente; por este motivo, se emplean técnicas especiales para la obtención de cortes ultrafinos a fin de poder observar las muestras. Una célula bacteriana, por ejemplo, se corta con una cuchilla especial en varios cortes ultrafinos de 20-60 nm de espesor que son posteriormente examinados de manera individual en el microscopio electrónico (Fuster-Valls *et al.*, 2008). Para obtener suficiente contraste, las preparaciones se tiñen previamente mediante tratamiento con compuestos como ácido ósmico, permanganato, sales de uranilo o de lantano, o plomo. Como estas sustancias poseen átomos pesados, son capaces de desviar los electrones y aumentar el contraste (Madigan y Martinko, 2006).

La microscopía electrónica es el mejor método para estudiar la forma de las bacterias. Los virus bacterianos, por tener un diámetro menor de 1000 Å, están por debajo del límite de resolución del microscopio óptico; sin embargo, es posible observarlos mediante el microscopio electrónico porque éste utiliza una radiación de longitud de onda más corta que permite aumentar 100 mil veces una resolución de 10 Å (Kruger *et al.*, 2000; Ackermann, 2003). Para observar detenidamente la morfología se requiere el microscopio electrónico con especificaciones precisas como el de barrido lo cual es una herramienta indispensable en biología molecular (Guzmán, 2015).

Para la observación, las partículas se suspenden en un medio volátil, por lo general una solución de acetato de amonio, y se colocan sobre una membrana sostenida por una rejilla metálica que prácticamente no absorbe electrones. El problema técnico más frecuente es la falta de contraste, como la imagen obtenida es el resultado de la dispersión de electrones por los átomos de la partícula se necesita una diferencia apreciable de poder dispersivo entre las partículas y el medio de soporte, generalmente se emplean técnicas tradicionales. La más utilizada se conoce como tinción negativa, consiste en mezclar la suspensión del bacteriófago con fosfotungstato de sodio o acetato de uranilo a pH neutro. A este pH las sales no se combinan con el bacteriófago, al secarse forman una capa uniforme y opaca a los electrones en la cual los bacteriófagos destacan como partículas más claras. Como las sales en solución penetran las irregularidades en la superficie de la partícula, la micrografía revela los detalles finos de los bacteriófagos (Fuster-Valls *et al.*, 2008; Montañez *et al.*, 2012).

La forma del bacteriófago se establece de manera visual, que es directa de la placa cuando las unidades formadoras de placa (UFP) que se observan a simple vista como placas líticas a contraluz (APHA, 2005).

Para estudiar la adhesión y formación celular en diversas superficies, se han desarrollado varias técnicas de microscopía, entre las cuales se distinguen la microscopía electrónica de barrido y de transmisión así como la microscopía de epifluorescencia (Fuster-Valls *et al.*, 2008), la cual se basa en los mismos principios de óptica de la microscopía común, con diferencias en el manejo y el diseño relacionadas con la generación y transmisión de longitudes de onda adecuadas a los fluorocromos que se quieren visualizar,

ya sean propios de la muestra o de la coloración utilizada (Franco, 2005).

El fundamento de la técnica radica en la capacidad que muestran algunos elementos o compuestos fluorescentes, denominados fluorocromos, en fijarse a los anticuerpos mediante un enlace químico estable que no puede romperse durante el curso de la reacción inmunológica. La espectroscopia de fluorescencia es la técnica de detección óptica más sensible. En el caso de la detección en células se exponen a alta energía utilizando lámparas de xenon excitando por varios nanosegundos y así emitiendo una longitud de onda de baja energía (Franz y Jendreizik, 2015)

H Fagoterapia

Las enfermedades infecciosas están catalogadas entre las primeras causas de muerte en el mundo y, por lo tanto, son consideradas un problema de salud pública. Entre ellas, las infecciones bacterianas causan gran preocupación, dado que las bacterias adquieren día a día mayor resistencia a los antibióticos; esto ocurre por medio de diversos mecanismos fisiológicos y moleculares que les permiten a estos microorganismos adaptarse rápidamente a condiciones adversas (Prada-Peñaranda, *et al.*, 2015).

El descubrimiento de los bacteriófagos, por d'Herelle se desarrolló cuando éste buscaba una vacuna que pudiera combatir la crisis de disentería hemorrágica que se presentó en 1915 en las afueras de Francia. d'Herelle observó que tras aislar lisados libres de bacterias de la materia fecal de los enfermos las bacterias eran destruidas por un agente desconocido, invisible capaz de destruir cultivos de bacterias o producir pequeñas áreas de color más claro cuando las bacterias eran crecidas en confluencia en placas de medio sólido, y publicó sus observaciones en el artículo titulado, "Sobre un microbio invisible antagonista de los bacilos de la disentería (Segundo *et al.*, 2010; Szafranski *et al.*, 2017).

El uso de los bacteriófagos como agentes terapéuticos comenzó hace más de 80 años. Entre los ejemplos más destacados y recientes de la utilización exitosa de la fagoterapia cabe citar el uso de bacteriófagos específicos en el control biológico de *E. coli* O157:H7 productora de colitis hemorrágica (en alimentos). También se ha estudiado el uso

de fagos en el tratamiento de infecciones peritoneales y otitis externa, en la erradicación de *P. aeruginosa* en pacientes con fibrosis quística, en el tratamiento de infecciones urinarias y osteomielitis por *S. aureus* y en la descolonización intestinal para combatir las infecciones por *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina, entre otros. Los efectos favorables de la fagoterapia podrían exceder incluso su actividad antibacteriana. Hay datos sorprendentes acerca de la actividad in vivo de los fagos: el conocido bacteriófago T4 de *E. coli* podría inhibir la adsorción y la replicación de adenovirus en sus células blanco, y el fago Pf4 de *P. aeruginosa* habría sido capaz de inhibir el desarrollo de cepas de *Aspergillus* por secuestro de hierro (Lopardo, 2017).

El estudio y desarrollo de nuevos tratamientos alternativos es de particular interés en la lucha contra la resistencia bacteriana. Los bacteriófagos presentan características que los hace una excelente herramienta contra las bacterias patógenas debido a su especificidad y seguridad ecológica. Los bacteriófagos no solo son atractivos desde un punto de vista clínico, Se han utilizándolos como potenciales aplicaciones en otras áreas, como la agricultura, el control de alimentos o la industria, como a continuación se describe en la siguiente tabla 5.

Tabla 5 Principales lugares donde se pueden encontrar bacteriófagos: la naturaleza, lugares urbanizados y cuerpo humano (Domingo-Calap. y Delgado-Martínez., 2018).

Fuente	Sitio encontrado
Naturaleza	Suelo
	Superficie terrestre
	Agua fresca
	Océano
	Superficie oceánica
Lugares artificiales	Ambientes extremos: hielo marino, pared de algas, zonas hipersalinas, etc
	Hospitales y zonas similares
	Planta de tratamiento de aguas negras
	Algunas zonas bajo el impacto humano
Cuerpo de animales	Tracto digestivo
	Vagina
	Tracto respiratorio y oral
	Piel
	Epitelio mucoso

Conforme a la tabla anterior, los fagos son una solución ecológica ubicua para desarrollar nuevos tratamientos contra las bacterias, aunque se deben realizar más estudios para comprender mejor la relación entre ellos y las bacterias antes de su aplicación (Domingo-Calap. y Delgado-Martínez., 2018).

Los productos comerciales para terapia fágica se distribuyen en diferentes presentaciones. Los fagos se pueden distribuir liofilizados y se disuelven antes de la administración por vía intravenosa en un soporte adecuado como por ejemplo una solución acuosa o tampón o suspenderse en cualquier líquido adecuado, coloidal, o de la matriz de polímeros para crear bactericidas; el principio activo se puede administrar de una manera conveniente, como por inyección (subcutánea, intravenosa, administración, etc.) por vía oral, pulmonar (por ejemplo, aerosoles o por otros dispositivos a los pulmones), spray nasal, intramuscular, intraperitoneal intrahecal, intravítrea, vaginal, rectal, la punción lumbar, y la aplicación directa. Dependiendo de la vía de administración, el principio activo puede estar recubierto

de un material que preserve la sustancia de la acción de enzimas, ácidos y otras condiciones naturales que pueden inactivar la sustancia (por ejemplo, comprimidos recubiertos entéricos o pastillas). Empresas dedicadas a la biotecnología se dedicaron a desarrollar productos utilizando fagos específicos para eliminar las bacterias que causan ETA; la Administración de drogas y alimentos de los Estados Unidos de Norteamérica (FDA), incluye a los fagos en la categoría de "aditivos alimentarios", la FDA ha publicado la aprobación de seis bacteriófagos para usar en alimentos listos para comer (ready to eat) efectivos para *listeria monocytogenes* de la compañía *Intralytix*. La compañía *Omnilytics* ofrece productos de control bacterial para varias áreas, como son, agricultura, agua y alimentos, industrias que se pueden observar en su página web (<https://www.omnilytics.com/>) y otras empresas como Biophage Pharma Inc (Cánada); Exponential Biotherapies (Estados Unidos) (Segundo, 2010).

Estas nuevas estrategias de intervención eco-amigable son requeridas como agente de biocontrol en contra de *Salmonella*. Los bacteriófagos han recibido mucha atención en los últimos años debido a sus características prometedoras como la de tomar un objetivo específico sin dañar la micro-flora en la que coexiste, baja toxicidad, robustez a los ambientes duros, distribución de esparcimiento, auto-replicación y producción relativamente barata y sencilla, algunos ejemplos de la aplicación de los bacteriófagos son los descritos en la siguiente tabla 6 (Oh y Park, 2017).

Tabla 6 Productos con bacteriófagos aprobados para aplicaciones de seguridad alimentaria (Oh y Park, 2017)

Compañía	Producto del fago	Organismo huésped	Regulación	Certificación
FINK TEC GmbH (Hamm, Germany)	Secure Shield E1	<i>E. coli</i>	FDA, GRN 724 pending as of 19 March 2018	
Intralix, Inc. (Baltimore, MD, USA)	Ecolicide®(EcolicidePX™)	<i>E. coli</i> O157:H7	USDA, FSIS Directive 7120.1	
	EcoShield™	<i>E. coli</i> O157:H7	FDA, FCN 1018; Israel Ministry of Health; Health Canada	Kosher; Halal
	ListShield™	<i>L.monocytogenes</i>	FDA, 21 CFR 172.785; FDA, GRN 528; EPA Reg. No. 74234-1; Israel Ministry of Health; Canada	Kosher; Halal; OMRI
	SalmoFresh™	<i>Salmonella spp.</i>	FDA, GRN 435; USDA, FSIS Directive 7120.1; Israel Ministry of Health; Health Canada	Kosher; Halal; OMRI
	ShigaShield™ (ShigActive™)	<i>Shigella spp.</i>	FDA, GRN 672	
Microcos Food Safety (Wageningen, Netherlands)	PhageGuard Listex™	<i>L.monocytogenes</i>	FDA, GRN 198/218; FSANZ; EFSA; Swiss BAG; Israel Ministry of Health; Health Canada	Kosher; Halal; OMRI; SKAL
	PhageGuard S™	<i>Salmonella spp.</i>	FDA, GRN 468; FSANZ; Swiss BAG; Israel Ministry of Health; Health Canada	Kosher; Halal; OMRI; SKAL
		<i>E. coli</i> O157:H7	FDA, GRN 757 pending as of 19 March 2018	
Passport Food Safety Solutions (West Des Moines, IA, USA)	Finalyse®	<i>E. coli</i> O157:H7	USDA, FSIS Directive 7120.1	
Phagelux (Shanghai, China)	AgriPhag	Xanthomonas campestris pv. vesicatoria, Pseudomonas syringae pv. tomato	EPA Reg. No. 67986-1	
		<i>Salmonella spp.</i>	FDA, GRN 603	
	SalmoPro®	<i>Salmonella spp.</i>	FDA, GRN 752 pending as of March 19, 2018	

III. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

A Objetivo general

El objetivo general de este estudio es aislar y caracterizar bacteriófagos contra *Salmonella* a partir de diversas fuentes para su uso potencial en el control biológico

El control de *Salmonella* es de gran interés para la industria alimentaria por lo que encontrar alternativas para su eliminación puede ser de gran impacto en la salud pública.

B Objetivos específicos

1.- Aislar bacteriófagos contra *Salmonella* spp provenientes de muestras de aguas residuales y de muestras de lavado de pollo.

2.- Caracterizar parcialmente los bacteriófagos aislados en base a su morfología y análisis de rango de huésped.

3.- Analizar el efecto de los bacteriófagos aislados sobre muestras de biofilms de *Salmonella* spp en discos de acero inoxidable.

C Plan de trabajo

Para alcanzar los objetivos establecidos, se considera la ubicación de las fuentes para la obtención de los bacteriófagos, en este caso el medio seleccionado son ríos, arroyos, así como un establecimiento donde se procesan canales de pollo en la zona metropolitana de Monterrey y las lagunas de oxidación de aguas residuales en Marín, ambas localidades en Nuevo León, México.

Posteriormente, se verifica cuáles de las 39 muestras a través de la técnica ADC se encuentran bacteriófagos y de estos saber cual tiene la condición de ser lítico para *Salmonella* entérica CECT 4138, y posteriormente se realizan pruebas de selectividad a los fagos, la idea principal es caracterizar los fagos aislados (por rango de huésped y morfología) aquí se incluyen varias cepas de *Salmonella* y cepas de *E. coli*.

Salmonella sp presenta un período de incubación es por lo general entre 12 y 36 horas y la contaminación bacteriana de las superficies puede dar como resultado la

Objetivos y plan de trabajo

formación de biofilm, y para este estudio se probaron en discos de acero inoxidable, con condiciones de humedad, en concentraciones de bacteriófagos en tiempo de hasta 72h, en 3 concentraciones 6, 7, y 9 UFP/mL.

Con el fin de conseguir este objetivo, el presente trabajo se ha estructurado en tres secciones como se explicó anteriormente y como se puede observar en la figura 5, considerando a las pruebas con DEM en discos de acero inoxidable.

