

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE QUITO**

**CARRERA:
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES**

**Trabajo de titulación previo a la obtención del título de:
INGENIEROS EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES**

**TEMA:
AISLAMIENTO DE BACTERIÓFAGOS INHIBIDORES DEL CRECIMIENTO DE
Listeria spp CON RESISTENCIA ANTIMICROBIANA**

**AUTORES:
GALO JAVIER GRANDA JÁTIVA
THALYA JAMILETH QUILACHAMIN GUERRERO**

**DIRECTORA:
GERMANIA MARGARITA KAROLYS GUTIÉRREZ**

**CO-TUTOR
FERNANDO XAVIER VILLAVICENCIO ZAMBRANO (INSPI)**

Quito, Enero del 2021

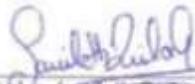
Cesión de derechos de autor

Nosotros Galo Javier Granda Játiva, con documento de identificación 1725534430 y Thalya Jamileth Quilachamin Guerrero con documento de identificación 1722014279, manifestamos nuestra voluntad y cedemos a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que somos autores del trabajo de titulación intitulado: “ Aislamiento de bacteriófagos inhibidores del crecimiento de *Listeria* spp con resistencia antimicrobiana”, mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingenieros en Biotecnología de los Recursos Naturales, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En aplicación a lo determinado en la Ley de Propiedad Intelectual, en nuestra condición de autores nos reservamos los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia, suscribimos este documento en el momento que hacemos entrega del trabajo final en digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.



Galo Javier Granda Játiva



Thalya Jamileth Quilachamin Guerrero

Cédulas: 1725534430

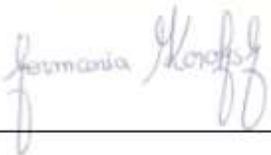
1722014279

Quito, enero del 2021

Declaratoria de coautoría del docente tutor/a

Yo, declaro que bajo mi dirección y asesoría fue desarrollado el trabajo de titulación: Aislamiento de bacteriófagos inhibidores del crecimiento de *Listeria* spp con resistencia antimicrobiana realizado por Galo Javier Granda Játiva y Thalya Jamileth Quilachamin Guerrero obteniendo un producto que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana para ser considerados como trabajo final de titulación.

Quito, enero del 2021



Germania Margarita Karoly Gutierrez

Cédula de identidad: 1708492499

Dedicatoria

Dedico este trabajo a mi familia que han sido mi apoyo fundamental en este proceso de mi vida, mi Mamá Ana mi Papá Galo mi hermana María José, sobrina Vicky quienes en los momentos más difíciles han estado conmigo y en especial a mi abuelito Moisés que siempre confió y me apoyo en mis estudios y sé que ahora desde el cielo me guía por este camino de conocimiento y
sonríe conmigo.

Galo Javier Granda Játiva

Dedicatoria

Dedico este trabajo de titulación a mi madre Narcisa, quién desde el cielo ha guiado mi camino y por quien lucho todos los días para ser mejor persona.

A mis abuelitos, mi padre y a toda mi familia quienes han sido un apoyo incondicional durante esta etapa.

Y por último quiero dedicar esta tesis a mi compañero Galo quién ha sido mi apoyo en todos este proceso, no solo en la tesis, sino en la Universidad quién me ayudo y jamás me ha dejado sola, quién ha confiado en mí cuando ni yo lo hacía y por quien esto no hubiera sido posible.

Thalya Jamileth Quilachamin Guerrero

Agradecimientos

A la Universidad Politécnica Salesiana, por ser nuestro segundo hogar durante los últimos cinco años, donde hemos encontrado a personas maravillosas como maestros, quienes han demostrado ser grandes profesionales y quienes estuvieron con nosotros en este proceso de aprendizaje; gracias por su tiempo y dedicación.

A nuestra tutora, MSc. Germania Margarita Karolys, quien nos brindó la oportunidad de trabajar a su lado y nos apoyó incondicionalmente durante todo el proceso, quien ha demostrado ser una gran persona y una excelente profesional.

Queremos agradecer de manera muy especial al equipo RAM, quienes nos han demostrado ser un grupo de amigos y profesionales increíbles, quienes nos ayudaron desde el primer día que asistimos a sus instalaciones abriéndonos los brazos, a Fernando Villavicencio por confiar en nosotros, brindarnos su asesoría y apoyo al abrirnos las puertas para este trabajo.

Índice de Contenidos

Introducción	1
Capítulo 1	5
1. Marco teórico.....	5
1.1. Bacteriófagos.....	5
1.1.1. Generalidades	5
1.1.2. Taxonomía	6
1.1.3. Estructura.....	8
1.1.4. Mecanismos de replicación.....	9
1.1.5. Técnicas de identificación de Bacteriófagos	12
1.1.6. Fagoterapia	13
1.2. <i>Listeria</i> spp.....	14
1.2.1. Generalidades	14
1.2.2. Morfología.....	15
1.2.3. Taxonomía	15
1.3. Resistencia antimicrobiana.....	16
1.3.1. Resistencia natural o intrínseca	16
1.3.2. Resistencia adquirida.....	17
1.3.3. Resistencia antimicrobiana en <i>Listeria</i> spp.	17
1.4. Mecanismos de resistencia antimicrobiana	18
1.4.1. Mecanismos de resistencia natural	18

1.4.2.	Mecanismos de resistencia adquirida	19
1.5.	<i>Listeria</i> spp. en el entorno de las (ETA)	19
1.5.1.	<i>Listeria</i> spp. en Ecuador	20
1.5.2.	Enfermedades ocasionadas por <i>Listeria</i> spp.....	20
1.6.	Fagoterapia como alternativa para el control y tratamiento de <i>Listeria</i> spp.	21
Capítulo 2.....		24
2.	Materiales y Métodos	24
2.1.	Procesamiento de cepas bacterianas.....	24
2.1.1.	Selección de cepas bacterianas	24
2.1.2.	Reactivación de cepas.....	25
2.1.3.	Pruebas confirmatorias de cepas de <i>Listeria</i> spp.....	25
2.1.4.	Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana.....	28
2.1.5.	Clasificación de cepas bacterianas.....	29
2.1.6.	Cultivo en fase exponencial.....	29
2.2.	Aislamiento de bacteriófagos.....	30
2.2.1.	Colecta de muestras de agua del río Machángara.....	30
2.2.2.	Procesamiento de las muestras de agua.....	30
2.2.3.	Enriquecimiento y curva de densidad óptica	31
2.3.	Titulación de los bacteriófagos	31
2.4.	Evaluación de la capacidad lítica de los bacteriófagos	33
2.4.1.	Prueba de la gota.....	33

2.4.2.	Rango del hospedero.....	34
2.5.	Concentración de los bacteriófagos.....	34
2.6.	Titulación de los lisados fágicos	35
2.7.	Evaluación de la capacidad lítica de los lisados fágicos	36
2.7.1.	Cinética de infección	36
2.8.	Conservación y almacenamiento de los bacteriófagos y de los lisados fágicos	36
2.8.1.	Resistencia al cloroformo.	36
2.8.2.	Almacenamiento	37
3.	Resultados y Discusión.....	38
3.1.	Cepas bacterianas	38
3.2.	Aislamiento de bacteriófagos de las muestras de agua enriquecidas.	40
3.3.	Titulación de fagos	43
3.4.	Evaluación de la capacidad lítica de los fagos	47
3.4.1.	Prueba de la gota.....	47
3.4.2.	Rango de hospedero.....	49
3.5.	Concentración de los bacteriófagos.....	50
3.6.	Titulación de los lisados fágicos	50
3.7.	Evaluación de la capacidad lítica de los lisados fágicos	55
3.7.1.	Cinética de infección	55
3.8.	Conservación y almacenamiento.....	64
3.8.1.	Resistencia al cloroformo	64
	Conclusiones	67
	Recomendaciones	69

Índice de Tablas

Tabla 1. Morfología de <i>Listeria</i> spp.....	26
Tabla 2. Perfil bioquímico de <i>Listeria</i> spp.....	26
Tabla 3. Puntos de corte de antibióticos para <i>Listeria monocytogenes</i>	29
Tabla 4. Características para interpretar los halos de lisis formados en el ensayo de la gota y rango de hospedero.....	33
Tabla 5. Principales grupos de cepas bacterianas.	39
Tabla 6. Unidades formadoras de placa obtenidas.	45
Tabla 7. Resultados de la prueba de la gota de los lisados fágicos.	48
Tabla 8. Resultados del rango de hospedero.	50
Tabla 9. Unidades formadoras de placa después de concentrar a los fagos a partir de los lisados fágicos.	51
Tabla 10. Resistencia a diferentes concentraciones de cloroformo de fagos almacenados en medio SM.	65
Tabla 11. Resistencia a diferentes concentraciones de cloroformo de los lisados fágicos.	65

