



UNIVERSIDAD MICHUACANA
DE SAN NICOLAS DE HIDALGO
FACULTAD DE QUIMICO
FARMACOBIOLOGIA



Aislamiento de bacteriófagos de muestras de
agua para el control de patógenos asociados a
alimentos

TESIS

para obtener el título de
QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

Presenta :

Adriana Carolina Gil Correa

Asesor: D.C. Juan José Valdez Alarcón

Morelia, Michoacán. Octubre del 2013

EL PRESENTE TRABAJO DE INVESTIGACIÓN SE
REALIZÓ EN EL C.M.E.B.-F.M.V.Z. DE LA U.M.S.N.H. BAJO
LA ASESORIA DEL D.C. JUAN JOSÉ VALDEZ ALARCÓN.

TESIS APOYADA POR EL CONSEJO ESTATAL DE
CIENCIA, TECNOLOGÍA E INNOVACIÓN DEL ESTADO DE
MICHOACÁN

Las mejores tareas son las finalizadas.

Proverbio árabe

AGRADECIMIENTOS

A todas las personas que directa o indirectamente han sido parte de mi formación, a todas aquellas personas que han sido maestros para mi, personas que han sido mis ejemplos y motivos de inspiración sin darse cuenta, y sin mencionar nombres, ya que sería una lista enorme y no me gustaría omitir a nadie.

A todos los profesores que con sus enseñanzas y muchas veces con sus exigencias lograron hacer de mí la persona que ahora soy.

A mi asesor el Doc. Juan José Valdez Alarcón, quien hizo posible este trabajo, haciéndolo a demás de la forma más grata que puede haber.

A todo el equipo de trabajo del CMEB, ejemplos de dedicación a la investigación, en especial a todos mis compañeros del modulo 4, quienes llegaron a ser otra familia para mi, dispuestos siempre a ayudarme en todo lo posible, haciendo a demás muy amenos todos esos días de trabajo.

De manera muy especial a mis revisores, quienes de la manera más amable aceptaron dedicarme su tiempo para revisar este proyecto.

A todas la personas que siempre me apoyaron en todo lo posible para que yo pudiera realizar este sueño, en verdad GRACIAS!!!!

DEDICATORIA

A Dios que me permitió llegar hasta donde estoy, y cumplir una meta más.

A mis padres quienes siempre me apoyaron incondicionalmente para que yo pudiera desarrollarme profesionalmente, y por todos los sacrificios que hicieron para que yo pudiera lograr este sueño.

A mi familia y amigos quienes me soportaron con mi mal humor en los momentos de mayor estrés, mostrando siempre su cariño y comprensión.

A todas las personas que estuvieron conmigo en este camino dándome aliento en los momentos en los que estuve a punto de desertar, siendo mi apoyo y fortaleza.

Contenido

Introducción	8
MARCO TEORICO.....	9
Reseña histórica de los bacteriófagos.....	9
Generalidades de los bacteriófagos.....	11
Ciclo lítico de los bacteriófagos.....	12
Ciclo lisogénico	12
Clasificación de los bacteriófagos	13
Utilidad y aplicaciones de la fagoterapia	14
Uso de fagos como antimicrobianos en humanos	14
Uso de bacteriófagos en animales como modelos de infección.....	16
Uso veterinario de bacteriófagos.....	18
Uso de bacteriófagos en la industria alimenticia	20
Principales patógenos transmitidos por alimentos.....	23
<i>Escherichia coli</i> como modelo de estudio	27
<i>Staphylococcus aureus</i>	29
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	30
JUSTIFICACIÓN	31
OBJETIVO GENERAL.....	32
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
MATERIALES Y METODOS.....	32
Toma de muestra	33
Aislamiento de los bacteriófagos	33
Aislamiento de <i>Escherichia coli</i>	34
Identificación de <i>Escherichia coli</i>	34
Obtención de bacteriófagos.....	35
Enriquecimiento de los bacteriófagos.....	35
Aislamiento de los bacteriófagos	36
Determinación del rango de hospedero	36
RESULTADOS	37
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	53
CONCLUSIONES	56

**AISLAMIENTO DE BACTERIÓFAGOS DE MUESTRAS DE AGUA PARA
EL CONTROL DE PATÓGENOS ASOCIADOS A ALIMENTOS**

Bibliografía 57

Introducción

Los bacteriófagos, comúnmente llamados fagos, son virus que infectan y se multiplican en bacterias llevando a la destrucción de las células hospederas con la liberación de bacteriófagos que infectan otras bacterias. Los fagos son parásitos obligados que contiene un genoma de ácido nucleico encerrado en una cubierta proteica llamada cápside y estos pueden multiplicarse por medio de un ciclo lítico o lisogénico. (O'Flaherty, *et al.*, 2009).

En el ciclo lítico la partícula de fago se adsorbe a la superficie de la célula hospedera e inyecta su material genómico en la bacteria, posteriormente, toma la maquinaria metabólica del hospedero resultando en la multiplicación intracelular del fago. El ciclo se completa con la lisis celular y la liberación de la progenie del fago (O'Flaherty, *et al.*, 2009).

Durante el ciclo lisogénico, el ADN del fago es incorporado en el ADN del huésped bacteriano, el material genético del fago se replica en el interior de la célula pero no hay liberación de partículas virales maduras o viriones. En este caso, la célula huésped bacteriana no se lisa y se mantiene viable. (Donlan, *et al.*, 2009).

Los fagos son ubicuos y se sabe que infectan a más de 140 géneros bacterianos, son considerados como la entidad biológica más abundante con estimaciones de 10^{31} partículas de fagos en el mundo (Bergh, *et al.*, 1989; Whitman, *et al.*, 1998).

A principios del siglo XX se realizaron grandes aportes en la terapia con fagos, principalmente en un estudio para tratar y controlar la disentería, así como diversas infecciones durante la segunda guerra mundial. Los ensayos clínicos más claramente documentados sobre el uso de fagos como agentes terapéuticos han sido publicados por el Instituto de Inmunología y Terapia Experimental ("Instituto Hirszfeld") en Wroclaw, Polonia, en donde se han publicado numerosos artículos que documentan, datos sobre aproximadamente 2000 pacientes infectados con una variedad de patógenos (predominantemente resistentes a antibióticos) que fueron tratados con fagos y cuyos resultados, en forma global, fueron exitosos entre del 60 al 90% de los casos (Inal, 2003)..

Sin embargo a pesar de los éxitos citados, la fagoterapia ha sido cuestionada ante la creciente comercialización de antibióticos en humanos y alimentos (Sulakvelidze, *et al.*, 2001), además de la estricta regulación del uso de bacteriófagos como agentes terapéuticos por las leyes nacionales e internacionales (Parracho, *et al.*, 2012).

El incremento en la resistencia a antibióticos en bacterias patógenas ha justificado la reconsideración del uso los fagos como agentes antibacterianos. (O'Flaherty, *et al.*, 2009). Recientemente se han incrementado las investigaciones alrededor del mundo enfocadas en la explotación de bacteriófagos como agentes antibacterianos para un amplio rango de aplicaciones. Además, se proponen el uso de grupos o complejos de fagos como estrategia de control bacteriano

El uso de bacteriófagos en la industria alimenticia para el biocontrol de contaminación bacteriana, resulta una alternativa segura, eficaz y accesible para la preservación de alimentos sin el uso de quimioterapia.

MARCO TEORICO

Reseña histórica de los bacteriófagos

La historia del descubrimiento de los bacteriófagos ha sido objeto de largos debates, incluida una controversia sobre reclamaciones de prioridad.

Ernest Hankin, un bacteriólogo británico, reportó en 1896, la presencia de una marcada actividad antibacteriana contra *Vibrio cholerae*, la cual observó en las aguas de los ríos Ganges y Jumna en la India, y sugirió que una sustancia no identificada fue la responsable de este fenómeno y de limitar la propagación de la epidemia de cólera. Dos años más tarde, el ruso Gamaleya bacteriólogo, observó un fenómeno similar al trabajar con *Bacillus anthracis*. Existen otras observaciones de muchos otros investigadores que se piensan, están relacionados al fenómeno de los bacteriófagos. Sin embargo, ninguno de estos investigadores estudió más a fondo sus hallazgos hasta que Frederick Twort, volvió a introducir el tema casi 20 años después de la observación de Hankin al informar de un fenómeno similar, avanzando la hipótesis de un virus. Sin embargo, por diversas razones, incluyendo dificultades financieras Twort abandono la investigación, dos años antes de que los bacteriófagos fueran "oficialmente" descubiertos por Félix d'Herelle en 1917. (Sulakvelidze *et al.*, 2001).

El descubrimiento o redescubrimiento de los bacteriófagos por d'Herelle a menudo se asocia con un brote de disentería hemorrágica grave entre las tropas francesas estacionadas en Maisons-Laffitte (en las afueras de París) en julio-agosto de 1915; aparentemente d'Herelle observó por primera vez el fenómeno del bacteriófago en 1910 mientras estudiaba medios microbiológicos para controlar una epizootia de langostas en México. Durante el brote de disentería varios soldados fueron hospitalizados, y d'Herelle fue asignado para llevar a cabo una investigación del brote. Durante estos estudios, hizo filtrados libres de bacterias de muestras fecales de los pacientes y los mezclo e incubo con cepas de *Shigella* aisladas de

los pacientes. Una parte de las mezclas se inoculó en animales de experimentación, y una porción fue sembrada en agar con el fin de observar el crecimiento de las bacterias. Fue en estos cultivos de agar que d'Herelle observó la aparición de zonas pequeñas y claras, que en un principio llamo *taches vierges* (puntos en blanco). Los hallazgos de D'Herelle fueron presentados durante la reunión de septiembre de 1917 en la Academia de Ciencias, y fueron publicados posteriormente en los trabajos de la reunión. En contraste con Hankin y Twort, d'Herelle tenía pocas dudas acerca de la naturaleza del fenómeno, y propuso que se debía a un virus capaz de parasitar bacterias. (Sulakvelidze *et al.*, 2001).

El nombre de "bacteriófago" fue propuesto por d'Herelle, quien decidió este nombre junto con su esposa Marie el 18 de octubre 1916. El nombre se forma a partir de "Bacterias" y "phagein" (comer o devorar, en griego), y fue para dar a entender que los fagos "comen" o "devoran" bacterias. D'Herelle, que se consideraba a sí mismo como el descubridor de los bacteriófagos, fue informado del descubrimiento anterior de Twort pero sostuvo que el fenómeno descrito por Twort era distinto de su descubrimiento. A diferencia de Twort, d'Herelle prosiguió activamente con los estudios de bacteriófagos y creía fuertemente que los fagos eran virus vivos y no "enzimas", como muchos de sus compañeros investigadores pensaban (Sulakvelidze *et al.*, 2001). La disputa por la prioridad cesó eventualmente, y muchos científicos aceptaron el descubrimiento independiente de los bacteriófagos y simplemente se refirieron a estos como el fenómeno "Twort-d'Herelle" y, más tarde, el "fenómeno del bacteriófago" (Sulakvelidze *et al.*, 2001).

Poco después de su descubrimiento, d'Herelle utilizó los fagos para tratar la disentería, en lo que probablemente fue el primer intento de usar bacteriófagos terapéuticamente. Los estudios fueron realizados en el Hospital de Enfants-Malades en Paris en 1919 bajo la supervisión de Victor-Henri Hutinel, jefe del hospital de Pediatría. La preparación de fagos fue ingerida por d'Herelle, Hutinel y varios internos del hospital con el fin de confirmar su seguridad antes de su administración para un niño de 12 años de edad, con grave disentería. Los síntomas del paciente cesaron después de una sola administración del fago antidisentería de d'Herelle, y el niño se recuperó en unos pocos días. La eficacia de la preparación de fago fue "confirmada" poco después, cuando tres pacientes adicionales con disentería bacteriana y tratados con una dosis de la preparación comenzaron a recuperarse dentro de 24 h de tratamiento. Sin embargo, los resultados de estos estudios no se publicaron inmediatamente y, por lo tanto, el primer reporte de la aplicación de fagos para tratar enfermedades infecciosas en humanos llegó en 1921 por Richard Bruynoghe y Maisin Joseph, que utilizaron bacteriófagos para el tratamiento de enfermedades de la piel por estafilococo. Los bacteriófagos fueron inyectados dentro y alrededor de heridas quirúrgicas,

obteniendo como resultado la regresión de las infecciones dentro de 24 a 48 h. Varios estudios prometedores y similares siguieron. Animados por los resultados preliminares, d'Herelle y otros continuaron con estudios sobre el uso terapéutico de los fagos. d'Herelle utilizó diversas preparaciones de fagos para tratar a miles de personas que tenían cólera y / o la peste bubónica en la India, además, varias empresas empezaron la producción activa comercial de fagos en contra de diversos patógenos bacterianos (Sulakvelidze *et al.*, 2001).

Generalidades de los bacteriófagos

Los virus de bacterias, también llamados bacteriófagos o fagos, son muy diversos. La mayoría de estos virus, que se han estudiado en detalle, infectan bacterias del grupo entérico, como *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*. Sin embargo, se conocen virus que infectan a diversos procariontes, tanto *Bacteria* como *Archaea*.

Los bacteriófagos mejor estudiados, en su mayoría contienen genomas con DNA bicatenario y se cree que este tipo de bacteriófago es el tipo más común en la naturaleza. Sin embargo, se conocen muchos tipos, incluyendo fagos que poseen genomas con RNA de cadena sencilla, con RNA de doble cadena segmentados, y con DNA de cadena sencilla (Madigan *et al.*, 2003).

El ciclo de infección de los virus puede ser resumido en las siguientes etapas (Fig.1):

- 1) *Unión o fijación* (adsorción) del virus a una célula hospedadora susceptible.
- 2) *Penetración* (inyección) del virión o de su ácido nucleico en la célula.
- 3) *Síntesis* de ácido nucleico y proteína; tiene lugar desde el comienzo hasta el final de la infección. Al principio, el virus redirige el metabolismo celular hacia la síntesis de ácido nucleico y proteínas víricas. Más tarde, se sintetizan proteínas estructurales que son componentes de la cubierta vírica.
- 4) *Ensamblaje* de las subunidades estructurales (y componentes de membrana en virus envueltos) y empaquetamiento del ácido nucleico para originar nuevas partículas víricas.
- 5) *Liberación* de los viriones maduros de la célula.

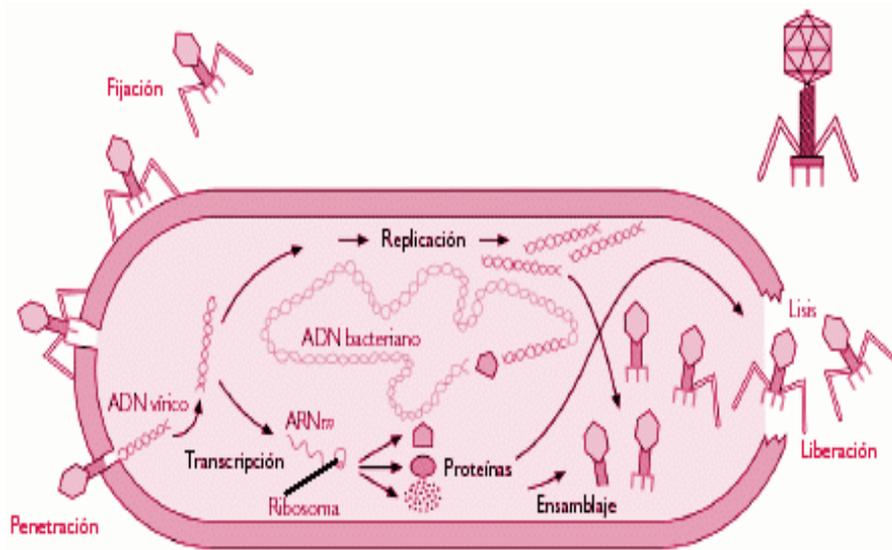


Fig.1: Ciclo de infección de los bacteriófagos
<http://www.hiru.com/biologia/los-virus>

Ciclo lítico de los bacteriófagos

La primera etapa en el ciclo lítico, se ve facilitada por fibras de la cola que se unen a moléculas específicas que funcionan como receptores de los fagos en la superficie celular bacteriana. La especificidad de receptores para cada fago solo determinará su rango de hospedero. Algunos fagos tienen una especificidad a nivel de cepa mientras que otros tienen un espectro más amplio para poder infectar muchas cepas bacterianas dentro de una sola especie o incluso especies múltiples.

En el ciclo lítico, una célula bacteriana con una sola partícula viral madura, llamada virión, dará lugar a la producción de múltiples fagos, el número de viriones liberados dependerá del fago en particular. El ciclo lítico de los fagos puede ser caracterizado por el período de eclipse, que es el período de tiempo que transcurre entre la infección inicial por fagos y la primera aparición de partículas de fagos infecciosos, y el período de latencia, que es el período de tiempo que transcurre entre la infección inicial por fagos y la liberación de partículas infecciosas de fagos mediante lisis celular (Donlan, 2009).