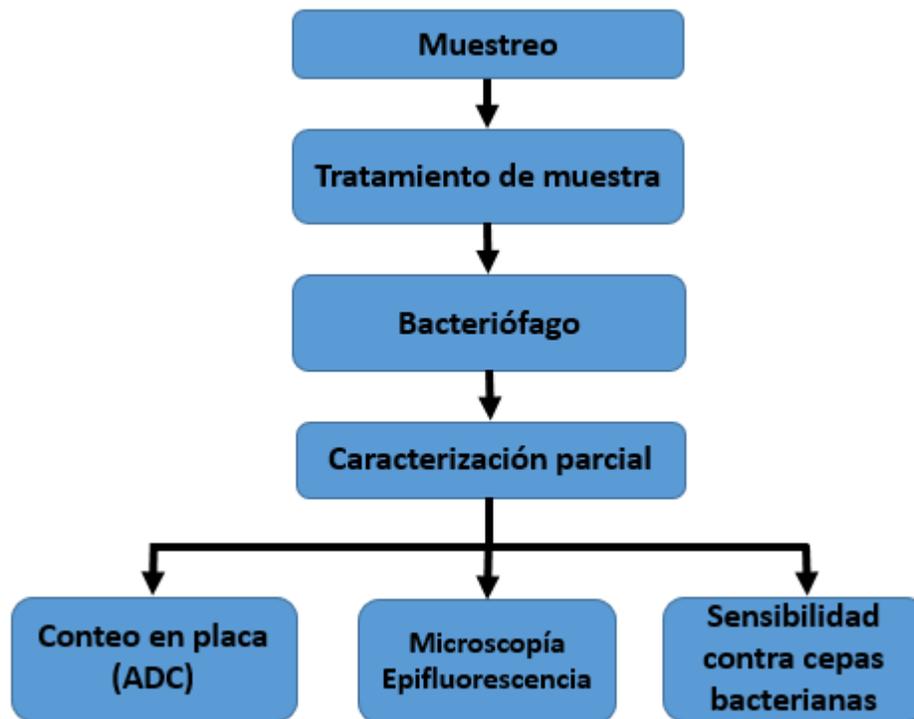


Figura 5 Diagrama general de trabajo

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

A Toma de muestras

Las muestras para obtención de bacteriófagos se recolectaron en diez sitios del área metropolitana de Monterrey y del municipio de Marín, Nuevo León, (tabla 7). El método que se utilizó para aislar fagos de diversas fuentes medio ambientales y su posterior traslado al laboratorio fue el descrito por Higgins *et al.* (2005). Se obtuvieron las muestras provenientes de aguas residuales y ríos, se emplearon frascos de 450 mL previamente lavados y secos, que posteriormente se impregnaron con una solución de tiosulfato de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) al 10% (p/v) (de Sigma-Aldrich, EE.UU.) y se esterilizaron en autoclave, 121°C/15min. Al momento de hacer la recolección en campo los frascos fueron abiertos cuidadosamente y se llenaron con el líquido, se almacenaron en hieleras para su traslado al laboratorio; el tiempo que transcurrió desde la toma de la muestra hasta la llegada al laboratorio fue entre 1 y 3 h, posteriormente las muestras se centrifugaron el mismo día y los sobrenadantes se almacenaron 4°C hasta su uso (Vidales-Contreras *et al.*, 2006).

A cada una de las muestras obtenidas en el muestreo se le agregó 2.5% de cloroformo (grado de reactivo 99.5% de Sigma-Aldrich, EE.UU.), para conservarlas en condiciones óptimas para su posterior llegar al laboratorio; se mantuvieron a 4°C durante toda la noche para permitir que el material grueso decante. Mientras tanto, en lo referente a las muestras obtenidas de aguas provenientes de los establecimientos expendedores de pollos, las muestras se trataron igual, pero como el sobrenadante contiene grasa se optó por filtrar y posteriormente se realizó el mismo procedimiento antes descrito.

Tabla 7. Sitios de muestreo para la obtención de bacteriófagos

Municipio	Sitio de la toma	N. de muestras	Tipo de agua
Monterrey	Parque Fundidora	3	Agua de estanque y corriente
	Río Santa Catarina	10	Agua corriente
	Establecimiento de comida	2	Agua del lavado del pollo
	Av. Conductores	2	Agua corriente
Marín	Lagunas de oxidación del sistema de desechos de agua municipal	10	Agua de estanque y corriente
	Río La Libertad	2	Agua corriente
Guadalupe	Alcantarillas de la colonia La Azteca	3	Agua corriente
	Establecimientos de venta de carne de pollo y derivados	2	Agua del lavado del pollo
San Nicolás de los Garza	Alcantarillas de la colonia Anáhuac	2	Agua corriente
Pesquería	Río Pesquería	3	Agua corriente

Se Buscó que las muestras de agua procedieran de sitios cercanos a las salidas de drenaje de hospitales, así lo mencionan varios autores (Tomat *et al.*, 2014; Mattila *et al.*, 2015; McShan y Nguyen, 2016). Esto tiene mucha importancia ya que la bibliografía indica que donde hay bacterias deberían existir sus respectivos bacteriófagos y para encontrar Salmonella, este fue un sitio estratégico.

B Obtención de bacteriófagos

Para aislar los bacteriófagos se utilizó la técnica descrita por Sambrook y Russell (2001) la cual se describe a continuación. En un tubo de ensayo (16/150 mm de la marca Fisherbrand, EE.UU.) conteniendo 4.5 mL de agar suave (AS) (Bioxon, México), manteniéndose a temperatura de 40°C (en una cuba hidroneumática con agua), se colocaron 500 µL de un cultivo de *S. Enteritidis* (provenientes del cepario del CINSP) en fase logarítmica, y se agregaron 300 µL de las muestras recolectadas en las que se presume contenían los bacteriófagos específicos para esta cepa. Se agitó el tubo de ensayo

mezclando con movimientos circulares suaves para evitar la formación de burbujas, este procedimiento se realizó aproximadamente por 5 segundos. El contenido se vertió uniformemente sobre una caja de Petri (de 100/15 mm, Fisherbrand, EE.UU.) conteniendo agar soya tripticasa (AST) (Bioxon, México), y se dejó a temperatura ambiente hasta solidificar la doble capa de agar (ADC). Se incubó a 37°C por 24h. Al momento de observar el desarrollo de las placas de lisis (calvas) se procedió al aislamiento de los bacteriófagos. Su cuantificación se realizó de manera directa e inmediata, ya que las calvas son visibles con una iluminación de contraste (Breeuwer *et al.*, 2003). Posteriormente los bacteriófagos que si formaron halos de inhibición fueron aislados de manera directa o siguiendo uno de los dos protocolos (enriquecimiento y sin enriquecer), debido a que depende principalmente de la amplificación del fago y las características de cada uno, se describen a continuación.

B1. Protocolo de enriquecimiento para la obtención bacteriófagos

Con el protocolo de enriquecimiento se proporcionó las condiciones óptimas de desarrollo al cultivo de la bacteria huésped y la muestra, al inocular el cultivo en la muestra, y de esta manera amplificar los posibles bacteriófagos que presentes en la muestra de agua.

Se realizó este protocolo de la siguiente manera: primero se seleccionó la cepa bacteriana que será el huésped, esto se consiguió haciendo un cultivo fresco (AST) (Bioxon, México), y se seleccionó una colonia definida de un cultivo “*overnight*”. Por otra parte, se prepararon alícuotas (10 mL cada una) de cada una de las muestras recolectadas (enriquecidas con cultivo bacteriano) y se centrifugan a 2700 g (centrifuga Eppendorf 5804R), durante 15 min a 4°C; después, el sobrenadante se pasó por jeringa y con filtros de 0.22 µm (Millex-GP, polyethersulfone, 33 mm, radio-sterilized). Estas dos entidades biológicas se unieron en un matraz de capacidad de 50 mL y se añadieron 20 mL de caldo soya tripticasa (TSB, Bioxon, México) a doble concentración (20%). En este matraz se agregaron 300 µL de la muestra previamente filtrada con bacteriófagos y 500 µL de cultivo bacteriano fresco, y se incubó a 37°C por 24h, posteriormente por medio de la técnica de ADC se pudo observar la formación de halos de lisis de los bacteriófagos (Vidales-Contreras *et al.*, 2006).

B2. Protocolo sin enriquecimiento para la obtención de bacteriófagos

El protocolo se emplea para adicionar directamente de la muestra una alícuota y testarla con la bacteria huésped.

Se siguieron los pasos anteriormente descritos a este protocolo, primero se seleccionó la cepa bacteriana (huésped), esto se realizó haciendo un cultivo fresco (AST) (Bioxon, México), y se seleccionó una colonia definida de un cultivo “*overnight*”. Por otra parte, se preparó alícuotas (10 mL) de cada una de las muestras recolectadas y se centrifugaron a 2700 g (centrifuga Eppendorf 5804R), durante 15 min a 4°C; después, el sobrenadante se pasó por jeringa con filtros de 0.22 µm (Millex-GP, polyethersulfone, 33 mm, radio-sterilized). Estas dos entidades biológicas se unieron en un matraz de capacidad de 50 mL y se añadieron 20 mL de caldo soya tripticasa (TSB, Bioxon, México) a doble concentración (20%). A este matraz se agregaron 300 µL de la muestra filtrada con bacteriófagos y 500 µL de cultivo bacteriano fresco, y se incubaron a 37°C por 24h, posteriormente por medio de la técnica de ADC se observaron la formación de halos de lisis de los bacteriófagos (Vidales-Contreras *et al.*, 2006).

B3. Puesta a punto de las entidades biológicas

Después de que los cultivos bacterianos se reactivaron, la preparación para trabajar con ellos fue la siguiente: se tomó una asada de una colonia bacteriana bien diferenciada y se incubó en un tubo inclinado (punta de flauta), se dejó el cultivo toda la noche y posteriormente se traspasó a un subcultivo en caldo con infusión cerebro-corazón (ICC, Merck, Alemania) e incubó a 37°C durante 24h, posteriormente se subcultivó en agar ICC en las mismas condiciones. Una colonia aislada en tubo punta de flauta se inoculó en 9 mL de agua peptonada (3M, México) y se incubó a 37°C durante 24h, luego se realizaron mezclas seriadas en diluyente (1 g/L triptona, 8.5 g/L NaCl, pH 7.2) (Merck, Alemania) y se implantaron en las superficies de los discos de acero inoxidable tipo 1.4301 de 2.0 cm de diámetro y un espesor de 1.2 mm con un volumen inferior a 50 µL. Como control del inóculo se prepararon 5 placas de TSA.

En el caso del bacteriófago obtenido, se amplificó realizando la infección en repetidas ocasiones hasta alcanzar una concentración de 1×10^7 UFP/mL.

B4. Activación y mantenimiento de cultivos

Para la realización de este estudio se utilizaron cepas bacterianas de *Salmonella* enterica y *E. coli* provenientes de diversas colecciones de los laboratorios involucrados, también se utilizó un bacteriófago de prueba (PRD1) para ser utilizado como control positivo en los aislamientos. En la tabla 8 se muestran las bacterias y el fago indicando su denominación y origen, así como las condiciones de conservación.

Tabla 8. Origen de las entidades biológicas y condiciones de conservación

Origen	Cepa bacteriana/ bacteriófagos	Clave	Condiciones de conservación
FaSPyN	<i>S. Typhimurium</i>	ATCC 13311	Glicerol a -20°C
	<i>S. Paratyphi</i>	ATCC 9150	
	<i>S. Enteritidis</i>	ATCC 13076	
FCB	<i>S. Typhi</i>	ATCC 19430	BGA, TSA, 4°C
	<i>S. Typhimurium</i>		TSA, 4°C
FAUANL	Bacteriófago PRD1		Tampón fosfato, 4°C
	<i>E. coli</i>	CECT 515	
	<i>E. coli</i>	K12	
	<i>E. coli</i>	ATCC 10536	
	<i>E. coli</i> O157:H7	CECT 4783	
	<i>S. bongori</i>	ATCC 43975	
FV-UAB	<i>S. enterica</i>	LT2	Vial liofilizado a -20°C
	<i>S. enterica sub. enterica</i>	CECT 4138	
	<i>S. enterica sub. enterica</i>	CECT 4594	
	<i>S. enterica sub. enterica</i>	CECT409	
	<i>S. enterica sub. enterica</i>	CECT 698	
	<i>S. Typhimurium</i>	CCUG 29478	

Notas: FaSPyN (Facultad de Salud Pública y Nutrición, UANL); FCB (Facultad de Ciencias Biológicas, UANL); FAUANL (Facultad de Agronomía, UANL), Unidad Marín, NL; FV-UAB (Facultad de Veterinaria, UAB); BGA, (agar verde brillante, Brilliant Green Agar); TSA, (agar soya tripticasa, Trypticase Soy Agar); ATCC (American Type Culture Collection); CECT (Colección Española de Cultivos Tipo); CCUG (Culture Collection University of Göteborg).

Para la reactivación de los cultivos que se almacenan a 4°C, se dejaron a temperatura ambiente; igualmente para los congelados. Posteriormente para sacarlos del estrés se sembraron en medio de cultivo fresco (AST) (Bioxon, México) y se incubaron a 37°C por 24 horas, tras estas condiciones ya se pudieron utilizar en los ensayos (McLaughlin *et al.*, 2006). A continuación, se describe la forma en que se reactivaron los cultivos en este estudio, de acuerdo a la forma en que estaban almacenados:

a) Cultivos almacenados en glicerol:

- Se descongelaron los viales a temperatura ambiente.
- Se transfirieron 5 µL de cultivo en 20 mL de TSB (Becton Dickinson and Co.) y se incubó a 37°C toda la noche.
- Se sembró en tres campos en caja de Petri de 90 mm con TSA (Becton Dickinson and Co.).
- Se incubó a 37°C por 24h.
- Se seleccionó una colonia aislada y bien diferenciada.
- El cultivo (colonia) se incubó en 20 mL de TSB a 37°C toda la noche.

b) En caso de los cultivos liofilizados:

- En el vial se hidrataron los cultivos agregando 1 mL de TSB e incubando 1h a 37°C.
- Se vertió el cultivo en 20 mL de TSB y se incubó a 37°C toda la noche.
- Se realizó el mismo proceso anteriormente mencionado en a).

B5. Método de agar doble capa (ADC)

La siembra o inoculación consistió en introducir artificialmente una porción de muestra (inóculo) en un medio adecuado, con el fin de iniciar un cultivo microbiano, para su desarrollo y multiplicación. Una vez inoculado el medio, se incubó a una temperatura adecuada para el óptimo crecimiento, en promedio 37°C. Los métodos de conteo en placa, como capa doble y capa simple de agar, se basan en la determinación de la concentración viral, mediante el conteo de unidades formadoras de placa (UFP), las cuales son zonas de aclaramiento circular o halo de inhibición de crecimiento bacteriano que se producen en la capa o césped bacteriano, debido a la lisis producida por los fagos. Inicialmente una

partícula de fago infecta a su bacteria huésped, se replica y posteriormente se disemina, generando una zona circular sin crecimiento de la bacteria (Solano *et al.*, 2012). Por esta razón en nuestro estudio se utilizó esta manera de trabajar, considerando las diferentes formas que se puede presentar los halos de inhibición (forma, tamaño, densidad).

La técnica se basó en mezclar el cultivo bacteriano en fase logarítmica y el bacteriófago en agar suave (AS), también llamado top agar cuando se aplica a la placa de Petri, donde se realizó el proceso de infección. El AS se preparó con TSB y agar bacteriológico (15%) para obtener una consistencia semisólida que permita el desarrollo de las calvas en el césped bacteriano. Se mantuvo a una temperatura adecuada para conservar el estado líquido y se agitó cuidadosamente para dejar interactuar los cultivos fago-huésped en el tubo de ensayo, posteriormente se dispersó de manera uniforme en placas de Petri de 90 mm de diámetro con 15 mL de TSA. La suspensión (césped bacteriano en ADC) se dejó solidificar a temperatura ambiente unos minutos y posteriormente se incubó 24h a 37°C (Vidales-Contreras *et al.*, 2006).