Índice Figuras

Figura 1. Descripción de la morfología de las familias de bacteriófagos.	7
Figura 2. Formas estructurales básicas de los bacteriófagos.	9
Figura 3. Mecanismos de replicación de los bacteriófagos.....	10
Figura 4. Prueba de CAMP (Christie–Atkins–Munch–Peterson) en <i>Listeria</i> spp.	28
Figura 5. Curva de densidad óptica de la cepa #23.....	42
Figura 6. Curva de densidad óptica de la cepa #39.....	43
Figura 7. Calvas de lisis formadas en la dilución 10^{-2} con la <i>Listeria</i> 3.....	45
Figura 8. Calvas de lisis formadas en la dilución 10^{-5} con la <i>Listeria</i> 3.....	46
Figura 9. Calvas de lisis formadas en la dilución 10^{-5} con la <i>Listeria</i> 4.	46
Figura 10. Calvas de lisis formadas en la dilución 10^{-5} con la <i>Listeria</i> 50.	47
Figura 11. Calvas de lisis producidas por el lisado fágico 2 con la dilución 10^{-2}	52
Figura 12. Calvas de lisis producidas por el lisado fágico 2 con la dilución 10^{-3}	52
Figura 13. Calvas de lisis producidas por el lisado fágico 4 con la dilución 10^{-2}	53
Figura 14. Calvas de lisis producidas por el lisado fágico 4 con la dilución 10^{-3}	53
Figura 15. Calvas de lisis producidas por el lisado fágico 10 con la dilución 10^{-2}	54
Figura 16. Calvas de lisis producidas por el lisado fágico 10 con la dilución 10^{-3}	54
Figura 17. Cinética fágica con el grupo 3 de bacterias.....	55
Figura 18. ANOVA de los valores de densidad óptica obtenidos en la cinética de infección de los bacteriófagos aislados sobre la bacteria <i>Listeria</i> #23.	57

Figura 19. Cinética fágica con el grupo 7 de bacterias..... 58

Figura 20. ANOVA de los valores de densidad óptica obtenidos en la cinética de infección de los bacteriófagos aislados sobre la bacteria *Listeria* #23..... 59

Figura 21. Cinética fágica con el grupo 9 de bacterias..... 60

Figura 22. ANOVA de los valores de densidad óptica obtenidos en la cinética de infección de los bacteriófagos aislados sobre la bacteria *Listeria* #23... 61

Figura 23. Cinética fágica con el grupo 11 de bacterias..... 62

Figura 24. ANOVA de los valores de densidad óptica obtenidos en la cinética de infección de los bacteriófagos aislados sobre la bacteria *Listeria* #3..... 63

Índice de Anexos

Anexo 1. Convenio Marco de colaboración científico-técnica entre Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública-INSPI-Dr. Leopoldo Izquieta Pérez y La Universidad Politécnica Salesiana.....	81
Anexo 2. Ciclos infectivos de los bacteriófagos.	87
Anexo 3. Muestreo de agua en el río Machángara, sector “La Recolecta”.....	88
Anexo 4. Muestreo en el sector de “La Recolecta”.....	89
Anexo 5. Cepas seleccionadas para el estudio.	90
Anexo 6. Perfil Bioquímico de las cepas de Listeria spp.....	92
Anexo 7. Perfil de resistencia y susceptibilidad de las cepas de Listeria spp.	94
Anexo 8. Perfil de resistencia y susceptibilidad en agar sangre.....	97
Anexo 9. Listeria monocytogenes. Grupo 1: cepa 28(Resistente: P, ERI, SXT, MEM).	98
Anexo 10. Listeria monocytogenes. Grupo 2: cepa 38(Resistente: P).....	99
Anexo 11. Listeria monocytogenes. Grupo 3: cepa 23 (Sensible a todos los antibióticos probados).....	100
Anexo 12. . Listeria monocytogenes. Grupo 4: cepa 48 (Resistente: P, MEM).	100
Anexo 13. Listeria monocytogenes. Grupo 5: cepa 35 (Resistente: P, SXT).	101
Anexo 14. Listeria monocytogenes. Grupo 6: cepa 8 (Resistente: SXT).	102
Anexo 15. Listeria monocytogenes. Grupo 7: cepa 39 (Resistente: P, ERI, AMP, MEM, SXT).	103
Anexo 16. Listeria monocytogenes. Grupo 8: cepa 40 (Resistente: ERI, MEM).....	104
Anexo 17. Listeria innocua. Grupo 9: cepa 4 (Resistente: SXT).....	105
Anexo 18. Listeria welshimeri. Grupo 11: cepa 3 (Resistente: P, ERI, MEM, SXT).....	106

Anexo 19. Rango del hospedero en <i>Escherichia coli</i>	107
Anexo 20. Rango del hospedero en <i>Klebsiella pneumoniae</i>	108
Anexo 21. Medios de Cultivo y Buffer.....	109
Anexo 22. Protocolo de Aislamiento de Bacteriófagos	110

Resumen

En Ecuador en el 2019 se reportó 19 500 casos de enfermedades transmitidas por los alimentos, considerando a este como un problema de salud pública. Estas enfermedades son causadas generalmente por la presencia de bacterias patógenas. *Listeria* es un género bacteriano que tiene la capacidad de colonizar distintos ambientes logrando inclusive colonizar alimentos procesados. Esta bacteria es causante de una enfermedad denominada listeriosis que tiene una alta tasa de mortalidad y morbilidad. Actualmente, para tratar enfermedades causadas por dicha bacteria se utilizan antibióticos como la penicilina, eritromicina, meropenem entre otros, sin embargo, debido a la multiresistencia que ha generado esta bacteria es necesario buscar nuevas alternativas como la fagoterapia, con fines terapéuticos y también utilizados en la industria alimenticia como control biológico de esta bacteria. El objetivo de este estudio fue aislar bacteriófagos que inhiban el crecimiento de *Listeria* spp resistente a antibióticos. Se colectaron muestras de agua del río Machángara que debido a la alta presencia de contaminación es un entorno óptimo para el desarrollo de bacteriófagos. Fueron aislados utilizando el ensayo de doble capa, posteriormente se evaluó la capacidad lítica de los bacteriófagos obtenidos y se concentraron para tener una mayor cantidad de unidades formadoras de placa (UFP), finalmente fueron almacenados para su conservación. Se obtuvieron bacteriófagos que inhiben el crecimiento de tres especies: *Listeria ivanovii*, *Listeria monocytogenes* y *Listeria welshimeri*, y que debido a su amplio espectro lítico inhiben otras enterobacterias.

Palabras clave: enteropatógenas, listeriosis, bacteria, virus, antibióticos.

Abstract

In Ecuador in 2019, 19,500 cases of foodborne diseases were reported, considering this as a public health problem. These diseases are generally caused by the presence of pathogenic bacteria. *Listeria* is a bacterial genus that has the ability to colonize different environments, even managing to colonize processed foods. This bacterium is the cause of a disease called listeriosis, which has a high mortality and morbidity rate. Currently, to treat diseases caused by said bacteria, antibiotics such as penicillin, erythromycin, meropenem, among others, are used, however, due to the multi-resistance generated by this bacterium, it is necessary to look for new alternatives such as phage therapy, for therapeutic purposes and also used in the food industry as a biological control of this bacterium. The objective of this study was to isolate bacteriophages that inhibit the growth of antibiotic-resistant *Listeria* spp. Water samples were collected from the Machángara River, which due to the high presence of contamination is an optimal environment for the development of bacteriophages. They were isolated using the double layer assay, later the lytic capacity of the bacteriophages obtained was evaluated and concentrated to have a greater quantity of plaque-forming units (UFP), finally they were stored for their conservation. Bacteriophages were obtained that inhibit the growth of three species: *Listeria ivanovii*, *Listeria monocytogenes* and *Listeria welshimeri*, and that due to their broad lytic spectrum inhibit other enterobacteria

Keys words: enteropathogenic, listeriosis, bacterium, virus, antibiotics.

Introducción

Una de las vías de entrada más importante para que los microorganismos patógenos ingresen al ser humano, es a través de la cadena alimenticia, produciendo infecciones microbianas conocidas como enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) (Mena, 2010). Estas enfermedades son consideradas como uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial (Kopper, Calderón, Schneider, Domínguez, & Gutiérrez, 2009). Según estimaciones estadísticas se dice que en el continente americano al menos 77 millones de personas son afectadas por la contaminación alimentaria, de los cuales 31 millones de esta cifra corresponden a niños menores de 5 años (OMS, 2015). De acuerdo al Centro de Control y Prevención de Decesos (CDC), alrededor de 48 millones de personas en USA son afectadas por el consumo de alimentos contaminados (Estrada, Strawn, Williams, & Moreno, 2019), lo que supondría que anualmente se pierden aproximadamente 2 millones de vidas humanas, alrededor de todo el mundo (Prada, Holguin, González, & Vives, 2015).

