

Aislamiento de bacteriófagos provenientes de una muestra de origen ambiental con capacidad de infectar *Salmonella* spp.

Juan Martín Álvarez Pérez

Directora:

Dra. Aura Dayana Falco Restrepo

**Universidad Santiago de Cali
Facultad de Ciencias Básicas
Programa de Microbiología
Cali, Colombia
2020**

Aislamiento de bacteriófagos provenientes de una muestra de origen ambiental con capacidad de infectar *Salmonella* spp.

Juan Martín Álvarez Pérez

**Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de:
Microbiólogo**

Directora

Dra. Aura Dayana Falco Restrepo

**Línea de Investigación:
Microbiología Ambiental
Grupo de Investigación:
GIMIA**

**Universidad Santiago de Cali
Facultad de Ciencias Básicas
Programa de Microbiología
Santiago de Cali, Colombia
2020**

IMPACTOS

Relacione el (los) impacto(s) que presentó el Trabajo de Grado

IMPACTO	PRODUCTO	BENEFICIARIO(S)
Económico		
Responsabilidad social		
Científico	Trabajo de grado aprobado, requisito para optar el título de Microbiólogo.	Grupos de investigación de la USC, estudiantes de la USC y comunidad en general.
Indicadores de Gestión		
Tecnológico		
Técnico		
Ambiental		
Social		
Cultural		

*Incluir los productos obtenidos derivados de la investigación como: apropiación social del conocimiento, generación de nuevo conocimiento entre otros.

AISLAMIENTO DE BACTERIÓFAGOS PROVENIENTES DE UNA MUESTRA DE ORIGEN AMBIENTAL CON CAPACIDAD DE INFECTAR *SALMONELLA* SPP.

Juan Martín Álvarez Pérez ¹, Aura Dayana Falco Restrepo ²

¹ Estudiante del programa de Microbiología, Facultad de Ciencias Básicas, Universidad Santiago de Cali, Campus Pampalinda Calle 5 # 62-00, Santiago de Cali, Colombia, grupo de investigación en Microbiología, Industria y Ambiente (GIMIA). Correo electrónico: juan.alvarez07@usc.edu.co. ² Dra. Aura Dayana Falco Restrepo, profesora titular y de dedicación exclusiva en la facultad de Ciencias Básicas, Universidad Santiago de Cali, grupo de investigación en Microbiología, Industria y Ambiente (GIMIA). Correo electrónico: aura.falco00@usc.edu.co.

RESUMEN

La Salmonelosis es una Enfermedad Transmitida por Alimentos (ETA) que se produce debido a la contaminación por bacterias del género *Salmonella* en comestibles como la carne de pollo y la de cerdo, así como en productos provenientes de granjas avícolas. Debido a que el uso indiscriminado de antibióticos en los pollos ha contribuido a la selección de bacterias resistentes, es necesario implementar alternativas naturales que permitan el control de las poblaciones bacterianas en granjas avícolas, siendo los bacteriófagos, una posible opción debido a su gran especificidad para infectar bacterias. Empleando el método de doble capa se lograron encontrar bacteriófagos en una muestra ambiental de gallinaza proveniente de una granja avícola ubicada en el municipio de Palmira, Valle del Cauca, capaces de infectar una cepa de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ATCC 14028.

Palabras clave: Terapia fágica, salmonelosis, *Salmonella* spp, granja avícola.

ISOLATION OF BACTERIOPHAGES FROM A SAMPLE OF ENVIRONMENTAL ORIGIN CAPABLE OF INFECTING *SALMONELLA* SPP.

ABSTRACT

Salmonellosis is a Foodborne Disease (FDB) that occurs due to contamination by bacteria of the *Salmonella* genus in edibles such as chicken and pork, as well as in products from poultry farms. Because the indiscriminate use of antibiotics in chickens has contributed to the selection of resistant bacteria, it is necessary to implement natural alternatives that allow the control of bacterial populations in poultry farms, bacteriophages being a possible option due to their high specificity to infect bacteria. Using the double layer method, bacteriophages were found in an environmental sample of chicken manure from a poultry farm located in the municipality of Palmira, Valle del Cauca, capable of infecting a strain of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ATCC 14028.

Keywords: Phage therapy, salmonellosis, *Salmonella* spp, poultry farm.

1. INTRODUCCIÓN

Los bacteriófagos son virus que infectan bacterias de manera específica, se les considera como parásitos intracelulares obligados y están constituidos por material genético y proteínas. Su genoma puede ser de ADN o de ARN (simple o doble cadena), protegido por una cubierta proteica denominada cápside. La estructura de los fagos es compleja porque están formados por: una cápside, el cuello, la cola, las láminas basales y las espículas. Estas últimas le brindan al bacteriófago la capacidad de adherirse al receptor de la célula huésped e iniciar el proceso infectivo [1]. Los bacteriófagos pueden realizar dos ciclos diferentes: ciclos líticos y/o ciclos lisogénicos. En el ciclo lítico, una vez que ha ocurrido la interacción virus-receptor de la bacteria, ocurre la adsorción del fago lo que desencadena la inyección del ácido nucleico al interior celular. Seguidamente, inicia la replicación del genoma viral, la expresión genética, la síntesis de proteínas y el ensamblaje de los viriones [2]. Finalmente, ocurre la liberación de progenie viral a través de la lisis de la célula hospedadora, por lo que los fagos se dispersan en el entorno, donde pueden infectar nuevos huéspedes. Los bacteriófagos que realizan el ciclo lisogénico, tienen una estrategia diferente. Después de la inyección del genoma, éste se integra en una sección específica del cromosoma bacteriano (profago), dando paso a la desaparición de la partícula viral infecciosa. Cada vez que la célula bacteriana replica su cromosoma, replica el ADN del profago, motivo por el cual las divisiones celulares sucesivas producirán una población de células bacterianas que albergan el material genético del bacteriófago. Los factores ambientales como el estrés por déficit de nutrientes u otras condiciones de crecimiento desfavorables, pueden inducir que inicie el ciclo lítico [3].

El género *Salmonella* pertenece a la Familia *Enterobacteriaceae*, y se caracterizan por ser bacilos Gram negativos, aerobios facultativos, móviles, no formadores de esporas y fermentadores de glucosa con formación de ácido y gas. Puede crecer entre 7 y 49°C (aun cuando su crecimiento se ve reducido a temperaturas inferiores a 15°C), a un pH óptimo entre 4.9 y 9.0 [4]. Se ha reportado que el género *Salmonella* crece bien en alimentos, especialmente si tiene un alto contenido de proteína. La habilidad de esta bacteria para sobrevivir en la cadena agroalimentaria se debe, en parte, a su capacidad para responder efectivamente a los cambios ambientales [5].