B6. Modelo de infección

Las enzimas endolisinas de los bacteriófagos provocan la lisis, debilitamiento y rompimiento de la pared celular, de las bacterias. La lisis depende de la proporción de fagos y huésped, o multiplicidad de infección (*Multiplicity of infection* MOI). Cuando hay una MOI baja, la relación de fagos a bacterias no es superior a 2:1 (relación directa). Cuando la MOI es alta, es decir, muchos bacteriófagos frente a pocas bacterias, las células se lisan directamente (Dimmock *et al.*, 2007).

En ese sentido la Norma ISO 10705-1:1995 indica que durante el ensayo el bacteriófago en fase de multiplicación experimenta varios ciclos de replicación, lo que resulta en la muerte de la célula huésped que ha actuado como fábrica para la producción viral. El modelo que se siguió es para observar los halos de inhibición y contrastar los resultados. En la figura 6 se presenta el modelo de infección utilizado con *S. Typhimurium* y el bacteriófago PRD1. siguiendo el modelo de Vidales-Contreras *et al.* (2006) y la puesta a punto de Sambrook y Russell (2001).

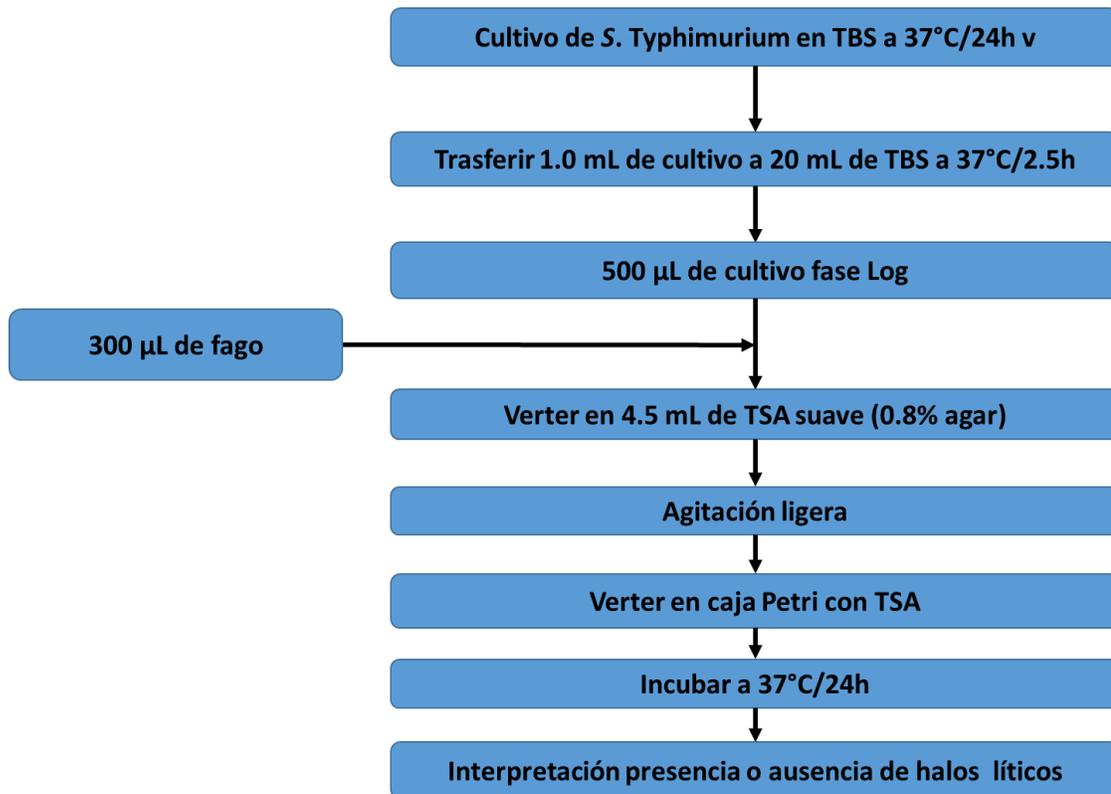


Figura 6. Diagrama de flujo utilizado para realizar la infección bacteriófago-huésped.

B7. Controles utilizados durante los ensayos

Se utilizó la cepa de *S. Typhimurium* y el bacteriófago PRD1 como control positivo para observar la formación de las calvas; para el control negativo se utilizó agua esterilizada, con esto se asegura que si existe infección y evitar los falsos positivos, que ocurren primordialmente por contaminación.

- Para control negativo, el césped bacteriano se obtuvo de la siguiente manera: en un tubo de ensayo se depositaron 4.5 mL de AS y se le agregaron 500 µL de cultivo de *S. Typhimurium* en fase logarítmica, más 300 µL de agua destilada estéril, la mezcla

se vertió en placa Petri con TSA.

- Como control positivo, el césped bacteriano y las placas de lisis se obtuvieron como sigue: en un tubo de ensayo se depositaron 4.5 mL de AS y se le agregaron 500 μ L de cultivo de *S. Typhimurium* en fase logarítmica, más 300 μ L de bacteriófagos PRD1, la mezcla se vertió en placa Petri con TSA.

B8. Curva de crecimiento de *Salmonella Typhimurium*

Para realizar los ensayos microbiológicos se requirió trabajar con la misma cantidad de biomasa en una fase de crecimiento similar. El conteo en placa es un método de medición de biomasa que permite el recuento de células viables y consiste en determinar el número de células capaces de reproducirse y generar colonias sobre un medio sólido (cada célula viable da origen a una colonia). Para este estudio y ver el efecto de los fagos sobre las bacterias primeramente se calculó la curva de crecimiento celular, pues es imprescindible para realizar la infección que la bacteria huésped y se encuentre en fase logarítmica. Es decir, para determinar la biomasa bacteriana se mide la cinética de crecimiento celular y se considera que se ha alcanzado la fase de crecimiento exponencial cuando la concentración es de 10^8 UFC/mL (McLaughlin *et al.*, 2006).

Para el conteo bacteriano se utilizó el método de filtración por membrana:

- Se transfirió 1 mL del cultivo bacteriano fresco a 20 mL de TSB y se incubó a 37°C.
- Cada 30 minutos se recolectaron 300 μ L de cultivo.
- A cada alícuota recogida se le realizaron diluciones seriadas con 2.7 mL de agua destilada estéril hasta obtener un factor de 10^{10} .
- De cada una de estas diluciones se obtuvieron 100 μ L que se filtraron por membrana de celulosa 0.45 μ m (Millipore Corporation Billerica, Ma 47 mm estéril. Cat. No. JMX000089, Millipore) montada en un embudo de filtración magnético de 47 mm (Pall GELMAN Laboratory con capacidad de 300 mL), y con bomba de vacío (GM motors & industrial systems, Modelo: 5kh36kna510x).
- Las membranas se colocaron en caja de Petri con TSA, y se incubaron 24h a 37°C.

C Concentración y purificación de bacteriófagos

Con excepción de la microscopía electrónica, los métodos empleados para determinar el tamaño, forma y composición química de los bacteriófagos, requieren una alta pureza de las partículas virales. El material de partida en cualquier estudio de este tipo para la obtención del bacteriófago es cuando se presenten los halos de inhibición en el ADC; en general, además de los bacteriófagos, estas zonas claras pudieran contener los restos celulares de las bacterias, como trozos de pared, membranas, ribosomas, ADN, ARN, proteínas y otros componentes de peso molecular más bajo. El contenido de bacteriófago en un lisado es del orden de 0.01 mg/ mL, por lo que para obtener la cantidad apropiada para su caracterización es necesario partir de varios litros (Leverentz *et al.*, 2003; Maestro y Sanz, 2016)

Para llevar a cabo la purificación de los fagos se debe de realizar con concentraciones superiores a 10^{10} UFP/mL. Uno de los métodos más utilizados es la centrifugación a alta velocidad y posterior resuspensión de las partículas sedimentadas en un volumen menor. Cuando es posible esta técnica se reemplaza por un sistema de dos fases basado en la propiedad que tienen algunos polímeros de alto peso molecular, como el polietilenglicol, el dextran sulfato de sodio y el dextrano, al separarse estas fases por diferencia de pesos moleculares los bacteriófagos se dispersan en este tipo de medios, considerando las concentraciones empleadas y las condiciones óptimas de pH, fuerza iónica y temperatura y al pasar por el proceso de centrifugación se concentran en una columna. Una vez concentrado el bacteriófago en la columna, se puede recuperar fácilmente de la interfase. Los procesos más comúnmente utilizados para la purificación posterior se basan en separar las partículas de bacteriófago ya sea por su tamaño o densidad (Sambrook y Russell, 2001; Vidales-Contreras *et al.*, 2006).

En la figura 7 se presenta el procedimiento para la amplificación de bacteriófagos, que nos asegura cultivos puros, uniformes y con títulos altos, lo cual es imprescindible para conseguir una buena imagen en el microscopio electrónico.

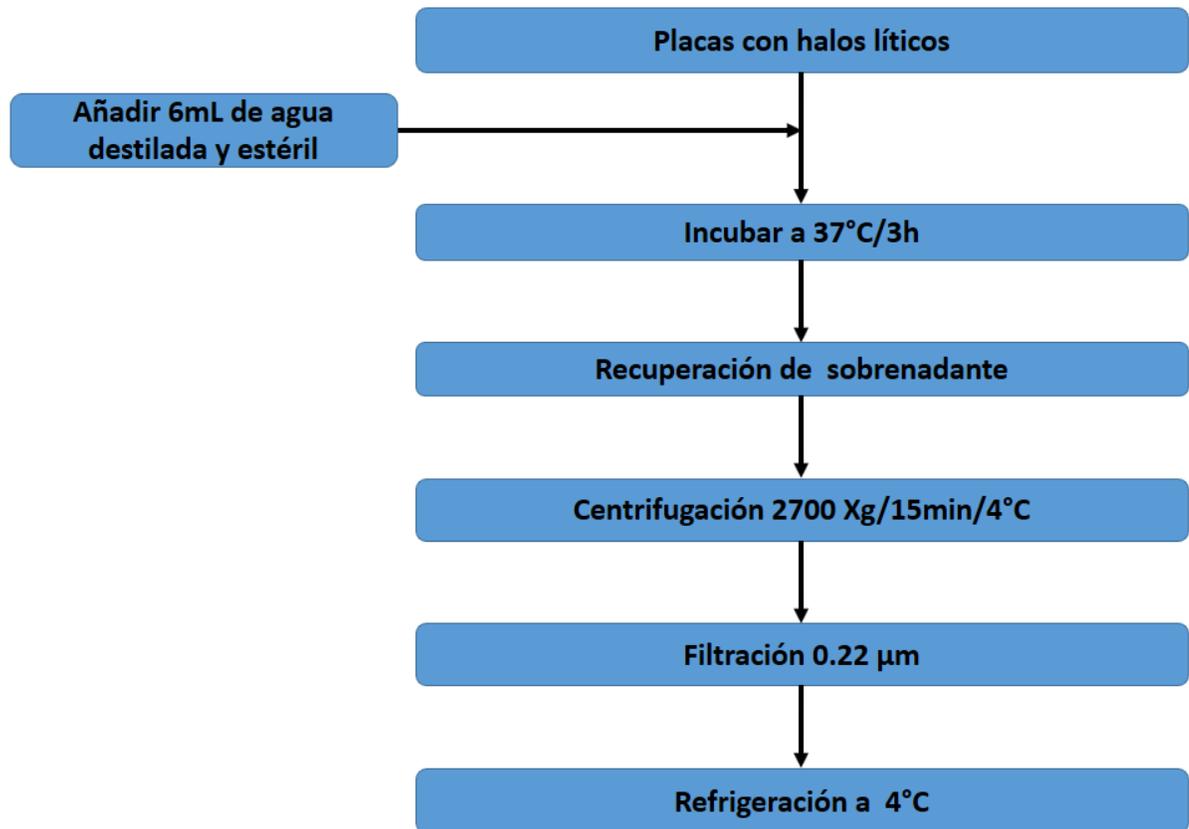


Figura 7. Técnica que se emplea para la amplificación de bacteriofagos aplicando la técnica de agar doble capa (ADC).

El método utilizado para purificar los fagos que después de utilizaron para analizar su morfología implicó el uso del kit Montage SEQ₉₆ (Millipore, Sequencing Reaction Cleanup Kit, Millipore Corporation, EEUU):

- En una placa de filtración (96 well SEQ plate by Millipore) se depositaron en cada pocillo 15 µL de concentrado de bacteriofagos más 5 µL de agua milli-Q (Injection Solution by Millipore).
- La separación se realizó por la exclusión de lavados de la columna de gel, aplicando vacío por medio de una bomba (Millipore, EEUU. Vacuum/pressure 220 V/50 Hz, 15 mm Hg).
- Posteriormente se resuspendió la muestra (Thermomixer comfort by Eppendorf) con agitación durante 1 min a 500 rpm.
- Finalmente se agregó 10 µL de agua ultra pura Milli-Q para concentrar la muestra (Injection Solution by Millipore).

Una de las modificaciones que se realizaron para obtener los fagos con elevada pureza y concentración para ser utilizada en la microscopía electrónica, se realizó con el kit Montage SEQ₉₆, que se utiliza para la purificación de DNA y en este caso se utilizó para concentrar los bacteriófagos (concentración 10^{12} UFP/mL). El procedimiento se describe a continuación:

- Se añadieron 20 μ L de buffer de inyección a la placa donde se tenía la suspensión de bacteriófagos, se resuspendió y transfirió todo el volumen a la placa azul de Millipore (kit Montage).
- Se colocó la placa en la bomba del kit Montage de 2 a 3 min hasta que quedó seca. Es aconsejable no dejar más tiempo del necesario para evitar un secado excesivo.
- Se limpió todo el exceso de líquido en la placa con papel filtro, secando un par de veces la placa sobre el papel. Inmediatamente después se colocó la placa sobre el soporte de la bomba, evitando dejarla sobre el papel.
- Se añadieron 30 μ L de buffer de inyección.
- Se colocó la placa en la bomba unos 4-5 min hasta secarse.
- Con papel filtro, se limpió todo el exceso de líquido que quedó en la placa y se colocó en el soporte de la bomba.
- Se añadieron 30 μ L más de buffer de inyección para resuspender.
- Se colocó la placa en agitación, se centrifugó a 500 g por 10 min.
- Se traspasaron los 30 μ L a un nuevo pocillo y se recolectó el sobrenadante.