Ciclo lisogénico

Durante el ciclo lisogénico, los fagos son capaces de entablar una relación estable con el hospedador, el ADN del fago es incorporado en el genoma bacteriano, a esta forma se le conoce como profago. El profago puede replicarse

como parte del genoma bacteriano durante generaciones. Las células lisogenizadas presentan inmunidad frente a la infección, es decir, no pueden ser reinfectadas por el mismo virus o por virus compatibles y la célula huésped bacteriana no es lisada. Estos fagos se denominan fagos temperados y la cepa bacteriana que contiene el ADN del fago es denominada lisogénica. Las bacterias lisogénicas pueden ser inducidas a iniciar el ciclo lítico del fago, resultando en la producción de fagos maduros. (Donlan, 2009).

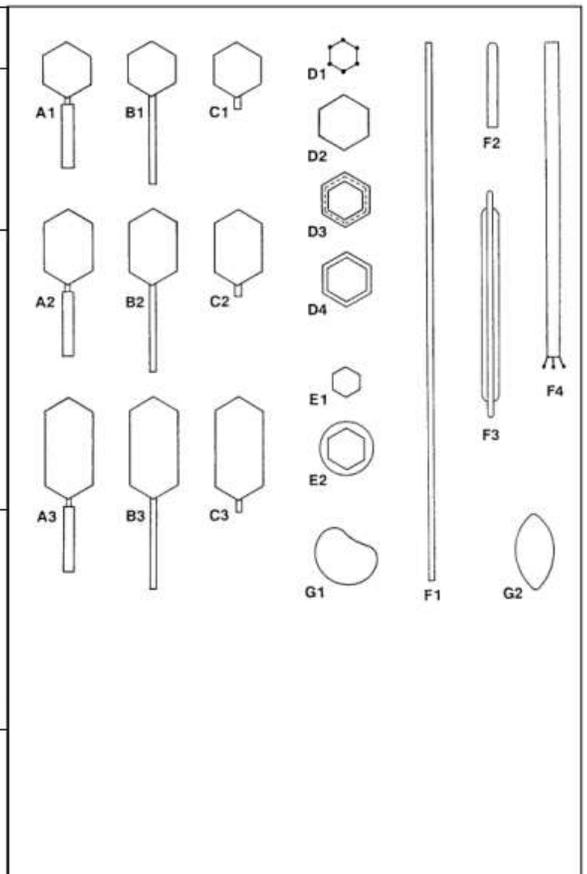
Esta inducción puede producirse espontáneamente o provocarse con luz UV o con mutágenos como la mitomicina C. (Wong, 2004).

Clasificación de los bacteriófagos

Existen 13 familias de fagos que se clasifican de acuerdo a la naturaleza de su genoma y a sus características morfológicas (Tabla 1) (Ackermann, 2001).

Tabla 1: Principales morfotipos y características de las familias de bacteriófagos (Ackermann, 2001)

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



Utilidad y aplicaciones de la fagoterapia

Uso de fagos como antimicrobianos en humanos

Durante los últimos años se ha visto una cantidad considerable de investigaciones en todo el mundo centradas en la explotación de fagos como agentes antibacterianos para un amplio rango de aplicaciones. En cuanto al uso de fagos como agentes antimicrobianos en los seres humanos se refiere, se han realizado múltiples investigaciones, entre las que destaca la realizada por el grupo polaco de Gorski y Weber-Dabrowska, en Wroclaw, Polonia, y por el grupo del Instituto Bacteriófago en Tbilisi, Georgia (Chanishvili, *et al.*, 2001), consideradas las investigaciones más importantes y amplias de los últimos años.

En las investigaciones realizadas en Polonia, las preparaciones de fagos fueron administrados generalmente a pacientes cuyas infecciones no respondían a terapia con antibióticos. Los pacientes tenían una amplia gama de enfermedades causada por bacterias de los géneros *Staphylococcus*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Proteus* y *Pseudomonas*. Las edades de los pacientes oscilaron entre 1 semana y 86 años de edad. Los fagos fueron generalmente administrados por vía oral tres veces al día, o a nivel local mediante aplicación directa en heridas o colocando una suspensión de fago en el ojo, oído o la nariz. En la mayoría de los casos, la sensibilidad bacteriana a los fagos fue monitoreada y en situaciones donde se producía resistencia a bacteriófagos eran utilizados diferentes fagos.

En un estudio de terapia de fagos fueron reportados resultados de 550 casos de 1981 a 1986 por Slopek *et al.* (1987). Estos resultados demostraron que el 92,4% de los pacientes estaban curados, 6,9% de los pacientes mostró una mejora en su estado de salud, en contraste con 0,7% de pacientes en los que la terapia de fagos resultó ser ineficaz (Slopek, *et al.*, 1987).

En un estudio posterior del mismo grupo de investigadores, se reportaron resultados similares. En este caso, la fagoterapia fue aplicada en un grupo de 1307 pacientes de edades comprendidas entre 4 semanas a 86 años (Weber-Dabrowska, *et al.*, 2000). De estos pacientes, la recuperación completa se produjo en 85,9% de los casos, una mejora en la condición en 10,9% de los casos, mientras que 3,8% de los casos no se observó mejoría. Como en el estudio anterior, los pacientes tenían una amplia gama de infecciones bacterianas causadas por *Staphylococcus*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Proteus* y *Pseudomonas* (Weber-Dabrowska, *et al.*, 2000).

El trabajo adicional publicado por este grupo destacó el uso de la terapia de fagos para tratar la piel supurativa crónica en 31 pacientes de edades comprendidas entre 12 y 86 años edad, cuyas infecciones fueron causadas por *Pseudomonas*,

Staphylococcus, *Klebsiella*, *Proteus*, y *E. coli* (Cislo , *et al.*, 1987). De los 31 casos, el 77% mostró mejoras en la condición. Sin embargo, en el 23% restante, el tratamiento se interrumpió ya sea debido a la falta de mejora o el desarrollo de efectos secundarios (Cislo , *et al.*, 1987).

En otro estudio, infecciones bacterianas en pacientes con cáncer fueron tratadas con fago terapia (Weber-Dabrowska , *et al.*, 2001). En este caso, fueron 20 pacientes con cáncer con edades entre 1 y 66 años que presentaban infecciones bacterianas concurrentes causadas por *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* y *E. coli*. En estos 20 pacientes, el tratamiento con antibióticos había fracasado. Los pacientes recibieron por vía oral fago tres veces al día, y en todos los casos la infección fue eliminada, variando el periodo de tiempo de mejoría de 2 a 9 semanas (Weber-Dabrowska , *et al.*, 2001).

En el año 2003, 94 pacientes con septicemia resistente a antibióticos fueron tratados con fagoterapia (Weber-Dabrowska, *et al.*, 2003). En 71 de estos casos, el tratamiento con antibióticos continuó en combinación con la terapia de fagos y en los otros 23 casos el fago se administró solo. De los 94 casos, la recuperación completa se logró en el 85,1% de los casos, mientras que en el 14,9% de los casos la terapia con fagos fue ineficaz.

Hoy en día la terapia de fagos generalmente se considera un tratamiento experimental, en Polonia en donde se administra a pacientes en los que generalmente la terapia antibiótica ha fallado (Gorski, *et al.*, 2007)

Biocontrol Ltd en el Reino Unido realizó ensayos clínicos de fase II con 24 pacientes. Este ensayo fue dirigido a infecciones del oído causadas por *P. aeruginosa*. Los resultados demostraron un 50% reducción de los síntomas en el grupo tratado con fagos comparado con un 20% en el grupo no tratado. Además, después de 3 semanas, el número de células bacterianas presentes en los oídos de los paciente tratados con fagos se reduce en un 80%, mientras que el número de células bacterianas en el grupo no tratado mostro un pequeño aumento (Fortuna , *et al.*, 2008).

Otro uso importante de bacteriófagos fue reportado por Jikia *et al.*, (2005). En este caso el producto PhagoBioDerm se utilizó para tratar a dos hombres de Georgia que fueron expuestos a estroncio-90 y posteriormente desarrollaron infecciones por *S. aureus*. Estas infecciones fueron tratadas sin éxito con antibióticos y pomadas tópicas. Doctores utilizaron PhagoBioDerm, un polímero biodegradable que contiene el antibiótico ciprofloxacina y bacteriófago, diseñado específicamente para la curación de heridas. Cabe mencionar que, la cepa de *S. aureus* tratado demostró ser resistente a ciprofloxacina y a otros antibióticos, por lo que las

mejoras se atribuyen al fago impregnado en el producto (Jikia, *et al.*, 2005). Los dos hombres fueron tratados con PhagoBioDerm un mes después de la hospitalización, la eliminación de la cepa de *S. aureus* se observó después de 7 días de la aplicación del producto. En este caso se mostró que cuando la medicina convencional ha fracasado, la aplicación de bacteriófagos puede tener éxito.

Uso de bacteriófagos en animales como modelos de infección

Como cualquier nuevo medicamento o agente antibacteriano, los bacteriófagos también han sido sometidos a pruebas en animales como modelos de infección humana, con el fin de evaluar su eficacia. Chibani-Chennoufi *et al.* (2004b) (citado por O'Flaherty *et al.*, 2009) cuantificaron la actividad de fagos frente a *E. coli*, tanto *in vitro* como *in vivo* en un modelo de infección en ratones. Los fagos fueron aislados del ambiente, a partir de muestras de agua y de muestras de heces de pacientes de pediatría. Los fagos fueron agregados al agua para beber de los ratones. Curiosamente, la parte *in vitro* del estudio demostró que las cepas intestinales de *E. coli* fueron susceptible a los fagos. Sin embargo, en el estudio *in vivo*, el título global de *E. coli* fue mínimamente afectado. Los autores sugirieron que la *E. coli* residente fue protegida de la infección del fago, considerando dos posibilidades: 1) que la infección del fago fue inhibida por la presencia de grandes cantidades de bacterias no-objetivo, considerando esta posibilidad como una protección física, 2) que las bacterias pudieron encontrarse en fase estacionaria de crecimiento, sirviendo esto como protección fisiológica ante la infección (O'Flaherty *et al.*, 2009).

En otro estudio realizado por Wang *et al.* (2006), se probó la terapia de fagos en un modelo de ratones infectados por *E. coli*. El bacteriófago se aisló de aguas residuales de un hospital y fue designado F9882, el cual exhibió un amplio espectro de actividad lítica contra aislados clínicos de *E. coli* resistentes a antibióticos. Los ratones fueron inyectados con la dosis letal mínima de *E. coli*, y se observó que los ratones que no recibieron fagos fallecieron a las 24 h. En contraste, todos los ratones que recibieron el fago F9882, administrado 40 min después de la inoculación de las bacterias sobrevivieron. Sin embargo, cuando el tratamiento con el fago se retrasó por 20 o 60min, sólo 60% de los ratones sobrevivieron. Esto se redujo aún más, hasta el 20%, cuando los fagos se administraron 3 h después de la inoculación de la bacteria. (Wang *et al.*, 2006). El hecho observado podría ser atribuido al proceso fisiopatológico de la infección, ya que la bacteria pudo haber quedado protegida del contacto con el bacteriófago después del tiempo esperado.

En un experimento, realizado por McVay *et al.* (2007) se utilizaron bacteriófagos para controlar la infección causada por *P. aeruginosa*, en una quemadura de ratón, como modelo de herida, (McVay, *et al.*, 2007); en este caso, un cóctel de

tres fagos fue administrado por vía intramuscular, subcutánea o intraperitoneal a grupos de 18 ratones. La supervivencia global en el grupo control fue del 6% en comparación con las tasas de supervivencia del 22-89%, dependiendo de la vía de inyección, siendo la vía intraperitoneal la más significativa, con un 89% de eficacia (McVay, *et al.*, 2007).

E. coli uropatógeno (UPEC) es otro patógeno multiresistente a antibióticos que recientemente fue tratado con bacteriófagos por Nishikawa *et al.* (2008). El fago T4 y el fago KEP10 fueron administrados en ratones inoculados con la cepa UPEC. Después de 7 días, 100 y 90% de los ratones tratados con T4 y KEP10, respectivamente sobrevivió. En el grupo de control, donde no se administraron fagos, todos los ratones murieron dentro de los 3 primeros días (Nishikawa, *et al.*, 2008).

Wills *et al.* (2005) reportaron el potencial de la terapia de fagos para controlar *S. aureus* en un modelo de infección en heridas de conejo. En este caso, la cepa bacteriana utilizada había causado infecciones en una granja de conejos. Para el experimento, dos grupos de ocho conejos fueron inoculados con cepas de *S. aureus* y un grupo recibió 2×10^9 PFU ml⁻¹ del fago LS2a. Uno de los ocho conejos tratados con fagos desarrolló un absceso de 64 mm², en comparación con el grupo de los ocho conejos no tratados, en los cuales los abscesos iban desde 32 hasta 144mm². Además, en un estudio de dosis-respuesta, todos menos uno de 12 conejos que recibieron *S. aureus* presentaron un absceso. El conejo que no presentó absceso, fue el que había recibido la dosis más alta de fago (6×10^7 PFU ml⁻¹). Un experimento en el que el tratamiento con el fago se retrasó 6, 12 y 24 h después de la inyección bacteriana, se realizó también; en este caso, todos los conejos presentaron abscesos, sin diferencias en la severidad entre éstos y el grupo de control negativo (Wills, *et al.*, 2005).

Cervený *et al.* (2002) examinaron el uso potencial de los fagos como agentes terapéuticos contra la infección por *Vibrio vulnificus* en un modelo de ratón. En el estudio, dos grupos de cuatro ratones fueron inyectados por vía intravenosa con 10^6 CFU ml⁻¹ de *V. vulnificus* e inmediatamente inyectados con 10^8 PFU ml⁻¹ de fago CK-2 (grupo de prueba) y el grupo de control con un buffer de fosfato 0,01% (p/v) de gelatina. Las tasas de supervivencia del grupo control de ratones fue de 0% comparada con la supervivencia total en los ratones tratados con fagos (Cervený, *et al.*, 2002).

Sunagar *et al.* (2010) evaluaron el efecto protector de bacteriófagos ante una bacteremia letal provocada por *S. aureus* en ratones diabéticos y no diabéticos. Durante este experimento también se comparó la eficacia del tratamiento con bacteriófagos y la terapia con antibióticos. La condición diabética fue inducida en

los ratones con estreptozotocina (STZ), la cual se administró intraperitonealmente. La bacteriemia fue provocada mediante la administración intraperitoneal de *S. aureus* (RCS21), con una dosis letal de 2×10^8 UFC en ambos grupos de ratones, diabéticos y no diabéticos. Para el tratamiento se administró una sola dosis de fagos, vía intraperitoneal, a los dos grupos de ratones (diabéticos y no diabéticos) 30 minutos después del desafío con la bacteria. Los fagos utilizados en este experimento (GRCS) fueron aislados a partir de aguas residuales de un sistema de alcantarillado municipal. El siguiente grupo de ratones fue tratado con oxacilina (20 mg/kg de peso corporal) vía intraperitoneal a fin de comparar ambos tratamientos. Finalmente en el grupo control solo se administraron 200 ml de solución salina. Dentro de los resultados obtenidos se encontró que una sola dosis de oxacilina presentó 40% de protección en ratones diabéticos y 70% de los no diabéticos, mientras que tres inyecciones consecutivas de oxacilina protegió 60% de los ratones diabéticos. Sin embargo, una sola dosis de tratamiento de oxacilina rescató 70% de los ratones no diabéticos. En marcado contraste, la administración de una sola dosis de fago GRCS de 2×10^9 PFU brindó protección de 90 y 100% de los ratones diabéticos y no diabéticos respectivamente. Dentro del grupo control se observaron diferencias en el porcentaje de mortalidad a pesar de una dosis similar de RCS21, 100% de mortalidad en ratones diabéticos, en diferencia de 80% en ratones no diabéticos. Con los resultados obtenidos durante este experimento, los investigadores confirmaron que una dosis intraperitoneal única de fagos fue más eficaz que la oxacilina. (Sunagar *et al.*, 2010)

Uso veterinario de bacteriófagos

Además del uso de los fagos para combatir agentes patógenos que afectan a los seres humanos, es posible utilizarlos como agentes terapéuticos para el tratamiento de infecciones en animales.

En la década de 1980 en el Instituto de Investigación de Enfermedades Animales en Houghton, Cambridgeshire, se realizó una de las investigaciones más importantes por Smith y Huggins. En un experimento estos investigadores suministraron una inyección intramuscular, a dosis única, de 3×10^8 UFP/ml de fago, la cual dio protección completa a ratones, que habían sido inyectados con una dosis de 3×10^8 UFC/ml de *E. coli* K1. Además, Smith y Huggins (1982) demostraron que una dosis única de fago fue más efectiva que las dosis múltiples de antibióticos como la ampicilina, tetraciclina y cloranfenicol (Smith y Huggins, 1982). Este grupo también utilizó con éxito bacteriófagos para prevenir la diarrea inducida por *E. coli* en terneros, lechones y corderos. Para realizar dicho estudio se aplicó como profiláctico una mezcla de dos bacteriófagos, B44/1 y B44/2, a fin de proteger a los terneros, lechones y corderos de una infección letal producida por *Escherichia coli* O9:K30, 99 enteropatógena, la cual había sido aislada de

brotes de diarrea neonatal en terneros. Los investigadores observaron que los terneros que respondieron satisfactoriamente al tratamiento de fagos tenían números más bajos de *E. coli* en el tracto digestivo que aquellos terneros que no habían sido tratados (Smith y Huggins, 1983).