La infección causada por *Salmonella* spp. se llama salmonelosis y hace parte del grupo de Enfermedades de Transmisión Alimentaria (ETA) [6], las cuales se originan por la ingestión de alimentos, incluida el agua, que contienen agentes etiológicos en cantidades tales que afectan la salud del consumidor a nivel individual o en grupos de la población [7]. Los principales síntomas asociados a esta patología son desórdenes gastrointestinales que incluyen dolor abdominal, diarrea, vómito, fiebre y en algunos casos, puede ocasionar enfermedad sistémica e incluso elevadas tasas de mortalidad en la población expuesta [6]. La salmonelosis es una de las ETA que se reporta con más frecuencia a nivel mundial. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), se reportan 550 millones de brotes de *Salmonella* spp. por año, de los cuales 220 millones de brotes corresponden a niños menores de 5 años. Se estima que anualmente en Estados Unidos, Europa y Latinoamérica se notifican 15; 19; 23,7 y 68,4 casos por cada 100.000 habitantes, respectivamente; mientras que, para Latinoamérica, se calcula que el número de casos podría aumentar aproximadamente 29 veces más [6].

Colombia ocupa el puesto 24 en producción mundial de pollo, mientras que el consumo per cápita durante los últimos 10 años ha venido aumentando de forma significativa de 20,1 a 30,2 kilogramos/habitante en los años 2000 y 2015. Hasta mayo de 2016, el departamento con mayor producción de carne de pollo fue Santander con el 24,6% de la producción anual, seguido por Cundinamarca con un 20,1% y Valle del Cauca con 16,2% [6]. De acuerdo con los datos reportados por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, el Departamento Administrativo Nacional de Estadística (DANE), la Federación Nacional de Avicultores de Colombia (FENAVI) y el Fondo Nacional Avícola (FONAV), en el Censo Nacional de Avicultura Industrial del 2002, existían 166 granjas reproductoras, con un total de 3.861 galpones, distribuidas principalmente en los departamentos de Cundinamarca, Santander y Valle del Cauca; de los cuales 1.883 eran pollo de engorde.

En la industria avícola colombiana, coincidiendo con lo reportado en otros países, se han identificado de las posibles vías de entrada de *Salmonella* spp. a las granjas, entre las cuales están: el hombre, el agua (principalmente en aquellas granjas en la que el abastecimiento se hace con fuentes no potables), vehículos que entran y/o salen de la granja (camiones que transportan los pollos y el alimento), la limpieza y la desinfección de los equipos usados para el manejo de las aves (comederos, bebederos, jaulas, nidos), la presencia de otros animales en la granja que pueden actuar como vectores de *Salmonella* spp. (porcinos, bovinos, caninos, equinos, etc.) [5]. De acuerdo con la principal guía de autocontrol en la industria alimentaria, *Salmonella* spp. se considera un peligro en la mayoría de

los PCC (Punto Crítico de Control), y, por lo tanto; debe ser controlado o eliminado desde las materias primas mediante la vigilancia de temperaturas de proceso de elaboración, aplicando medidas de control como la limpieza y desinfección de los equipos, en prácticas de higiene personal o en mantenimiento de instalaciones [8].

Una desventaja que tienen las industrias avícolas artesanales es que no cuentan con los equipos sistematizados para el control de la higiene en sus cadenas de producción, por esta razón, realizar un control para garantizar la inocuidad de los productos resulta muy complejo. En muchas ocasiones, los avicultores optan por suministrar diferentes antibióticos para controlar infecciones bacterianas; lo cual supone un costo elevado sin mencionar que muchos de los antibióticos pueden generar problemas en el producto final, como, por ejemplo, la progresiva resistencia por parte de las bacterias a los diferentes antimicrobianos [9]. La resistencia antimicrobiana es considerada una amenaza creciente a nivel global debido a la diversidad y volumen de antimicrobianos prescritos en medicina humana y veterinaria, lo que ha facilitado la selección y dispersión de patógenos resistentes a estos fármacos, además, la persistencia ambiental de bacterias multirresistentes constituye un riesgo para la salud pública y para la salud de los animales, por lo que es importante implementar medidas de prevención y vigilancia, y que impulse la evaluación de estrategias alternativas al uso de antimicrobianos en la industria, como por ejemplo la aplicación de extractos naturales o la fagoterapia [10].

Las preocupaciones sobre la presencia de bacterias en alimentos de origen animal y la necesidad de un período de retención para evitar la exposición humana, han aumentado el interés en la terapia de fagos contra los patógenos transmitidos por los alimentos [11]. Además, los bacteriófagos tienen la ventaja de ser naturales, no tóxicos para las poblaciones naturales de microbiota humana o animal, y relativamente económicos, a diferencia de muchos antibióticos.

En Estados Unidos, la *Food and Drug Administration* (FDA) ha realizado esfuerzos desde hace 40 años para regular el uso de antibióticos en los animales. En Colombia, la resolución No. 1966 del 5 de septiembre de 1984 del Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) permite el uso de sustancias antimicrobianas como promotores de crecimiento o mejoradores de la eficiencia alimentaria siempre y cuando estos no coincidan con los utilizados con fines terapéuticos en medicina humana. El problema radica en que los llamados promotores de crecimiento son o tienen entre sus componentes antibióticos de amplio espectro, que pueden llegar a generar resistencia cruzada frente a antibióticos usados en medicina [12]. Por los motivos antes expuestos, en este trabajo se realizó la búsqueda de bacteriófagos proveniente de muestras de origen ambiental con capacidad de infectar *Salmonella* spp. provenientes de una granja avícola ubicada en el municipio de Palmira, Valle del Cauca.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1. Condiciones de crecimiento y medios de cultivo.