D Preparación de muestras para microscopía electrónica

Con la concentración de fagos purificados se preparó la muestra para la observación al microscopio electrónico y se procedió utilizando la técnica de tinción negativa, tal como se explica a continuación.

Se depositaron 2 μ L de suspensión de bacteriófagos en un disco de capa fina de carbono y cobre (200 Mesh Holes 100 μ m square Ethene old 200, UK), después de 2 min de reposo a temperatura ambiente, se eliminó el exceso de líquido con papel absorbente. Se añadieron 2 μ L de agente de contraste, solución tampón 1% de acetato de uranilo (UO₂).

(CH₃COO)₂·2H₂O) (Merck, Alemania). Se dejó actuar el colorante durante 2 min a temperatura ambiente y se eliminó el exceso de líquido con papel absorbente, y después se dejó el disco alrededor de 5 min a temperatura ambiente antes de observar en el microscopio.

D1. Observación de bacteriófagos mediante microscopía de epifluorescencia directa (DEM, Direct epifluorescence microscopy)

La microscopía óptica es el método adecuado para la investigación de procesos celulares ya que es menos agresivo para el manejo de la muestra. Existen técnicas de microscopía con otras especificaciones donde se aplican para estudiar la adhesión celular y formación de biofilms en superficies, tales como el espectrofotómetro infrarrojo transformada de Fourier, el láser confocal de barrido y la microscopía de fuerza atómica, estos microscopios se caracterizada por detectar las células viables de las dañadas por medio de cromóforos (Montañez *et al.*, 2012). La microscopía que estamos trabajando esta basada en fluorescencia la cual utiliza cromóforos para detectar DNA de células vivas (coloración verde) y células muertas (coloración roja) y ha tenido grandes avances en la observación de tejidos, células, moléculas individuales y por consiguiente algunos restos celulares, todos estos con una excelente resolución (Pellegrotti *et al.*, 2014).

Para la observación de células mediante el DEM se utilizó el kit comercial de viabilidad Bac Light (LIVE/DEAD Bacterial Viability Kit L-13152 Thermo fisher scientific Molecular Pribes, EE.UU.) que está compuesto por dos colorantes fluorescentes de ácidos nucleicos (SYTO[®]9 y PI. SYTO[®]9) que penetran tanto en las membranas intactas como en las lesionadas, lo que permite evaluar la vitalidad de las células bacterianas basándose en la detección de la actividad de las oxidasas y reductasas bacterianas. Se observa una señal fluorescente mejorada en células bacterianas con procesos metabólicos activos. En contraste, PI SYTO[®]9 se manifiesta sólo en las células que presentan membranas lesionadas y reduce el colorante SYTO[®]9. Cuando se aplican estos dos colorantes en proporción adecuada, las células viables con membranas intactas presentarán fluorescencia verde y en contraste las células muertas o lesionadas tendrán coloración roja.

Se prepararon las muestras para ser observadas por el DEM estos pasos se

describen a continuación:

- Se colocaron 2 μL de la concentración/ suspensión de la muestra con bacteriófagos en una concentración de 1×10^{12} UFC/mL sobre un disco de acero inoxidable (tipo 1.4301 (2 cm de diámetro y 1 mm de grosor), ligeramente convexos, con una altura máxima, en el centro, de 1 mm.
- Se dejó secar a temperatura ambiente por espacio de 10 min.
- Posteriormente se aplicaron 2 μL de la solución vital de fluorescencia (LIVE/DEAD Bac Light, Thermo fisher scientific Molecular Pribes, EE.UU.) que reacciona y da la coloración al material genético de las bacterias.
- Para la observación de los discos se utilizó el microscopio de fluorescencia Olympus BX51/BX52 (Tokio, Japón) con cámara digital incorporada (DP 50 Olympus), equipado con lámpara de mercurio de 100 W (USH-103 OL Olympus), con filtro de doble paso (U-M51004 F/R V2, Olympus).
- Para enumerar las células bacterianas se trabajó con un objetivo de 20X, en el cual se ubicaban 10 campos elegidos al azar y los resultados se expresaron por cm^2 . Las imágenes se revisaron con el sistema de análisis de imagen (análisis 3.2; soft Imaging System GMBH, Alemania).

D2 Formación del biofilm y observación al DEM

El biofilm bacteriano se desarrolló en la superficie de discos de acero inoxidable tipo 1.4301 (2 cm de diámetro y 1 mm de grosor), ligeramente convexos, con una altura máxima, en el centro, de 1 mm, comprados a una industria metalúrgica. Antes de usarse deben limpiarse bien por inmersión en una solución acuosa de detergente (DINO-dis-Dipol, España) al 5% en agua durante 1 h, después se realizó la inmersión en baño con alcohol isopropílico (2-propanol) (Merck, Alemania) al 70% en agua, durante 15 min. Una vez secos se esterilizaron en autoclave a 121°C por 15 min.

Se inocularon la superficie de los discos con 50 μL de cultivo de *S. enterica*, más medio de cultivo (TSB) para proporcionar en medio rico para que se forme el biofilm, posteriormente se colocaron en cajas de Petri estériles y se mantuvieron en condiciones de humedad a temperatura ambiente durante períodos de 24, 48 y 72h, realizándoles el conteo correspondiente para verificar el desarrollo del biofilm.

Una vez formado el biofilms, se inocularon los discos con 3 concentraciones diferentes de bacteriófagos: 6, 7 y 8 log/cm², en un volumen inferior a 50 µL. Las diluciones del bacteriófago se hicieron en solución salina fisiológica (SSF; cloruro de sodio 0.80%) (Merck, Alemania). Se realizó la infección al inocular a los discos prueba y los discos de control con el mismo volumen de SSF, las condiciones de incubación se realizaron con humedad y a temperatura ambiente.

Los discos de acero inoxidable que fueron inoculados con la infección fago-bacteria se analizaron en períodos de 0, 2, 8, 24 y 48 h. Se utilizaron 6 discos para cada valoración, para cada concentración del bacteriófago, se distribuyeron de la siguiente manera: 2 para visualización microscópica panorámica, 2 para recuento bacteriano por microscopía y 2 para recuento bacteriano y de bacteriófagos en placa. En total se emplearon un total de 432 discos, por prueba.

Para el conteo, sobre cada disco se colocaron 20 µL del colorante (LIVE/DEAD Pribes) y se incubaron por 5 min a temperatura ambiente en condiciones de oscuridad, y se tomaron fotografías a 10X, 20X y 40X. Para la microscopía de recuento, y para las fotografías se realizaron a un aumento de 40X.

Cuando se formó del biofilm se requirió hacer los recuentos de bacterias y de bacteriófagos, en ese sentido, para recuperar las bacterias los discos se colocaron en un frasco con 5 mL de TSB con Tween 80 (TSBTW) (Merck, Alemania) y 3 g de perlas de vidrio, se homogeneizó la muestra por 1 min en agitador vórtex a máxima potencia para favorecer el desprendimiento de los microorganismos y posteriormente se realizaron diluciones seriadas. De este mismo extracto se obtuvo el material necesario para hacer el conteo de bacteriófagos utilizando la técnica de ADC. Y para el recuento de las bacterias viables se trabajó con cajas de Petri, se sembró 1 mL en TSA con 0.6% de extracto de levadura (TSAYE, Merck, Alemania) y se incubó a 37°C durante 24h (Fuster-Valls *et al.*, 2008).

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. Sitios de recolección y número de muestras

Se obtuvieron un total de 39 muestras que se recolectaron de 10 sitios diferentes, durante el mes de junio de 2007. En la tabla 9 se presentan los sitios y el número de muestras recogidas en cada sitio. En el caso del Rio Santa Catarina se abarcó una distancia de 9.5 kilómetros la cual presentaba diferentes zonas de descarga de aguas residuales y de ahí se hicieron las tomas en un periodo de estiaje. En el caso de las lagunas de oxidación del municipio de Marín, esta zona presenta tres lagunas con un área total de 16,700 m² se realizó el muestreo de manera aleatoria. En cuanto a las muestras que se obtuvieron en el sitio de agua de lavado de pollo se les trató de igual manera para comprobar si existían bacteriófagos.

Los lugares elegidos para la recolección de muestras son similares a los reportados en la literatura; regularmente para el aislamiento de bacteriófagos del ambiente se utilizan aguas residuales y establecimientos de manipulación y/o venta de alimentos (Leeuw *et al.*, 2017). En investigaciones previas se realizan muestreos de diversos sitios como en la piel y heces de animales, manos de los cuidadores, superficies quirúrgicas e instrumentos o utensilios usados en los establecimientos, hoteles y restaurantes (Ejo *et al.*, 2016; Yergeau *et al.*, 2016). Los muestreos de aguas también se pueden realizar en sitios cercanos a las salidas de drenaje de hospitales; esto es de gran importancia ya que donde hay bacterias posiblemente estén sus respectivos bacteriófagos (Tomat *et al.*, 2014; Mattila *et al.*, 2015; McShan y Nguyen, 2016).

En el caso de localizar alguna entida biológica, en este caso *Salmonella*, las muestras de agua se buscan en sitios cercanos a las salidas de drenaje de hospitales, así lo mencionan varios autores (Tomat *et al.*, 2014; Mattila *et al.*, 2015; McShan y Nguyen, 2016). Esto es de gran importancia porque la bibliografía indica que donde hay bacterias deberían existir sus respectivos bacteriófagos.

Tabla 9 Sitios donde se obtuvieron las muestras de agua para obtener bacteriófagos

Municipio	Sitio de la toma	N. de muestras	Tipo de agua
Monterrey	Parque Fundidora	3	Agua de estanque y corriente
	Río Santa Catarina	10	Agua corriente
	Establecimiento de comida	2	Agua del lavado del pollo
	Av. Conductores	2	Agua corriente
Marín	Lagunas de oxidación del sistema de desechos de agua municipal	10	Agua de estanque y corriente
	Río La Libertad	2	Agua corriente
Guadalupe	Alcantarillas de la colonia La Azteca	3	Agua corriente
	Establecimientos de venta de carne de pollo y derivados	2	Agua del lavado del pollo
San Nicolás de los Garza	Alcantarillas de la colonia Anáhuac	2	Agua corriente
Pesquería	Río Pesquería	3	Agua corriente

B. Aislamiento de bacteriófagos de *Salmonella*

Para el aislamiento de los bacteriófagos específicos de *Salmonella* fue necesario la puesta a punto de varios procedimientos: la técnica de agar doble capa (ADC), determinar la cinética de crecimiento de cultivos de *Salmonella*, determinar la fase de eclipse en la relación fago-bacteria (se utilizó como control la cepa *S. Typhimurium* y el bacteriófago PRD1), y su puesta a punto en el laboratorio de bioremediación de la Facultad de agronomía de la UANL.

B1. Puesta a punto de la técnica de agar doble capa (ADC) mediante *S. Typhimurium*

La acción lítica de los bacteriófagos sobre *Salmonella* se analizó utilizando la técnica ADC.

En este procedimiento es necesario tener un césped bacteriano uniforme entre dos capas de medio sólido, que puede ser agar-agar o agar-agarosa (Sambrook y Rusell, 2001). Con el objetivo de abaratar los costes y mejorar los resultados, en este trabajo se empleó esta técnica con algunas modificaciones que se describen a continuación. Así pues, se decidió que las capas fueran agar-agar, donde la primera capa fue de agar al 1.5% en medio TS, y la segunda con agar a una menor concentración para hacer la capa menos firme, por lo que fue necesario poner a punto la técnica probando diferentes concentraciones de agar; en ambos casos a pH 7.2. Además, esta adecuación es importante por el ahorro que se generó al utilizar un componente más económico que la agarosa, lo cual repercutió favorablemente en el coste de la prueba. En la tabla 10 se muestran las características de las capas en la caja Petri para un buen manejo y desarrollo de la zona lítica producida por el bacteriófago al multiplicarse.

Tabla 10 Características finales de la técnica de ADC

Parámetro	Condiciones
Agar suave (con agar) (%)	0.8
Temperatura del agar suave (°C)	49
pH del medio de cultivo (sólido y líquido)	7.2
Cantidad de agar suave (mL)	4.5
Cultivo bacteriano (µL)	500
Muestra tratada con bacteriófagos (µL)	100

Otra variable para poner a punto en la técnica de ADC es el volumen de cultivo bacteriano a utilizar para generar el césped de *Salmonella* y lograr una adecuada interacción con el bacteriófago. Se probaron 3 volúmenes diferentes de cultivo de *S. Typhimurium* incubados 24 horas a 37°C para alcanzar una concentración de 1.6×10^8 UFC/mL. Dependiendo de la cantidad de inóculo las características del césped bacteriano tienen diferente contraste lo cual puede facilitar o dificultar la observación de las placas líticas. Finalmente, el mejor resultado se obtuvo al utilizar el volumen de 500 µL, ya que se logró una mejor observación del aclaramiento del césped bacteriano al formar las placas líticas.

El cultivo huésped debe de encontrarse creciendo en medio líquido TS en fase logarítmica al momento de mezclarlo con el bacteriófago. Para identificar la fase logarítmica se probaron

diferentes tiempos de crecimiento (tabla XXX). Con todo ello se observa que la fase logarítmica de *S. Typhimurium* se encuentra en el minuto 150, coincidiendo con los datos reportados por Vidales-Contreras *et al.* (2006). Y siguiendo con esta tesis, la determinación de la concentración se realizó mediante el promedio de la enumeración de las unidades formadores de placa por placas Petri, preparadas por duplicado, multiplicado por el factor de dilución el cual es el recíproco del producto del volumen ensayado y la dilución usada para el análisis. Al final se observa cuando se ha llegado a la fase estacionaria del desarrollo bacteriano (tabla 11).

Tabla 11. Identificación de la fase logarítmica de *S. Typhimurium*

Tiempo	Minutos (Acumulado)	Dilución	UFC/mL Promedio *	F (Factor)	Concentración parcial (UFC/mL)
T ₀	0	1 x 10 ⁻⁵	9±2.5	1 x 10 ⁶	9.00 x 10 ⁶
T ₁	30	1 x 10 ⁻⁵	13±7.4	1 x 10 ⁶	1.30 x 10 ⁷
T ₂	60	1 x 10 ⁻⁵	24±5.6	1 x 10 ⁶	2.40 x 10 ⁷
T ₃	90	1 x 10 ⁻⁵	51±3.2	1 x 10 ⁶	5.10 x 10 ⁷
T ₄	123	1 x 10 ⁻⁵	211±8.9	1 x 10 ⁶	2.11 x 10 ⁸
T ₅	150	1 x 10 ⁻⁶	215±8.1	1 x 10 ⁷	2.15 x 10 ⁹

* Promedio ± Desviación Standard (DS). Según ecuación de Vidales-Contreras *et al.* (2006).