En Ecuador un estudio realizado en el 2018 por el Ministerio de Salud Pública, llegó a la conclusión que durante ese año, la cifra ascendió a 24.000 casos de infecciones, además, en el último informe presentado en el mes de julio del 2019 se reportaron alrededor de 11.411 casos más (MSPE, 2019). La presencia de contaminación bacteriana en los productos alimenticios principalmente se debe al incumplimiento de las buenas prácticas de manufactura durante su proceso de elaboración (Chiluisa, Cabrera, & Valladares, 2017), a esto se le debe sumar la presencia de patógenos en materias primas como: leche, carne, pescado, vegetales, etc. Justamente por estos motivos, las industrias realizan esfuerzos para minimizar el riesgo de contaminación (Díaz, Chávez, & Saucedo,

2012) , sobre todo en aquellas partes del proceso donde el alimento no se somete a un tratamiento que permita eliminar los patógenos (Schöbitz, Ciampi, & Nahuelquin, 2009).

Entre los géneros más comunes de bacterias causantes de enfermedades transmitidas por los alimentos se han encontrado: *Campylobacter jejuni*, *Clostridium botulinum*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp, *Shigella* spp, *Staphylococcus aureus* (USDA, 2013). Además, también se encuentra el género de bacterias gram positivas *Listeria* spp, que posee siete especies, sin embargo, dos de estas poseen un mayor interés en la patología humana y animal: *Listeria monocytogenes* y *Listeria ivanovii* (Acha & Szyfres, 2001), que se transmiten a través de los alimentos por vía digestiva (M. Fernández, 2016).

Listeria monocytogenes produce una enfermedad denominada listeriosis, misma que se caracteriza por su alta tasa de letalidad (Acha & Szyfres, 2001), reportándose casos alrededor de todo el mundo (Orsi & Wiedmann, 2016), se sitúa entre las enfermedades transmitidas por alimentos de mayor relevancia en la salud pública, debido al impacto social y económico que tiene por la gravedad de su cuadro clínico (A. Muñoz, Vargas, Otero, Díaz, & Guzmán, 2011). Esta enfermedad se caracteriza por afectar principalmente a poblaciones de riesgo, es decir, a mujeres embarazadas, niños, ancianos y personas inmunocomprometidas. También causa abortos, partos prematuros, meningitis y septicemia (Niño, 2012).

Para combatir dichas enfermedades se utilizan antibióticos, no obstante, la resistencia a los antibióticos es un problema que no solo engloba el ámbito de la salud humana, sino también, se conecta con la salud de los animales y el medio ambiente. Lo que se debe en gran medida a como se usan estos antibióticos, en el caso de la ganadería se han utilizado dosis subterapéuticas en periodos largos de exposición lo que genera condiciones ideales para que las bacterias confieran genes de resistencia. Posteriormente, estos genes pueden transferirse a los patógenos adaptados al

ser humano o inclusive directamente a la microbiota intestinal ya sea por el contacto con personas infectadas, alimentos contaminados o el entorno que nos rodea (Robinson et al., 2016).

Este tipo de bacterias han desarrollado resistencia a antibióticos de primera generación como la penicilina, ampicilina y la gentamicina, esto se debe a la capacidad que tienen las bacterias para desarrollar diversos mecanismos fisiológicos y moleculares, logrando adaptarse rápidamente a condiciones adversas (Prada et al., 2015).

Inclusive se ha determinado que, las bacterias del género *Listeria* poseen mecanismos de resistencia a una gran variedad de antibióticos (Daza, 1998) como son: el cloranfenicol, eritromicina, estreptomicina, tetraciclina, vancomicina y trimetoprim (Niño, 2012) porque lo es necesario buscar nuevas opciones de tratamiento capaces de eliminar a las bacterias.

Una de las alternativas en los últimos años es el uso de la fagoterapia la cual emplea virus específicos de las bacterias conocidos como fagos. Estos reconocen la superficie de la célula bacteriana con alta especificidad inyectan su ADN o ARN y se multiplican y ensamblan dentro de la bacteria, para finalmente romper la célula y liberar su progenie, esto provocará que se infecte a nuevas células bacterianas. El número de fagos crece de forma exponencial, lo que coadyuva a provocar un efecto en el sitio de infección (Prada et al., 2015).

Los bacteriófagos se aíslan principalmente de aguas residuales debido a la alta prevalencia de bacterias patógenas en este ambiente y, por lo tanto, de fagos específicos para cada bacteria, además, presenta condiciones ambientales óptimas para su crecimiento (Alegre, 2019). Un estudio realizado en el río Machángara, expone el alto grado de contaminación, pH alto y bajo potencial de óxido reducción, acumulación de materia orgánica, por ende, gracias a estas características ambientales, se garantiza la presencia de fagos y facilita su aislamiento (Reinoso, 2015). En investigaciones realizadas por varios autores se ha logrado aislar fagos para *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii*, aislados de este mismo río (Egas, 2016).

A pesar de las investigaciones en el país sobre los bacteriófagos aún no se ha profundizado la obtención de bacteriófagos para *Listeria* spp. y su potencial uso como tratamiento. Este trabajo de titulación se desarrolló en Centro de Referencia Nacional de Resistencia a los Antimicrobianos (CRN-RAM), perteneciente al Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública Dr. Leopoldo Izquita Pérez zona 9 (INSPI-LIP) en la ciudad de Quito y tiene como objetivo, aislar bacteriófagos inhibidores del crecimiento de *Listeria* spp. con resistencia antimicrobiana. Para lo cual se tomarán muestras de agua del río Machángara y se evaluará la capacidad que tienen los bacteriófagos aislados de inhibir el crecimiento de las bacterias resistentes a múltiples antibióticos.

Capítulo 1

1. Marco teórico

1.1. Bacteriófagos

Los bacteriófagos también conocidos como fagos o virus bacterianos fueron descubiertos por Frederick W. Twort en 1915 y Félix d'Hérelle en 1917 (Ausgustyn et al., 2018). La palabra bacteriófago proviene del griego *βακτήριον* (baktérion) y *φαγεῖν* (phageín) que significa comer o devorar (Leitner, Kessler, & Klumpp, 2019). Estos son considerados como los entes biológicos de mayor abundancia, estimando un total de 10^{30} a 10^{32} partículas en todo el planeta, además desempeñan un papel importante y determinante en el balance de los ecosistemas bacterianos (Punil, 2017).

Estos virus son parásitos intracelulares obligados que utilizan la maquinaria de las bacterias para replicarse (Monk, Rees, Barrow, Hagens, & Harper, 2010). Los bacteriófagos logran reconocer con alta especificidad la superficie celular para así inyectar su ADN o ARN (Prada et al., 2015), esto se debe a que existen receptores específicos en la superficie de las bacterias para que los fagos se adhieran conllevando a resultados posibles de infección (C. Torres, 2018).

1.1.1. Generalidades

Los bacteriófagos son muy específicos por lo que algunos infectan a cepas particulares dentro de una sola especie. Sin embargo, tienen un amplio rango de hospedadores, es decir, pueden infectar a varias especies dentro de un género (Monk et al., 2010).

Algunas funciones que cumplen los bacteriófagos son de tipo ecológicas, donde se incluye la estructuración de comunidades microbianas, impulsar la evolución a partir de la transferencia de genes y desempeñar un papel primordial en el ciclo biogeoquímico (Dwivedi, Schmierer,

Goldsmith, Edwards, & Breitbart, 2012). También, son considerados el principal promotor entre bacterias del intercambio horizontal de genes (Leitner et al., 2019).

Son importantes ya que han sido considerados y aplicados como un modelo que permite el estudio de la genética de las bacterias, así como también, de los distintos mecanismos de control de la expresión génica, todo esto debido a que las bacterias hospederas son simples de manejar y cultivar dentro del laboratorio (Gaviria, González, & Castaño, 2017).

Los bacteriófagos se utilizan como una herramienta para la transformación genómica bacteriana, y sirven además, para la elaboración de vacunas, siendo una alternativa para el manejo de infecciones también llamada fagoterapia (Hernández, 2007).