Recientemente, Sheng *et al.* (2006) publicaron informes del uso de fagos para controlar *E. coli* O157: H7 en ovejas y ganado. *E. coli* O157: H7 es considerada una amenaza mundial para la salud pública desde su asociación con la enfermedad en 1982, y hoy en día es uno de los patógenos transmitidos por los alimentos más preocupantes, provocando diarrea acuosa, colitis hemorrágica síndrome urémico hemolítico y púrpura trombocitopénica trombótica. Los bovinos y ovinos, son los principales reservorios de este patógeno humano y son las fuentes más comunes de las infecciones ya que *E. coli* serotipo O157: H7 es un miembro de la flora gastrointestinal de rumiantes. En el estudio, se utilizaron dos fagos, SH1 y KH1, para reducir el número de bacterias en ratones, ovejas y vacas. Dentro de los resultados se observó que, a pesar de que SH1, era más eficaz que KH1, no eliminó a todas las bacterias, sin embargo, el número de *E. coli* O157: H7 se redujo en novillos tratados con SH1 solo o una combinación de SH1 y KH1, en comparación con los animales de control (Sheng, *et al.*, 2006).

Infecciones respiratorias causadas por *E. coli* en pollos han sido tratadas con fagos. Se encontró que la terapia con fagos era ineficaz en experimentos en los que se administró el fago en agua potable (Huff, *et al.*, 2002). Además, se estudió la eficacia de bacteriófagos administrados por aerosol y por inyección intramuscular, para tratar una infección por *E. coli* en pollos de engorda (Huff, *et al.*, 2003). En este caso, la inyección intramuscular del fago redujo la mortalidad de 53% a 17%, 46% a 10%, y 44% a 20% cuando este fue administrado a las 0, 24, o 48 h después de la inoculación con 10^4 CFUml⁻¹ de *E. coli*, respectivamente.

Infecciones en pollos en engorda, causadas por *Salmonella*, fueron tratadas con bacteriófagos por Fiorentin *et al.* (2005) y Toro *et al.* (2005). En el estudio realizado por Fiorentin *et al.* (2005), administraron por vía oral bacteriófagos a los pollos, después de la administración, los niveles de *Salmonella enterica* serovar *Enteritidis* se redujeron 3.5 veces por gramo de contenido cecal de los pollos después de 5 días (Fiorentin, *et al.*, 2005). Por otro lado, Toro *et al.* (2005) utilizaron un coctel de fagos específico para *Salmonella* para reducir *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* en pollos. Los autores observaron una reducción de *Salmonella* en el ciego y el íleon en las aves tratadas con fagos. Además, el cóctel de fagos causó un efecto benéfico en el rendimiento de la ganancia de peso (Toro, *et al.*, 2005).

Efectos protectores de los bacteriófagos contra la infección por *Lactobacillus garvieae* en el pescado jurel fueron demostrados después de la administración oral o intraperitoneal de fagos por Nakai *et al.* (1999). En este estudio, 100% de peces inoculados con *L. garvieae* sobrevivió tras la administración del fago, en comparación con sólo el 10% de supervivencia en el grupo de control, donde no se administró el fago (Nakai, *et al.*, 1999). Se ha informado también de protección contra la infección por *Pseudomonas plecoglossicida* en peces Ayu (*Plecoglossus altivelis*) con la administración de fagos (Park, *et al.*, 2000). En el ensayo, los peces fueron desafiados oralmente primero con *P. plecoglossicida* en pellets (10^7 CFUg⁻¹). Quince minutos más tarde, se administró el fago impregnado en el alimento del pescado (10^7 PFUg⁻¹) y alimento libre de fago. Después de 2 semanas, la tasa de mortalidad en los peces que recibieron alimento sin fagos fue de 65% (n = 40). En cambio, la tasa de mortalidad en los peces que recibieron el fago en el alimentos fue del 22,5% (N = 40). Estos investigadores ampliaron sus estudios a una prueba de campo donde fue administrado alimento impregnado con fagos a los peces en un estanque. En este caso, la enfermedad no fue inducida artificialmente pero se produjo de forma natural en el estanque. La tasa de mortalidad (900 ejemplares por día) disminuyó un tercio en comparación con el grupo control (Park y Nakai, 2003).

Uso de bacteriófagos en la industria alimenticia

El control de patógenos bacterianos, que pueden estar presentes en frutas y hortalizas frescas y alimentos listos para comer, es una de las principales preocupación porque estos alimentos por lo general no sufren ningún procesamiento o cocción para eliminar a los patógenos antes de su consumo.

La literatura existente sugiere que los fagos también tiene aplicaciones potenciales en el control de patógenos presentes en alimentos (Goodridge, 2004; Sulakvelidze & Barrow, 2005). Leverentz y sus colegas del Departamento de EE.UU. de Agricultura (USDA), en Maryland, estudiaron el uso de fagos para controlar una variedad de patógenos bacterianos, centrandó su atención en melones y manzanas (Leverentz, *et al.*, 2001, 2003, 2004). Estos investigadores demostraron una reducción de 3,5 log en *Salmonella enterica* serovar *Enteritidis* en rodajas de melón almacenado entre 5 y 10 °C; sin embargo no se observó una disminución significativa en manzanas. Estos investigadores recientemente optimizaron la concentración del fago y el tiempo de aplicación del fago a través de aerosol en rebanadas frescas de melones logrando una reducción de patógenos de 6,8 unidades logarítmicas después de 7 días de almacenamiento, aplicando concentraciones entre 10^4 y 10^8 UFP/ml. De sus observaciones concluyeron que para reducir las poblaciones de patógenos a niveles no detectables se requiere una concentración de fagos de 10^8 UFP/ml (Leverentz, *et al.*, 2004).

En otro estudio diferente, pieles de pollo fueron inoculadas con 10^4 CFU ml^{-1} de *C. jejuni* y posteriormente se administraron 10^6 PFU $\cdot cm^{-2}$ de bacteriófagos resultando una reducción del 95% de *C. jejuni*. Este grupo de investigadores también estudió la reducción de *S. enterica* serovar *Enteritidis* en la piel de pollos. Después de la administración del fagos, se observó una reducción del 99% en el número de bacterias en comparación con los controles donde ningún fago se aplicó (Goode, *et al.*, 2003).

García *et al.* (2009), evaluaron la prevalencia de bacteriófagos capaces de infectar *Staphylococcus aureus* en muestras de leche. Catorce cepas de *S. aureus* aisladas a partir de muestras de leche de vacas con mastitis, y caracterizadas mediante análisis de Polimorfismo en los Productos de Amplificación al Azar (RAPD, por sus siglas en inglés), estas cepas fueron utilizadas como hospederos en los ensayos de enriquecimiento. Se analizaron 75 muestras: leche de tanque de 72 granjas y 3 quesos de distintas fábricas. Se aislaron 8 fagos diferentes, 2 de quesos y 6 a partir de leche. 89% de las muestras contenían fagos $\Phi H5$, $\Phi G7$, $\Phi A72$, que fueron detectados en 26, 21, y 20 muestras de leche, respectivamente. Algunos de los fagos presentaron alta especificidad, infectando sólo una cepa de las 14 utilizadas para el estudio, otros como $\Phi A72$, infectó a una gama mucho más amplia de cepas de estafilococos. Además, durante este estudio se probó la estabilidad de estos fagos en la leche a diferentes temperaturas, encontrando que de 0 a 5 °C es el rango más adecuado. Sin embargo, todos los bacteriófagos aislados durante este estudio fueron bacteriófagos lisogénicos, lo que dificulta el uso de dichos bacteriófagos como agentes de control biológico en los alimentos (García, *et al.*, 2009).

Bueno *et al.* (2012), evaluaron el potencial de dos bacteriófagos líticos aislados de productos lácteos (vB_SauS-phi-IPLA35 y vB_SauS-phi-Saus IPLA88-), como agentes para el control biológico de microorganismos en queso fresco y queso duro. La leche pasteurizada que se utilizó para la preparación de los quesos fue previamente inoculada con *S. aureus* (10^6 CFU/ml). Los quesos fueron fabricados en una planta piloto del Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA-CSIC) mediante la técnica tradicional de manufactura. A un grupo de quesos se les agregó un coctel de fagos (10^6 PFU), mientras que en el grupo de quesos control no se adicionaron fagos. Dentro de los resultados obtenidos, se observó una notable disminución en el recuento de *S. aureus* viables durante la cuajada. En los quesos frescos de prueba se observó una reducción de 3,83 log UFC/g de *S. aureus* en 3 horas, en comparación con el queso control. En los quesos duros, la cuenta de *S. aureus* se redujo en 4,64 log UFC/ en comparación con los quesos testigo. Estos resultados muestran que el uso de bacteriófagos en la industria

alimenticia como agentes de control biológico de microorganismos patógenos en alimentos resulta factible (Bueno, *et al.*, 2012)

Otra forma en que los fagos se han utilizado, para controlar contaminación de patógenos en alimentos, es en combinación con sustancias naturales con poder antimicrobiano, como fue el caso del estudio realizado por Viazis *et al.* (2011a). Este grupo de investigadores probaron el efecto de un cóctel de bacteriófagos, BEC8, solo y en combinación con el aceite esencial trans-cinnamaldehído (TC) sobre la viabilidad de una mezcla de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) O157: H7 resistentes a ácido nalidíxico, las cepas fueron aplicadas en lechuga romana y hojas de espinaca. El propósito de este estudio fue determinar el efecto de BEC8 y TC, individualmente y en combinación. La supervivencia de EHEC se determinó usando recuento de placa estándar en ácido nalidíxico (50 mg / ml) en agar MacConkey. A niveles de inóculo bajos no se detectaron supervivientes cuando ambas hojas se trataron con BEC8 o TC individualmente, después de 24 h a 23 y 37°C. En cambio, a niveles de inóculo EHEC altos y/o disminución de la temperatura de incubación, la eficacia de BEC8 y TC disminuyó. Sin embargo, cuando los dos tratamientos se combinaron, no hubo sobrevivientes después de los primeros 10 min de incubación a todas las temperaturas en ambos vegetales, demostrando la eficacia de la combinación BEC8/TC contra EHEC en ambos vegetales de hojas verdes, combinación que podría ser utilizado como un agente antimicrobiano contra EHEC O157: H7 a fin de reducir su incidencia en la cadena alimentaria (Viazis, *et al.*, 2011a).

En otro estudio realizado por el mismo grupo de investigadores, se determinó el efecto de la mezcla de fagos previamente caracterizados, BEC8, con actividad lítica sobre *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) O157: H7, la mezcla de fagos se aplicó sobre materiales típicamente utilizados como superficies en el procesamiento de alimentos. Acero inoxidable (SSC), cerámica (CTC) y polietileno de alta densidad (HDPEC) fueron utilizados. Los cultivos de ECEH O157: H7 cepas EK27, ATCC 43895, y 472 fueron combinados. BEC8 fueron aplicados sobre superficies inoculadas con los cultivos de ECEH O157: H7 e incubadas a 4, 12, 23, y 37 °C. La supervivencia EHEC se determinó utilizando recuento estándar en placa en agar de soya tripticasa. A 37 ° C y 12 °C en SSC, no se detectaron sobrevivientes después del tratamiento con BEC8 a los 10 min y a 23 °C después de 1 h. Un resultado similar se obtuvo en CTC a 37 °C después de 10 min, y después de 1 hora a 23 °C. Los resultados obtenidos durante este estudio indican que la mezcla de fagos BEC8, es eficaz dentro de una hora frente a niveles bajos de la mezcla de EHEC a temperatura ambiente en las 3 superficies. Estos fagos podrían ser utilizados para reducir la contaminación por patógenos bacterianos en equipos y superficies para el procesamiento de

alimentos, reduciendo con esto la incidencia de enfermedades transmitidas por alimentos (Viazis, *et al.*, 2011b).

Recientemente la Food and Drug Administración (FDA) y el Departamento de Agricultura de EE.UU. han aprobado preparaciones comerciales de fagos para prevenir la contaminación bacteriana de los animales, los cultivos, la carne y otros alimentos. La FDA reconoce actualmente preparados comerciales de bacteriófagos contra patógenos bacterianos comunes, tales como *Listeria monocytogenes* y *E. coli* aprobados para su uso en los alimentos consumidos por los seres humanos (71 Fed. Reg. 47729,.. 2006). El primer producto basado en bacteriófagos, aprobado en inocuidad de alimentos, fue ListShield™ (LMP-102™), de Intralytix Inc, un cóctel de fagos que se dirige a los contaminantes *L. monocytogenes* en los alimentos listos para comer (RTE) que contengan productos de carne y aves de corral (Bren, 2007). La aprobación se concedió en 2006 y es la primera vez que la FDA aceptó el uso de una preparación de fagos como un aditivo alimentario. Similares aplicaciones de seguridad alimentaria y otras aplicaciones no humanas, como en la cría agrícola, animal, veterinaria y sectores de diagnóstico parecen estar progresando con un número creciente de productos disponibles cada vez mayor. (Parracho, *et al.*, 2012)

Principales patógenos transmitidos por alimentos

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) son enfermedades producidas por la ingestión de alimentos o agua contaminados con agentes químicos o microbiológicos, por lo que pueden clasificarse en infecciones o intoxicaciones alimentarias sin incluir las reacciones de hipersensibilidad a los alimentos. Las ETA y otras enfermedades entéricas infecciosas ocurren a menudo como brotes, siendo una causa importante de morbilidad y mortalidad en todo el mundo, además de producir un gran impacto económico debido a que produce gastos en salud y en actividades económicas relacionadas con la producción de alimentos. (Zamudio, *et al.*, 2011).

Para el año 2005 se estimó que 1,5 millones de personas murieron a causa de enfermedades diarreicas a nivel mundial y el 70% de ellas son atribuidas a las ETA, y se estima que durante el año de 1996 en Estados Unidos se produjeron 76 millones de casos, 325 mil hospitalizaciones y cinco mil muertes. (Zamudio, *et al.*, 2011).

Existen numerosos microorganismos patógenos que pueden contaminar los alimentos, ocasionando cuadros clínicos diferentes según el agente involucrado. Se han descrito más de 250 enfermedades, de las cuales la mayoría son

infecciones ocasionadas por bacterias, virus y parásitos. Generalmente el agente patógeno o la toxina se introducen en el cuerpo a través del tubo digestivo, provocando náusea, fiebre, vómitos, cólicos abdominales, diarrea y deshidratación. La causa más común de estas enfermedades, son la presencia de bacterias patógenas en alimentos crudos o poco cocidos. (Moreno y Alarcón, 2010).

Dentro de los principales patógenos bacterianos encontrados en alimentos destacan tanto bacterias Gram positivas como Gram negativas, como se muestra a continuación (Tabla 2a, 2b).

Tabla 2a.- Principales microorganismos patógenos Gram positivos encontrados en alimentos.

Patógeno	Conceptos básicos	Fuentes	Incubación	Duración
<i>Clostridium botulinum</i>	Bacteria que puede encontrarse en comida húmeda y con poco ácido. Produce toxinas	Alimentos enlatados y preparados en el hogar, alimentos envasados al	4 a 36 horas después de consumir comida	Entre 1 semana y un año

**AISLAMIENTO DE BACTERIÓFAGOS DE MUESTRAS DE AGUA PARA
 EL CONTROL DE PATÓGENOS ASOCIADOS A ALIMENTOS**

	causantes del botulismo, provocando parálisis muscular. El botulismo es producido por el consumo de las esporas de <i>Clostridium botulinum</i> , que crecen en el intestino y liberan toxinas.	vacío y envueltos en forma hermética, productos derivados de carne de res, pescados y mariscos, y aceites de cocina con hierbas.	contaminada.	entero.
<i>Clostridium perfringens</i>	Bacteria que produce esporas resistentes al calor, que pueden crecer en alimentos que no están bien cocidos o alimentos no refrigerados.	Carne de res y productos derivados de ella.	8 a 12 horas después de consumir comida contaminada.	1 día o menos
<i>Listeria monocytogenes</i>	Puede crecer lentamente a temperaturas de refrigeración. Produce enfermedades graves o la muerte en mujeres embarazadas, fetos y recién nacidos.	Alimentos refrigerados listos para consumir, leche sin pasteurizar y productos lácteos o alimentos elaborados con leche sin pasteurizar.	48 a 72 horas después de la ingestión, pero se puede producir entre 7 y 30 días después de consumir comida contaminada.	1 a 4 días
<i>Staphylococcus aureus</i>	Esta bacteria está presente en la piel y en las fosas nasales de los seres humanos. Es transferida a la comida por las personas como consecuencia de una higiene deficiente. Es productor de toxinas causantes de enfermedades.	Productos lácteos, ensaladas, masas rellenas con crema y otros postres, comidas con alto contenido proteico (jamón cocido, carne de res y pollo crudos), y seres humanos (piel, cortes infectados, granos, nariz y garganta).	Normalmente rápida: entre 30 minutos y 8 horas después de consumir comida contaminada.	24 a 48 horas

Tabla 2b.- Principales microorganismos patógenos Gram negativos encontrados en alimentos.