2.1.1. Aislamiento de una cepa de *Salmonella* spp. proveniente de una muestra de gallinaza.

Se prepararon 5 tubos de ensayo con 9 mL de Trypticase de Soya Broth (TSB) (Merk VM821959). En uno de los 5 tubos, se agregó 1 g de gallinaza y se homogenizó utilizando un vortex (Boeco, vortex V1 Plus). A continuación, se realizaron diluciones seriadas (1:10) hasta 10^{-5} , Los tubos fueron incubados (VW-R Scientific Products Md 5015) a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 18 horas, para posteriormente sembrar 0,1 mL de cada dilución en placas de agar XLD (AD-BIO; AD-MP40-3; lote: 4019006), las cuales se incubaron durante 18 horas a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$. Una vez transcurrido este tiempo, se seleccionaron colonias que correspondieran presuntamente a *Salmonella* spp. ya que esta bacteria se caracteriza por producir colonias con un centro negro grande y brillante o colonias casi completamente negras [13]. Adicionalmente, se realizó una prueba fenotípica rápida, llamada catalasa, para verificar otra característica fenotípica correspondiente al género *Salmonella*. Para llevar a cabo esta prueba, se tomó una colonia con un asa metálica y se esparció sobre un porta objetos limpio, para posteriormente agregar una gota de peróxido de hidrógeno. La prueba es positiva cuando se observa burbujeo. Aquellas colonias negras, catalasa positiva fueron consideradas como presuntas *Salmonella* spp.

2.2. Extracción de ADN empleando el método de ebullición, PCR y secuenciación.

La extracción del ADN de las presuntas *Salmonella* spp. (colonias negras, catalasa positivas) se realizó resuspendiendo una colonia aislada en 100 µL de agua ultra pura y estéril. Seguidamente se sumergió en el tubo de microcentrifuga de 1,5 mL en un baño maría a 100°C, durante 10 minutos. Una vez terminado el ciclo de ebullición, se procedió a centrifugar a 13.000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se transfirió a otro tubo de microcentrifuga de 1,5 mL estéril para ser utilizado como ADN molde para la PCR [14].

El gen 16S fue amplificado por PCR haciendo uso de los iniciadores que se observan en la tabla 1.

Tabla 1. Iniciadores utilizados para llevar a cabo la PCR [15].

Nombre del Cebador	Secuencia del Cebador	Tamaño del amplicón	Temperatura de hibridación (°C)
U1	5-CCAGCAGCCGCGGTAATACG-3	996	55
U2	5-ATCGG (C/T) TACCTTGTTACGACTTC-3		

Para realizar la PCR se usó la mezcla de reacción PCR 100 2X (CorpoGen OPTBM-00006), empelando las concentraciones finales que se observan en la Tabla 2. Luego, las muestras fueron colocadas en un termociclador (Eppendorf 95000040 Mastercycler) y se utilizaron las condiciones que se observan en la Tabla 3. En esta tabla se observa el proceso de 1 ciclo, para este ensayo se realizaron 35 ciclos consecutivos. El control positivo fue una cepa de referencia conocida (*Escherichia coli* ATCC 25922), mientras que en el control negativo se sustituyó el ADN por agua ultra pura, estéril.

Tabla 2. Concentraciones de los componentes empleados para realizar la PCR.

Componentes	Concentración inicial	Concentración Final
Mezcla para PCR	2X	1X
Primer forward U1	10 µM	0,2 µM
Primer reverse U2	10 µM	0,2 µM
ADN	50 µL	10% del Volumen final de reacción
Agua ultra pura	-	Hasta completar el volumen final

Tabla 3. Condiciones de procesamiento de las muestras en el termociclador.

Proceso	Temperatura (C°)	Tiempo (minutos)
Desnaturalización Inicial	94	3
Desnaturalización	94	1
Hibridación	55	1
Extensión	72	1
Extensión final	72	5

La separación de los fragmentos de ADN se realizó por medio de electroforesis horizontal en gel de agarosa haciendo uso de un tampón TBE (Tris 0,089 M; ácido bórico 0; 089 M, EDTA 0; 002 M; de CorpoGen) a una concentración final de 1X. La concentración del gel de agarosa (*HydraGene*) fue del 1% p/v. Para la electroforesis se empleó un marcador de peso molecular de 100 bp *DNA Ladder* (*New England Biolabs*) (Fig. 1). La visualización del ADN se realizó mediante fluorescencia indirecta a 320 nm por medio de tinción con *Sybr Green* y con la utilización de un transiluminador (UVP, *BenchTop*).

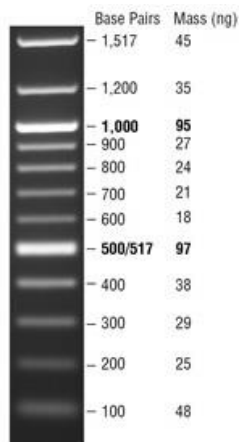


Figura 1. Marcador de peso molecular 100 bp Ladder New England Biolabs.

El producto de PCR fue secuenciado en Macrogen (Corea), empleando el método Sanger. Las secuencias se analizaron por medio del programa ChromasPro (versión 2.1.8) y se compararon con las secuencias disponibles en la base de datos GenBank del *International Nucleotide Sequence Database Collaboration* (NCBI), utilizando la herramienta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST).

2.3. Obtención de lisados virales a partir de muestras de origen ambiental provenientes de una granja avícola.

Se recolectaron muestras de gallinaza y de agua de los bebederos de los corrales ubicados en la finca avícola Los Portales, ubicada en el Km 10 vía Cali-aeropuerto Internacional Alfonso Bonilla Aragón, frente a la zona franca del pacífico, Palmira, Valle del Cauca (Anexo 1). Las muestras se trasladaron al laboratorio de microbiología de la Universidad Santiago de Cali, en una nevera de poliestireno expandido, manteniendo una temperatura de 4°C.

En un tubo cónico se agregaron 2,5 g de gallinaza o 2,5 mL de las muestras tomadas de los bebederos, y se mezclaron con 22,5 mL de buffer SM (5.8 g NaCl; 2.0 g MgSO₄ · 7H₂O 50 mL 1 M Tris-HCl pH 7.4, por litro de agua estéril) [16] y 2,5 mL de TSB (10X). Esta mezcla se centrifugó a 4000 g durante 15 minutos a 4°C y, el sobrenadante se filtró empleando un sistema de filtración que tenía una membrana de 0,45 µm. A este filtrado, se le agregaron 75 µL de un cultivo de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ATCC 14028 en fase estacionaria y TSB suplementado con CaCl₂ (10mM). Esta mezcla se incubó sin agitación, durante 16 horas a 37°C. Luego, se le agregó el 10% v/v de CH₂Cl₂, se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos y se centrifugó a 4000 g durante 15 minutos a 4°C, para posteriormente extraer la fase acuosa, la cual se nombró Lisado #1.