B2. Puesta a punto del modelo de crecimiento de *Salmonella spp*

Tomando en consideración el modelo infectivo *S. Typhimurium* y el bacteriófago PRD1 y utilizando la técnica ADC (mejorada según el apartado anterior) se realizó la infección de la cepa de *S. Enteritidis* y el bacteriófago MRH6 obtenido de las muestras de aguas. Los resultados de las 5 repeticiones realizadas se pueden observar en la tabla 12. La fase de eclipse es aquella en la cual es posible recuperar viriones infectantes líticos, después de lisar la célula. En el momento de la inyección del ácido nucleico hay inhibición de la síntesis y del metabolismo bacteriano, en ese sentido es importante determinar cuando el cultivo bacteriano está en su fase log, para lograr con esto una mejor interacción fago-bacteria y dibujar la curva de crecimiento de *S. Enteritidis*.

Tabla 12. Determinación de la fase logarítmica de *S. Enteritidis* (10^8 UFC/mL) y el bacteriófago MRH6 utilizando la técnica de filtración (37 °C/24h). Según ecuación de Vidales-Contreras *et al.* (2006).

Tiempo	Minutos (acumulados)	Dilución	UFC/mL*	F (factor)♦	Concentración parcial (UFC/mL)
T ₀	0	1 x 10 ⁻⁵	21.6 ± 7.10	1 x 10 ⁶	2.0 x 10 ⁷
T ₁	60	1 x 10 ⁻⁵	26.0 ± 6.08	1 x 10 ⁶	2.0 x 10 ⁷
T ₂	120	1 x 10 ⁻⁶	16.0 ± 1.73	1 x 10 ⁷	1.6 x 10 ⁸
T ₃	180	1 x 10 ⁻⁶	24.4 ± 2.08	1 x 10 ⁷	2.4 x 10 ⁸
T ₄	240	1 x 10 ⁻⁷	40.0 ± 1.00	1 x 10 ⁷	4.0 x 10 ⁹

* Promedio ± Desviación Standard (DS).

B3. Obtención de bacteriófagos contra de *Salmonella* spp

De las 39 muestras tomadas se obtuvo un total de 15 bacteriófagos aislados a partir de dos fuentes de aguas residuales, las del río Sanat Catarina y las lagunas de oxidación de Marín. Los 15 fagos se probaron contra la cepa huésped *S. Enteritidis* (obtenida del cepario del CINSP, tabla 4), tras realizar de 3 a 4 amplificaciones, la mayoría (14 bacteriófagos) no presentó actividad lítica (formación de halos de inhibición), de manera que fueron descartados para los siguientes estudios, siendo solamente uno, proveniente de la muestra del Río de Santa Catarina, el que produjo halos bien definidos en el césped bacteriano y con éste se continuó trabajando. Se propuso nombrarle como MRH6, considerando la M para muestra, la RH por el Rodrigo Hernández y el número 6 por ser la muestra de donde se obtuvo resultado con bacteriófago lítico.

B4. Diferenciación de los bacteriófagos por la formación de halo de inhibición

En nuestro estudio, las muestras de agua recolectadas fueron tratadas (para la obtención de fagos) y analizadas mediante la técnica ADC observando los halos de inhibición claros y de diferentes diámetros; estas observaciones son similares a las observadas por Ackermann (2003).

En la figura 8 se puede observar los halos de inhibición en césped de *Salmonella*, al realizar la infección se pueden observar los diferentes tamaños y la forma se da por la capacidad de ráfaga (número de copias al realizar el proceso lítico) de los fagos de la progenie, los bacteriófagos suelen tener una ráfaga de más de 100 partículas infectivas producidas en un lapso de tiempo de 0.5 – 2.0 h. Algunos halos formados por el bacteriófago fueron claros, lo que indica que es lítico de acuerdo con diversos autores (Wong *et al.*, 2014)

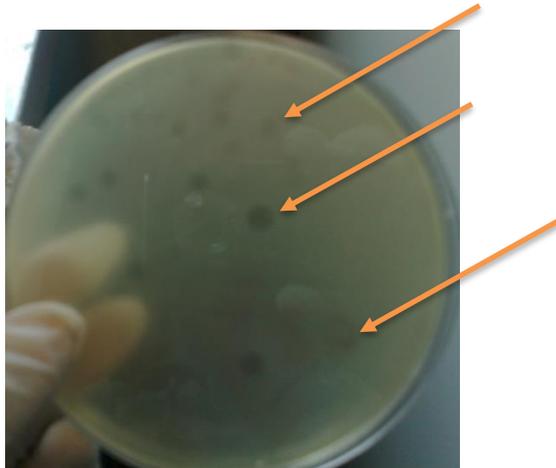


Figura 8. Césped bacteriano de *S. Enteritidis* infectado por bacteriófagos, con halos de inhibición de diferentes tamaños.

C. Selección y purificación de los bacteriófagos

Para llevar a cabo la caracterización del bacteriófago es necesario comprobar la pureza de los lisados fágicos empleados como fuente del material biológico. Al sembrar por vaciado en placa estos lisados sobre la cepa indicadora se obtuvieron diferentes tamaños de placas líticas.

En la selección de sé evalúa y seleccionar los bacteriófagos considerando varios factores entre ellos el tiempo que tarda la replicación viral (lo cual es variable), siendo que en algunos casos se pueden replicar en cuestión de minutos. Así se puede observar la formación de halos de lisis en el césped bacteriano en las cajas de Petri. En la tabla 13 se presenta el rango de huésped de los bacteriófagos aislados; se puede observar que afecta a algunas serovariedades de *Salmonella* y no tiene efecto en otras especies.

Resultados y discusión

Tabla 13. Rango de huesped de los bacteriófagos aislados contra serovariedades de *Salmonella* spp y de *E. coli*.

<i>Cepas huésped</i>	<i>Bacteriófagos</i>														
	MRH1	MRH2	MRH3	MRH4	MRH5	MRH6	MRH7	MRH8	MRH9	MRH10	MRH11	MRH12	MRH13	MRH14	MRH15
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 13311	-	-	±t	-	-	±t	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. Paratyphi</i> ATCC 9150	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. Enteritidis</i> ATCC 13076	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. Typhi</i> ATCC 19430	+	+	+	+	+	tc	+	+	+	nd	nd	nd	nd	nd	+
<i>S. Typhimurium</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. Bongori</i> ATCC 43975	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. enterica</i> LT2	-	-	±	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. sub. enterica</i> CECT 4138	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. sub. enterica</i> CECT 4594	±t	±t	±t	-	+	+	+	-	-	-	±t	-	-	-	-
<i>S. sub. enterica</i> CECT 409	-	-	-	-	nd	-	-	±t	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. sub. enterica</i> CECT 698	-	-	-	-	-	tc	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. Typhimurium</i> CCUG 29478	-	-	±	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> CECT 515	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> K12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> ATCC 10536	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> O157:H7 CECT 4783	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ATCC, American Type Culture Collection; **CECT**, Colección Española de Cultivos Tipo; **CCUG**, Culture Collection University of Göteborg; **+**, crecimiento y desarrollo de halo; **±**, indica desarrollo muy pequeño o difuso del halo; **±t**, indica desarrollo pequeño y turbio del halo; **tc**, indica turbio o con centro opaco en el centro del halo; **-**, no crecimiento o desarrollo de halo; **nd**, no descripción, aparente baja efectividad o halo difuso.

La clasificación de los bacteriófagos se basa en la morfología, el ácido nucleico, el espectro de acción y algunas consideraciones inmunológicas (Criscuolo *et al.*, 2017). Al realizar la infección de fago-bacteria y observar la presencia de halos líticos en las placas de césped bacteriano se considera que se ha producido una infección exitosa; pero previamente es necesario poner a punto el cultivo puro de ambos cultivos y considerar la concentración de cultivos a utilizar.

Así pues, la técnica ADC se repitió varias veces hasta obtener placas líticas con idéntica morfología y tamaño. En la tabla 14 se observa que hay diferentes tamaños de halos. En los primeros ensayos sólo cuatro muestras de agua (15, 21, 26 y 33) dieron halos de inhibición, pudiéndose distinguir bien la forma y el tamaño. Al realizar posteriores siembras, los bacteriófagos fueron perdiendo capacidad de infección (bacteriófagos atemperados) y sólo una muestra de las lagunas de oxidación provenientes de Marín presentó bacteriófagos con actividad lítica, y el resto de bacteriófagos no desarrolló actividad constante.

Tabla 14. Frecuencia de cada tamaño de halo de inhibición, de *S. Enteritidis* en césped bacteriano.

Distribución de tamaños de halo			
Muestra de agua	Grande	Mediano	Pequeño
15	8	23	15
21	17	11	27
26	10	18	6
33	7	9	13
Diámetro medio halo (mm)	1.055	0.671	0.376

Diámetro de halo: grande ≥ 8 mm; mediano $8 < X < 6$ mm; pequeño ≤ 5 mm

El bacteriófago que sí mostró actividad (MRH6) se amplificó y continuó con el desarrollo lítico, se trabajó y se verificó por medio de amplificaciones seriadas que los halos continuaban uniformes al considerar el tamaño uniforme como una entidad pura de bacteriófago. Los resultados obtenidos en este trabajo son semejantes a los mostrados por Thung *et al.* (2017). En la figura 9 se ilustran las imágenes donde se muestra el desarrollo de halos líticos previamente mencionados, donde se puede observar los halos uniformes contra: A) *S. Enteritidis* (del CINSP Monterrey, N. L. México), y B) *S. Typhi* ATCC 19430,

(del Laboratorio de Ciencia de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la UAB, España).

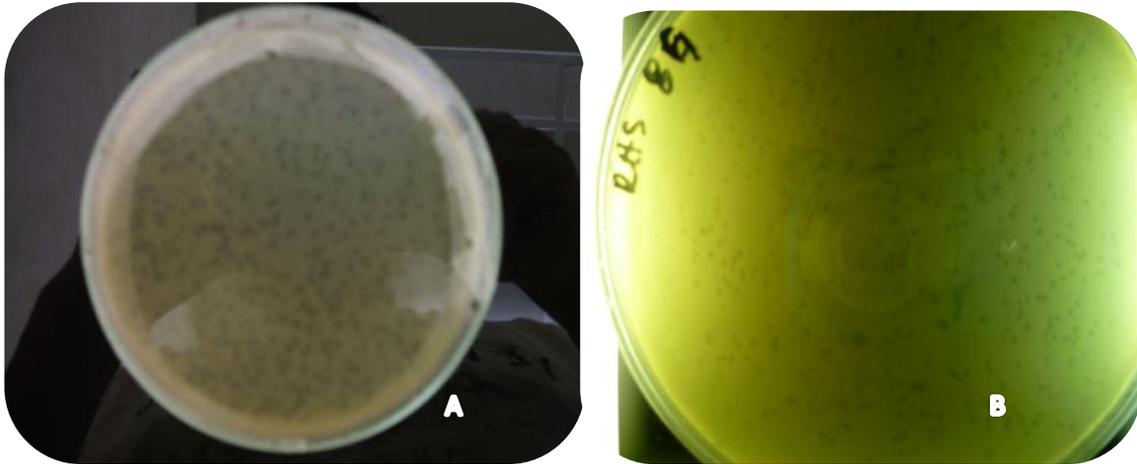


Figura 9. Placas con desarrollo de halos líticos generados por la infección fago-bacteria A) *S. Enteritidis* (CINSP) y B) *S. Typhi* ATCC 19430

La especificidad de los bacteriófagos se encuentra generalmente a nivel de cepa y también de especie, y más raramente a nivel de género. Es de interés el garantizar una eficiente infección de la dupla fago-bacteria, de esta manera se toman todas las medidas precautorias para obtener resultados fiables, en este sentido se requiere verificar todos los aspectos como son los controles (positivo y negativo). En este caso como control negativo se verificó el desarrollo de césped bacteriano de la cepa huésped y, como control positivo se consideró el modelo (PRD 1 y su respectivo huésped) empleado en el laboratorio de bioremediación de la Facultad de Agronomía de la UANL (México). Los bacteriófagos son específicos (no afecta a otros cultivos bacterianos), y no se puede descartar falsos positivos por la presencia de restos celulares bacterianos (Segundo *et al.*, 2010; Szafranski *et al.*, 2017).

D. Identificación de los bacteriófagos por microscopía electrónica de transmisión

En la figura 10 se presentan las imágenes de la morfología observada mediante el microscopio electrónico para el bacteriófago MRH6. El comité internacional de taxonomía de virus clasifica a los bacteriófagos en 1 orden, 13 familias, y 31 géneros. De los cuales se observa a los Caudovirales, y estos están constituidos por 3 familias con cola: *Myoviridae*,

Podoviridae y *Siphoviridae*.

El análisis de la microscopía electrónica, con una concentración de 1×10^{12} UFP/mL muestra una distintiva morfología de cabeza icosaédrica, estructura alargada y cola no contráctil. Estas características se corresponden con la familia *Siphoviridae*, además se confirma con el hecho de que tiene como huésped a las enterobacterias, lo que coincide con lo sugerido por otros autores (Yang *et al.*, 2017).

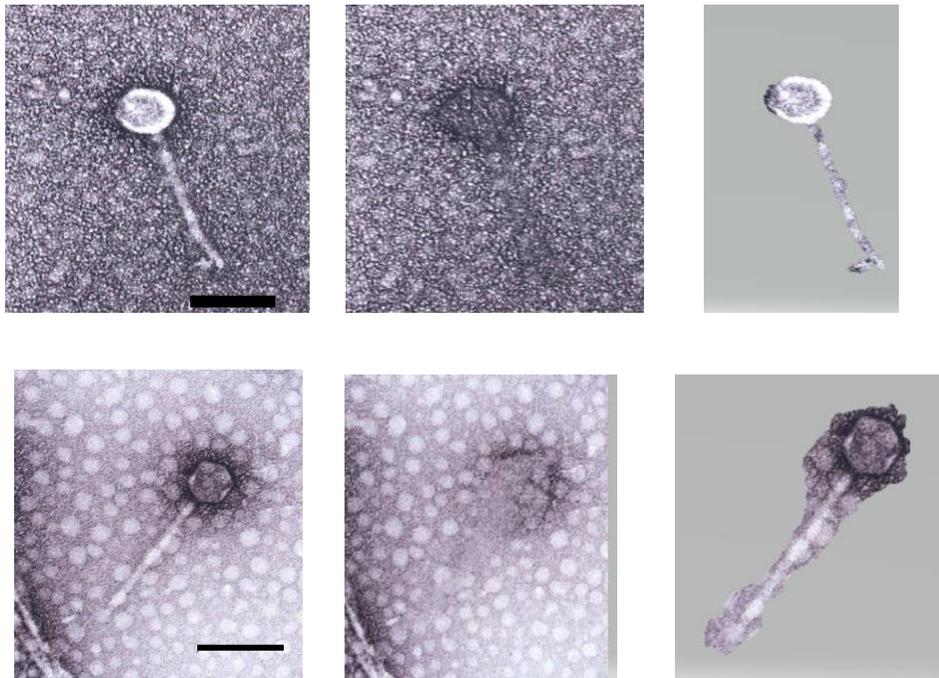


Figura 10. Imagen de microscopía electrónica de transmisión obtenidas en el servicio de microscopía de la UAB. del bacteriófago MRH6 (X100 000), la barra representa 100nm.