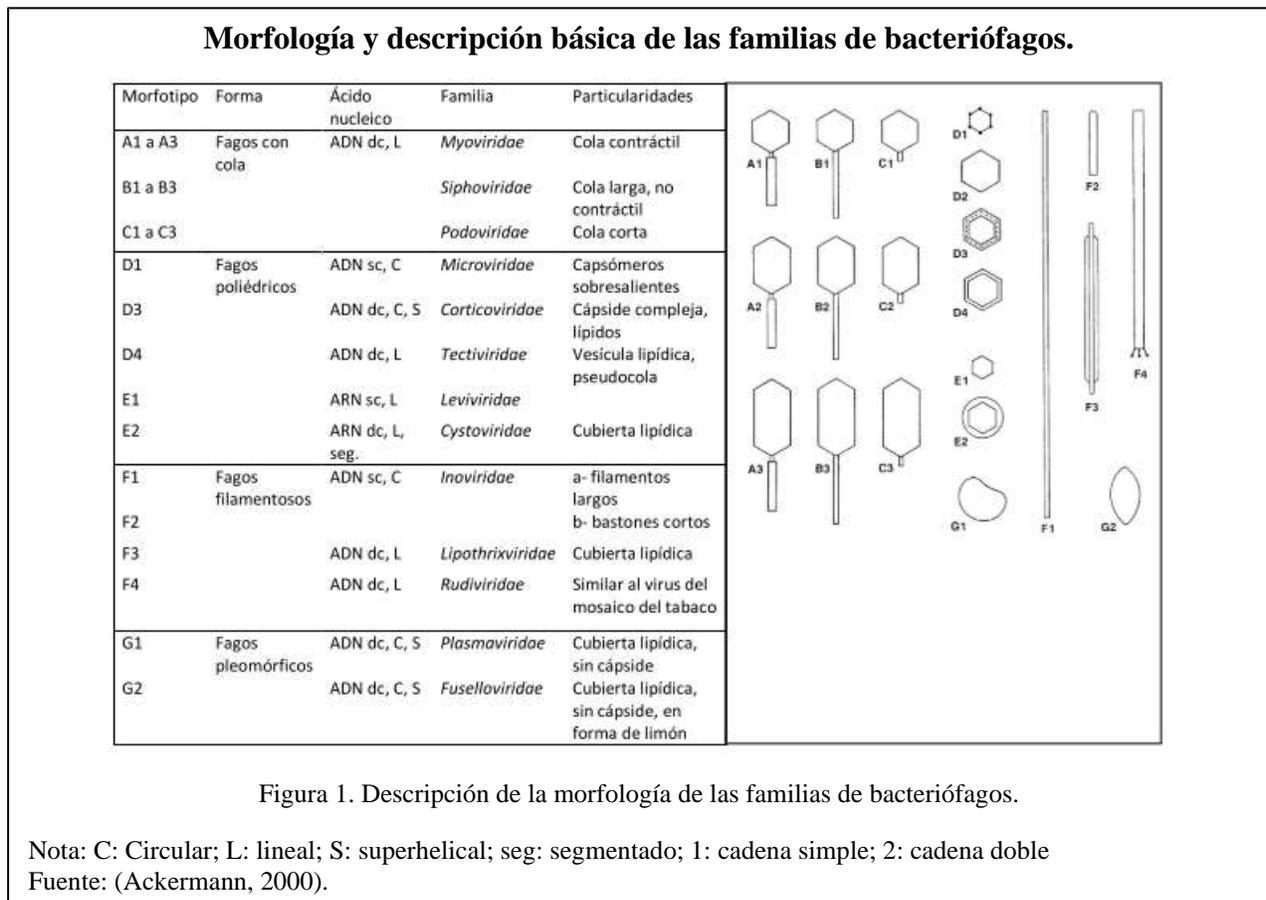
Una característica importante de los bacteriófagos es que tienen la habilidad de persistir viables por largos periodos de tiempo, esto se debe a la conformación y organización de las proteínas de la cápside, superando condiciones ambientales adversas, pH y temperatura variable e inclusive cuando estos se encuentran expuestos a ADN-asas (Gaviria et al., 2017).

1.1.2. Taxonomía

En el año de 1966 se estableció el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV), con la finalidad de implementar un esquema único y universal para clasificar a cientos de virus aislados de humanos, animales, plantas y bacterias (Murphy et al., 1995). La clasificación se basa según el tipo de ácido nucleico, morfología o por sistemas taxonómicos basados en secuencias (Rohwer & Edwards, 2002). Inclusive se los clasifica según su modo de replicación, el organismo huésped y el tipo de enfermedad (White & Orlova, 2016).

Según su morfología se pueden clasificar en fagos filamentosos, con envoltura lipídica y fagos con lípidos en su cubierta proteica (White & Orlova, 2016), algunos suelen tener formas icosaédricas

y presentar cola siendo estos últimos los más complejos. Otra de las formas de clasificar a los fagos es a partir del material genético que puede ser de ADN o ARN y este a su vez ser de doble o simple cadena, circular o lineal (Carter & Saunders, 2007). Se han descrito 13 familias posibles de fagos que se dividen según su estructura morfológica, naturaleza de su genoma, presencia o no de cola, en (Figura 1), se muestran algunas de las familias de bacteriófagos (Ackermann, 2000).

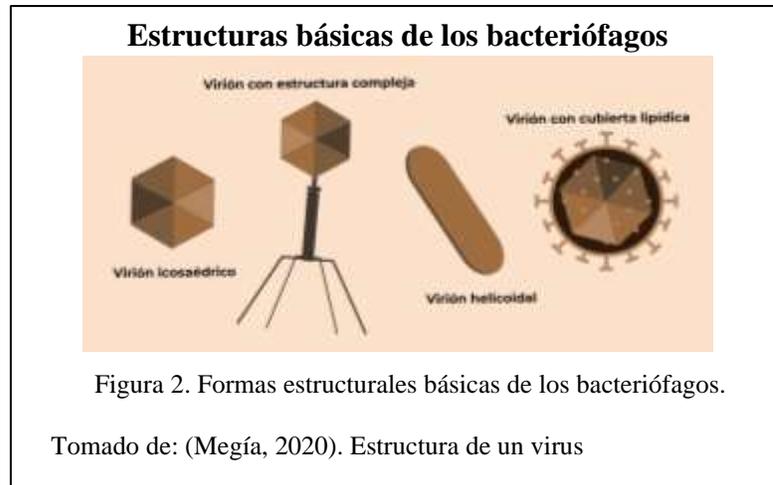


Desde el año de 1959, a partir de la microscopía electrónica se ha logrado determinar la estructura de aproximadamente 5100 bacteriófagos, llegando a demostrar que el 96 % de los fagos totales poseen cola. Dentro de este grupo la distribución de los aislados es de 25,1 % perteneciente a la familia Myoviridae, 60,8 % a la Siphoviridae y 14,1 % a la Podoviridae. Estos fagos constituyen el orden de los Caudovirales (Dini, 2011).

1.1.3. Estructura

Los bacteriófagos tienen un tamaño que varía entre 20-200 nm (L. Fernández, Gutiérrez, Rodríguez, & García, 2020). Se ha descrito a los fagos como los viriones más complejos, debido a que se conforman por varias partes separadas, con formas y simetrías diferentes. Se ha considerado a los fagos compuestos por cabeza icosaédrica y cola helicoidal como los más completos (Madigan, Martinko, Bender, Buckley, & Stahl, 2015). A pesar de la diversidad estructural que poseen la mayoría de fagos según la familia a la que pertenecen, estos al igual que todos los virus se componen básicamente de una cubierta proteica o cápside que protege el material genético que se encuentra en su interior (Alegre, 2019). Existen tres formas básicas en las que puede estar formado un fago: Una cabeza icosaédrica con cola, una cabeza icosaédrica sin cola y de forma filamentosa (Ausgustyn et al., 2018). En la (Figura 2), se muestran algunas de las formas más comunes de los bacteriófagos.

Uno de los fagos que mayormente se ha descrito es el fago T4 específico para *Escherichia coli*, que se compone de una cola con al menos 20 proteínas que dependen entre sí, una cabeza con mayor cantidad de proteínas, el ensamblaje de ambas partes suele ser un proceso complicado ya que la cola se forma de manera independiente antes de unirse con la cabeza del fago (Madigan et al., 2015).



1.1.4. Mecanismos de replicación

La replicación es el mecanismo por el cual los bacteriófagos o virus logran que una célula viva, es decir el hospedador, sintetice todos los componentes necesarios para generar una mayor cantidad de partículas virales, una vez sintetizados los componentes son ensamblados para finalmente obtener como producto nuevas partículas (Madigan et al., 2015).

Los bacteriófagos poseen dos mecanismos de replicación: el ciclo lítico y lisogénico (Gill & Hyman, 2010) como se pueden observar en la (Figura 3). En cualquiera de los dos ciclos como primer paso los fagos reconocen los receptores de membrana y posteriormente insertan su material genético en la célula hospedera (Anexo 2) (Lewin, 2008).