2.4. Determinación de presencia de bacteriófagos por el método de doble capa.

Para detectar la presencia de fagos en el Lisado #1, se empleó una prueba cuantitativa llamada “Método de doble capa”. Esta técnica se inició haciendo diluciones seriadas del Lisado #1, hasta llegar a 10⁻³. Luego, se realizaron mezclas de 0,1 mL de un cultivo de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ATCC 14028 con 0,1 mL del Lisado #1 puro y con cada una de las diluciones realizadas (10⁻¹, 10⁻², 10⁻³). Cada uno de los 4 tubos, se mantuvieron a temperatura ambiente durante 10 minutos, para luego agregar 5 mL de agar blando Tripticasa de Soya (TSAB, 7 g de agar por litro). Las mezclas se homogenizaron con vortex y se vertieron en cajas de agar Tripticasa de soya (TSA). Las cajas se incubaron a 37°C durante 18-20 horas [17]. Esta metodología también se realizó con la cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922, la cual se empleó como control del proceso.

2.5. Recuento de placas líticas.

Transcurridas las 18-20 horas de incubación, se observó presencia de placas líticas y se calculó el título viral (UFP/ml) aplicando la siguiente fórmula (Ecuación No. 1): [18]

$$T\left(\frac{UFP}{mL}\right) = \frac{\# \text{ de placas líticas} * \text{factor de dilución}}{\text{volumen de muestra sembrada}}$$

Ecuación 1. Fórmula aritmética utilizada para calcular el número de placas líticas por mililitro.

3. RESULTADOS

3.1. Aislamiento de una cepa de *Salmonella* spp. proveniente de muestras ambientales de una granja avícola.

Se recolectaron muestras de gallinaza de la granja en la avícola los Portales con el fin de aislar una cepa silvestre de *Salmonella* spp. (Fig. 2). Estas muestras se trataron realizando diluciones seriadas (1:10) de solución salina 0.85% estéril hasta llegar a la dilución 10^{-5} para disminuir la carga microbiana.



Figura 2. Gallinaza producida por las gallinas de la línea Lohmann Brown (Fotografía tomada por Juan Martín Álvarez Pérez, 2019).

Una vez realizada las diluciones seriadas de la gallinaza y sembradas en medio XLD, se puede observar que hay un crecimiento limitado de colonias color negro (Fig. 3), que serían presuntas *Salmonella* spp. Por esta razón, se procedió a aislar y purificar la única colonia que cumplía con las características fenotípicas esperadas hasta obtener un aislado que estuviera lo más puro posible.

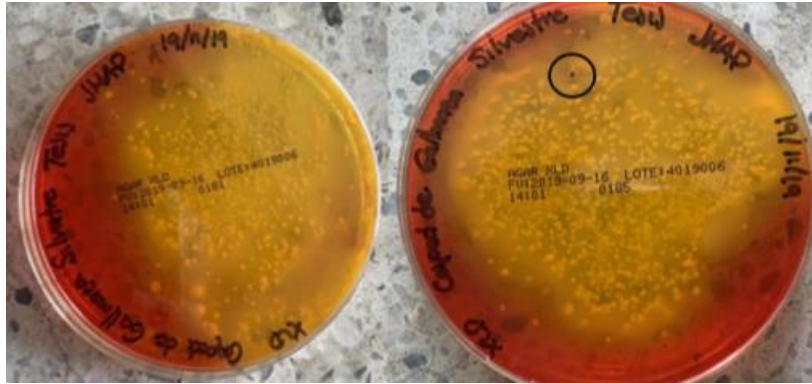


Figura 3. Siembra en superficie de las diluciones de gallinaza sobre agar XLD (Fotografía tomada por Juan Martín Álvarez, 2019).

Después del reislamiento, se obtuvieron colonias que cumplían con la morfología descrita para el crecimiento presuntivo de *Salmonella* spp. en agar XLD, es decir, eran colonias negras, con bordes lisos y claros (Fig. 4), que además, resultaron ser catalasa positiva (Fig. 5).

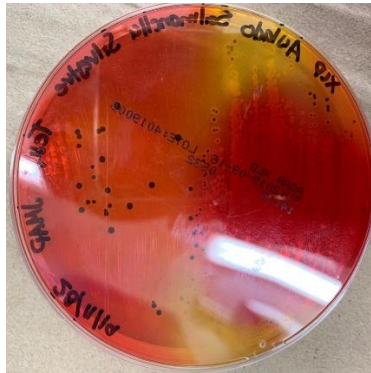


Figura 4. Aislado final de una presunta colonia de *Salmonella* spp. de una muestra de gallinaza (Fotografía tomada por Juan Martín Álvarez Pérez, 2019).



Figura 5. Prueba catalasa positiva (Fotografía tomada por Juan Martín Álvarez Pérez, 2019).

3.2. Aislamiento de ADN empleando el método de ebullición, PCR y secuenciación.

Para comprobar que la cepa aislada perteneciera al género *Salmonella* spp., se realizó una PCR del gen que codifica para la subunidad 16S del ARN ribosomal. Se evidenció el amplificado (996 pb) a través de una electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1% (p/v) (Fig. 6).

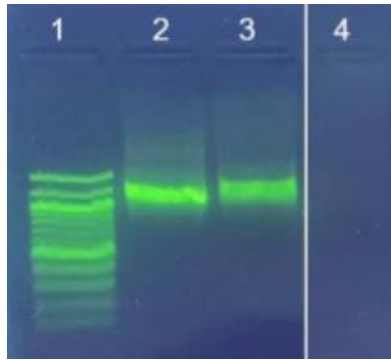


Figura 6. Electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1% del producto de PCR correspondiente a la subunidad ribosomal 16S. **Carril 1:** 100 pb *New England Biolabs*, **carril 2:** aislado presuntivo para *Salmonella* spp., **carril 3:** control positivo, **carril 4:** control negativo (Fotografía tomada por Juan Martín Álvarez Pérez, 2019).

El producto de PCR fue secuenciado en Macrogen (Corea) (Fig. 8). Al analizar la secuencia, se determinó que el gen 16S tiene un 99,54% de indentidad con el mismo gen de la bacteria *Proteus mirabilis*, por lo cual se concluye que no es un aislado correspondiente a *Salmonella* spp.