D1. Evaluación de la formación de biofilms de *S. entérica* en superficies de acero inoxidable y comparación de métodos de conteo mediante microscopía de epifluorescencia directa (DEM)

Para corroborar la potencial condición como agente de desinfección del bacteriófago MRH6 es necesario observar su efectividad a través de la DEM, con la que se pueden observar bacterias viables y no viables. También la materia orgánica puede dar falsos positivos (Montañez *et al.*, 2012) y se debe tener en cuenta al comparar con otros métodos de conteo.

En este trabajo, *S. enterica* CECT 4138 desarrolló biofilms en las superficies de acero inoxidable (discos tipo 1.4301 de 2.0 cm de diámetro y un espesor de 1.2 mm) y consiguieron niveles de 2.9 ± 0.2 UFC/cm² después de tener un máximo de 72 h en incubación en condiciones de humedad y temperatura ambiente, tal como se puede observar en la figura 11. Estos biofilms tienen distinta intensidad según el tiempo de incubación, siendo los periodos evaluados de 24, 48 y 72h respectivamente. En estas condiciones se realizó el recuento en tres zonas de cada disco para cada tiempo de incubación, y los resultados se presentan en la figura 12. Para tener fiabilidad de los resultados se realizaron los conteos por triplicado, porque el manejo de los discos es muy complejo y para evitar errores de manejo se consideró necesario tener más de una muestra, otorgando además la oportunidad de comparar resultados y tener un margen de referencia en cuanto a los resultados obtenidos.

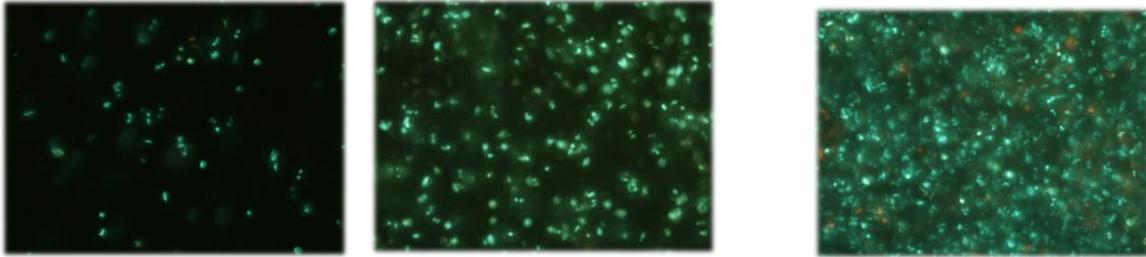


Figura 11. Imágenes obtenidas por epifluorescencia de biofilms de *S. enterica* CECT 4138, en diferentes tiempos de incubación (24, 48 y 72h) a temperatura ambiente.

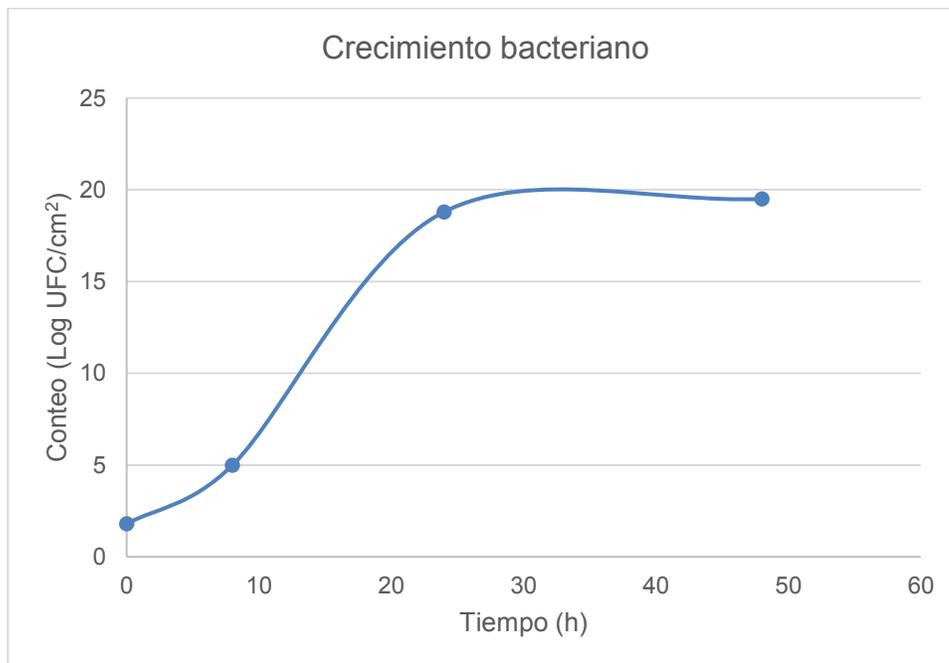


Figura 12. Crecimiento de *S. enterica* CECT 4138 sobre discos de acero inoxidable tipo 1.4301 incubados a temperatura ambiente.

En este estudio, se compararon 2 métodos de conteo de bacterias después de ser atacadas por los bacteriófagos, éstos fueron el recuento en placa de agar y por otro lado la observación por microscopía de epifluorescencia y la relación entre ambos métodos, es una relación lineal estocástica dando como resultado una R^2 igual a 0.86. Ello indica que los resultados obtenidos por ambos métodos son semejantes. Es importante señalar que un coeficiente de correlación alto no implica causalidad, dos variables pueden estar linealmente relacionadas (incluso muy relacionadas) sin que una sea causa de la otra. Estos resultados coinciden con otros autores (Fuster-Valls *et al.*, 2008; Engelhardt *et al.*, 2014).

El cultivo bacteriano se puede contabilizar por conteo en placa directo (TSA) este método es utilizado generalmente para cultivos de gérmenes no exigentes o moderadamente exigentes y cuando se quiere visualizar como afecta el ataque de los bacteriófagos, las células bacterianas se visualizan por DEM (cuya coloración cambia a verde cuando han sido atacadas por los bacteriófagos) y una forma de visualizar este ataque es por medio de TSA con la técnica de ADC.

D2 Conteo por DEM en placas de acero inoxidable

Se aplicó la DEM para evaluar la efectividad del bacteriófago MRH6 en el control de *Salmonella* entérica CECT 4138 sobre superficies de acero inoxidable, en condiciones de humedad. El bacteriófago MRH6 es un fago lítico capaz de disgregar los biofilms a temperatura ambiente con concentraciones de bacteriófago mayores a 7 UFP/mL.

El analizar la acción lítica del fago sobre *Salmonella* por medio del DEM es muy importante e innovador; pero, el material que se utiliza y la manera en que se comportan las diferentes bacterias hacen que se deba ser muy precavido al considerar el uso de este método como adecuado para realizar conteos (Libuchi, *et al.*, 2010); por ejemplo, se debe tener en cuenta que existen bacterias que no forman un biofilm y presentan movimiento, esto puede llegar a complicar el visualizarlas si no están en el campo, por lo que se podría pensar que fueron atacadas y eliminadas por los bacteriófagos, o bien que por los diferentes lavados se barrieron.

La DEM con la tinción LIVE/DEAD reveló la presencia de células viables, con coloración verde. En la figura 13 se puede observar el efecto letal del bacteriófago MRH6, sobre la población de *S. entérica*, disminuyendo su cantidad considerablemente en base a el tiempo de incubación, en color verde. Se observa que hay disminución de las células de *S. entérica* CECT 4138 al ser atacadas por el bacteriófago MRH6. Recordemos que la infección con el MRH6 se realizó después de formar un biofilm a temperatura ambiente y con humedad por espacio de 72h, en 3 concentraciones 6, 7, y 8 UFP/mL. Al paso del tiempo se aprecia que a las 48h hay pocas células vivas, al menos detectadas por la técnica utilizada.

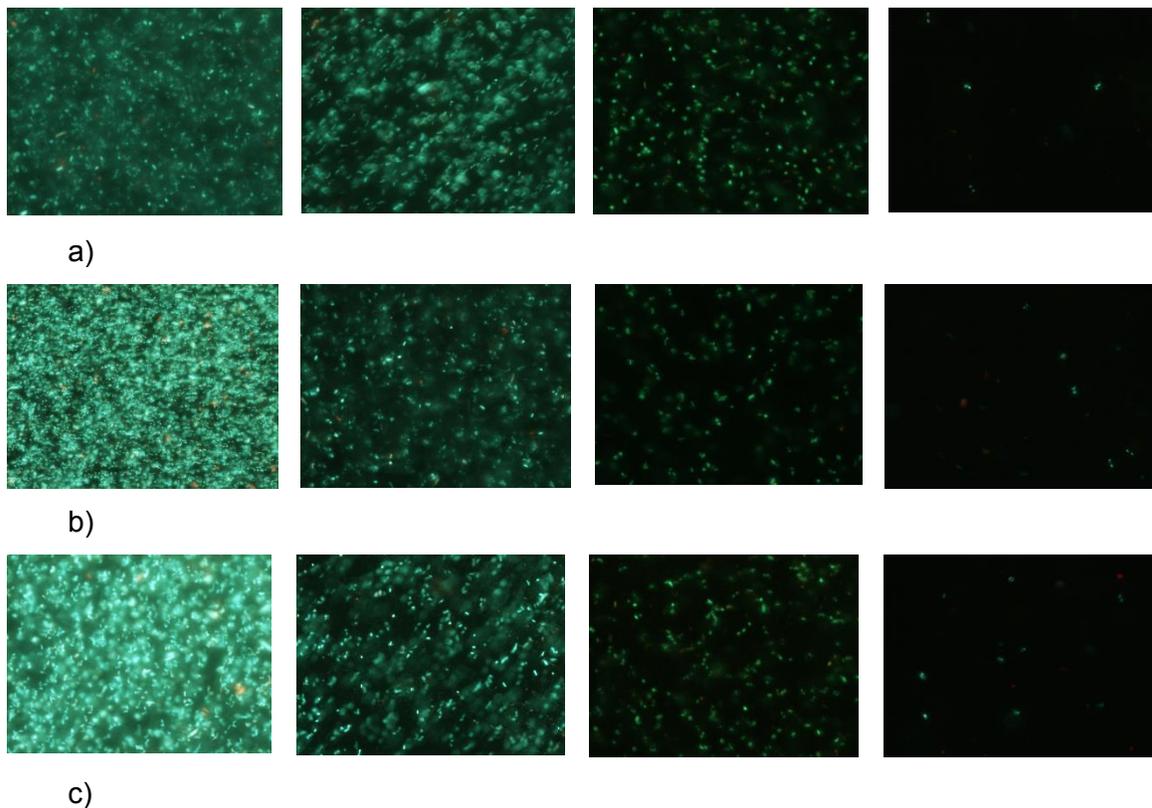


Figura 13. Secuencia de imágenes de epifluorescencia que ilustran la destrucción de *S. enterica* CECT 4138, sobre discos de acero inoxidable tipo 1.4301 causada por el bacteriófago MRH6, tras incubación de 0, 8, 24 y 48h, y con 3 concentraciones de bacteriófagos: a) 6; b) 7 y c) 8 UFP/mL respectivamente.

La DEM es un método altamente sensible que se caracteriza por la formación de imágenes amplificadas, y es considerada una técnica poderosa con altos niveles de sensibilidad y resolución (Montañez *et al.*, 2012). Tomando como referencia los resultados se considera que la DEM es una herramienta eficaz para el conteo bacteriano.

En algunas ocasiones al observar las bacterias atacadas por los bacteriófago se pueden encontrar muestras con material genético mezclado con restos celulares, esta situación hace que algunos investigadores recomienden extraer los bacteriófagos de la muestra antes de sembrar las bacterias, con el fin de determinar la reducción bacteriana únicamente debida a la actividad virulenta del bacteriófago sobre la muestra y no a la infección por bacteriófagos libres presentes en el agar (Sharma *et al.*, 2009). En ese sentido tal como reporta Fuster-Valls *et al.*, (2008) el método utilizado en esta tesis indica que el límite de detección por el DEM utilizado es de $2.79 \log_{10}$ células por cm^2 . Reportado por

Montañez *et al.* (2012).

Los bacteriófagos utilizan los recursos de la célula para hacer muchos fagos nuevos, lo que causa que la célula lise (estalle) y muera en el proceso. La lisis: en las últimas etapas del ciclo lítico, el bacteriófago expresa los genes para las proteínas que hacen agujeros en la membrana plasmática y la pared celular y en la figura 14 se puede observar cómo mientras el conteo de bacteria disminuye, el conteo de bacteriófagos se incrementa.

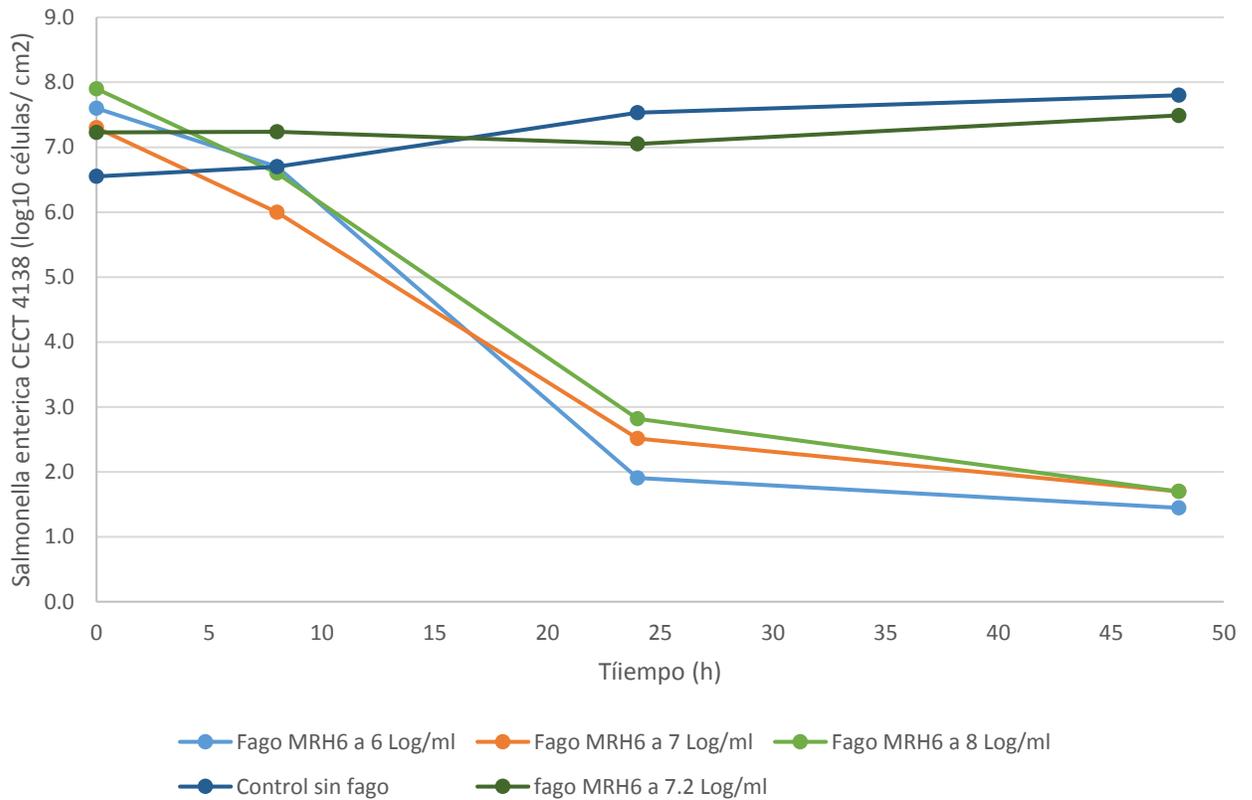


Figura 14. Reducción de *Salmonella enterica* CECT 4138 por el bacteriófago MRH6 en superficies de acero inoxidable con diferentes concentraiones durante 48 h.