Patógeno	Conceptos básicos	Fuentes	Incubación	Duración
<i>Campylobacter jejuni</i>	Es la causa más común de diarrea de origen bacteriano en los Estados Unidos. Los niños menores de 1	Leche cruda, agua no tratada, carne de res, pollo o pescados crudos y que no estén bien cocidos.	De 2 a 5 días después de consumir comida contaminada.	7 a 10 días

**AISLAMIENTO DE BACTERIÓFAGOS DE MUESTRAS DE AGUA PARA
 EL CONTROL DE PATÓGENOS ASOCIADOS A ALIMENTOS**

	año tienen la tasa más alta de infecciones.			
<i>Escherichia coli</i>	Grupo de bacterias que puede producir diversas toxinas mortales.	Carne de res, productos frescos no cocidos, leche cruda, jugos sin pasteurizar y agua contaminada.	Normalmente, 3 a 4 días después de la ingestión, pero se puede producir entre 1 y 10 días después de consumir comida contaminada.	5 a 8 días
<i>Salmonella enteritidis</i>	Puede infectar los ovarios de gallinas aparentemente saludables e infectar internamente los huevos antes de que sean puestos.	Huevos crudos o que no estén bien cocidos, carne de res, pollo, pescados y mariscos crudos, leche cruda, productos lácteos y productos frescos.	12 a 72 horas después de consumir comida contaminada.	4 a 7 días
<i>Salmonella typhimurium</i>	Algunas cepas de esta bacteria, presentan resistencia a antibióticos.	Carne de res, pollo, pescados y mariscos crudos, leche cruda, productos lácteos y productos frescos.	12 a 72 horas después de consumir comida contaminada.	4 a 7 días
<i>Shigella sp.</i>	Bacteria que se transmite fácilmente de persona a persona a través de la comida, como consecuencia de una higiene deficiente, Solamente los seres humanos son portadores de esta bacteria.	Ensaladas, productos lácteos, ostras crudas, carne molida de res, pollo y agua sucia.	1 a 7 días después de consumir comida contaminada.	5 a 7 días
<i>Vibrio cholerae</i>	Se presenta naturalmente en ambientes de estuario. Causa cólera, provocando la muerte si no es tratada.	Pescados y mariscos crudos o que no estén bien cocidos, u otros alimentos y agua contaminados.	6 horas a 5 días después de consumir comida contaminada.	7 días
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Vive en agua salada y provoca enfermedades gastrointestinales en los seres humanos.	Pescados y mariscos crudos o que no estén bien cocidos.	4 a 96 horas después de consumir comida contaminada.	2.5 días
<i>Vibrio vulnificus</i>	Bacteria que vive en agua de mar cálida. Puede provocar infecciones en personas que consumen pescados y mariscos contaminados o que tienen una herida abierta expuesta al agua	Pescados y mariscos crudos, en especial, ostras crudas.	Normalmente, 16 horas después de consumir comida contaminada o de la exposición al organismo.	2 a 3 días

**AISLAMIENTO DE BACTERIÓFAGOS DE MUESTRAS DE AGUA PARA
 EL CONTROL DE PATÓGENOS ASOCIADOS A ALIMENTOS**

	de mar.			
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Bacteria que provoca yersiniosis, una enfermedad que se caracteriza por diarrea o vómitos.	Carne de res y pescados y mariscos crudos, productos lácteos, productos frescos y agua no tratada.	1 a 2 días después de consumir comida contaminada.	1 a 2 días

<http://www.fda.gov/Food/ResourcesForYou/HealthEducators/ucm091976.htm>

En la presente investigación se tomaron como modelo de estudio dos de estos patógenos: *E. coli* como modelo de bacteria Gram-negativa y *S. aureus* como modelo de bacteria Gram-positiva, debido a que ambos microorganismos han sido ampliamente estudiados a nivel de laboratorio y ambos son altamente patógenos para el ser humano, causando múltiples enfermedades debido a su presencia en distintos tipos de alimentos.

***Escherichia coli* como modelo de estudio**

Escherichia coli es el miembro más frecuente e importante del genero *Escherichia* y es una bacteria que presenta una gran variabilidad genética. Existen variedades no patógenas que habitan normalmente en el intestino de mamíferos, sin embargo, existen variantes patogénicas dañinas para el ser humano y animales. (Dini, 2011).

Este microorganismo se asocia a enfermedades múltiples, incluida la gastroenteritis e infecciones extraintestinales, como las urinarias (ITU), meningitis y sepsis. Multitud de cepas son capaces de producir enfermedad y algunos serotipos se asocian a una mayor virulencia (Murray, *et al.*, 2009).

Se han identificado una gran variedad de alimentos contaminados con *E. coli*, de los que destacan carne y derivados insuficientemente cocidos, productos lácteos y jugos no pasteurizados, vegetales y agua de consumo, principalmente (Dini, 2011). La contaminación proviene, en el caso de la carne, de su contacto con las heces del intestino vacuno durante el desposte, la de la leche por contacto fecal durante el ordeño (Griffin y Tauxe, 1991), y la de vegetales y sus derivados por contacto con heces en el suelo de las plantaciones o riego con aguas servidas (Strachan, *et al.*, 2006).

E. coli posee una amplia variedad de factores de virulencia especializados. De acuerdo a los factores de virulencia que presenta cada cepa, podemos encontrar 5 variantes patogénicas de *E. coli*, capaces de producir enfermedades: *E. coli* enteropatógena (ECEP), *E. coli* enterotoxígena (ECET), *E. coli* enterohemorrágica (ECEH), *E. coli* enteroinvasiva (ECEI) y *E. coli* enteroagregativa (ECEA), difiriendo además en el tipo de daño producido en el huesped (Donnenberg, 2002, Nataro & Kaper, 1998, Doyle, *et al.*, 2001). Las cepas de las especies del género

Escherichia poseen factores de virulencia especializados que se clasifican en adhesinas y exotoxinas (Tabla 3) (Murray, *et al.*, 2009).

Tabla 3: Adhesinas y exotoxinas presentes en cepas de *E.coli* (Murray, *et al.*, 2009).

Bacteria	Adhesinas	Exotoxinas
ECET	Antígenos del factor de colonización (CFA/I, CFA/II, CFA/III)	Toxina termolábil (LT-1): toxina termo estable (STa)
ECEP	<i>Pili</i> formadores de haces (Bfp); intimina	
ECEA	Fimbrias adherentes agregantes (AAF/I, AAF/II, AAF/III)	Toxina termoestable enteroagregante (EAST); toxina codificada por plasmidos (Pet)
ECEH	Bfp: intimina	Toxinas de Shiga (Stx-1, Stx-2)
ECEI	Antígeno del plasmido invasivo (Ipa)	Hemolisina (HlyA)
Patógenos urológicos	<i>Pili P; fimbrias Dr</i>	

E. coli enterotoxigénica (ETEC, del inglés Enterotoxigenic *E. coli*): Las infecciones por ETEC tienen lugar a través de dos factores de virulencia: fimbrias adhesivas y endotoxinas. La colonización del epitelio intestinal del huésped es esencial para la patogénesis. Esta adherencia está mediada por estructuras proteínicas superficiales de la bacteria, conocidas como factores de colonización.

Escherichia coli enteropatógenas (EPEC, del inglés Enteropathogenic *E.coli*): no poseen fimbrias, pero la expresión de toxinas similares a las del género *Shigella* causa graves formas de diarrea asociada con enfermedad de sangrado complicaciones como la colitis hemorrágica o insuficiencia renal.

E. coli enteroagregativa (EAEC, del Inglés Enteroaggregative *E. coli*): se definen como aquellas que no secretan enterotoxinas termolábiles ni termoestables y adhieren a células HEp-2 en un patrón agregativo, reconocido por su auto aglutinación en forma de “ladrillos apilados”.

E. coli enteroinvasiva (EIEC, del inglés Enteroinvasive *E. coli*): Este grupo, junto con miembros del género *Shigella* son responsables de una enfermedad denominada disentería bacilar o shigellosis que se caracteriza por fiebre, dolores abdominales y diarrea. Estas bacterias desencadenan la enfermedad a través de la invasión de las células epiteliales del intestino grueso, multiplicación dentro de las células y la diseminación célula-a-célula (sin abandonar el medio intracelular y exponerse nuevamente a la luz intestinal) a través de la capa epitelial del colon.

Clínicamente, la enfermedad causada por *Shigella*, es difícil distinguir de la causada por EIEC, pero mientras que para la shigelosis 500 de las células bacterianas son suficientes para desencadenar la enfermedad, en caso de EIEC se necesitan 10^6 células.

E. coli enterohemorrágica (EHEC, enterohemorrhagic *E. coli*): Es un subgrupo dentro de las denominadas *E. coli* productoras de toxina Shiga (STEC). Las EHEC, además de producir esta toxina, poseen la capacidad de producir la lesión de adherencia y esfacelamiento. Esta bacteria se asocia a brotes de colitis hemorrágica y es considerado el principal agente causal del Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) (Dini, 2011).

Las cepas de *E. coli* que forman parte de la microflora comensal y normal, pueden convertirse en patógenas cuando adquieren genes con factores de virulencia presentes en plásmidos, bacteriófagos o islas de patogenicidad, o pueden actuar como patógenos oportunistas, produciendo infecciones en anfitriones inmunocomprometidos. La mayoría de las infecciones causadas por *E. coli* son endógenas, aunque las cepas que producen gastroenteritis se adquieren generalmente en forma exógena. (Murray, *et al.*, 2009)

Staphylococcus aureus

Los estafilococos conforman un importante grupo de patógenos en el ser humano, y son causantes de un amplio espectro de enfermedades como infecciones de la piel, tejidos blandos, huesos y aparato genitourinario e infecciones oportunistas. *S. aureus* es el miembro que se asocia con mayor frecuencia a enfermedades en el humano, y es además el miembro más virulento y mejor conocido del género. (Murray, *et al.*, 2009).

S. aureus es una bacteria esférica, Gram positiva, anaerobia facultativa, productora de hemolisinas y coagulasa. *S. aureus* se asocia a osteomielitis, endocarditis y septicemia, pudiendo ser fatal, además se asocia con procedimientos invasivos en el hospital, como cirugías, venoclisis, inserción de implantes o prótesis, etc. Además de las infecciones Adquiridas en Hospitales (AH), *S. aureus* puede causar infecciones en la población abierta, a las que se conoce como Adquiridas en la Comunidad (AC), entre las que destacan úlceras, abscesos, forúnculos y escaldaduras de la piel y la neumonía necrotizante. (Valdez *et al.*, *en preparación*).

Generalmente los factores de virulencia asociados a las cepas de infecciones AH son componentes de la pared celular, como el peptidoglicano, factores de adhesión, polisacáridos capsulares y la proteína A; enzimas hidrolíticas como las hialuronidasas, lipasas, nucleasas, colagenasas, catalasa, coagulasa y

estafilocinasa; toxinas como las hemolisinas (α , β , γ y δ), enterotoxinas, toxinas exfoliativas, asociada al síndrome de choque tóxico. (Valdez, *et al.*). *S. aureus* es reconocido además, por poseer genes que confieren resistencia a una gran variedad de antibióticos, entre ellos la meticilina, la resistencia a dicho antibiótico se observó por primera vez 1961, a tan solo dos años de que comenzará a utilizarse en el tratamiento de infecciones por *S. aureus*. (Valdez, *et al.*, en *preparación*)

S. aureus es un agente etiológico importante de enfermedades transmitidas por alimentos debido a la capacidad de algunas cepas para producir enterotoxinas termoestables y otros factores de virulencia que causan envenenamiento alimenticio. Algunas cepas de *S. aureus* son capaces de producir hasta 20 diferentes enterotoxinas estafilocócicas (SE), que podría ser responsable de la intoxicación alimentaria. (García, *et al.*, 2009a).

Cepas de *S. aureus* han sido aisladas de una gran variedad de alimentos incluyendo productos lácteos. La mastitis, causada por este patógeno y la poca higiene en las condiciones de procesamiento son las principales fuentes de contaminación en productos lácteos. El crecimiento de *S. aureus* en leche cruda y productos lácteos representa un potencial peligro para la salud de los consumidores. (García, *et al.*, 2009b). Por ejemplo, en Francia, 25 de cada 149 brotes de infecciones estafilocócicas transmitidas por los alimentos en 1999 se atribuyeron al consumo de quesos de leche cruda, y 3 de cada 13 en Italia. (WHO, 2000). Un brote masivo de intoxicación estafilocócica se informó en Japón causado por el consumo de leche descremada reconstituida (Ikeda, *et al.*, 2005).

Otros alimentos comúnmente contaminados con *S. aureus* son las carnes elaboradas como el jamón y el cerdo crudos con sal, los bollos rellenos de crema, ensaladas y helados. El crecimiento de *S. aureus* en las carnes crudas con sal corresponde a su capacidad de proliferar en presencia de concentraciones elevadas de sal (halotolerancia). La contaminación de alimentos por *S. aureus* generalmente es causada por un portador humano, y aproximadamente el 50% de dichos portadores son asintomáticos. Las intoxicaciones alimenticias por estafilococos se caracterizan por la aparición de vómitos, diarrea, dolor abdominal y náuseas. (Murray, *et al.*, 2009).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) son una causa importante de morbilidad y mortalidad en todo el mundo, además de producir un gran impacto económico tanto por gastos en salud como en las actividades económicas relacionadas en la producción de alimentos. (Zammudio *et al.*, 2011).

La contaminación de los alimentos es una consecuencia directa de las deficiencias sanitarias durante su proceso de elaboración, manipulación, transporte, almacenamiento y las condiciones en que son suministrados al consumidor. Los microorganismos provenientes de diferentes fuentes de contaminación, son transferidos a la superficie de los alimentos donde encuentran los nutrientes necesarios para proliferar. (Blanco *et al.*, 2011).

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), existen 250 tipos de enfermedades transmitidas por alimentos que se consolidan como un problema de salud pública (Helms *et al.*, 2004), destacando como agentes causantes de infecciones patógenos como *Salmonella sp.*, *Campylobacter sp.*, *Escherichia coli*, *Listeria sp.* y *S. aureus* (García *et al.*, 2008)

Hoy en día la inocuidad alimentaria resulta sumamente importante debido a las exigencias cada vez mayores de los consumidores, además de las demandas del comercio exterior. Esta inocuidad alimentaria permite prevenir enfermedades, principalmente digestivas, causadas por una gran variedad de agentes patógenos presentes en los alimentos.

A pesar de las medidas preventivas que se han implementado en las industrias alimenticias para reducir la contaminación bacteriana, y el uso de métodos que eliminen patógenos como la aplicación de vapor, calor seco, la luz UV y el uso de desinfectantes, en los últimos años se ha presentado una creciente incidencia de reportes de enfermedades causadas por alimentos en todo el mundo, ocasionando cuadros clínicos diferentes según el agente involucrado. (Moreno y Alarcón 2010). Por ello se buscan nuevas estrategias para evitar la transmisión de agentes patógenos bacterianos a fin de satisfacer las demandas de los consumidores y proteger la salud de los mismos.

JUSTIFICACIÓN

Las tecnologías actuales empleadas para inactivar patógenos en los alimentos no son infalibles, esto se demuestra con el continuo aumento de enfermedades causadas por patógenos, como *Salmonella*, *Campylobacter*, *Escherichia coli*, *Listeria* y *S. aureus*, entre otros patógenos, los cuales afectan la salud de los humanos causando un problema de salud pública. (García *et al.*, 2008).

En los últimos años, un gran número de estrategias para minimizar la carga microbiana en alimentos han sido probadas, uno de ellos fue el uso de antibióticos, el cual actualmente está restringido debido al incremento de cepas bacterianas resistentes a antibióticos, además de reacciones alérgicas que pueden causar en humanos.

Otros métodos como los tratamientos físicos, tales como vapor, calor seco y la luz UV, pueden producir efectos no deseados en los alimentos como el deterioro de las propiedades organolépticas; además, el uso excesivo de desinfectantes ha llevado al desarrollo de cepas resistentes. Por otro lado, no es posible utilizar cualquier método para reducir la contaminación por patógenos directamente a las frutas frescas, verduras y algunos alimentos listos para el consumo, esto sin tomar en cuenta las demandas de los consumidores, que prefieren adquirir alimentos mínimamente procesados con menos conservadores químicos.

En años recientes se ha hecho ampliamente reconocido que los bacteriófagos tienen aplicaciones potenciales en la industria alimentaria, como bioconservantes en los alimentos.

El uso de bacteriófagos resulta una alternativa segura, eficaz y accesible para la preservación de alimentos sin el uso de antibióticos, ya que son inofensivos para las células de mamíferos y su alta especificidad de anfitrión mantiene la microbiota natural inalterada. (García *et al.*, 2008).

OBJETIVO GENERAL

- Obtener bacteriófagos líticos que actúen sobre las principales especies bacterianas presentes en alimentos contaminados, tomando a *E. coli* y *S. aureus* como modelos de estudio.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar el aislamiento de bacteriófagos.
- Determinar el rango de hospedero de los bacteriófagos aislados.

MATERIALES Y METODOS

Inicialmente se buscaban bacteriófagos líticos para *S. aureus*, por lo que únicamente se trabajó con cepas de dicho microorganismo, utilizando algunas de las cepas que se tienen en la colección del CMEB (Bautista *et al.*, 2013; Angel-Andrés, 2012)

Para el aislamiento y enriquecimiento de bacteriófagos específicos de *S. aureus* se siguió la metodología disponible en la literatura (García, *et al.*, 2009, Tanji, *et al.*, 2008, Synnott, *et al.*, 2009).