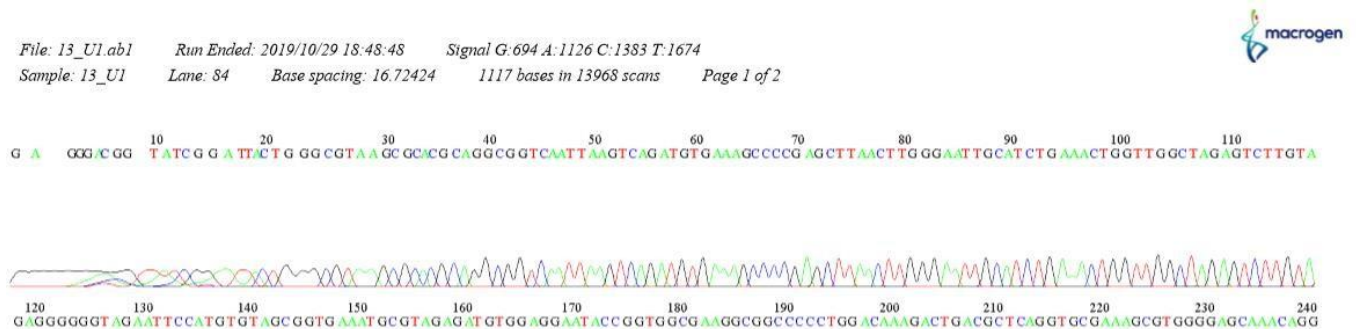


Figura 8. Esferograma correspondiente a la secuenciación del producto de PCR correspondiente al 16S de la presunta colonia de *Salmonella* spp. empleando el iniciador U1

3.3. Obtención del lisado viral proveniente de una muestra de origen ambiental.

Las muestras de gallinaza y de las aguas recolectadas de los bebederos (Fig. 9) se procesaron con el fin de obtener un filtrado llamado Lisado #1 (Fig. 10), que se utilizó para detectar la presencia de bacteriófagos específicos para infectar de forma lítica a las cepas *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ATCC 14028.



Figura 9. Bebederos de agua dentro de los corrales de la granja avícola Los Portales (Fotografía tomada por Juan Martín Álvarez Pérez, 2019).



Figura 10. Lisado #1 (Fotografía tomada por Juan Martín Álvarez Pérez, 2019).

3.4. Evaluación de la capacidad infectiva del lisado viral sobre una cepa de *Salmonella* spp. de origen ambiental y *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ATCC 14028.

Los resultados obtenidos al realizar el Método de Doble Capa indican que se obtuvieron placas líticas para *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ATCC 14028 de la dilución 10^{-1} , resultantes de la mezcla de la gallinaza y de las aguas de los bebederos. Las placas líticas presentaron una morfología que incluye forma circular, bordes regulares y fondos turbios (Fig. 11).



Figura 11. Formación de placas líticas sobre el césped bacteriano de la cepa *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ATCC 14028. (Fotografía tomada desde un estereoscopio por Juan Martín Álvarez Pérez, 2019).

3.5. Recuento de placas líticas.

A continuación, se presentan los títulos virales (UFP/ml) calculados para la cepa de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ATCC 14028. En la Ecuación No. 2 se observa el cálculo realizado para las placas líticas obtenidas para el Lisado #1, sin diluir.

$$\text{Título viral} = \frac{5 \text{ UFP} * 1}{0,1 \text{ mL}} = 50 \text{ UFP/mL}$$

Ecuación No. 2. Calculo del título viral para *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ATCC 14028.

4. DISCUSIÓN.

La salmonelosis es una ETA considerada como un problema de salud pública mundial por su magnitud y por su impacto socioeconómico. Se estima que entre 15% y 20% de dicha enfermedades están directamente asociadas al consumo de carne de pollo o sus derivados [19] contaminados con el agente causal de la enfermedad, la bacteria *Salmonella* spp.

A pesar de que la distribución de la salmonelosis es a nivel mundial, es más frecuente en lugares donde se practica la ganadería intensiva [20]. El pollo se considera un alimento de alto riesgo por sus características fisicoquímicas (pH cercano a la neutralidad, actividad de agua alta, y alto contenido de proteínas y grasas), lo que permite que su superficie se contamine con diversos microorganismos los cuales pueden causar enfermedades en los consumidores. Esta bacteria contamina la carne de pollo durante la etapa de evisceración, en el que se liberan bacterias existentes en el sistema gastrointestinal, siendo la más importante *Salmonella* spp. [21]. Además, se puede encontrar esta bacteria en la gallinaza que se encuentra en las camas de los pollos, donde muchas veces esta entra en contacto con el producto final, los huevos.

De acuerdo con los resultados obtenidos, se pudo observar la presencia de una colonia presuntiva de *Salmonella* spp. sobre una placa de agar XLD proveniente de las muestras de la granja avícola. El agar XLD es un medio selectivo y diferencial que utiliza el desoxicolato de sodio como agente selectivo e inhibe a los microorganismos Gram positivos. La xilosa se incorpora en el medio dado que la fermentan prácticamente todos los microorganismos entéricos, excepto *Shigella*, y esta propiedad hace posible la diferenciación de dicha especie. La lisina se incluye para permitir la diferenciación del grupo *Salmonella* spp. de los organismos no patógenos, dado que, sin lisina, *Salmonella* spp. fermentaría rápidamente la xilosa y no se distinguiría de las especies no patógenas. Para evitar el cambio similar en los organismos coliformes positivos a la lisina, se añaden lactosa y sacarosa para producir ácido en exceso. Para aumentar la capacidad de diferenciación de la fórmula, se incluye un sistema indicador de H₂S, formado por tiosulfato sódico y citrato férrico amónico, para la visualización del ácido sulfhídrico producido, lo que

origina la formación de colonias con centros de color negro para *Salmonella* spp. Los organismos no patógenos, no productores de H₂S, no descarboxilan la lisina; por lo tanto, la reacción ácida producida por dichos organismos evita el oscurecimiento de las colonias [22]. La presunta colonia de *Salmonella* spp. presentó todas las características antes mencionadas (Fig. 4) y dio positivo para la prueba de catalasa (Fig. 5). Sin embargo, se evidenció un crecimiento masivo de otro tipo de enterobacterias, que, según la morfología vista, podrían corresponder a *E. coli*, que, al ser fermentadora de lactosa, viró el medio a color amarillo. Otra bacteria que tiene un crecimiento similar a *Salmonella* spp. en medio XLD es *Proteus mirabilis*, esta bacteria forma colonias de color rojo carmesí y centro de color negro y son catalasa positiva. Por este motivo y para descartar de un falso positivo, se decidió identificar genotípicamente el aislado bacteriano obtenido de gallinaza de pollos. Al realizar el análisis de datos de la secuenciación, la comparación realizada mediante el programa BLAST arrojó la cepa aislada y a la cual se le realizó la PCR para la subunidad 16S del ARN ribosomal, presentaba un 99,54% de identidad con una cepa de *Proteus mirabilis*.