Mecanismos de Replicación de los bacteriófagos

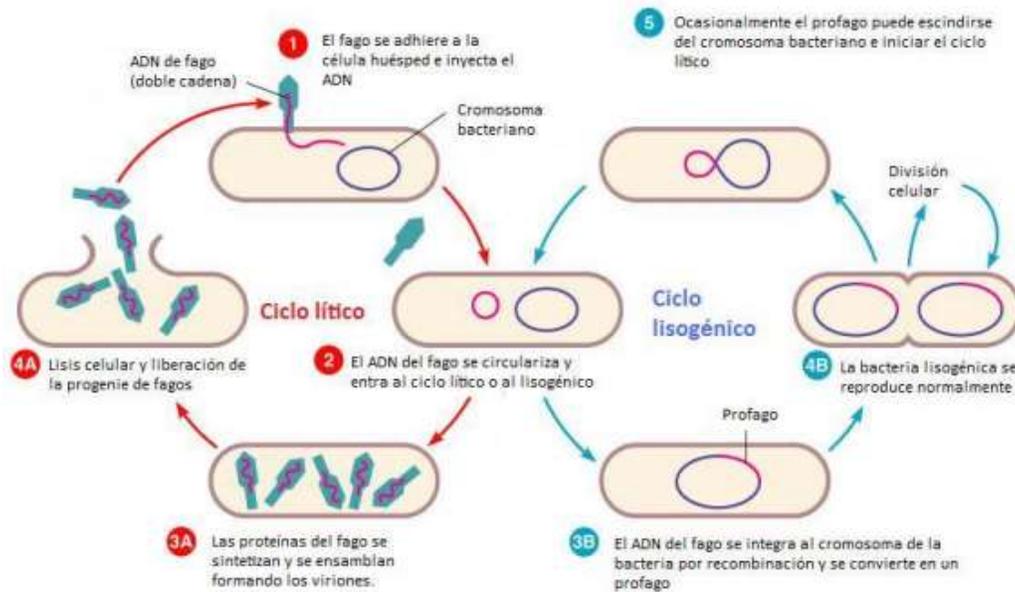


Figura 3. Mecanismos de replicación de los bacteriófagos.

Fuente: (Dini, 2011). Libro: “Microbiology: an introduction”.

1.1.4.1. Ciclo lítico

Corresponde al primer ciclo replicativo que tendrán los bacteriófagos, principalmente aquellos fagos que son virulentos (Segundo, Hernández, López, & Torres, 2010). Este ciclo representa una importancia en la aplicación de fagoterapia ya que termina con la lisis o muerte de la célula hospedera (Gill & Hyman, 2010). La resistencia que tenga la bacteria target del bacteriófago no se encuentra influyendo en la capacidad lítica (Orlova, 2012).

En primer lugar se da un reconocimiento de los receptores de la bacteria por parte del fago, seguido de la adsorción del virus en la célula huésped, la penetración del material genético del fago en la célula, la síntesis de cada componente estructural y finalmente la salida de las partículas formadas del bacteriófago (Segundo et al., 2010). Las fases se dividen en las siguientes:

a) Reconocimiento y Adsorción

Esta fase provoca una unión reversible gracias a la interacción de las proteínas de la cola con los receptores que están en la superficie de la célula hospedera, posteriormente se posesiona correctamente y genera una unión irreversible (Dini, 2011). Los receptores de la superficie bacteriana van a variar entre gram positivas conformado por elementos de peptidoglucano, ácidos teicoicos, lipoteicoicos, por otro lado las bacterias gram negativas conformados por lipopolisacáridos (LPS), y proteínas de la membrana externa como porinas y proteínas de transporte. El mismo bacteriófago puede tener diferentes tipos de receptores en su estructura, esto es importante ya que mientras más receptores tenga el fago mayor será el rango de hospedero del mismo (Kutter & Sulakvelidze, 2004).

b) Replicación

La eficiencia de la replicación del material genético del fago dependerá de la naturaleza de este. La fase de eclipse es el periodo desde que se da la infección del bacteriófago hasta que se forma la partícula completa, en esta fase se replica totalmente el ADN de un fago, se sintetizan las proteínas de la cápside y finalmente ocurre el ensamblaje de todos sus componentes (Clokier & Kropinski, 2009).

Este proceso ocurre principalmente en tres fases i) la transcripción de los genes tempranos, ii) transcripción de los genes que codifican para las enzimas para la replicación y iii) transcripción de genes estructurales y de lisis (Kutter & Sulakvelidze, 2004).

c) Liberación de la progenie

Este corresponde al último paso del ciclo lítico, se da la liberación de la célula huésped de nuevos fagos completamente formados y maduros, la cantidad de fagos que son liberados pueden ir desde algunos a miles, este número de partículas virales expulsadas es conocido como tamaño de explosión (Dini, 2011).

1.1.4.2. Ciclo lisogénico

En este ciclo los bacteriófagos insertan su material genético en la célula huésped lo que se conoce como “profago”, ya sea en forma de plásmido (C. Torres, 2018), o en el interior de una región específica del cromosoma bacteriano, por lo tanto, éste se replica conjuntamente con la célula huésped y se transmite a la progenie (Orlova, 2012). Los fagos que realizan lisogénia se denominan templados, y codifican enzimas específicas, como un represor transcripcional.

Este ciclo no tiene una aplicación dentro de la fagoterapia ya que no termina con la muerte de la bacteria (Gill & Hyman, 2010).

1.1.5. Técnicas de identificación de Bacteriófagos

Los bacteriófagos han podido ser identificados a través de técnicas que permiten diferenciarlos molecular o morfológicamente, entre ellas destacan a nivel molecular la amplificación de marcos de lectura pertenecientes al genoma viral a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), por otra parte también, está el uso de fragmentos de restricción y la secuenciación masiva del genoma del fago. En cuanto a la identificación morfológica principalmente se utiliza la microscopia electrónica que permite identificar la estructura de los bacteriófagos y así identificarlos por la morfología de la cápside y cola.

1.1.5.1. Microscopía Electrónica

El estudio de la microbiología y la bacteriología han brindado una idea clara de la capacidad que tienen los virus para infectar a las células. Sin embargo, es necesario conocer la organización estructural y sus componentes a nivel atómico para comprender su función y lograr así su regulación o modificación (White & Orlova, 2016). Con la aparición de la microscopía electrónica se pudo determinar que los fagos poseen una naturaleza particulada y viral, además, de poseer diferentes tamaños y formas. Más de 5500 bacteriófagos se han caracterizado gracias a la microscopía electrónica. Existen dos principales ramas en la microscopía: microscopía electrónica de barrido y microscopía electrónica de transmisión (H. Ackermann, 2012).

1.1.6. Fagoterapia

En el año 1919, el científico d'Herelle fue el primero en utilizar fagos como posible alternativa para tratar infecciones bacterianas, aisló bacteriófagos de muestras de heces de aves para combatir específicamente la disentería en pollos (Prada et al., 2015). Posteriormente sus estudios fueron probados en humanos en el Hospital de Enfants-Malades en Paris (Prada et al., 2015), uno de sus ensayos se basó en tratar la infección de un paciente de 12 años de edad, en el cual aplicó una única inyección de fagos, finalmente observó que los síntomas de la enfermedad desaparecían inmediatamente (E García & López, 2002).

Al notar que los virus destruían al huésped bacteriano y a la vez eran inofensivos para los humanos (Inal, 2003) se generó el laboratorio comercial de d'Herelle que produjo algunas preparaciones a base de fagos como, por ejemplo: Bacto-pyo-phage, Bacto-coli-phage, Bacto-rhino-phage, Bacto-intestini-phage y Bacto-staphy-phage (Segundo et al., 2010).

A pesar de los prometedores resultados al curar enfermedades como la disentería severa, infecciones cutáneas y otras infecciones bacterianas (Segundo et al., 2010) en los años 1920 y 1930 los avances logrados fueron interrumpidos por la Asociación Médica Americana sobre todo porque existía un desconocimiento de la biología de los fagos ya que la primera descripción morfológica de un fago se realizó hasta el año 1943 a través de microscopía electrónica (E García & López, 2002). Además, la fagoterapia fue opacada por la aparición de los antibióticos (Prada et al., 2015).

Sin embargo, en los últimos años el interés por la fagoterapia se ha reactivado principalmente por la resistencia que han generado las bacterias a los antibióticos (Inal, 2003). Se ha demostrado la eficacia de los fagos al combatir bacterias gram positivas y gram negativas (Segundo et al., 2010). Esta terapia se basa en la utilización de bacteriófagos para el control de bacterias patógenas (Kutter & Sulakvelidze, 2004). La fagoterapia es un tratamiento basado en la actividad bactericida de los bacteriófagos (fagos), virus específicos de las bacterias. Los fagos reconocen la superficie de la célula bacteriana con alta especificidad, inyectan su ADN o ARN, se multiplican y ensamblan dentro de la bacteria, para finalmente romper la célula y liberar su progenie, que infectará nuevas células bacterianas. El número de fagos crece de forma exponencial, por lo que tiene un mayor efecto en el sitio de infección (Prada et al., 2015).

1.2. *Listeria* spp.

1.2.1. Generalidades

Es una bacteria cocobacilo gram positiva, aerobia o anaerobia facultativa, móvil a 25 °C e inmóvil a 37 °C (Schöbitz et al., 2009), puede crecer en un amplio rango de temperaturas que van desde 0.5° C hasta 45 °C y condiciones de pH (4.7- 9.2) (Skowron et al., 2018). Estos microorganismos tienen la capacidad de sobrevivir a diferentes condiciones como, concentración de salinidad

elevada, temperaturas bajas y a distintos valores de pH, estas características les permite colonizar distintos ambientes como pueden ser aceites, aguas residuales, plantas de procesamiento industrial, maquinaria entre otros (Ferreira, Wiedmann, Teixeira, & Stasiewicz, 2013). Son capaces de sobrevivir por mucho tiempo e incluso han generado resistencia a temperaturas de refrigeración (Oteo & Alós, 2009).