Toma de muestra

- 1) La muestra se colectó en un tubo Falcon de 50 ml esteril. El tubo se sumergió por debajo del nivel de la superficie del líquido (aguas en tratamiento, leche del tanque, etc.) y se transportó en hielo al laboratorio.
- 2) Las muestras se centrifugaron a 1000 X g por 15 min.
- 3) El sobrenadante se recuperó y se le adicionaron 100 µL de cloroformo por cada 10 ml de sobrenadante. Se incubó en agitación por 20 min a 120 rpm y se centrifugó nuevamente en las condiciones ya mencionadas.
- 4) El sobrenadante se filtró a través de una membrana Millipore de 0.22 µm (GSWP 02500) y se almacenó a 4°C.

Enriquecimiento de los bacteriófagos.

1) Cepas de *S. aureus* perfectamente caracterizadas se dejaron crecer durante toda la noche a 37°C en agitación a 200 rpm en tubos de cultivo con 3 ml de medio de cultivo 2xYT* (triptona, 16 g/L; extracto de levadura, 10 g/L; NaCl, 5 g/L).

* El medio 2xYT se preparó aparte y al momento de usar se adicionó el CaCl₂ y el MgSO₄ a partir de soluciones madre estériles de 100 mg/ml.

- 2) Del cultivo de toda la noche se tomaron 150 µL y se inocularon en 3 ml de medio 2xYT adicionado con CaCl₂, 10 mg/L y MgSO₄, 10 mg/L (2xYTϕ). Se adicionó 150 µL del filtrado de bacteriófagos y se incubó por toda la noche a 37°C en agitación a 200 rpm.
- 3) El cultivo clarificado por la lisis de las bacterias se centrifugó a 1000 x g por 15 min. Al sobrenadante se le adicionaron 100 µL de cloroformo por cada 10 ml de sobrenadante, se incubó en agitación por 20 min a 120 rpm y se centrifugó nuevamente en las condiciones anteriormente mencionadas.
- 4) El sobrenadante fue filtrado a través de una membrana Millipore de 0.22 µm (GSWP 02500). Al filtrado se le adicionaron 100 µL de cloroformo por cada 10 ml de sobrenadante y fue almacenado a 4°C.

Aislamiento de los bacteriófagos

1) De cultivos de *S. aureus* de toda la noche en 3 ml de medio 2xYTØ, se agregaron 100 µL a 3 ml de 2xYTϕ-top agar (2xYTϕ con 7 g/L de agar) fundido y atemperado a 45°C, al cual se añadieron 100 µL de diluciones seriadas del filtrado de bacteriófagos. La mezcla fue vertida en placas de agar 2xYTϕ (2xYTϕ con 1.5 g/L de agar). Y se incubó por toda la noche a 37°C.

2) Las placas líticas obtenidas se aislarón utilizando una puntilla de 1000 µL (azul) con la punta recortada. El trozo de agar fue suspendido en amortiguador SM (Tris-HCl 20 mg/L, MgSO₄ 10 mg/L, CaCl₂ 10 mg/L, NaCl 100 mg/L; pH 7.5). Y se añadieron 100 µL de cloroformo por cada 10 ml de sobrenadante.

Tras utilizar un gran número de muestras como posibles fuentes de bacteriófagos y no obtener los resultados esperados, se procedió a trabajar con cepas de *E. coli* a la par que con *S. aureus* y se realizaron algunas modificaciones a la metodología inicialmente establecida. Además se procedió a recolectar muestras para obtener aislamientos de *E. coli*, ya que en el laboratorio únicamente se contaba con una cepa de referencia.

Aislamiento de *Escherichia coli*.

Se aislaron 5 cepas de *Escherichia coli* de diferentes fuentes y se utilizaron dos cepas de referencia: *E. coli* ATCC25922 y *E. coli* XL1Blue.

Para la obtención de los aislamientos de *E. coli* se recolectaron muestras de heces fecales de cerdos, pollos, borregos, vacas y caballos, así como aguas negras, muestras de leche cruda y quesos.

Las muestras fueron recolectadas y transportadas en tubos que contenían caldo BHI (BDBioxon) para su posterior agitación a 37°C durante 24 h.

Después de la incubación, se tomaron alícuotas de cada muestra y con la ayuda de hisopos estériles fueron sembradas con la técnica de estriado masivo en placas con medio de Agar de Eosina y Azul de Metileno (EMB, BDBioxon), las placas fueron incubadas a 28°C durante 24 h.

Finalmente, se observaron las diferentes morfologías coloniales típicas de *E. coli* en las placas de EMB, para ello se seleccionaron las colonias que presentaron coloración verde con brillo metálico.

Identificación de *Escherichia coli*

Las colonias que presentaron morfología característica de *E. coli*, fueron seleccionadas y cultivadas por estría cruzada en medio EMB con la finalidad de obtener cultivos puros.

Los cultivos puros fueron identificados a través de pruebas bioquímicas. Los medios utilizados como pruebas bioquímicas de identificación de *E. coli* fueron Agar de Hierro-Triple Azúcar (TSI, BDBioxon), Agar Citrato de Simmons (BDBioxon), Agar de Hierro y Lisina (LIA, BDBioxon), MIO (BDBioxon) y rojo de metilo (Sigma). Se seleccionaron únicamente los aislamientos que presentaron metabolismo característico de *E. coli*, el resto fue descartado (Tabla 4).

Tabla 4: Características metabólicas de *E. coli*.

Medio	Resultado
TSI	A/A (gas)
Citrato de Simmons	Negativo
LIA	K/K
MIO	M(+) I(+) O(+)
RM	Positivo

Obtención de bacteriófagos

Para la obtención de los bacteriófagos se recolectaron muestras de diferentes fuentes como: aguas de riego, quesos, leche, agua de mar y heces de bovinos, para ello se utilizaron tubos Falcón de 50 ml estériles.

A cada una de las muestras de diferentes fuentes se les agregó aproximadamente 20 ml de caldo 2xYT, posteriormente fueron inoculadas con 30 μ L de cultivo de cada uno de los aislamientos de *E. coli* previamente crecidos en caldo 2xYT y se incubaron a temperatura ambiente durante 24 h.

Transcurrido el tiempo de incubación, las muestras fueron centrifugadas a 4000 rpm durante 20 min, el sobrenadante fue recuperado y filtrado a través de una membrana Millipore de 0.22 μ m. El filtrado obtenido se le agregó 100 μ L de cloroformo por cada 10 ml de sobrenadante y fue almacenado a 4°C para su conservación.

Enriquecimiento de los bacteriófagos

Cepas de *E. coli* ATCC 25922 se inocularon en 3 ml de caldo 2xYT y se incubaron en agitación durante toda la noche a 37°C. Del cultivo se tomaron 40 μ L y se mezclaron con 4 ml de 2xYT ϕ -top agar (0.7%) fundido y atemperado. Esta mezcla se vertió en placas con 2xYT ϕ -top agar (1,5%) previamente gelificado.

Una vez que el agar gelificó, se agregaron aproximadamente 10 μ L del filtrado y se dejó secar, las placas fueron incubadas durante 24 h a 28°C. Además, con la finalidad de corroborar que el cloroformo no tenía un efecto inhibitor del crecimiento bacteriano, se utilizó un control que contenía únicamente medio SM y cloroformo (100 μ L de cloroformo por cada 10 ml de medio) el cual fue tratado de la misma forma que las soluciones de fagos descritas anteriormente.

Después de la incubación, se observaron las placas y se identificaron las zonas de lisis que se caracterizan como zonas circulares claras en el medio. Las zonas con lisis se recuperaron con un sacabocado y el trozo de agar fue colocado en tubos eppendorf de 2 ml y se agregaron 500 μ L de medio SM, la mezcla fue agitada

vigorosamente con el fin de disolver el trozo de agar que contenía los bacteriófagos. Finalmente, a cada tubo con la suspensión de fagos, se le agregó cloroformo (100 μ L de cloroformo por cada 10 ml de medio) para eliminar bacterias que pudieran acarrear con el agar. Las muestras que no presentaron lisis en los cultivos fueron descartadas.

La suspensión de fagos se sometió a un segundo enriquecimiento, se mezclaron 20 μ L de cultivo de cada uno de los aislamientos de *E. coli* con 2 ml de caldo 2xYT y 20 μ L de solución de fagos, esta mezcla se incubó durante 24 h a 37°C en agitación. Una vez transcurrido el tiempo de incubación la mezcla se centrifugó a 4000 rpm durante 20 min, el sobrenadante se recuperó en tubos ependorf y se agregó cloroformo (100 μ L de cloroformo por cada 10 ml de sobrenadante). Esta solución fue almacenada en refrigeración a 4°C y fue probada con cada uno de los aislamientos de *E. coli* a fin de observar si las soluciones de fagos también producían lisis sobre estos.

Aislamiento de los bacteriófagos

El aislamiento de los bacteriófagos se realizó para identificar la presencia de mezclas de fagos en cada una de las muestras, para lo cual se mezclaron 20 μ L de un cultivo de *E. coli* ATCC25922 con 20 μ L de las soluciones de fagos obtenidas a partir de cada una de las muestras, esta mezcla se colocó en tubos con 2 ml de medio 2xYT Φ -top agar (0.7%) fundido y atemperado. Esta mezcla se vertió en placas con 2xYT Φ -top agar (1.5%) y se dejaron secar, para posteriormente incubar a 28°C durante 24 h.

Después de la incubación se observaron zonas líticas con diferentes morfologías, cada una de las morfologías puede corresponder a un fago diferente en una mezcla. Aquellas que presentaron diferencias en tamaño, borde y transparencia fueron recuperadas en medio SM y nuevamente fueron plaqueadas con cultivos de *E. coli* de la forma ya descrita, hasta observar morfologías homogéneas en cada una de las placas.

Una vez que se obtuvieron placas homogéneas, se aislaron cada una de las morfologías en medio SM y se le adicionó cloroformo (100 μ L de cloroformo por cada 10 ml de solución de fagos) para su conservación en refrigeración a 4°C para su posterior determinación de rango de hospedero.

Determinación del rango de hospedero

Para la determinación del rango de hospedero se prepararon cultivos de cada uno de los aislamientos, para lo cual se inocularon tubos con caldo 2xYT con cada uno de los aislamientos, estos tubos fueron incubados con agitación durante 24 h a 37°C. Se tomaron 20 μ L de los cultivos y se mezclaron con 2 ml 2xYT Φ -top agar

(0.7%) fundido y atemperado. Esta mezcla fue vertida sobre placas con 2xYTΦ-top agar (1.5%), y se esperó a que el agar gelificara.

Una vez que el agar gelifico, a cada una de las placas se agrego una gota (10 µL) de cada una de las suspensiones de fagos, y se espero a que la gota de suspensión seicara para posteriormente incubar a 28°C durante 24 h. después de la incubación se observaron todas las placas para identificar en cuál de los cultivos se había presentado lisis.

RESULTADOS

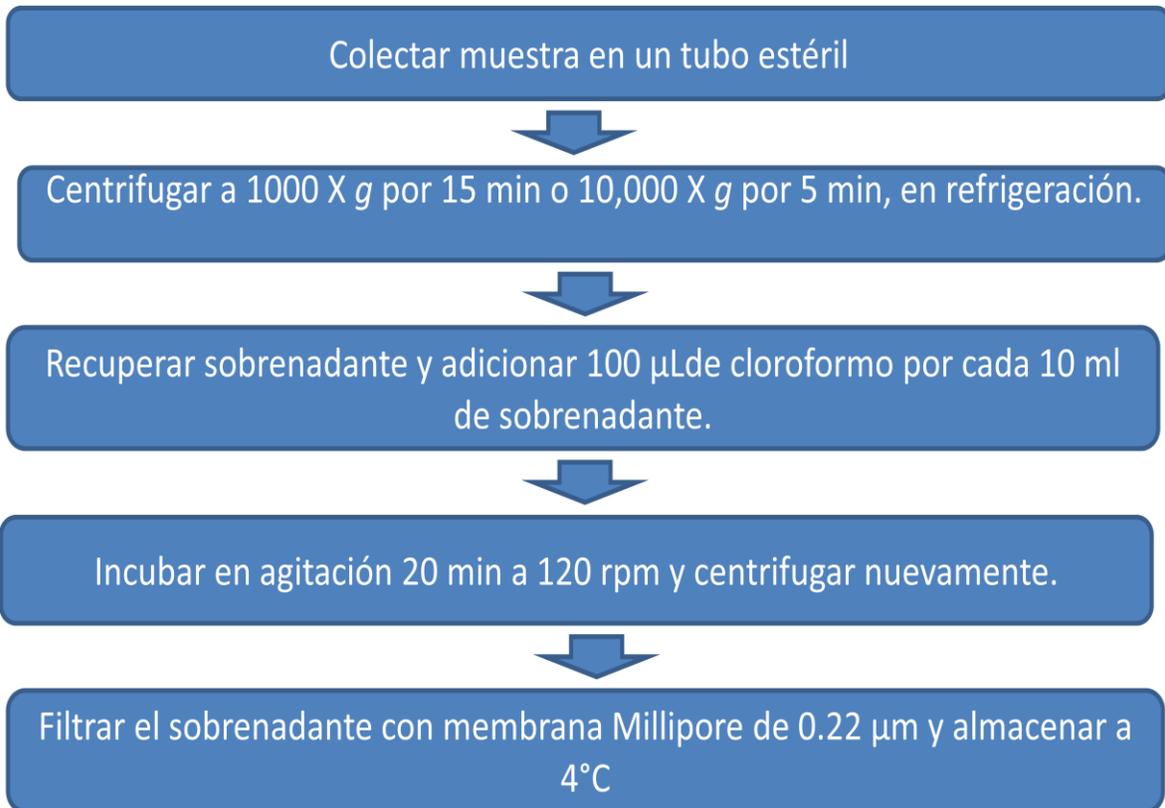
De todas las muestras con las que se trabajó inicialmente, en ninguna se observó la presencia de bacteriófagos líticos que actuaran en contra de *S. aureus*.

Al momento de trabajar con *S. aureus* y la cepa de referencia de *E. coli* a la par, se encontraron bacteriófagos con actividad lítica sobre *E. coli* desde la primer muestra que se probó, y al probar esta misma muestra con *S. aureus* no se encontró lisis, por lo que se decidió descartar la búsqueda de bacteriófagos para *S. aureus* y trabajar únicamente con *E. coli*.

Antes de obtener resultados favorables, se realizaron modificaciones a los protocolos que se obtuvieron inicialmente de la bibliografía, las diferencias entre el primer protocolo y el protocolo final, a partir del cual se obtuvieron los resultados se pueden observar en los siguientes diagramas.

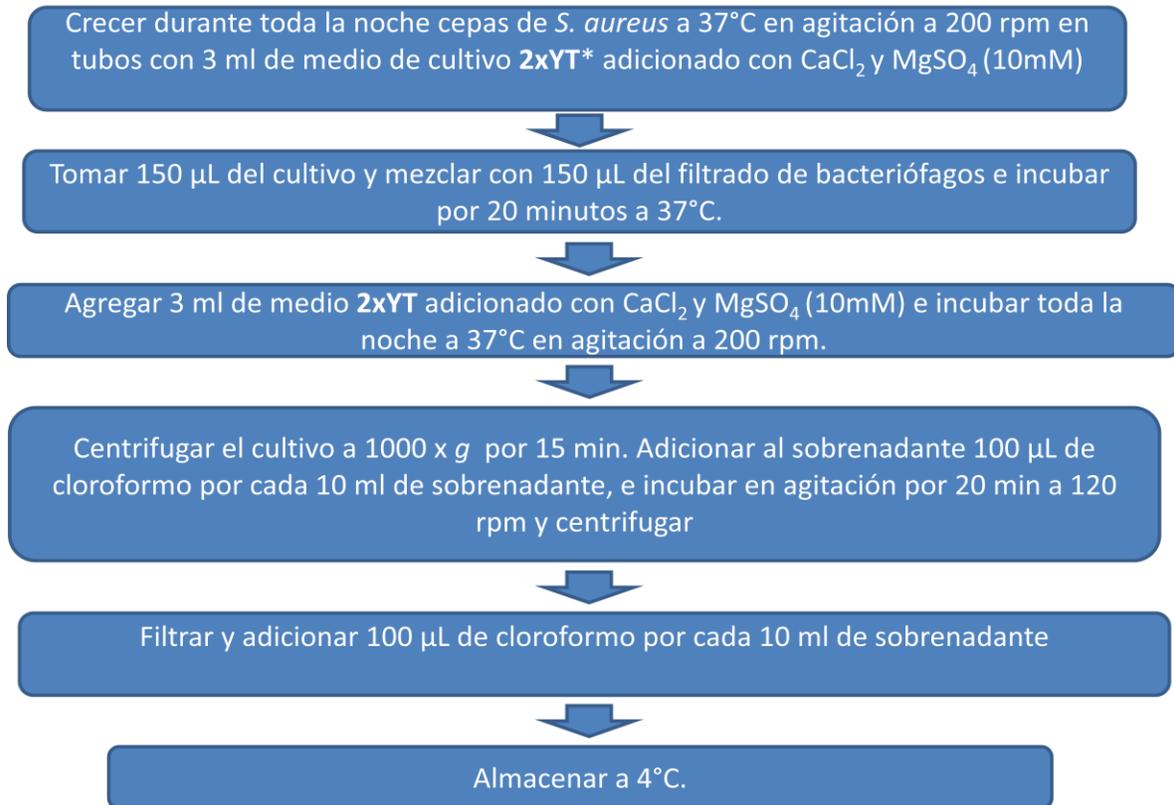
Diagrama de aislamiento y enriquecimiento de bacteriófagos específicos de *Staphylococcus aureus*.