Salmonella spp. es un patógeno natural en la microflora presente en el tracto gastrointestinal de las gallinas y de los pollos, por esta razón, es un patógeno que se encuentra comúnmente en la gallinaza. La presencia baja de *Salmonella* spp. en la gallinaza se puede asociar a que en la granja avícola Los Portales, se les proporcionan a las gallinas, diferentes antibióticos para prevenir enfermedades bacterianas, entre las cuales se encuentran salmonelosis aviar.

Por este motivo, el estudio se continuó usando la cepa *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ATCC 14028. Entonces, se empleó el método de doble capa para detectar los fagos presentes en el lisado #1 (que se obtuvo a partir del procesamiento de las muestras de agua de los bebederos y de la gallinaza) que fueran capaces de infectar esta cepa. Se pudo evidenciar la presencia de placas líticas (Fig. 11) sobre un césped de la *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ATCC 14028, lo cual significa que los fagos obtenidos en las muestras evaluadas tienen la capacidad de realizar un ciclo lítico que produjo la lisis de las bacterias que formaban parte del césped. Las cinco placas líticas obtenidas, tenían la mismas características fenotípicas: halos redondos, bordes regulares y fondo turbio, tal como se han reportado para el fago MP78 para *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ATCC 14028 [23]. Es recomendable hacer microscopía electrónica de los fagos obtenidos para poder hacer la identificación correspondiente.

Todos los bacteriófagos conocidos del género *Salmonella* spp. pertenecen al orden *Caudovirales*, estos fagos tienen genomas de ADN doble cadena, sin envoltura y con una estructura compleja que implica: una cabeza con simetría icosaédrica y una cola helicoidal. La cabeza es una cubierta de proteína y contiene una sola molécula lineal de ADN doble cadena, y la cola es un tubo de proteína cuyo extremo distal se une a los receptores de la superficie en células bacterianas susceptibles. Según la morfología de la cola, se pueden clasificar en tres familias: miofagos (*Myoviridae*) con colas largas y contráctiles, sifofagos (*Siphoviridae*) con colas largas no contráctiles y podofagos (*Podoviridae*) con colas cortas no contráctiles [24].

Los fagos pertenecientes a la Familia *Myoviridae* típicamente poseen ADN bicatenario como su genoma [25]. Estos fagos están representados clásicamente por fagos del tipo T4, que se caracterizan por tener una vaina de cola contráctil e infectan una amplia gama de huéspedes bacterianos. A partir de análisis de genomas de fagos similares a T4, se ha sugerido que los genomas de miovirus son mosaicos de genes centrales conservados, que incluyen genes estructurales que codifican para proteínas de la cabeza y de la cola [26]. Los *Siphoviridae* son una familia de bacteriófagos que hace parte del Grupo I de la Clasificación de Baltimore, por lo tanto, poseen un genoma de ADN doble cadena lineal, protegido por una cabeza de forma icosaédrica y son virus sin envoltura. Por su parte, los fagos de la Familia *Podoviridae* poseen características únicas que incluyen la existencia de un pequeño ADN de doble cadena y una ADN polimerasa tipo B que también se encuentra en la familia de fagos *Tectiviridae*. Hasta la fecha, solo dos géneros se han caracterizado para esta subfamilia [27].

Hasta el año 2005, se habían descrito 172 bacteriófagos capaces de infectar de manera lítica y lisogénica a *Salmonella* spp., todos pertenecientes al orden *Caudoviridae*, correspondiendo 44 de ellos a la familia *Myoviridae*, 65 a la *Siphoviridae* y 63 a la *Podoviridae*. En el año 2008, esta clasificación se amplió con la inclusión de 2 bacteriófagos nuevos, el fago ES18 y SP6. Entre los bacteriófagos que infectan *Salmonella* spp. identificados y caracterizados hasta el momento, se observa una clara predominancia de fagos que realizan ciclos lisogénicos, siendo uno de los motivos por el cual las cepas de *Salmonella* spp. se caracterizan por tener una gran cantidad de profagos en su genoma. Estos profagos juegan un papel importante en las células hospederas porque le conceden inmunidad frente a la infección de otros fagos líticos [28], [29], debido a que impiden su entrada a la célula

bacteriana. Esto puede explicar el bajo recuento de placas líticas para la cepa de *Salmonella entérica* subsp. *entérica* ATCC 14028.

Este y otros estudios realizados muestran a los bacteriófagos con un futuro promisorio en el ámbito del control de *Salmonella* spp. en el sector de la salud y en el sector agrícola, más específicamente en el sector avícola, porque se ha demostrado que *Salmonella* spp. es agente causal de enfermedades para el hombre y que la forma más común de propagación de este patógeno es mediante los productos finales de las industrias avícolas como el pollo y los huevos. La idea de implementar un coctel de bacteriófagos para reducir la carga microbiana de esta bacteria en el tracto gastrointestinal de las gallinas ponedoras de huevos y de los pollos de engorde supone una alternativa económica, amigable con los animales y el medio ambiente para las diferentes granjas que no cuentan con una infraestructura y un sistema especializado para la detención de la propagación de este patógeno y así disminuir el consumo de antibióticos que fomenten la resistencia bacteriana. Realizando los estudios pertinentes de inocuidad, eficacia y estabilidad ambiental podría masificarse su uso y facilitar su administración a través de vehículos como agua, comida o aerosol [30].

5. CONCLUSIONES.

- Se obtuvieron colonias presuntivas de *Salmonella* spp., sin embargo, al realizar la PCR para el gen de la subunidad 16S del ARN ribosomal, se evidenció que la cepa aislada pertenecía a la bacteria *Proteus mirabilis*.
- Los bacteriófagos presentes en la muestra ambiental fueron capaces de infectar *Salmonella entérica* subsp. *entérica* ATCC 14028.

6. PERSPECTIVAS.

- Realizar una caracterización morfológica de los bacteriófagos encontrados.