La gran habilidad para colonizar y crecer en diversos ecosistemas se debe a la presencia de 331 genes que codifican para varias proteínas de transporte (K. Torres, Sierra, Poutou, Carrascal, & Mercado, 2005). Por lo que ha sido posible aislar esta bacteria de suelos, materia vegetal, aguas residuales comida animal y en alimentos de consumo humano como son productos lácteos no pasteurizados, verduras entre otros (Oteo & Alós, 2009).

1.2.2. Morfología

El género *Listeria* es caracterizado por tener una morfología de cocobacilos Gram positivo, cortos, regulares, no esporulados, ni ramificados, que suelen observarse en disposición individual o formando cadenas cortas (A. Muñoz et al., 2011). Sus colonias son pequeñas de 1 a 2 mm tras 24 horas de incubación, con una coloración blanco-grisácea, además, presentan hemólisis, que excede de manera tenue el borde de la colonia (Benadof, 2008).

1.2.3. Taxonomía

Según Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, la clasificación científica de *Listeria*, está pertenece al dominio "*Bacteria*"; filo "*Firmicutes*"; clase "*Bacilli*"; familia "*Listeriaceae*" (Staley et al., 2005). En la actualidad este género comprende seis especies: *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii*, *Listeria innocua*, *Listeria welshimeri*, *Listeria seeligeri* y *Listeria grayi* (Schöbitz et al., 2009). Solo dos especies de este género son consideradas patogénicas: *Listeria*

monocytogenes asociada a infecciones en humanos y *Listeria ivanovii* asociada a infecciones en animales (K. Torres et al., 2005). Existen 13 serovares de *Listeria monocytogenes*: 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e, 7 (A. Muñoz et al., 2011), que se consideran potencialmente patogénicos, sin embargo, se determinó que más del 90 % de estos están involucrados en el desarrollo de la listeriosis de origen alimentario como es el caso de los serovares: 4b, 1/2b, 1/2a y 1/2c (Carrascal et al., 2011).

1.3. Resistencia antimicrobiana

Uno de los principales problemas en la actualidad, es la capacidad que tienen las bacterias para generar resistencia a los antibióticos, lo cual, ha ocasionado problemas de salud pública aumentando la mortalidad, morbilidad y los costos destinados a la atención médica (Prada et al., 2015). Sin duda, el manejo inapropiado, el uso excesivo y la mala administración de los antibióticos para tratar cualquier tipo de enfermedad infecciosa, ha generado que las bacterias adquieran la capacidad de resistencia a los antibióticos por medio de diferentes mecanismos (Cires, 2002). Existen diversos tipos de resistencia que pueden adoptar las bacterias.

1.3.1. Resistencia natural o intrínseca

En los últimos años se ha generado una contaminación ambiental por el uso excesivo de antibióticos como quinolonas y tetraciclinas que permanecen en el ambiente por largos periodos de tiempo. La capacidad que tienen las bacterias para sobrevivir en lugares con presencia de sustancias inhibidoras se conoce como resistencia intrínseca, la cual se debe a diversos mecanismos de defensa ubicados en la célula de forma natural (Loera, López, Romero, Luévanos, & Balagurusamy, 2016), este tipo de resistencia es propia de cada familia, grupo o especie bacteriana (Vignoli & Seija, 2006).

1.3.2. Resistencia adquirida

Este tipo de resistencia la adquiere una cepa de una especie bacteriana por lo que se considera variable (Vignoli & Seija, 2006). Esta resistencia se debe a la modificación genética horizontal (Loera et al., 2016), por lo que tiene mayor importancia en el ámbito clínico. Es por esta razón que es importante conocer los mecanismos de resistencia que impiden a los antimicrobianos ejercer su acción sobre la bacteria (Daza, 1998). Puede darse este tipo de resistencia por mutaciones o por mecanismo de transferencia genética. Una bacteria obtiene información genética que codifica resistencia a partir de otra bacteria que, si es resistente, es mediada por plásmidos, transposones o integrones (Daza, 1998).

1.3.3. Resistencia antimicrobiana en *Listeria* spp.

Durante muchos años no se consideró necesario realizar pruebas de sensibilidad para *Listeria* spp, no obstante, desde el año 1993 la National Committee for the Clinical Laboratory Standards (NCCLS), genera los primeros valores estándar para interpretar de manera correcta las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de esta bacteria (Herrera et al., 2001).

Por mucho tiempo, esta bacteria ha conservado relativamente su sensibilidad a los antimicrobianos siendo intrínsecamente resistente a las cefalosporinas de tercera generación y a las quinolonas de primera generación (Oteo & Alós, 2009), sin embargo, en la actualidad existen diferentes estudios que han demostrado la multiresistencia de esta bacteria a distintos antibióticos como: penicilina, gentamicina, clindamicina, sulfametoxazol-trimetoprim, tetraciclina y ciprofloxacina (Rivera, 2016). Con lo cual ha generado que se estandaricen valores para su correcta interpretación, como se muestra en la versión 10.0 del European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), donde existen tablas que muestran los puntos de interrupción para la interpretación de

MIC y el diámetro de la zona para *Listeria monocytogenes* con diversos antibióticos como: penicilinas, carbapenémicos, macrólidos y diversos agentes (EUCAST, 2020).

Listeria monocytogenes ha logrado desarrollar diferentes mecanismos de resistencia a los antibióticos, por un lado, la resistencia intrínseca que se manifiesta por medio de la interferencia de enzimas inactivadoras, provocadas por mutaciones espontáneas en genes constitutivos de esta bacteria y también se encuentra la resistencia adquirida que se debe a mecanismos de resistencia cromosomales o extracromosomales mediados por plásmidos (Rivera, 2016).

1.4. Mecanismos de resistencia antimicrobiana

1.4.1. Mecanismos de resistencia natural

- a. Permeabilidad de la membrana externa:** la bicapa lipídica puede alterarse por acción de las bacterias, sin embargo, la permeabilidad de la membrana puede deberse a cambios conformacionales de las porinas, proteínas que forman canales de agua que regulan la entrada de sustancias como los antibióticos. Al cambiar su conformación genera que la membrana externa no permita el paso de las sustancias al espacio peri plasmático (Tafur, Torres, & Villegas, 2008).
- b. Bombas de expulsión:** estas bombas toman el antibiótico del espacio periplasmático y lo expulsan al exterior, evitando que llegue al sitio de acción (Tafur et al., 2008).
- c. Alteración al sitio de acción:** este mecanismo es utilizado por las bacterias Gram-positivas, las cuales alteran el sitio donde el antibiótico se une a ella y alteran el sitio de acción del antibiótico (Loera et al., 2016). Este mecanismo es utilizado principalmente por bacterias gram positivas, que generan cambios en el sitio de acción de los antibióticos beta-lactámicos (Tafur et al., 2008).

d. Modificación enzimática del antibiótico: este mecanismo es utilizado por las bacterias Gram- positivas, las cuales alteran el sitio donde el antibiótico se une a ella y alteran el sitio de acción del antibiótico (Loera et al., 2016). Este mecanismo es utilizado principalmente por bacterias Gram positivas, que generan cambios en el sitio de acción de los antibióticos beta-lactámicos (Tafur et al., 2008).

1.4.2. Mecanismos de resistencia adquirida

Debido a la gran capacidad de las bacterias para adaptarse a diferentes ambientes, este microorganismo puede adquirir cierto grado de resistencia a los antibióticos, y así transferir esta resistencia de manera eficiente a otras bacterias por medio de elementos genéticos móviles, como pueden ser, plásmidos, DNA desnudo y transposones (Giedraitienė, Vitkauskienė, Naginienė, & Pavilonis, 2011)

1.5. *Listeria* spp. en el entorno de las (ETA)

Las enfermedades transmitidas por alimentos son consideradas como uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial, siendo una de las principales causas de morbilidad y mortalidad. Son ocasionadas debido al consumo de alimentos contaminados por bacterias, virus y parásitos (MSPE, 2019).

Las bacterias del género *Listeria* spp. comprenden uno de los principales agentes causales de una ETA, es una bacteria que tiene la capacidad de colonizar y sobrevivir en muchos ambientes como en el intestino de animales, agua, suelo, superficies, paredes, techos, plantas y han sido también aisladas de productos terminados que están listos para el consumo esto se debe a la capacidad que tienen de resistir temperaturas de refrigeración (Fundación Vasca para la Seguridad Agroalimentaria, 2006).

Los primeros brotes de *Listeria* spp. en alimentos fueron en los años 80 y fue desde este año que comenzaron a aumentarse, en 1983 se dieron los primeros casos epidémicos en América del Norte y en Europa, generando más de 2500 casos por año de infecciones ocasionadas por esta bacteria, causando listeriosis en los pacientes y ocasionando la muerte de 500 personas (Mena, 2010).