Toma de muestra:



Enriquecimiento de los bacteriófagos

AISLAMIENTO DE BACTERIÓFAGOS DE MUESTRAS DE AGUA PARA EL CONTROL DE PATÓGENOS ASOCIADOS A ALIMENTOS



Aislamiento y titulación de los bacteriófagos

AISLAMIENTO DE BACTERIÓFAGOS DE MUESTRAS DE AGUA PARA EL CONTROL DE PATÓGENOS ASOCIADOS A ALIMENTOS

Realizar diluciones seriadas 1:10 del filtrado de bacteriófagos utilizando **amortiguador SM** como diluyente

De un cultivo de *S. aureus* de toda la noche en 3 ml de medio **2XYT ϕ** , tomar 100 μ L y se mezclar con 100 μ L de cada una de las diluciones e incubar 20 minutos a 37°C

Agregar 3 ml de **2XYT ϕ -top agar** fundido y atemperado a 45°C, y verter en placas de medio 2XYT ϕ .

Incubar a 37°C durante toda la noche.

Las placas líticas obtenidas se aíslan utilizando una puntilla de 1000 μ l.

Suspender el trozo de agar en **amortiguador SM**

Añadir 100 μ L de cloroformo por cada 10 ml de sobrenadante para preservación a 4°C

Para obtención del título de los bacteriófagos, de cultivos de *S. aureus* de toda la noche en 3 ml de medio **2xYT ϕ** , se agregan 100 μ L a 3 ml de **2xYT ϕ -top agar** (**2xYT ϕ** con 7 g/L de agar) fundido y atemperado a 45°C, el cual se vierte en placas de agar **2xYT ϕ** (**2xYT ϕ** con 15 g/L de agar) . Sobre la superficie del **2xYT ϕ -top agar**, se aplican alícuotas de 20 μ L de diluciones de cada uno de los bacteriófagos aislados. Se incuba por toda la noche a 37°C.

En la siguiente tabla se describen las modificaciones realizadas en los protocolos antes de llegar al protocolo final.

**AISLAMIENTO DE BACTERIÓFAGOS DE MUESTRAS DE AGUA PARA
 EL CONTROL DE PATÓGENOS ASOCIADOS A ALIMENTOS**

Protocolo según la bibliografía: Toma de muestra	Modificaciones 1	Modificaciones 2	Modificaciones 3	Modificaciones 4
Colectar muestra en un tubo estéril	Común	Común	Colectar muestra en un tubo estéril y agregar 10 µL de MgSO ₄ y CaCl ₂ (1M) por cada 1ml de muestra y 50 µL de cultivo de <i>S. aureus</i> . Incubar 12h 374°C con agitación.	Colectar muestra en un tubo estéril e inocular con <i>S. aureus</i> . Y <i>E. coli</i>
Centrifugar a 1000 X g por 15 min o 10,000 X g por 5 min, en refrigeración	Centrifugar a 4,000 rpm por 8 min	Centrifugar a 15,000 rpm por 5 min	Centrifugar a 4,000 rpm por 20 min	Centrifugar a 14,000 rpm por 10 min
Recuperar sobrenadante y adicionar 100 µL de cloroformo por cada 10 ml de sobrenadante.	Común	Común	Común	Recuperar sobrenadante, y dividir en dos, a uno agregar 100 µL de cloroformo por cada 10 ml de sobrenadante y al otro no agregar cloroformo.
Incubar en agitación 20 min a 120 rpm y centrifugar nuevamente.	Común	Común	Común	Común
Filtrar el sobrenadante con membrana Millipore de 0.22 µm y almacenar a 4°C	Común	Común	Filtrar el sobrenadante con membrana Millipore de 0.45 µm y almacenar a 4°C	Común

Protocolo según la bibliografía: Enriquecimiento	Modificaciones 1	Modificaciones 2	Modificaciones 3	Modificaciones 4

**AISLAMIENTO DE BACTERIÓFAGOS DE MUESTRAS DE AGUA PARA
 EL CONTROL DE PATÓGENOS ASOCIADOS A ALIMENTOS**

de bacteriófagos				
Crecer cepas de <i>S. aureus</i> a 37°C en agitación a 200 rpm en 3 ml de medio 2xYT* adicionado con CaCl ₂ y MgSO ₄ (10mM)	Común	Común	Común	Común
Tomar 150 µL del cultivo y mezclar con 150 µL del filtrado e incubar por 20 minutos a 37°C.	Tomar 50 µL del cultivo y mezclar con 250 µL del filtrado e incubar por 15 minutos a 37°C.	Tomar 150 µL del cultivo y mezclar con 150 µL del filtrado.	Tomar 150 µL del cultivo y mezclar con 150 µL del filtrado.	Común
Agregar 3 ml de medio 2xYT adicionado con CaCl ₂ y MgSO ₄ (10mM) e incubar toda la noche a 37°C en agitación a 200 rpm.	Común	Común	Común	Común
Centrifugar a 1000 x g por 15 min. Adicionar al sobrenadante 100 µL de cloroformo por cada 10 ml de sobrenadante, e incubar en agitación por 20 min a 120 rpm y centrifugar	Centrifugar a 4,000 rpm por 8 min. Adicionar al sobrenadante 100 µL de cloroformo por cada 10 ml de sobrenadante, e incubar en agitación por 20 min a 120 rpm y centrifugar	Centrifugar a 15,000 rpm por 5 min. Adicionar al sobrenadante 100 µL de cloroformo por cada 10 ml de sobrenadante, e incubar en agitación por 20 min a 120 rpm y centrifugar	Centrifugar a 4,000 rpm por 20 min. Adicionar al sobrenadante 100 µL de cloroformo por cada 10 ml de sobrenadante, e incubar en agitación por 20 min a 120 rpm y centrifugar	Centrifugar 14,000 rpm por 10 min. Adicionar al sobrenadante 100 µL de cloroformo por cada 10 ml de sobrenadante, e incubar en agitación por 20 min a 120 rpm y centrifugar
Filtrar y adicionar 100 µL de cloroformo por cada 10 ml de sobrenadante	Común	Común	Común	Común
Almacenar a 4°C	Común	Común	Común	Común

Protocolo según	Modificaciones 1	Modificaciones 2	Modificaciones 3	Modificaciones 4
-----------------	------------------	------------------	------------------	------------------

**AISLAMIENTO DE BACTERIÓFAGOS DE MUESTRAS DE AGUA PARA
 EL CONTROL DE PATÓGENOS ASOCIADOS A ALIMENTOS**

la bibliografía: Aislamiento y titulación de bacteriófagos				
Realizar diluciones seriadas 1:10 del filtrado utilizando amortiguador SM como diluyente	No realizado	No realizado	No realizado	No realizado
De un cultivo de <i>S. aureus</i> en medio 2XYTφ , tomar 100 μL y mezclar con 100 μL de cada una de las diluciones e incubar 20 minutos a 37°C	De un cultivo de <i>S. aureus</i> en medio 2XYTφ , tomar 30 μL y mezclar con 270 μL de filtrado e incubar 15 minutos a 37°C	De un cultivo de <i>S. aureus</i> en medio 2XYTφ , tomar 150 μL y mezclar con 150 μL de filtrado e incubar 20 minutos a 37°C	De un cultivo de <i>S. aureus</i> en medio 2XYTφ , tomar 20 μL y mezclar con 2 ml de 2XYTφ-top agar fundido y atemperado	De un cultivo de <i>S. aureus</i> en medio 2XYTφ , tomar 150 μL y mezclar con 150 μL de filtrado e incubar 20 minutos a 37°C
Agregar 3 ml de 2XYTφ-top agar fundido y atemperado a 45°C, y verter en placas de medio 2XYTφ. Se incuba a 37°C durante toda la noche.	Agregar 30 μL de MgSO ₄ y CaCl ₂ (1M) y 3 ml de 2XYTφ-top agar fundido y atemperado a 45°C, y verter en placas de medio 2XYTφ. Incubar a 37°C durante toda la noche.	Agregar 30 μL de MgSO ₄ y CaCl ₂ (1M) y 3 ml de 2XYTφ-top agar fundido y atemperado a 45°C, y verter en placas de medio 2XYTφ. Incubar a 37°C durante toda la noche.	Verter en placas de medio 2XYTφ y esperar a que el medio gelifique, para posteriormente agregar una gota del filtrado sobre el medio inoculado.	Agregar 3 ml de 2XYTφ-top agar fundido y atemperado a 45°C, y verter en placas de medio 2XYTφ. Se incuba a 37°C durante toda la noche.
Incubar a 37°C durante toda la noche.	Común	Común	Incubar a 28°C durante toda la noche.	NE
Las placas líticas obtenidas se aíslan utilizando una puntilla de 1000 μL.	NE	NE	NE	NE
Suspender el trozo de agar en amortiguador SM	NE	NE	NE	NE

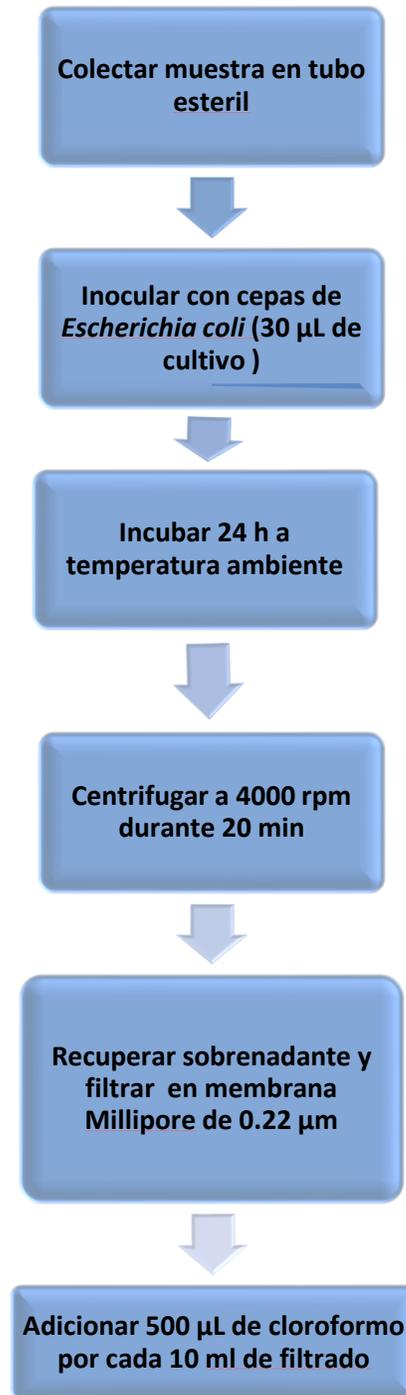
**AISLAMIENTO DE BACTERIÓFAGOS DE MUESTRAS DE AGUA PARA
EL CONTROL DE PATÓGENOS ASOCIADOS A ALIMENTOS**

Añadir 100 µL de cloroformo por cada 10 ml de sobrenadante para preservación a 4°C	NE	NE	NE	NE

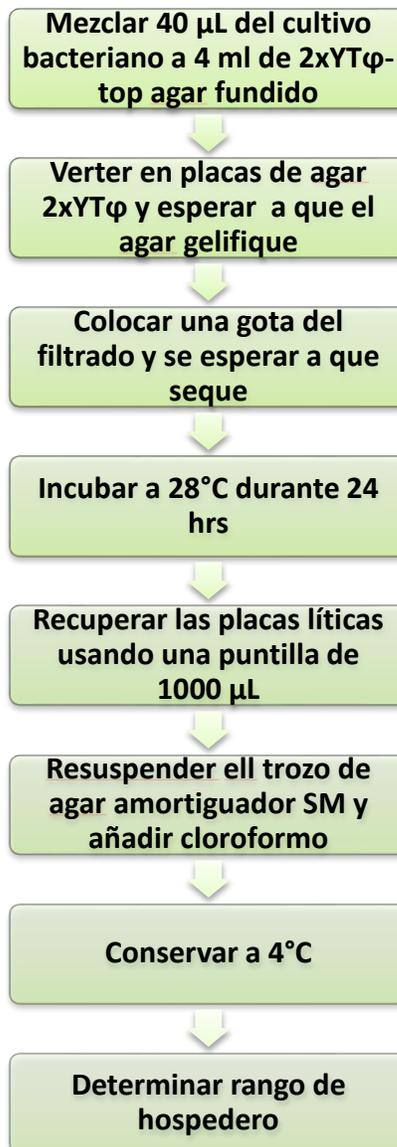
En la tabla se indica cómo común a los pasos que se realizaron de la misma forma a la que se indicaba en los protocolos. NE se refiere a los pasos no efectuados debido a que no se obtuvieron resultados que permitieran realizar esos pasos.

Diagrama final para la obtención y aislamiento de bacteriófagos para *Escherichia coli*.

Toma de muestra



Aislamiento de los bacteriófagos



Determinación del rango de hospedero



Tras la búsqueda de más bacterias que sirvieran como hospedero de los bacteriófagos obtenidos, se identificaron 5 posibles aislamientos de *E. coli*, además se obtuvo otra cepa de referencia *E. coli* ATCC25922, proporcionada por el departamento de microbiología de la facultad de Químico Farmacobiología de la U.M.S.N.H.

Para la obtención de *E. coli*, se tomaron varias muestras que se sospechaba podrían ser fuente de *E. coli*, estas muestras se inocularon inicialmente en medio EMB, y solo aquellas colonias que presentaron coloración verde con brillo metálico fueron sometidas a pruebas bioquímicas con el fin de realizar su identificación (Fig. 1). En la tabla 4 se muestra la procedencia de las muestras que se tomaron y cuales si fueron candidatas para realizar pruebas bioquímicas.

**AISLAMIENTO DE BACTERIÓFAGOS DE MUESTRAS DE AGUA PARA
 EL CONTROL DE PATÓGENOS ASOCIADOS A ALIMENTOS**

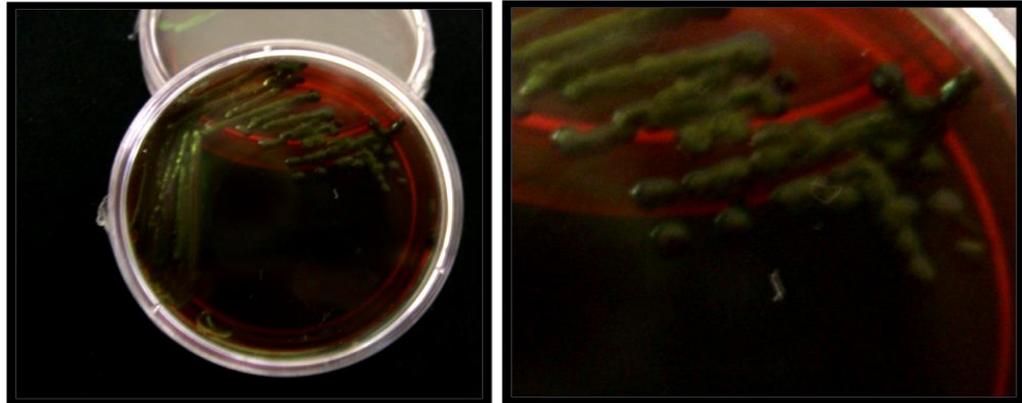


Fig.1 Morfología colonial característica de *E.coli* en agar EMB

Tabla 5: Aislamientos obtenidos a partir de las diferentes muestras utilizadas. Las muestras con el símbolo + fueron sometidas a pruebas bioquímicas para su identificación. Muestras marcadas con – fueron descartadas.

Aislamiento	Fuente	Desarrollo de coloración verde con brillo metálico	Pruebas bioquímicas complementarias características de <i>E. coli</i>
HCe	Heces de cerdo	-	-
HB	Heces de borrego	-	-
HV	Heces de vacas	+	Descartada: Citrato positiva
HCa	Heces de caballos	-	-
HCo	Heces de conejos	-	-
HP	Heces de pollos	-	-
L1	Leche de hatos lecheros (L1)	+	Característica <i>E. coli</i>
L2	Leche de hatos lecheros (L2)	-	-
L3	Leche de hatos lecheros (L3)	+	Característica <i>E. coli</i>
L4	Leche de hatos lecheros (L4)	+	Característica <i>E. coli</i>
AP	Agua de riego: La palma (AP)	+	Descartada: TSI k/k
AT	Agua de riego: El trébol (AT)	+	Característica <i>E. coli</i>
Q1	Queso fresco (1)	-	-
Q2	Queso fresco (2)	+	Característica <i>E. coli</i>
Q3	Queso fresco (3)	-	-

En la tabla 5.1 se observan los nombres que se asignaron a cada aislamiento y la fuente a partir de la cual se obtuvieron.

Tabla 5.1: Aislamientos de *E. coli* obtenidos y su respectiva fuente.