7. AGRADECIMIENTOS.

A Dios por darme salud y vida para poder realizar mi sueño, a mi familia entera por al apoyo incondicional, a la Universidad Santiago de Cali por brindarme el conjunto de conocimientos adquiridos durante este tiempo, al docente Carlos Andrés Aranaga por sus conocimientos brindados y la ayuda durante este proceso y a mi tutora, la Doctora Aura Falco, por su entrega y paciencia durante estos años de investigación y por ayudarme a culminar esta maravillosa etapa.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- [1] S. A. Nallelyt, H. B. Efrén, L. V. Oliver, and T. A. Oscar, "Los bacteriófagos como una alternativa en el tratamiento de enfermedades infecciosas bacterianas (fagoterapia)," *Rev. Mex. Ciencias Farm.*, vol. 41, no. 3, pp. 17–26, 2010.
- [2] L. Leitner, T. M. Kessler, and J. Klumpp, "Bacteriophages: a Panacea in Neuro-Urology?," *Eur. Urol. Focus*, pp. 10–13, 2019, doi: 10.1016/j.euf.2019.10.018.
- [3] C. Perez and S. Cardozo, "REPORTES DE BROTES Y AISLAMIENTOS DE *SALMONELLA* SPP. EN COLOMBIA," Boyaca, 2014.
- [4] USAID, Perfil de riesgo. 2017.
- [5] R. Castañeda-Salazar, A. N. Pereira-Bazurdo, A. D. P. Pulido-Villamarín, and M. F. Mendoza-Gómez, "Estimación de la prevalencia de *Salmonella* spp. en pechugas de pollo para consumo humano provenientes de cuatro localidades de Bogotá- Colombia," *Infectio*, vol. 23, no. 1, p. 27, 2018, doi: 10.22354/in.v23i1.752.
- [6] Secretaria Distrital de Salud de Bogotá, "Guía para la atención de brotes de ETA (enfermedades transmitidas por alimentos)," *Dir. Salud Pública Área Vigil. en Salud Pública*, pp. 4– 23, 2011, [Online].
- [7] A. Robledo, "Investigación de *Salmonella* spp. en alimentos mediante el método tradicional ISO 6579 y dos

métodos inmunoenzimáticos,” *Univ. Politécnica Cataluña*, pp. 77, 2015.

- [8] M. Barreto, M. Castillo-Ruiz, and P. Retamal, “*Salmonella enterica*: una revisión de la trilogía agente, hospedero y ambiente, y su trascendencia en Chile,” *Rev. Chil. infectología*, vol. 33, no. 5, pp. 547–557, 2016, doi: 10.4067/s0716-10182016000500010.
- [9] H. A. Lopardo, “Fagotherapy: Multi-drug resistance compel us to review the past,” *Rev. Argent. Microbiol.*, vol. 49, no. 1, pp. 1–2, 2017, doi: 10.1016/j.ram.2017.03.002.
- [10] C. S. L. Vaz, D. Voss-Rech, L. Alves, A. Coldebella, L. Brentano, and I. M. Trevisol, “Effect of time of therapy with wild-type lytic bacteriophages on the reduction of *Salmonella Enteritidis* in broiler chickens,” *Vet. Microbiol.*, vol. 240, no. November 2019, p. 108527, 2020, doi: 10.1016/j.vetmic.2019.108527.
- [11] T. H. Lim et al., “Use of bacteriophage for biological control of *Salmonella Enteritidis* infection in chicken,” *Res. Vet. Sci.*, vol. 93, no. 3, pp. 1173–1178, 2012, doi: 10.1016/j.rvsc.2012.06.004.
- [12] A. Liu et al., “Characterization of the narrow-spectrum bacteriophage LSE7621 towards *Salmonella Enteritidis* and its biocontrol potential on different foods,” *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 118, no. October 2019, p. 108791, 2019, doi: 10.1016/j.lwt.2019.108791.
- [13] C. L. Carrillo, R. J. Atterbury, E. Dillon, a Scott, I. F. Connerton, and P. L. Connerton, “Bacteriophage Therapy To Reduce *Campylobacter jejuni* Colonization of Broiler Chickens Bacteriophage Therapy To Reduce *Campylobacter jejuni* Colonization of Broiler Chickens †,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 71, no. 11, pp. 6554–6563, 2005, doi: 10.1128/AEM.71.11.6554.
- [14] C. Levesque, L. Piche, C. Larose, and P. H. Roy, “PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes,” *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 39, no. 1, pp. 185– 191, 1995, doi: 10.1128/aac.39.1.185.
- [15] J. J. Lu, C. L. Perng, S. Y. Lee, and C. C. Wan, “Use of PCR with universal primers and restriction endonuclease digestions for detection and identification of common bacterial pathogens in cerebrospinal fluid,” *J. Clin. Microbiol.*, vol. 38, no. 6, pp. 2076–2080, 2000.
- [16] C. Dini, “Aislamiento y caracterización molecular de bacteriófagos de bacterias enteropatógenas para biocontrol de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA),” p. 142, 2011.
- [17] S. Rodrigo, “BACTERIÓFAGOS DE *SALMONELLA* SPP. CON POTENCIAL Departament de Ciència Animal i dels Aliments,” p. 89, 2019.
- [18] A. Gabriel Gaviria, S. de María González, and O. Jhon Castaño, “Técnica para aislamiento de bacteriófagos específicos para *E.coli* DH5 α a partir de aguas residuales,” *Rev. MVZ Cordoba*, vol. 17, no. 1, pp. 2852–2860, 2012, doi: 10.21897/rmvz.253.
- [19] N. Molina, B. Millán, and M. Araque, “Indicadores de calidad sanitaria y fenotipificación de *Salmonella enterica* aislada de pollo crudo comercializado en el área urbana de Mérida, Venezuela,” *Infectio*, vol. 14, no. 3, pp. 174–185, 2010, doi: 10.1016/s0123-9392(10)70109-0.
- [20] E. C. Rodríguez et al., “Vigilancia por laboratorio de *Salmonella enterica* en casos clínicos humanos en Colombia 2005 a 2011,” *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, vol. 35, no. 7, pp. 417–425, 2017, doi: 10.1016/j.eimc.2016.02.023.
- [21] B. Medina D., “Fiebre tifoidea y paratifoidea,” *Vigja (Santiago)*, vol. 8, no. 22, pp. 37–38, 2017.
- [22] D. G. Becton, “INSTRUCCIONES DE USO – MEDIOS EN PLACA LISTOS PARA USAR BD XLD Agar (Xylose-Lysine-Desoxycholate Agar),” no. April, pp. 8–11, 2013, [Online]. Available: <http://www.bd.com/resource.aspx?IDX=8783>.
- [23] I. S. Rondón-Barragán, G. A. Rodríguez, and G. A. Marín M, “Determinación de la seroprevalencia de *Salmonella* spp. en granjas porcinas del departamento del Tolima,” *Orinoquia*, vol. 18, no. 1, p. 60, 2014, doi: 10.22579/20112629.281.
- [24] T. C. for food security and P. H. CFSPH, “Salmonellosis paratifoide, no tifoidea Última,” pp. 1–2, 2006, [Online]. Available: <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/salmonellosis.pdf>.
- [25] T. Yamada et al., “A jumbo phage infecting the phytopathogen *Ralstonia solanacearum* defines a new lineage of the *Myoviridae* family,” *Virology*, vol. 398, no. 1, pp. 135–147, 2010, doi: 10.1016/j.virol.2009.11.043.
- [26] J. E. Han et al., “Isolation and characterization of a *Myoviridae* bacteriophage against *Staphylococcus aureus*