1.5.1. *Listeria* spp. en Ecuador

En el Ecuador se ha encontrado contaminación por *Listeria* spp en alimentos listos para el consumo tales como: embutidos, leches pasteurizadas, quesos, yogurt, carnes crudas y elaboradas, dichos alimentos son de venta libre al público en mercados, tiendas e incluso en restaurantes (Chiluisa et al., 2017; Mena, 2010; Plaza, 2013). Este microorganismo, aunque se encuentre en bajas concentraciones iniciales en los alimentos, tiene la capacidad de multiplicarse rápidamente durante el proceso de almacenamiento así sea en bajas temperaturas, por lo tanto, el riesgo de contaminación por *Listeria* spp, es alta (INEN, 2014).

1.5.2. Enfermedades ocasionadas por *Listeria* spp.

1.5.2.1. Listeriosis

Es una enfermedad producida por *Listeria monocytogenes* (K. Torres et al., 2005) en humanos se cree que la principal ruta de transmisión se debe al consumo de alimentos contaminados (Hof, Nichterlein, & Kretschmar, 1997), generando una infección que puede presentarse de manera esporádica o en epidemias (Oteo & Alós, 2009). Sin embargo, esta enfermedad puede darse por diversas formas de transmisión como por ejemplo de manera vertical, es decir de madre a hijo; zoonótico por medio del contacto con animales enfermos y nosocomia que se refiere a la adquisición de esta enfermedad en los hospitales (Fundación Vasca para la Seguridad Agroalimentaria, 2006).

La listeriosis es considerada una infección potencialmente grave (Rodríguez, 2018), con tasas de mortalidad del 20 % al 40 % y una incidencia anual del 0.3 al 0.8 % por 100.000 habitantes, inclusive puede alcanzar un porcentaje del 5 % cuando se dan brotes epidemiológicos (Becroft et al., 1971). Esta enfermedad se manifiesta clínicamente siguiendo dos categorías: listeriosis invasiva y listeriosis no invasiva.

La listeriosis invasiva se produce cuando las células bacterianas tienen la capacidad de atravesar la barrera intestinal afectando a órganos y sistemas como: el sistema nervioso central y el útero en caso de una mujer embarazada puede ocasionar meningitis, bacteremias, septicemias, meningoencefalitis. Por otra parte, la listeriosis no invasiva se puede manifestar con síntomas como la gastroenteritis, diarrea, fiebre, dolor de cabeza (A. Muñoz et al., 2011).

1.6. Fagoterapia como alternativa para el control y tratamiento de *Listeria* spp.

Por muchos años, las enfermedades causadas por *Listeria* spp, fueron tratados con antibióticos como la amoxicilina, gentamicina y ampicilina, obtenido buenos resultados terapéuticos (Granda, 2018), sin embargo, en los últimos años con la generación de nuevos mecanismos de resistencia adquiridos por este género de bacterias en particular, es necesario buscar nuevas opciones de tratamiento para pacientes infectados e inclusive investigar alternativas que puedan eliminar las bacterias en los procesos productivos de elaboración de alimentos, donde muchas veces los alimentos son contaminados por este patógeno llegando a producir una infección.

Una alternativa para combatir a *Listeria* spp. resistente a los antibióticos es la fagoterapia que emplea el uso de bacteriófagos líticos para eliminar o inhibir el crecimiento bacteriano. Se ha utilizado fagos en el ámbito terapéutico para tratar infecciones en humanos y animales, a su vez que se han venido desarrollando productos fágicos utilizados en la industria alimentaria en

cualquiera de los procesos de producción de alimentos (Ernesto García, 2014). Varios estudios realizados en el año 2005 han determinado que este tipo de terapia es segura por lo que se han desarrollado suspensiones de fagos que pueden ser ingeridas para tratar infecciones en humanos. Un ejemplo específico ocurrió en Europa donde en un estudio, se administró a diversas personas por vía oral una concentración de 10^5 UFP/mL del fago T4, demostrando que las personas no desarrollaron ningún tipo de efecto secundario. Otro estudio demostró tener resultados exitosos con el empleo de un fago lítico capaz de inhibir a *Pseudomonas aeruginosa*, para lo cual se administró una suspensión de fagos en pacientes con otitis ocasionada por esta bacteria, los investigadores obtuvieron que en el 50 % de pacientes ocurrió una disminución y mejora de los síntomas, así como también que lograron reducir la carga microbiana en un 80 % a comparación de los pacientes no tratados (Reina & Reina, 2018).

La fagoterapia posee un gran número de ventajas como son: baja posibilidad de desarrollar infecciones secundarias debido a su alta especificidad al combatir una bacteria en particular (Inal, 2003); mayor efecto en el sitio de infección gracias al crecimiento exponencial de fagos (Prada et al., 2015). Además, los receptores a los que se dirigen los bacteriófagos en la superficie de la célula bacteriana son factores de virulencia, esto quiere decir que cuando las bacterias generan resistencia a los fagos, generalmente se alteran resultando en una atenuación de la virulencia (Inal, 2003), pueden lisar a células resistentes a antibióticos (Segundo et al., 2010). Debido a su capacidad para mutar pueden combatir la resistencia que podrían llegar a generar las bacterias hacia los fagos (Prada et al., 2015); son auto replicables se multiplican solo mientras encuentren la presencia de la bacteria hospedera, los fagos no presentan ningún riesgo para la salud humana y animal esto se debe a su alto grado de inocuidad y seguridad (Romero, 2015). Mientras que los antibióticos pueden causar desordenes intestinales, alergias y otros efectos adversos no deseados; cabe destacar

que la producción de fagos es un proceso relativamente rápido y económico. Desde su selección y su generación en laboratorio hasta llegar a la comercialización puede tardar meses, comparado con los antibióticos que suelen tardar varios años (Prada et al., 2015).

Esto demuestra que la fagoterapia es una alternativa eficaz y segura para ser administrada a pacientes que se encuentran infectados por bacterias multiresistentes. En el caso de *Listeria* spp. no solo se podría utilizar para administrar directamente a los pacientes, sino que también es posible utilizar suspensiones de fagos en procesos de elaboración de alimentos para disminuir la posibilidad de infestación por esta bacteria y evitar el uso de antibióticos directamente en el alimento ya que esto conlleva al aumento de la resistencia.

Capítulo 2

2. Materiales y Métodos

El estudio se llevó a cabo en el laboratorio de investigación del Centro de Referencia Nacional de Resistencia a los Antimicrobianos (CRN-RAM) del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública Dr. Leopoldo Izquieta Pérez (INSPI-LIP) Coordinación zonal 9. Se utilizaron cepas bacterianas de *Listeria* spp, pertenecientes al cepario del CRN-RAM, procedentes de diversos hospitales del país y de muestras de la Agencia Nacional de Regulación, Control y Vigilancia Sanitaria (ARCSA).

2.1. Procesamiento de cepas bacterianas

2.1.1. Selección de cepas bacterianas

Se seleccionaron las cepas bacterianas de la base de datos del cepario del CRN-RAM del INSPI CZ-9 desde el año 2015 hasta el año 2019. En este caso se seleccionaron las cepas de *Listeria* spp, provenientes de muestras de aislados clínicos y productos lácteos listos para el consumo humano. Los criterios de selección de las cepas fueron: cepas con no más de 5 años de almacenamiento en el cepario, cepas que hayan sido analizadas previamente mediante pruebas de susceptibilidad y resistencia a los antibióticos y pruebas moleculares como PCR que fueron usadas para identificar la especie de *Listeria* spp.

2.1.2. Reactivación de cepas

Para la reactivación de las cepas seleccionadas anteriormente, se procedió a descongelar los viales originales a temperatura ambiente y a homogenizar las muestras en vórtex durante un minuto. Posteriormente se realizó la siembra de las cepas en agar sangre de cordero al 5 %, mediante el método de agotamiento por estriado. Se incubaron a 37 °C durante 24 horas, finalizado el tiempo de incubación se verificó el crecimiento de las colonias.

Se realizaron suspensiones de las cepas para ello se recolectó varias colonias con la ayuda de un asa estéril y se colocaron en 5 mL de BHI + glicerol al 20 %, posteriormente se homogenizaron en vórtex por un minuto y se guardaron en un congelador a -20 °C. Esto con la finalidad de evitar contaminar los viales originales del cepario y generar un reservorio de cepas para posteriores pruebas.

2.1.3. Pruebas confirmatorias de cepas de *Listeria* spp.

2.1.3.1. Pruebas morfológicas

Para esto se tomaron los viales de respaldo y se dejaron a temperatura ambiente, se homogenizaron con vórtex durante un minuto y se realizó la siembra por estriado en agar sangre de cordero al 5 %, las muestras se incubaron a 37 °C por 24 horas. Una vez finalizado el tiempo de incubación se observó las placas bajo un estereoscopio con la finalidad de observar colonias de color blanco-grisáceas de alrededor de 1 a 2 mm de *Listeria* spp. Además, se tomaron alrededor de 2-4 colonias y con un asa estéril se procedió a colocarlas en una placa y realizar la prueba de Tinción Gram (Tabla 1).