Aislamiento/Cepa	Fuente
L4	Leche
1.1	Leche
3.2	Leche
Q2	Queso
At	Agua de riego
ATCC25922	Cepa de referencia proporcionada por el departamento de microbiología de la Facultad de QFB (Aislado clínico)
XL1Blue	CMEB (Cepa comercial de <i>E.coli</i> utilizada en el laboratorio de biología molecular debido a que tiene mutaciones artificiales, tetraciclina resistente)

Para realizar este trabajo se utilizaron varias muestras como posibles fuentes de bacteriófagos, a pesar de esto, solo de dos muestras se logró el aislamiento de bacteriófagos: Agua de un canal de riego (AP), el cual se encuentra ubicado en las inmediaciones de la unidad habitacional la Palma, y agua de mar (AL), proveniente de Playa Jardín, en Lázaro Cárdenas Michoacán. Estas muestras provocaron inhibición en el crecimiento de los cultivos bacterianos de *E. coli* ATCC25922, en las zonas en las que se colocó una gota de las muestras previamente tratadas (Fig. 2).

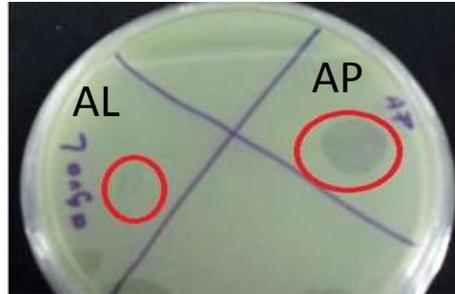


Fig.2 Placas líticas (remarcadas con rojo) obtenidas con muestras de agua:
 Agua de mar (AL) y agua de riego (AP)

Además estas dos muestras provocaron inhibición del crecimiento en el resto de los aislados de *E. coli* que se tenían (Tabla 6). Dicha inhibición sugiere la presencia de bacteriófagos en las dos muestras. Además en el control de cloroformo-SM utilizado para descartar inhibición bacteriana debido a la presencia de cloroformo no se observó ningún cambio en el crecimiento de la bacteria, lo que indica que la cantidad de cloroformo utilizada en el tratamiento de los filtrados que contenían a los bacteriófagos fue insuficiente para provocar inhibición en los cultivos bacterianos.

Tabla 6: Inhibición del crecimiento bacteriano por las distintas soluciones de fagos utilizadas

Aislamiento	Fuente	AL	AP	Leche	Queso	Heces bovinos	Control
L4	Leche	+	+	-	-	-	-
1.1	Leche	+	+	-	-	-	-
3.2	Leche	+	+	-	-	-	-
Q2	Queso	+	+	-	-	-	-
At	Agua de riego	+	+	-	-	-	-
ATCC25922	Referencia (Facultad de QFB)	+	+	-	-	-	-
XL1Blue	CMEB	+	+	-	-	-	-

En la tabla se observan los siete aislamientos bacterianos y las soluciones de fagos utilizadas (AL, AP, leche, queso y heces bovinos), así como el control de cloroformo, marcando con el signo +, aquellos aislados en los que se presentó lisis debido a la presencia de fagos en las muestras, el signo (-) indica que no se observó lisis.

En ambas muestras se identificaron morfologías de las placas líticas diferentes, estas diferencias se observaron en el tamaño y forma de las placas, además algunas placas se observaban más claras que otras (Fig. 3), mostrando que algunos de los bacteriófagos poseen mayor actividad lítica que otros, esto nos indica que en cada muestra hay mezclas de diferentes fagos, por lo que se realizó el aislamiento de cada una de las placas para obtener cada tipo de fago por separado, obteniendo 7 presuntos fagos de la muestra AL y 4 de AP (Tabla 7). Para el aislamiento se utilizó una punta de micropipeta a manera de sacabocado para extraer el trozo de agar con la placa lítica, se extrajeron aquellas que presentaban diferencias, el trozo de agar fue suspendido en medio SM y a partir de esta solución se inoculó nuevamente en placas de agar 2XYT de la forma descrita en la metodología, a fin de obtener placas líticas aisladas.



Fig.3. Diferentes morfologías de placas líticas (zonas más claras, algunas se señaladas con flechas) encontradas en las muestras a partir de las cuales se obtuvieron bacteriófagos.

Tabla 7: bacteriófagos obtenidos así como la fuente a partir de la cual se aislaron, y su morfología.

Bacteriófago	Fuente	Morfología
φUMSNH 1	AL	Placas puntiformes muy claras
φUMSNH 2	AL	Placas pequeñas opacas
φUMSNH 3	AL	Placas pequeñas no muy claras
φUMSNH 4	AL	Placas pequeñas claras
φUMSNH 5	AL	Placas grandes muy claras
φUMSNH 6	AL	Placas grandes opacas
φUMSNH 7	AL	Placas muy grandes y claras
φUMSNH 1´	AP	Placas pequeñas opacas
φUMSNH 2´	AP	Placas pequeñas muy claras
φUMSNH 3´	AP	Placas pequeñas claras
φUMSNH 4´	AP	Placas muy pequeñas y claras

Los fagos obtenidos fueron probados contra los 7 aislamientos de *E. coli* a fin de determinar el rango de hospedero de cada uno de los fagos. Se observó que después de la incubación de las cajas a 28°C por 24 h, los fagos no fueron capaces de lisar en todos los aislamientos obtenidos; algunos fagos lisaron con mayor intensidad que otros, lo que sugiere que se obtuvieron fagos con diferente capacidad lítica; otros fagos lisaban mejor en ciertos aislamientos, mostrando que la susceptibilidad a la infección por bacteriófagos es diferente en cada uno de los aislamientos de *E. coli*, siendo la cepa de referencia ATCC25922 y XL1blue las que presentaron mayor susceptibilidad. (Tabla 8).

Tabla8: Grado de lisis provocada en los aislamientos por los diferentes fagos obtenidos.

Bacteriófago/Cepa	1.1	3.2	Q2	At	L4	ATCC25922	XL1Blue
φUMSNH 1	++	+	-	±	±	++	++
φUMSNH 2	++	+	-	±	±	++	++
φUMSNH 3	+	+	-	±	±	±	++
φUMSNH 4	+	±	-	±	±	+	++
φUMSNH 5	+	±	-	±	±	+	++
φUMSNH 6	+	±	-	±	±	±	++
φUMSNH 7	+	-	-	±	±	±	+
φUMSNH 1'	+	-	-	±	±	±	+
φUMSNH 2'	+	-	-	±	±	±	+
φUMSNH 3'	+	-	-	-	±	+	+
φUMSNH 4'	++	-	-	-	±	++	++

En la tabla se muestra en que aislados se presentó lisis por cada uno de los fagos obtenidos tras incubar a 28°C durante 24 h. El signo (-) significa que no se observó lisis, (±) regular lisis, (+) lisis, (++) lisis intensa.

Después de la incubación de las cajas y la determinación de rango de hospedero, estas fueron almacenadas en refrigeración a 4°C y después de aproximadamente 3 semanas de refrigeración, se observó una lisis más intensa de la que se había observado inicialmente tras la incubación, además de observar placas líticas en aquellas cajas en las que inicialmente no se observó lisis. (Tabla 9).

AISLAMIENTO DE BACTERIÓFAGOS DE MUESTRAS DE AGUA PARA EL CONTROL DE PATÓGENOS ASOCIADOS A ALIMENTOS

Tabla 9: Grado de lisis bacteriana provocada por bacteriófagos después refrigerar.

	1.1	3.2	Q2	At	L4	ATCC25922	XL1Blue
φUMSNH 1	++	++	+	+	±	++	++
φUMSNH 2	++	+	+	+	±	++	++
φUMSNH 3	++	+	+	+	±	++	++
φUMSNH 4	+	+	+	+	±	++	++
φUMSNH 5	++	+	+	+	±	++	++
φUMSNH 6	++	+	+	+	±	++	++
φUMSNH 7	++	+	+	+	±	++	++
φUMSNH 1´	+	+	+	+	±	+	++
φUMSNH 2´	+	+	+	+	±	+	++
φUMSNH 3´	+	+	+	+	±	+	++
φUMSNH 4´	++	±	-	±	±	++	++

En la tabla se observan los resultados de la lisis por los diferentes fagos sobre los aislamientos tras refrigerar a 4°C por aproximadamente tres semanas. (-) no se observó lisis, (±) regular lisis, (+) lisis, (++) lisis intensa.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Este trabajo inicio con la búsqueda de bacteriófagos líticos para *S. aureus* por ser un modelo experimental muy conocido, además de ser de los principales patógenos presentes en alimentos y causante de severos problemas de salud.

Muchos autores han reportado el aislamiento de bacteriófagos con actividad lítica en *S. aureus*, sin embargo, en los resultados de estos trabajos es posible encontrar ciertas dificultades con las que se encontraron los autores antes de lograr la obtención de dichos fagos, como es el caso de Synnott *et al.* (2009) y García, *et al.*, (2009). A pesar de los resultados reportados, empresas dedicadas al desarrollo de productos elaborados con bacteriófagos para el tratamiento de infecciones bacterianas, no han logrado lanzar al mercado productos que ataque infecciones por *S. aureus*, tal es el caso de AmpliPhi Biosciences Corporation, que a pesar de contar con varios productos a base de fagos que ataquen infecciones bacterianas, entre los cuales destacan Biophage-PA, Biophage PR-, ambos productos dirigidos para el tratamiento de infecciones causadas por bacterias del genero *Pseudomona*, productos dirigidos a *S. aureus* se encuentran en vías de desarrollo.

Antecedentes como este sugieren que la selección de bacteriófagos líticos para *S. aureus* presenta ciertas dificultades. Esto nos hace deducir que los bacteriófagos que presentan actividad lítica sobre *S. aureus* pueden ser inestables dificultando su aislamiento, y que posiblemente esa sea la razón por la cual no logramos aislar ningún bacteriófago que lograra causar lisis en *S. aureus* a pesar de haber seguido los protocolos reportados en la literatura. Otra posibilidad es que *S. aureus* presente algún mecanismo que le confiera cierta resistencia, dificultando con esto el ataque de los bacteriófagos. El motivo por el cual la lisis de *S. aureus* provocada por bacteriófagos resulta un tanto complicada debe ser objeto de estudio para futuras investigaciones, ya que en la literatura no se encuentran reportes acerca de esto.

Otra motivo por el cual se pudiera ver afectado el tratamiento de *S. aureus* con bacteriófagos pudiera ser la capacidad de este para formar biopelículas, y es posible que estas biopelículas confieran cierta protección a la bacteria, de la misma forma que la protege de los antibióticos confiriendo resistencia a estos, complicando con esto el ataque del bacteriófago a la bacteria. Sin embargo, se han publicado ya varios estudios en los que se ha demostrado que el uso de bacteriofagos puede prevenir la formación de estas biopelículas, tal es el caso de Curtin y Donlan (2006), quienes utilizaron bacteriófagos para tratar de reducir la formación de biopelículas, pero en este caso el patógeno utilizado como modelo fue *S. epidermidis*. En este estudio se investigó si catéteres de hidrogel recubiertos previamente con el bacteriófago456 reducirían la formación de biopelículas por *S. epidermidis*, encontrando una significativa disminución de la formación de biopelículas durante un periodo de exposición de 24 h (Curtin y Donlan, 2006).

En otro estudio realizado por Hanlon *et al.* (2001) se demostró que el bacteriófago F116, reduce la viscosidad de biopelículas formadas por *P. aeruginosa*, con lo que se facilita la migración del bacteriófago a través de la biopelícula. (Hanlon *et al.*, 2001)

Con estos estudios se sugiere el potencial de bacteriófagos para mitigar la formación de biopelículas y facilitar con esto el ataque de patógenos productores de estas biopelículas.

Por otro lado, el aislamiento de bacteriófagos líticos para *E. coli* ha sido reportado por diversos autores desde hace ya varios años. Viazis *et al.* (2011b) aislaron bacteriófagos con actividad lítica contra *E. coli* a partir de productos lácteos y ganado en engorda. Sin embargo, estos autores encontraron que los fagos aislados, mostraban un rango de hospedero no muy amplio cuando era utilizado un solo fago por separado, y que estos resultaban ser más eficientes cuando se

utilizaba una mezcla de dichos fagos. En nuestro estudio se lograron aislar 11 fagos a partir de dos muestras diferentes, los cuales fueron probados de uno en uno con 7 aislamientos de *E. coli*, mostrando actividad lítica sobre estos mismos, por lo tanto representan una opción a usarse en una amplia gama de hospedero.

Se sabe que es posible encontrar una gran cantidad de fagos en agua, tan solo en el agua de mar se estima que hay alrededor 10^{10} fagos por cada litro de agua (Ronda *et al.*, 2003). Este hecho ha sido aprovechado para facilitar la búsqueda de fagos por algunos autores. Song *et al.* (2007) lograron aislar de un estanque de aguas residuales un bacteriófago, el cual presentó actividad lítica en 6 diferentes cepas de *E. coli*, las cuales cabe mencionar eran cepas de referencia. Al igual que dichos autores, en este estudio se obtuvieron los bacteriófagos a partir de muestras de agua, en nuestro caso, aguas de un canal de riego y agua de mar. A diferencia de Song *et al.* (2007) los aislamientos bacterianos utilizados durante este estudio para probar la actividad lítica de los bacteriófagos, no fueron solo cepas de referencia, sino que además se utilizaron 5 aislamientos ambientales, provenientes de queso, agua de riego, y leches, observando que en el caso de las cepas de referencia (ATCC25922 y XL1Blue) presentan mayor susceptibilidad a la actividad lítica de los bacteriófagos en comparación con los aislamientos ambientales.

En el estudio realizado por Song *et al.* (2007) se evaluó el uso de bacteriófagos en el tratamiento de aguas residuales mostrando que el uso de este fago resulta una alternativa viable. En nuestro caso se pretende utilizar a los fagos en el biocontrol de microorganismos contaminantes en productos alimenticios, en específico, productos lácteos. Como dichos fagos mostraron actividad lítica en contra de las bacterias, en su mayoría aisladas de este tipo de productos, se estima que su uso puede ser efectivo en la industria láctea y alimenticia. Dini (2011) aisló bacteriófagos líticos para el biocontrol de patógenos asociados con enfermedades transmitidas por alimentos, utilizando las principales bacterias enteropatógenas encontradas en alimentos. Dini (2011), al igual que nosotros se centró en *E. coli*, por ser una especie bacteriana que se encuentra frecuentemente en productos alimenticios como carne y derivados insuficientemente cocidos, productos lácteos y jugos no pasteurizados, vegetales contaminados, entre otros, produciendo un espectro de enfermedades que abarcan desde diarreas no hemorrágicas, colitis hemorrágica, síndrome urémico hemolítico (SUH) y púrpura trombocitopénica trombótica (PTT), incluso puede llegar a causar infecciones asintomáticas. Dini (2011) utilizó para todos los ensayos las cepas WG5 (ISO 10705-2:1999) y ATCC 25922 de *E. coli* no patógena, la cepa EDL 933 (ATCC 700927) de EHEC O157:H7 y una serie de aislados. En el estudio de Dini, la finalidad de utilizar la cepa ATCC 25922 fue de

control, ya que los bacteriófagos aislados durante el estudio serían aplicados por vía oral a bovinos y se buscaban bacteriófagos que no infectaran a *E. coli* ATCC 25922 no patógena, ya que de lo contrario era probable que los bacteriófagos administrados atacaran la flora normal de los borregos. En nuestro estudio se pretendía encontrar a los bacteriófagos que atacaran el mayor número de aislamientos posible, ya que se busca utilizar a estos bacteriófagos como aditivos alimenticios, a fin de controlar la contaminación bacteriana, por lo tanto se requieren bacteriófagos que eliminen un gran número de bacterias, y no se utilizó ninguna bacteria como modelo de biota normal, sin embargo es importante considerar esta biota normal para tratar de obtener bacteriófagos que no dañen a la misma, por lo que podrían utilizarse más adelante aislados de *E. coli* de pacientes sanos para que sean utilizados como modelo de biota normal y seleccionar preferentemente aquellos bacteriófagos que no ataquen a dichos aislamientos. A pesar de esto cabe mencionar que no existen reportes de efectos contraproducentes al utilizar bacteriófagos como agentes antibacterianos en humanos, por lo que se presume que aunque la biota normal pudiera verse afectada esta se regenera antes de producir algún efecto nocivo.

En la mayoría de los trabajos en los que se han realizado aislamientos de bacteriófagos líticos para alguna bacteria se realiza también la caracterización de dichos fagos, como fue el caso del trabajo reportado por Oliveira *et al.* (2009) en donde se evaluó el rendimiento lítico de bacteriófagos obtenidos a partir de muestras de agua, en este caso agua residual de aves de corral, contra cepas de *E. coli* (EPEC) que presentaron resistencia a antibióticos. Este grupo de investigadores reportaron el aislamiento de 5 bacteriófagos, los cuales fueron probados con cepas EPEC, observando que 70% de las cepas eran sensibles a la combinación de 3 de los 5 fagos aislados. En este caso los bacteriófagos fueron caracterizados morfológicamente mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) y la comparación genética entre el ADN de bacteriófagos se realizó por polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP). En nuestro caso no se realizó ningún método de caracterización para la identificación de los fagos, quedando abierto dicho trabajo para próximas investigaciones.

CONCLUSIONES

- Es posible aislar bacteriófagos contra *E. coli* presente en productos lácteos, a partir de muestras de agua estancada o agua de mar.
- El rango de hospedero de los bacteriófagos aislados fue amplio, ya que actuaron sobre los 7 aislados diferentes de *E. coli*, lo cual permitirá evaluarlos en su aplicación a alimentos contaminados.