isolated from dairy cows with mastitis,” *Res. Vet. Sci.*, vol. 95, no. 2, pp. 758– 763, 2013, doi: 10.1016/j.rvsc.2013.06.001.

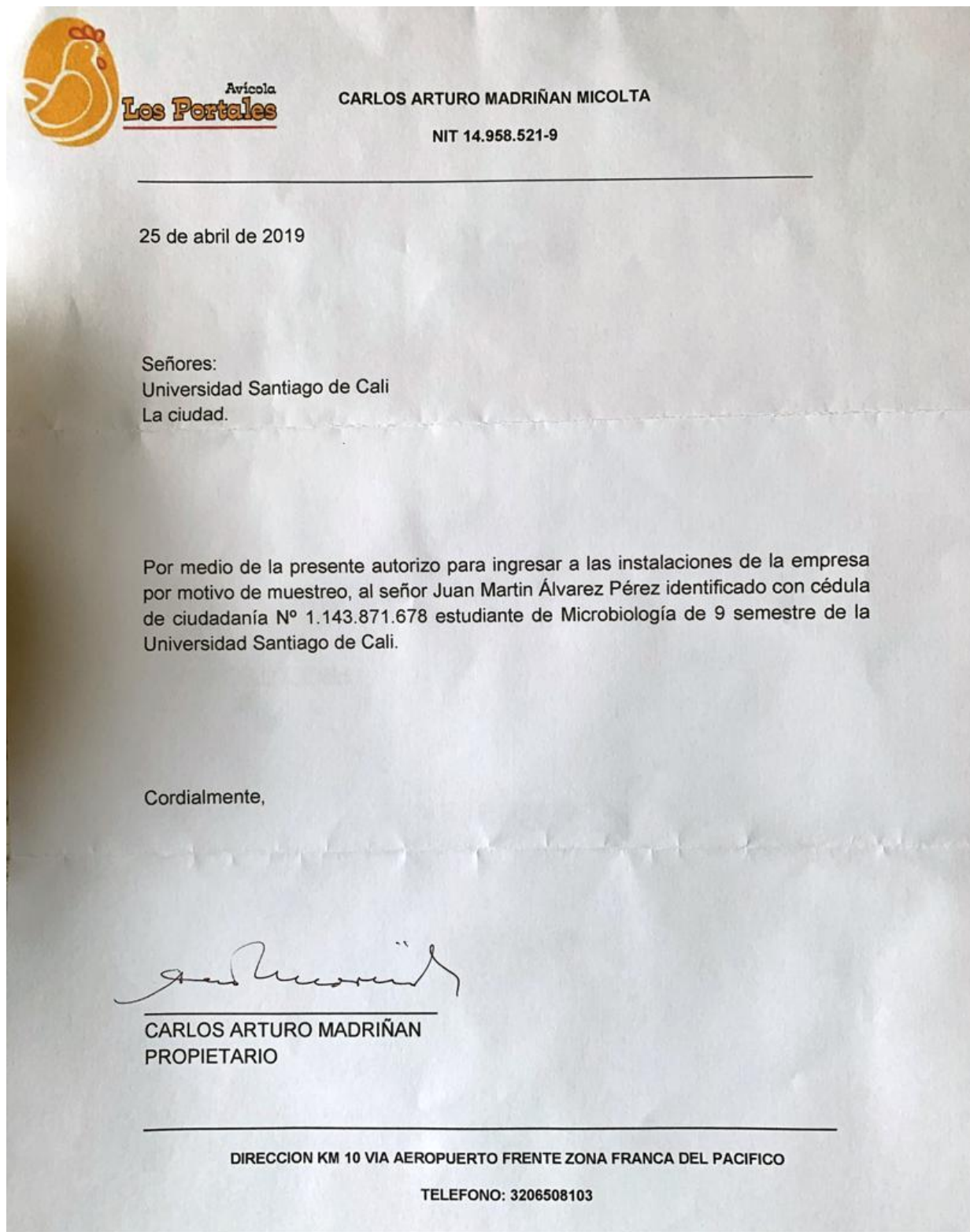
[27] S. M. Ghasemi, M. Bouzari, B. H. Yoon, and H. I. Chang, “Comparative genomic analysis of *Lactococcus garvieae* phage WP-2, a new member of *Picovirinae* subfamily of *Podoviridae*,” *Gene*, vol. 551, no. 2, pp. 222–229, 2014, doi: 10.1016/j.gene.2014.08.060.

[28] T. D. Hoai, I. Nishiki, and T. Yoshida, “Properties and genomic analysis of *Lactococcus garvieae* lysogenic bacteriophage PLgT-1, a new member of *Siphoviridae*, with homology to *Lactococcus lactis* phages,” *Virus Res.*, vol. 222, pp. 13–23, 2016, doi: 10.1016/j.virusres.2016.05.021.

[29] A. Garin-Fernandez and A. Wichels, “Looking for the hidden: Characterization of lysogenic phages in potential pathogenic *Vibrio* species from the North Sea,” *Mar. Genomics*, no. November, p. 100725, 2019, doi: 10.1016/j.margen.2019.100725.

[30] P. Quirós Fernández, “Los bacteriófagos como elementos de transmisión genética horizontal de resistencias a antibióticos y toxinas Stx,” TDX (Tesis Dr. en Xarxa), 2018.

9. ANEXOS.



Anexo 1. Permiso otorgado por la Finca Avícola Los Portales para realizar el muestreo