En este trabajo se buscó crear condiciones de infección fago-bacteria en el laboratorio que las que se pudieran presentarse en la industria, los resultados de esta relación del bacteriófago MRH6 y *S. enterica* CECT 4138, muestran que la aplicación del bacteriófago es efectiva, pero hay que considerar que funciona mejor a altos títulos (10^8 UFC/mL) y que deberá de potenciarse cuando se trate de un coctel de fagos.

Nuestros resultados sugieren que los fagos pueden ser utilizados como un método para controlar un biofilm formado por un bacteria específica.

Las consideraciones que se envían como propuesta es que existen en estos momentos muchos trabajos sobre bacteriófagos, pero aquí, en México, no hay trabajos reportados y los que existen están apenas en fases iniciales.

Existe un enorme potencial de trabajo en esta área con los bacteriófagos, tal es el caso de la fagoterapia; en otros sitios y en otros tiempos, están realizando experimentos para ser explotada como alternativa para todos los ámbitos, desde hogares, industria, salud, animales, vegetales, etc. Por lo menos en EE.UU. tienen grandes avances en estudios relacionados con la aplicación en bacterias multiresistentes que por el uso de antibióticos han mutado, esto en el sector salud, donde se está perdiendo la batalla.

Una de las fortalezas de estudiar a los bacteriófagos es que antes de que los antibióticos fueran descubiertos, había investigación considerable sobre los bacteriófagos como tratamiento para las enfermedades bacterianas humanas, por lo menos en parte de Europa. La aplicación de los bacteriófagos es potencialmente son buenos candidatos para tratar enfermedades bacterianas en seres humanos, inocuidad aliemnaria, bioremediación y cada región tiene bacteriófagos endémicos y este trabajo representa de los primeros en llevarse en Monterrey.

Ciertas limitaciones del estudio se debio por las condiciones que se presentaron al realizar el estudio (laboratorio, equipo, conocimiento propio del tema), solamente se pudo aislar uno bacteriófago y lo recomendable es que sean varios bacteriófagos, dado que son muy específicos de especie o hasta de cepa. Se probó su acción sobre superficies con un solo cultivo bacteriano y en la realidad las superficies se contaminan con diferentes bacterias.

Lo que se vizualiza para nuestro estudio es sugerir varias líneas de acción a futuro. Por ejemplo, el fago aislado podría probarse *in vivo* sobre carne de pollo o fagoterapia; también podría continuar los estudios para aislar más fagos y hacer mezclas (cocteles) que

tuvieran un mayor rango de actividad y combatir a diversas especies de *Salmonella*. Con respecto al tratamiento de superficies, podrían utilizarse cocteles de fagos para tratar biofilms bacterianos formados por mas de dos especies o inclusive podrían probarse en biopelículas industriales reales.

VI. CONCLUSIONES

Al realizar la búsqueda de información en diferentes motores de búsqueda una de las plataformas como es el motor de búsqueda de libre acceso Pubmed, se puede obtener una relación de 5% en publicaciones de bacteriófagos contra diferentes serovariedades de *Salmonella spp.* lo que se puede traducir en que hay un área de oportunidad latente.

A pesar de que son abundantes en la naturaleza se logró tener solo un bacteriófago lítico contra *Salmonella enterica* CECT 4138. en este caso fue difícil localizarlos, las zonas donde se pudieron encontrar son de aguas residuales cercanas a hospitales; lo cual conlleva a riesgos para la persona que toma las muestras, por que trabajar con bacterias patógenas requiere tener mucho cuidado para no contaminarse,

Por las características morfológicas el fago pertenece a la familia *Myoviridae* (cabeza es de unos 60 nm de diámetro. La cola larga no es contráctil y tiene 6 fibras, algunos siphovirus tienen solo 3 o 4, la cápside es icosaédrica), y se le designo el nombre MRH6 ya que no perdió la capacidad lítica contra *Salmonella enterica* CECT 4138.

Los resultados obtenidos utilizando la DEM indican que el bacteriófago lítico MRH6 contra *Salmonella enterica* CECT 4138, se muestra como biocontrol potencial.

Este trabajo refleja el interés por iniciar o regresar a trabajar con bacteriófagos tal como esta sucediendo en otras partes del mundo. Hasta el momento hay muchas expectativas, sin embargo todavía se necesita investigación para saber qué tan seguros son.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Ackermann, H.W. (2003). Bacteriophage observations and evolution. *Research in Microbiology.*, Elsevier.154(4), 245-251.
- APHA (Asociación Americana de Salud Pública). 2005. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 21 ed. United Book Press, Washington.
- Atlas, R., & Bartha, R. (2002). *Ecología microbiana y microbiología ambiental*. México:,4ed. Pearson,(2), 29-34.
- Atterbury, R., Connerton, P., Dodd, C., Rees, C., & Connerton, I. (2003). Application of host-specific bacteriophages to the surface of chicken skin leads to a reduction in recovery of *Campylobacter jejuni*. *Applied and Environmental Microbiology*. 69(10):6302-6306.
- Bradley, D.E. (1967). Ultrastructure of bacteriophages and bacteriocins. *Bacteriological Reviews*, 31(4),230 -304.
- Breeuwer, P., Boissin-Delaporte, C., Joosten, H., & Lardeau, A. (2005). Isolated phages and their use as disinfectant in food or for sanitation factory environment. EUROPEAN PATENT SPECIFICATION. Patente Europea EP.1 533 369 B1:1-20
- Brenner, F., Villar, R., Angulo, F., Tauxe, R., & Swaminathan, B. (2000). *Salmonella* nomenclature. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(7) 2465–2467.
- Brooks, G., Butel, J., Ornston, N., Jawetz, E., Melnick, &, Adelberg, E. (1992). *Microbiología Médica*. México: El Manual Moderno. 7(5), 65-73.
- Callaway, T., Edrington, T., Anderson, R., Byrd, J., Nisbet, D. (2008). Gastrointestinal microbial ecology and the safety of our food supply as related to *Salmonella*. *Journal of Animal Science*, 86(14) 163-172.
- Calva, E., López, C., Zaidi, M. (2006). Estudios mexicanos sobre *Salmonella*: epidemiología, vacunas y biología molecular. *Revista Latinoamericana de*

Microbiología, 48(2) 121-125.

Carlos Ríos Bustamante, E. P. (2012). *Manejo clínico de las intoxicaciones alimentarias, Toxicología alimentaria Ed. Díaz de Santos, Zaragoza. Cap 37,662-665.*

CENAVECE. (2007). Centro nacional de vigilancia epidemiológica y de control de enfermedades. Disponible en <https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/historico-boletin-epidemiologico>

CENAVECE. (2018). Centro nacional de vigilancia epidemiológica y de control de enfermedades. Disponible en: http://www.cenaprece.salud.gob.mx/descargas/pdf/PAE_PreencionEnfermedadesDiarreicasAgudasColera2013_2018.pdf

Cerril, C., Biswas, B., Carlton, R., Jensen, N., Creed, J., Zullo, S. (1996). Long-circulating bacteriophage as antibacterial agents. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(8); 3188-3192.

CFSPH. (2005). Salmonellosis. The Center for Food Security and Public Health. Disponible en http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/nontyphoidal_salmonellosis.pdf
CSHL Press, Capítulos 2 y 3, 17-42, 25-106.

Chlebicz, A.; Śliżewska, K. (2018). Campylobacteriosis, Salmonellosis, Yersiniosis, and Listeriosis as Zoonotic Foodborne Diseases: A Review. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 15, 863-892.

Criscuolo, E., Spadini, S., Lamanna, J., Ferro, M., & Burioni, R. (2017). Bacteriophages and Their Immunological Applications against Infectious Threats. *Journal of immunology research*, 2017, 3780697. doi:10.1155/2017/3780697

DeWaal, C. S., Barlow, K. (2014). *Outbreak alert. Closing the gaps in our federal food safety net*. Washington: Center for Science in the Public Interest. 1-64

- Dimmock, N.J., Easton, A.J., Leppard, K.N. (2007). Introduction to modern virology. Blackwell Science. Malden. Capítulo 1, pag 9.
- Domingo-Calap, P., & Delgado-Martínez, J. (2018). Bacteriophages: Protagonists of a Post-Antibiotic Era. *Antibiotics* (Basel, Switzerland),7(3), 66.
doi:10.3390/antibiotics7030066
- Dunkley, K., Callaway, T., Chalova, V., McReynolds, J., Hume, M., & Dunkley, C. (2009). Foodborne *Salmonella* ecology in the avian gastrointestinal tract. *Anaerobe*, 15(1-2): 26-35.
- EFSA (2014). Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). Scientific Opinion on the public health risks of table eggs due to deterioration and development of pathogens. Disponible en <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2014.3782>
- Engelhardt T, Kallmeyer J, Cypionka H, Engelen B.(2014) High virus-to-cell ratios indicate ongoing production of viruses in deep subsurface sediments. *ISME J* 8: 1503-1509},
- EPA (2001). Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos: Method 1602: Male-specific (F+) and somatic coliphage in water by single agar layer (SAL) procedure. Disponible en:
<https://nepis.epa.gov/Exe/ZyPDF.cgi/P1002D21.PDF?Dockey=P1002D21.PDF>
- Fakruddin, Md., Rahaman, M., Ahmed, M.M., Hoque, M. (2014). Stress tolerant virulent strains of *Cronobacter sakazakii* from food. *Biological Research*, 47(1): 63-75.
- Falk, P., Hooper, F., Midtvedt, T., & Gordon, J. (1998). Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: What we know and need to know from gnotobiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(4), 1157–1170.
- FDA (2017). La FDA investiga múltiples brotes de cepas de *Salmonella* vinculadas a papayas. Disponible en:
<https://www.fda.gov/Food/RecallsOutbreaksEmergencies/Outbreaks/ucm568393.htm>

- Fernández Ferran, R., Rodríguez Pérez, C., Rodríguez Rivalta, I., & Gómez Martínez, F. (2003). *Escherichia coli* como causa de diarrea infantil. *Revista Cubana Pediátrica*, 36-39.
- Fernández, E. (2008). *Microbiología e inocuidad de los alimentos*. México: Editorial la Universidad Autónoma de Querétaro. Introducción a las enfermedades microbianas transmisibles por los alimentos.
- Figueroa, I., & Verdugo, A. (2005). Mecanismos moleculares de patogenicidad de *Salmonella* sp. *Salmonella* spp. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 47(1-2): 25-42.
- Forsythe, S., & Hayes, P. (2002). *Higiene de los alimentos, microbiología y HACCP*. España: Ed. Acribia. XXI, 519 p. ISBN: 9788420009865
- Franco Cardoza, Y. (2005). La microscopía de fluorescencia y su aplicación en el diagnóstico de bacterias fitopatógenas. *Fitosanidad*,9(3): 65-68.
- Franz, H., & Jendreizik, V. (2015). Fluorescence method development Handbook. Thermo scientific, Disponible en: <http://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/AN-70302-Fluorescence-Method-Development-Handbook-AN70302-E.pdf>
- Freedman, S., Sherman, P., Andrew, J., Willan, A., Johnson, D., & Gouin, S. (2015). Emergency department treatment of children with diarrhea who attend day care: a randomized multidosed trial of a lactobacillus helveticus and lactobacillus rhamnosus combination probiotic. *Clinical Pediatrics*. 1-9 1158–1166. DOI: 10.1177/0009922815569200
- Fuster-Valls, N., Hernández-Herrero, M., Marín-de-Mateo, M., & Rodríguez-Jerez, J. (2008). Effect of different environmental conditions on the bacteria survival on stainless steel surfaces. *Food Control*, 19. 308-314.

- Goode, D., Allen, V., & Barrow, A. (2003). Reduction of experimental *Salmonella* and *Campylobacter* contamination of chicken skin by application of lytic bacteriophages. *Applied and Environmental Microbiology*. 69(8): 5032-5036.
- Grabow, W. (2001). Bacteriophages: Update on application as models for viruses in water. *Water*, 27(2):251-268.
- Grimont, F., & Grimont, P. (2006). *The genus enterobacter*. Prokaryote. New York: Springer. Capítulo 3.3.9. (6):197-214.
- Guenther, S., Huwyler, D., Richard, S., & Loessner, M. J. (2009). Virulent bacteriophage for efficient biocontrol of *listeria monocytogenes* in ready to eat foods. *Applied and Environmental Microbiology*. 75(1):93-100.
- Guzmán, M. (2015). El bacteriófago, cien años de hallazgos trascendentales. *Revista del Instituto Nacional de Salud de Colombia*. 35(2):1-3.
- Higgins, J., Higgins, S., Guenther, K., Huff, W., Donoghue A, Donoghue, D. et al., (2005). Use of a specific bacteriophage treatment to reduce *Salmonella* in poultry products. *Poultry Science*. 84(7): 1141-1145.
- Hunter-Cevera, J., & Belt, A. (1996). *Maintaining cultures for biotechnology and industry: Characterization of Cultures Used for Biotechnology and Industry*. London, : Academic Press. Capítulo 12: 251-254.
- Huss AR, Schumacher LL, Cochrane RA, Poulsen E, Bai J, Woodworth JC, et al. (2017) Elimination of Porcine Epidemic Diarrhea Virus in an Animal Feed Manufacturing Facility. PLoS ONE 12(1): e0169612. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169612>
- Jawale, C., & Lee, J. (2014). Comparative evaluation of *Salmonella* enteritidis ghost vaccine with a comercial vaccine for protection against internal egg contamination whith *Salmonella*. *Vaccine*-32(45): 5925-5930.