- La obtención de bacteriófagos líticos contra *S. aureus* presenta ciertas dificultades técnicas, las cuales pueden deberse a mecanismos de resistencia del propio patógeno, o a inestabilidad por parte de los bacteriófagos.

Bibliografía

1. Ackermann, H. W., (2001) Frequency of morphological phage descriptions in the year 2000. Brief review. Arch Virol 146: 843-857.
2. Angel, A. D. 2012. Caracterización molecular de aislados de *Staphylococcus aureus* de bovinos productores de leche y de humanos del municipio de Tarímbaro, Michoacán. (Tesis de maestría). Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Morelia, Michoacán, México.
3. Bergh, O., Borsheim, K.Y., Bratbak, G. & Heldal, M., (1989) High abundance of viruses found in aquatic environments. Nature 340: 467–468. WhitmanWB, Coleman DC &WiebeWJ (1998) Prokaryotes: the unseen majority. P Natl Acad Sci USA 95: 6578–6583.
4. Blanco, R. F. A., Casadiego, A. G., Pacheco, P. A. 2011. Calidad microbiológica de alimentos remitidos a un laboratorio de salud pública en el año 2009. Rev. salud pública. 13: 953-965
5. Bren L. 2007. Bacteria-eating virus approved as food additive. FDA Consum, 41, 20-22.
6. Bueno, E., García, P., Martínez, B., Rodríguez, A. 2012. Phage inactivation of *Staphylococcus aureus* in fresh and hard-type cheeses. International Journal of Food Microbiology 158: 23–27.
7. Carlton, R.M., Noordman, W.H., Biswas, B., de Meester, E.D., Loessner, M.J. (2005) Bacteriophage P100 for control of *Listeria monocytogenes* in foods: genome sequence, bioinformatic analyses, oral toxicity study, and application. Regul Toxicol Pharm 43: 301–312.
8. Cervený, K.E., DePaola, A., Duckworth, D.H., Gulig, P.A. (2002) Phage therapy of local and systemic disease caused by *Vibrio vulnificus* in iron-dextran-treated mice. Infect Immun 70: 6251–6262.
9. Chanishvili, N., Chanishvili, T., Tediashvili, M., Barrow PA (2001) Phages and their application against drug-resistant bacteria. J Chem Technol Biot 76: 689–699.
10. Cislo, M., Dabrowski, M., Weber-Dabrowska B., Woyton, A. (1987) Bacteriophage treatment of suppurative skin infections. Arch Immunol Ther Ex 35: 175–183.

11. Curtin y Donlan, 2006. Using bacteriophages to reduce formation of catheter-associated biofilms by *Staphylococcus epidermidis*. *ANTIMICROB. AGENTS CHEMOTHER.* 50:1268–1275.
12. Dini, C. 2011. Aislamiento y caracterización molecular de bacteriófagos de bacterias enteropatógenas para biocontrol de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA). (Tesis de doctorado). Universidad Nacional de la Plata, Facultad de Ciencias Exactas. La Plata, Buenos Aires, Argentina.
13. Donlan, M. R. 2009. Preventing biofilms of clinically relevant organisms using bacteriophage. *Trends Microbiol.* 17(2):66-72.
14. Donnenberg, M. S., (2002) *Escherichia coli* : virulence mechanisms of a versatile pathogen, p. xxv, 417 p., [418] p. of plates. Academic Press, Amsterdam ; London.
15. Doyle, M. P., Beuchat L. R., Montville, T. J., (2001) *Food microbiology : fundamentals and frontiers*. ASM Press, Washington, D.C.
16. Fiorentin, L., Vieira, N.D., Barioni, W. Jr. (2005) Oral treatment with bacteriophages reduces the concentration of *Salmonella Enteritidis* PT4 in caecal contents of broilers. *Avian Pathol* 34: 258–263.
17. Fortuna, W., Miedzybrodzki, R., Weber-Dabrowska, B., Gorski, A. (2008) Bacteriophage therapy in children: facts and prospects. *Med Sci Monitor* 14: RA126–RA132.
18. García P., Madera C., Martínez B., Rodríguez A., Suárez J.E. 2009a. Prevalence of bacteriophages infecting *Staphylococcus aureus* in dairy samples and their potential as biocontrol agents. *J. Dairy Sci.* 92: 3019-3026.
19. García, P., Martínez, B., Obeso, J. M., Lavigne, R., Lurz, R., Rodríguez, A. 2009b. Functional genomics analysis of two *Staphylococcus aureus* phages isolated from the dairy environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:7663–7673.
20. García, P., Martínez, B., Obeso, J.M., Rodríguez, A. 2008. Bacteriophages and their application in food safety. *The Society for Applied Microbiology.* 47:479–485.
21. Gorski, A., Borysowski, J., Miedzybrodzki, R., Weber-Dabrowska, B. (2007) Bacteriophages in medicine. *Bacteriophage: Genetics and Molecular Biology* (McGrath S & Van Sinderen D, eds), pp. 125–158. Caister Academic Press, Norfolk, UK.
22. Goode, D., Allen, V.M., Barrow, P.A. (2003) Reduction of experimental *Salmonella* and *Campylobacter* contamination of chicken skin by application of lytic bacteriophages. *Appl Environ Microb* 69: 5032–5036.
23. Goodridge, L.D. (2004) Bacteriophage biocontrol of plant pathogens: fact or fiction? *Trends Biotechnol* 22: 384–385.
24. Greer, G.G. (1986) Homologous bacteriophage control of *Pseudomonas* growth and beef spoilage. *J Food Prot* 49: 104–109.

25. Greer, G.G., Dilts, B.D. (1990) Inability of a bacteriophage pool to control beef spoilage. *Int J Food Microbiol* 10: 331–342.
26. Greer, G.G., Dilts, B.D. (2002) Control of *Brochothrix thermosphacta* spoilage of pork adipose tissue using bacteriophages. *J Food Prot* 65: 861–863.
27. Griffin, P. M., Tauxe, R. V. (1991) The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. *Epidemiol Rev* 13: 60-98.
28. Hanlon, G. W., Denyer, S. P., Olliff, C. J., Ibrahim, L. J. (2001) Reduction in exopolysaccharide viscosity as an aid to bacteriophage penetration through *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *APPL.ENVIRON.MICROBIOL.* 67:2746-2753.
29. Helms, M., Simonsen, J., Molbak, K. (2006) Foodborne bacterial infection and hospitalization. *Clin Infect Dis.* 42: 498-506.
30. Huff, W.E., Huff, G.R., Rath, N.C., Balog, J.M., Xie H., Moore, P.A. Jr., Donoghue A.M. (2002) Prevention of *Escherichia coli* respiratory infection in broiler chickens with bacteriophage (SPR02). *Poultry Sci* 81: 437–441.
31. Huff, W.E., Huff, G.R., Rath, N.C., Balog, J.M., Donoghue, A.M. (2003) Evaluation of aerosol spray and intramuscular injection of bacteriophage to treat an *Escherichia coli* respiratory infection. *Poultry Sci* 82: 1108–1112
32. Ikeda, T., Tamate, N., Yamaguchi, K., Makino, S. 2005. Quantitative analysis of *Staphylococcus aureus* in skimmed milk powder by realtime PCR. *J. Vet. Med. Sci.* 67:1037–1041.
33. Inal, J. M., (2003) Phage therapy: a reappraisal of bacteriophages as antibiotics. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 51: 237-244.
34. Jikia, D., Chkhaidze, N., Imedashvili, E., Mgaloblishvili, I., Tsitlanadze, G., Katsarava, R., Morris, J.G. Jr., Sulakvelidze, A. (2005) The use of a novel biodegradable preparation capable of the sustained release of bacteriophages and ciprofloxacin, in the complex treatment of multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*- infected local radiation injuries caused by exposure to Sr90. *Clin Exp Dermatol* 30: 23–26.
35. Leverentz, B., Conway, W.S., Alavidze, Z., Janisiewicz, W.J., Fuchs, Y., Camp, M.J., Chighladze, E., Sulakvelidze, A. (2001) Examination of bacteriophage as a biocontrol method for *Salmonella* on fresh-cut fruit: a model study. *J Food Prot* 64: 1116–1121.
36. Leverentz, B., Conway, W.S., Camp, M.J., Janisiewicz, W.J., Abuladze, T., Yang, M., Saftner. R., Sulakvelidze, A. (2003) Biocontrol of *Listeria monocytogenes* on fresh-cut produce by treatment with lytic bacteriophages and a bacteriocin. *Appl Environ Microb* 69: 4519–4526.

37. Leverentz, B., Conway, W.S., Janisiewicz, W., y Camp, M.J. (2004) Optimizing concentration and timing of a phage spray application to reduce *Listeria monocytogenes* on honeydew melon tissue. *J Food Prot* 67: 1682–1686.
38. Madigan, M. T., Martinko, J., Parker, J. 2003. Brock biología de los microorganismos (10ª edición) Ed. Pearson Educacion, Madrid, España. p. 240-247
39. McVay, C.S., Velasquez, M., Fralick, J.A. (2007) Phage therapy of *Pseudomonas aeruginosa* infection in a mouse burn wound model. *Antimicrob Agents Ch* 51: 1934–1938.
40. Moreno, G. M., Alarcón, A. (2010). Food safety for the prevention of the infectious and toxins of the foodborne diseases. *Rev. Med. Clin. CONDES* 21:749-755.
41. Murray, P.R., Rosenthal K. S. Pfaller, M. A. 2009. *Microbiología médica* (6ª edición) Ed. Elsevier Mosby, Barcelona, España. p. 209-223, 303-307.
42. Nataro, J. P., Kaper, J. B. (1998) Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 11: 142-201.
43. Nakai, T., Sugimoto. R., Park, K.H., Matsuoka, S., Mori, K., Nishioka, T., Maruyama, K. (1999) Protective effects of bacteriophage on experimental *Lactococcus garvieae* infection in yellowtail. *Dis Aquat Organ* 37: 33–41.
44. Nishikawa, H., Yasuda, M., Uchiyama, J. (2008) T-even-related bacteriophages as candidates for treatment of *Escherichia coli* urinary tract infections. *Arch Virol* 153: 507–515.
45. O'Flaherty, S., Ross, P. R., Coffey, A. 2009. Bacteriophage and their lysins for elimination of infectious bacteria. *FEMS*. 33: 801–819.
46. Oliveira A., Sillankorva, S., Quinta, R., Henriques, A., Sereno, R., Azeredo, J. 2009. Isolation and characterization of bacteriophages for avian pathogenic *E. coli* strains. *The Society for Applied Microbiology* .106: 1919–1927.
47. Park, S.C., Shimamura, I., Fukunaga, M., Mori, K.I. Nakai, T. (2000) Isolation of bacteriophages specific to a fish pathogen, *Pseudomonas plecoglossicida*, as a candidate for disease control. *Appl Environ Microb* 66: 1416–1422.
48. Parracho, H. M., Burrowes, B. H., Enright M. C., McConville, M. L., Harper, D.R. 2012. The role of regulated clinical trials in the development of bacteriophage therapeutics. *Journal of Molecular and Genetic Medicine* 6:279-286.
49. Ronda, C., Vázquez, M., López, R. 2003. Los bacteriófagos como herramienta para combatir infecciones en Acuicultura. *AquaTIC*. 18:3-10.

50. Slopek, S., Weber-Dabrowska, B., Dabrowski, M., Kucharewicz- Krukowska, A. (1987) Results of bacteriophage treatment of suppurative bacterial infections in the years 1981–1986. *Arch Immunol Ther Ex* 35: 569–583.
51. Sheng, H., Knecht, H.J., Kudva, I.T., Hovde, C.J., (2006) Application of bacteriophages to control intestinal *Escherichia coli* O157:H7 levels in ruminants. *Appl Environ Microb* 72: 5359–5366.
52. Slopek, S., Durlakowa, I., Kucharewicz-Krukowska, B., Dabrowski, M., Bisikiewicz, R. (1983) Results of bacteriophage treatment of suppurative bacterial infections. *Arch Immunol Ther Ex* 31: 293–327.
53. Smith, H.W., Huggins, M.B. (1982) Successful treatment of experimental *Escherichia coli* infections in mice using phage: its general superiority over antibiotics. *J Gen Microbiol* 128: 307–318.
54. Smith, H.W., Huggins, M.B. (1983) Effectiveness of phages in treating experimental *Escherichia coli* diarrhoea in calves, piglets and lambs. *J Gen Microbiol* 129: 2659–2675.
55. Strachan, N. J., Dunn, G. M., Locking, M. E., Reid, T. M., Ogden, I. D. (2006) *Escherichia coli* O157: burger bug or environmental pathogen? *Int J Food Microbiol* 112: 129-137.
56. Sulakvelidze, A., Alavidze, Z., Morris, J. G. 2001. Bacteriophage Therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:649–659.
57. Sulakvelidze, A., Barrow, P. (2005) Phage therapy in animals and agribusiness. *Bacteriophages Biology and Applications* (Kutter E & Sulakvelidze A, eds), pp. 335–380. CRC Press, Boca Raton, FL.
58. Sunagar, R., Patil, S. A., Chandrakanth, R. K. 2010. Bacteriophage therapy for *Staphylococcus aureus* bacteremia in streptozotocin-induced diabetic mice. *Research in Microbiology* 161: 854-860.
59. Synnott, A.J., Kuang, Y., Kurimoto, M., Yamamichi, K., Iwano, H., Tanji, Y. 2009. Isolation from sewage influent and characterization of a novel *Staphylococcus aureus* bacteriophage with wide host ranges and potent lytic capabilities. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 4483-4490.
60. Synnott, A. J., Kuang, Y., Kurimoto, M., Yamamichi, K., Iwano, H., Tanji, Y. 2009. Isolation from sewage influent and characterization of novel *Staphylococcus aureus* bacteriophages with wide host ranges and potent lytic capabilities. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:4483–4490.
61. Tanji, Y., Hattori, K., Suzuki, K., Myanaga, K. 2008. Spontaneous deletion of a 209-kilobase-pair fragment from the *Escherichia coli* genome occurs with acquisition of resistance to an assortment of infectious phages. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 4256-4263.

62. Toro, H., Price, S.B., McKee, A.S., Hoerr, F.J., Krehling, J., Perdue, M., Bauermeister, L. (2005) Use of bacteriophages in combination with competitive exclusion to reduce Salmonella from infected chickens. *Avian Dis* 49: 118–124.
63. Valdez, J.J., Hamdan, A., Bustos, J.A., Baizabal, V.M., Arteaga, R.I., Bravo, A., Cajero, M. Epidemiología molecular de infecciones por *Staphylococcus aureus* en animales: nuevas oportunidades para investigación y control. En preparación.
64. Viazis, S., Akhtar, M., Feirtag, J., Diez, G. F. 2011a. Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 viability on leafy green vegetables by treatment with a bacteriophage mixture and trans-cinnamaldehyde *Food Microbiology* 28:149-157.
65. Viazis, S., Akhtar, M., Feirtag, J., Diez, G. F. 2011b. Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 viability on hard surfaces by treatment with a bacteriophage mixture. *International Journal of Food Microbiology* 145: 37–42.
66. Wang, J., Hu, B., Xu, M. (2006) Therapeutic effectiveness of bacteriophages in the rescue of mice with extended spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* bacteremia. *Int J Mol Med* 17: 347–355.
67. Weber-Dabrowska, B., Mulczyk, M., Gorski, A. (2000) Bacteriophage therapy of bacterial infections: an update of our institute's experience. *Arch Immunol Ther Ex* 48: 547–551.
68. Weber-Dabrowska, B., Mulczyk, M., Gorski, A. (2001) Bacterophage therapy for infections in cancer patients. *Clin Applied Immunol Rev* 1: 131–134.
69. Weber-Dabrowska, B., Mulczyk, M., Gorski, A. (2003) Bacteriophages as an efficient therapy for antibiotic-resistant septicemia in man. *Transplant Proc* 35: 1385–1386.
70. Whichard, J.M., Sriranganathan, N., Pierson, F.W. (2003) Suppression of *Salmonella* growth by wild-type and large- plaque variants of bacteriophage Felix O1 in liquid culture and on chicken frankfurters. *J Food Prot* 66: 220–225.
71. WHO (World Health Organization). 2000. Surveillance Report: Programme for Control of Foodborne Infections and Intoxications in Europe. 8th Report 1999–2000. http://www.bfr.bund.de/internet/8threport/8threp_fr.htm.
72. Wills, Q.F., Kerrigan, C., Soothill, J.S. (2005) Experimental bacteriophage protection against *Staphylococcus aureus* abscesses in a rabbit model. *Antimicrob Agents Ch* 49: 1220–1221.

73. Wong, G. A. 1994. Purificación y caracterización biológica del bacteriofago uB-19 específico de *Bacillus thuringiensis*. (Tesis de maestría). Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas. Monterrey, N. L., México.
74. Zamudio, M. L., Meza, A., Bailón, H., Martínez, U. J., Campos, J. 2012. Experiencias en la vigilancia epidemiológica de agentes patógenos transmitidos por alimentos a través de electroforesis en campo pulsado (PFGE) en el Perú. Rev Peru Med Exp Salud Pública. 28(1): 128-35.
75. <http://www.fda.gov/Food/ResourcesForYou/HealthEducators/ucm091976.htm>
76. http://www.ampliphbio.com/index.php/pipeline/product_pipeline#