- Khan, I., Hill, S., Nowak, E., & Edge, T. (2013). Effect of incubation temperature on the detection of thermophilic *Campylobacter* species from freshwater beaches, nearby wastewater effluence and bird fecal droppings. *Applied and Environmental Microbiology*. 79(24): 7639-7645.
- Kruger, D., Schneck, P., & Gelderblom, H. (2000). Helmut Ruska and the visualisation of viruses. *The Lancet*. Vol. 355.1713-1717.
- Larcher, L.I., & Cattaneo, C. (2006). Simulación de crecimiento de microorganismos utilizando el método de Monte Carlo. Asociación Argentina de Mecánica Computacional. Disponible en:
https://www.researchgate.net/publication/228651277_Simulacion_de_crecimiento_de_microorganismos_utilizando_el_metodo_de_Monte_Carlo
- Lee H, Ku H-J, Lee D-H, Kim Y-T, Shin H, Ryu S, et al. (2016) Characterization and Genomic Study of the Novel Bacteriophage HY01 Infecting Both *Escherichia coli* O157:H7 and *Shigella flexneri*: Potential as a Biocontrol Agent in Food. PLoS ONE 11(12): e0168985. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168985>
- Leeuw, M., Baron, M., Brenner, A., & Kushmaro, A. (2017). Genome Analysis of a Novel Broad Host Range Proteobacteria Phage Isolated from a Bioreactor Treating Industrial Wastewater. *Genes*, 8(1), 40. doi:10.3390/genes8010040
- Leverentz, B., Conway, W., Camp, M., & Sulakvelidze, A. (2003). Biocontrol of *Listeria monocytogenes* on fresh-cut produce by treatment with lytic bacteriophages and a bacteriocin. *Applied and Environmental Microbiology*. 69(8): 4519-4526.
- Libuchi, R., Hara-kudo, Y., Hasegawa, A. & Kumagai, S. (2010). Survival of *Salmonella* on a polypropylene surface under dry conditions in relation to biofilm-formation Capability. *Journal of Food Protection*. 73:1506–1510.

- Liu, D. (2006). Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes* an important foodborne pathogen. *Journal of Medical Microbiology*, 55(Pt6).645-659.
- Lopardo, H. (2017). Fagotherapy: Multi-drug resistance compel us to review the past. *Revista Argentina de Microbiol.*49(1):1-2
- Madigan, M., Martinko, J. (2006). *Brock Biología de los Microorganismos*. Madrid: Pearson Prentice Hall. Cap 9. 231-264.
- Maestro, B., & Sanz, J. (2016). Choline Binding Proteins from *Streptococcus pneumoniae*: A Dual Role as Enzybiotics and Targets for the Design of New Antimicrobials. *Antibiotics*. 5(2): 1-33.
- Mancera, A., Vázquez, J., & Heneidi, A. (2004). Fagotipificación de aislamientos de *Salmonella enteritidis* obtenidos de aves en México, *Técnica Pecuaria en México*. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, México. 42(2):287-294.
- Marcus, R., Rabatsky-Ehr, F., Mohle-Boetani, J., Farley, M., Medus, C., & Shiferaw, B. (2004). Dramatic decrease in the incidence of *Salmonella* serotype enteritidis infections in 5 food net sites: 1996–1999. *Centers for Disease Control and Prevention's National Center for Infectious Diseases*,15(38):135–141.
- Mastroeni, P. & Maskell, D. (2006). *Salmonella infections: clinical, immunological and molecular aspects*. Cambridge: Cambridge University Press Capítulo1 ,1-17.
- Mattila, S., Ruotsalainen, P., Jalasvuori, M. (2015). On-demand isolation of bacteriophages against drug-resistant bacteria for personalized phage therapy. *Front Microbiol*. 13(6):1271.
- McLaughlin, M., Balaa, M., Sims, J., King, R. (2006). Isolation of *Salmonella* bacteriophages from swine effluent lagoons. *Journal of Environmental Quality*, 35.522-528.

- McShan WM, Nguyen SV. The Bacteriophages of *Streptococcus pyogenes*. 2016 Feb 10 [Updated 2016 Mar 25]. In: Ferretti JJ, Stevens DL, Fischetti VA, editors. *Streptococcus pyogenes : Basic Biology to Clinical Manifestations* [Internet]. Oklahoma City (OK): University of Oklahoma Health Sciences Center; 2016-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK333409/>
- Melbinger, A., Cremer, J., Frey, E. (2015). The emergence of cooperation from a single mutant during microbial life cycles. *The Royal Society Publishing Interface*, 1-8. J R Soc Interface. 2015 Jul 6; 12(108): 20150171.
- Mebrat Ejo, Legesse Garedew, Zabishwork Alebachew, and Walelgn Worku, "Prevalence and Antimicrobial Resistance of Salmonella Isolated from Animal-Origin Food Items in Gondar, Ethiopia," *BioMed Research International*, vol. 2016, Article ID 4290506, 8 pages, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/4290506>.
- Montañez, V., Salas, D., Rodriguez, J. (2012). Use of epifluorescence microscopy to asses the effectiveness of phage P100 in controlling *Listeria monocytogenes* biofilms on stainless Steel surfaces. *Food Control*. 23(2): 470-477.
- Muniesa, M., Blanch, A., Lucena, F., Jofre, J. (2005). Bacteriophages may bias outcome of bacterial enrichment culture. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(8):4269-4275.
- Nazar C, Julio. (2007). Biofilms bacterianos. *Revista de otorrinolaringología y cirugía de cabeza y cuello*, 67(1), 161-172. <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-48162007000100011>
- Nichols, G. (2005). Fly transmtion of *Campylobacter*. *Emergent Infectious Diseases*, vol 11(3):361-364.
- Nguendo Yongsí HB. Eating to Live or Eating to Damage One's Health: Microbiological Risks Associated with Street-Vended Foods in a Subtropical Urban Setting (Yaoundé-Cameroon). *Nutri Food Sci Int J*. 2018; 6(4): 555695. DOI: [10.19080/NFSIJ.2018.06.555695](https://doi.org/10.19080/NFSIJ.2018.06.555695).

- Oh, J.-H. Park, M.-K. (2017). Recent trends in *Salmonella* outbreaks and emerging z. 27(12): 2075-2088.
- OMS (2017). *Organización mundial de la salud. Enfermedades diarreicas*. Obtenido de <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/diarrhoeal-disease> oral biofilms. *Journal of Biotechnology*. 250. 29-44.
- Ouyang, Y., Li, X. (2013). Recent research progress on soil microbial responses to drying-rewetting cycles. *Acta Ecologica Sinica*, 33(1):1-6.
- Parra, M., Durango, J., Máttar, S. (2002). Microbiología, patogénesis, epidemiología, clínica y diagnóstico de las infecciones producidas por *Salmonella*. *MVZ-Córdoba*. 7(2) 187-200.
- Pellegrotti, J.V., Caldarola, M., Kreuzer, M.P., Cortés, E., Bordenave, M.D., Sanchez, A.D., Ojea, I., Bragas, A.V., Stefani, F.D. (2014). Biosensado basado en modulación de fluorescencia por calentamiento plasmónico de nanovarillas de oro. *Anales Acad. Nac. de Cs. Ex., Fís. y Nat.* 66:82-94.
- Prada-Peñaranda, C., Holguín-Moreno, A. v., González-Barríos, A. F. y Vives-Flórez M. J. (2015). Fagoterapia, alternativa para el control de las infecciones bacterianas. *Perspectivas en Colombia.. Univ. Sci.* 2015, Vol. 20 (1): 43-59. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/unsc/v20n1/v20n1a04.pdf>
- Prescott, L., Harley, J. Klein, D. (1999). *Microbiología*. Madrid: McGraw-Hill Interamericana. 5ª edición, parte VIII, 641-719.
- Prüss-Üstün, A., Corbalán, C. (2006). Preventing disease through healthy environments: Towards an estimate of the environmental burden of disease. France: WHO, Disponible en: https://www.who.int/quantifying_ehimpacts/publications/preventingdisease.pdf?ua=1.

- Rios, J., Paris, E., Bettini, M., Repotto, G. (2012). Manejo clínico de las intoxicaciones alimentarias. Díaz de Santos. España. Toxicología alimentaria:
<https://books.google.com.mx/books?id=ZVMBF-CJBFsC&pg=PA660&lpg=PA660&dq=Rios,+Paris,+bettini,+repotto+2012012&source=bl&ots=KiutELMWr&sig=ACfU3U0NrztQNtUFAFiRV5KbyUWyl2Qjg&hl=es&sa=X&ved=2ahUKEwiM1M2K-IHgAhUKMawKHU9IBzkQ6AEwB3oECAgQAQ#v=onepage&q=Rios%2>
- Rodríguez Torrens, H., Barreto Argilagos, G., Sedrés Cabrera, M., Bertot Valdés, J., Martínez Sáez,S., Guevara Viera,G.(2015).Las enfermedades transmitidas por alimentos, un problema sanitario que hereda e incrementa el nuevo el nuevo milenio. REDVET revista electrónica.16(8):1-27
- Salgado-Nava, A., & Jiménez-Munguía, M. (2012). Métodos de control de crecimiento microbiano en el pan. Temas selectos de ingeniería de alimentos, 6.2. 160-172.
- Sambrook, J., & Russell, D. (2001). Molecular Cloning and Laboratory Manual 3th edition. CSHL Press. Capítulo 1, Protocolo 8, 9 y 10, 31-41.
- Schmelcher M & Loessner MJ. (2014). Application of bacteriophages for detection of foodborne pathogens. *Bacteriophage*. Vol. e28137-1- e28137-14.
- Segundo, N., Hernández, E., López, O., & Torres, A. (2010). Los bacteriófagos como una alternativa en el tratamiento de enfermedades infecciosas Bacterianas(Fagoterapia). Redalyc. 41(3):17-26.
- Shafiei, R., Zarmehrkhoshid, R., Bentaib, A., Babanezhad, M., Leprince, P., & Delvigne, F. (2014). The role of protein modifications in senescence of freeze-dried *Acetobacter senegalensis* during storage. *Microbial Cell Factories*, 13(26): 1-16.
- Sharma, M., Patel, J., Conway, W., Ferguson, S., & Sulakvelidze, A. (2009). Effectiveness of bacteriophages in reducing *Escherichia coli* O157:H7 on fresh-cut cantaloupes and lettuce. *Journal of Food Protection*72(7): 1481-1485.

- Solano Barquero, M., Chacón Jiménez, L. M., Barrantes Jiménez, K., & Achí Araya, R. (2012). Implementación de dos métodos de recuento en placa para la detección de colifagos somáticos, aportes a las metodologías estándar. *Revista Peruana de Biología*. 19(3): 335-340.
- Szafranski, S. P., Winkel, A., Stiesch, M. (2017). The use of bacteriophages to biocontrol oral biofilms. *Journal of Biotechnology*. ELSEVIER. 250,29-44
- Thung, T., Siti, B., Premarathne, J., Chang, W., Loo, Y., Kuan, C., New, C., Ubong, A., Ramzi, O., Mahyudin, N., Dayang, F., Che, W., & Son, R. (2017). Isolation of food-borne pathogen bacteriophages from retail food and environmental sewage. *International Food Research Journal*. 24(1): 450-454.
- Tomat, David Damian; Quiberoni, Andrea del Lujan; Mercanti, Diego Javier; Balagué, Claudia; Hard Surfaces Decontamination of Enteropathogenic and Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* using Bacteriophages; Elsevier; *Food Research International*; 57; 3-2014; 123-129.
- Uribe, C., & Suarez, M.C. (2006). Salmonelosis no tifoidea y su transmisión a través de alimentos de origen aviar. *Colombia Médica*, 37(2): 151-158.
- Van de Venter, T. (2000). Department of Health, Republic of South Africa. Emerging food-borne diseases: a global responsibility. Disponible en <https://pdfs.semanticscholar.org/6e71/6f058f29598151c8e69cc3ba08f300de5119.pdf>
- Vanegas, M. C., Rugeles, L. C., & Martínez, A. J. (2009). Aislamiento e identificación de *Enterobacter sakazakii* en lactarios de Bogotá D.C. Asociación colombiana de infectología *Infection*. 13(1): 36-42.
- Vestby, L. K., Møretrø, T., Langsrud, S., Heir, E., & Nesse, L. L. (2009). Biofilm forming abilities of *Salmonella* are correlated with persistence in fish meal- and feed factories. *BMC veterinary research*, 5, 20. doi:10.1186/1746-6148-5-20

- Vidales-Contreras, J., Gerba, C., Karpiscak, M., Acuna-Askar, K., Chaidez-Quiroz. (2006). Transport of coliphage PRD1 in a surface flow constructed wetland. *Water Environment Research*, 78(11): 2253-2260.
- Villamizar-G. Raquel Amanda, Ortiz-R. Oscar O, Aquiles-Darghan, Enrique. (2015). Metodología rápida y sencilla para la determinación de colifagos somáticos como indicadores de contaminación fecal en una planta de tratamiento de agua localizada al noreste colombiano. *Rev. Universidad y Salud*. 17. 57-68.
- Weaver, T., Valcanis, M., Mercoulia, K., Sait, M., Tuke, J., Kiermeier, A. (2017). Longitudinal study of *Salmonella* 1,4,[5],12:i:- shedding in five Australian pig herds. *Preventive Veterinary Medicine*. 136.19-28.
- Wong, C., Sieo, C., Tan, W., Abdullah, N., Hair-Bejo, M., Abu, J., Ho, Y. (2014). Evaluation of lytic bacteriophage, Φ st1, for biocontrol of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in chickens. *International Journal of Food Microbiology*. 172(17): 92-101.
- Wright, K. M., Crozier, L., Marshall, J., Merget, B., Holmes, A., & Holden, N. J. (2017). Differences in internalization and growth of *Escherichia coli* O157:H7 within the apoplast of edible plants, spinach and lettuce, compared with the model species *Nicotiana benthamiana*. *Microbial biotechnology*, 10(3), 555-569.
- Wu S, Wu Q, Zhang J, Chen M, Yan Z, Hu H (2015) *Listeria monocytogenes* Prevalence and Characteristics in Retail Raw Foods in China. *PLoS ONE* 10(8): e0136682. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136682>
- Yang, Q., Zhao, H., & Du, B. (2017). Bacteria and bacteriophages communities in bulking and non-bulking activated sludge in full- scale municipal wastewater treatment systems. Elsevier. 119. 101-111. doi = {10.1016/j.bej.2016.12.017}
- Yergeau, E., Masson, L., Elias, M., Xiang, S., Madey, E., Huang, H., Brooks, B., Beaudette, L. A. (2016). Comparison of Methods to Identify Pathogens and Associated Virulence Functional Genes in Biosolids from Two Different Wastewater

Bibliografía

Treatment Facilities in Canada. *PloS one*, 11(4), e0153554.
doi:10.1371/journal.pone.0153554

Zaidi, M.B., López Macías, C., & Calva, E. (2006). Estudios mexicanos sobre *Salmonella*: epidemiología, vacunas y biología molecular. *Rev Latinoam Microbiol.* 48(2):121-125