Tabla 1.

Morfología de *Listeria* spp.

Método	Características de <i>Listeria</i> spp
Colonias	(1 a 2 mm) lisas.
Tinción Gram	Positiva
Morfología celular	Bacilo corto (0.4-0.5 um x 0.5-2.00 um)

Fuente: Organización Mundial de la Sanidad Animal (OIE), 2018. Modificado por: (Los autores, 2021).

2.1.3.2. Pruebas bioquímicas

Se realizaron pruebas bioquímicas para *Listeria* spp, el perfil de identificación se describe en la (Tabla 2). Se tomaron alrededor de 3-6 colonias de la placa y se procedió sembrar en distintos tipos de medio de cultivo selectivos que fueron: agar Kligler el cual permite la capacidad de la bacteria para utilizar los hidratos de carbono (Glucosa, lactosa) como fuente de energía; Lia se busca la capacidad de la bacteria para descarboxilar la lisina; Citrato que sirve para conocer si el microorganismo utiliza el citrato como única fuente de carbono; Urea ; caldo MRVP en este se busca la reacción con el rojo de metilo el cual permite identificar a través de la coloración rojiza el pH y la capacidad de fermentación del microorganismo, a su vez también se añade el reactivo Vogues Parker que indica si el microorganismo fermenta la glucosa por vía butanodiólica en caso de *listeria* spp ambas pruebas son negativas; medio sim en el cual se observa la motilidad de la bacteria, Manitol es una prueba que determina si el microorganismo en estudio puede fermentar este azúcar (A. Fernández, García, Saéz, & Valdezate, 2010).

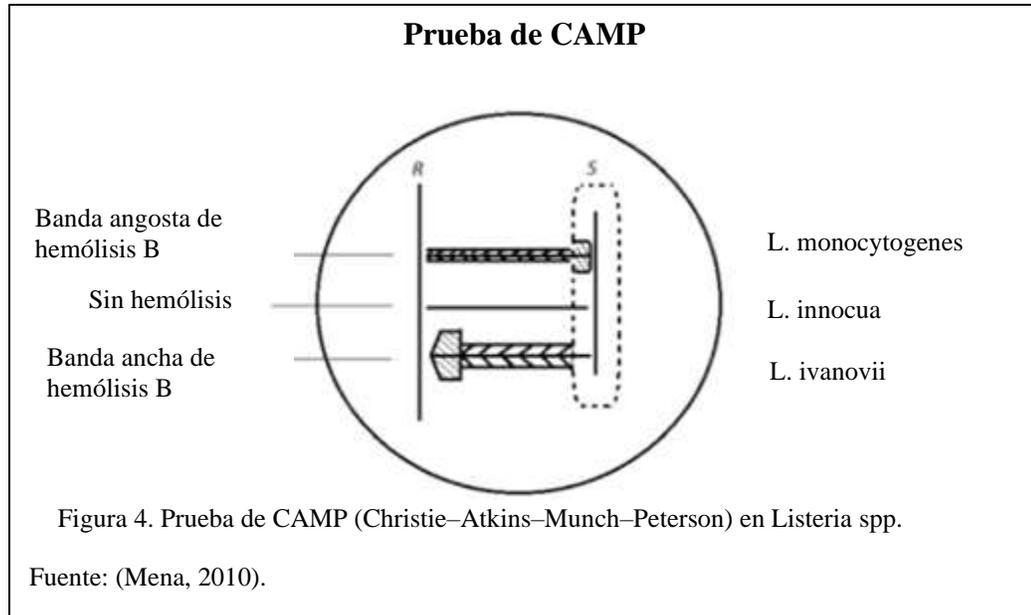
Tabla 2.

Perfil bioquímico de *Listeria* spp.

Método	Reacción de <i>Listeria</i> spp
Condiciones de crecimiento	Aerobio y anaerobio facultativo
Kligler	A/A
Lia	Negativo
Citrato	Negativo
Voges –Proskauer	Positiva
Rojo de metilo	Positiva
Urea	Negativa
Movilidad	Movilidad a propulsión o en paraguas en agar de movilidad: 20-28 °C positiva; a 37 °C negativa.
Catalasa	Positiva
Indol	Negativa

Fuente: (OIE (Organización Mundial de la Sanidad Animal), 2018). Modificado por: (Los autores, 2021).

Una vez realizadas las pruebas bioquímicas y morfológicas de las cepas, se procedió a realizar la reacción de Christie, Atkins, Munch-Petersen (CAMP) en agar sangre de cordero al 5 %, esta prueba consiste básicamente en sembrar un inóculo de *Staphylococcus aureus* de forma paralela, posteriormente se siembra de manera perpendicular las cepas de estudio, en este caso se colocará inóculos de *Listeria* spp a una distancia de 5 mm, con el fin de observar un efecto sinérgico de la B-hemolisina de *Staphylococcus aureus* sobre eritrocitos bovinos lo que genera un fenómeno lítico en la intersección de los dos microorganismos (A. Fernández, García, Saéz, & Valdezate, 2010). Esta es una prueba que ayuda a la identificación de especies de *Listeria* spp, ya que al ser una bacteria que tiende a presentar hemolisis se pueden diferenciar sus especies dependiendo de los patrones de hemolisis que se forman entre ambas bacterias. A continuación, en la (Figura 4) se muestran los patrones de algunas especies de *Listeria* spp a partir de la prueba de CAMP.



2.1.4. Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana

Las pruebas de susceptibilidad fueron realizadas por el método de difusión en disco, para el cual se partió de una suspensión bacteriana de *Listeria* spp, 0.5 McFarland en solución salina al 5 %. Con la ayuda de un hisopo estéril se sembró la suspensión en agar Mueller-Hinton + 0.5 % de sangre de cordero. Se colocaron los antibióticos sugeridos por EUCAST para el perfil de *Listeria* spp, los discos de antibióticos utilizados fueron: penicilina, ampicilina, eritromicina, meropenem y trimetoprima-sulfametoxazol, se incubó las cajas a 37 °C por 24 horas. Una vez que finalizó el tiempo de incubación se observó las cajas para comparar los halos con los puntos de corte descritos por el EUCAST, (2019), y así determinar los patrones de resistencia y sensibilidad de las cepas bacterianas (Tabla 3).

Tabla 3.

Puntos de corte de antibióticos para *Listeria monocytogenes*.

Antibiótico	Contenido del disco (ug)	Diámetro de la zona puntos de corte (mm)	
		S \geq	R <
Penicilina	1 unidad	13	13
Ampicilina	2	16	16
Eritromicina	15	25	25
Meropenem	10	26	26
Trimetoprima-sulfametoxazol	1.25-23.75	29	29

Nota: “mm:” milímetros; “S”: sensible; “R”: resistente; “ug”: microgramos (EUCAST, 2019).(Modificado por: Los autores, 2021).

2.1.5. Clasificación de cepas bacterianas

Se clasificaron las cepas bacterianas de *Listeria* spp en grupos que dependieron de la especie y de su perfil de resistencia y sensibilidad a los antibióticos.

2.1.6. Cultivo en fase exponencial

Se realizó un cultivo en fase exponencial de las bacterias, para esto se partió de colonias puras que no presenten ningún tipo de contaminación, obtenidas previamente en agar sangre de cordero al 5 %. Se tomó alrededor de 5 colonias que se inocularon en 2 mL medio líquido LEM, se realizó un vórtex por unos 2 minutos y se incubó a 37 °C por 120 minutos o hasta obtener una medición de densidad óptica igual a 0.6 de absorbancia a 600 nm, la cual se verificaría en el espectrofotómetro (Eppendorf ® BioPhotometer plus). Este cultivo en fase exponencial fue utilizado posteriormente para el enriquecimiento de las muestras de agua y la titulación del bacteriófago.

2.2. Aislamiento de bacteriófagos.

2.2.1. Colecta de muestras de agua del río Machángara

Las muestras fueron colectadas en el río Machángara en el sector de “La Recoleta”, (Latitud: -0.23360366, Longitud: -78.51457715 30" Sur, 70° 37' 60" Oeste), se tomó en este sector ya que no existe cerca una planta de tratamiento de agua, lo que garantiza una mayor concentración de carga bacteriana y por ende la presencia de bacteriófagos en las muestras. En el (Anexo 3) y (Anexo 4), se especifica la ubicación donde se recolectó el agua de río.

La recolección se realizó en recipientes de 1 litro, previamente esterilizados con alcohol al 90 %, la toma de muestras se realizó a un metro de profundidad para evitar tomar agua que esté alterada por los efectos de la luz, así como también, procurando recolectar de un lugar donde la corriente del río sea menor, esto garantiza que exista mayor concentración de los bacteriófagos. Se mantuvieron las muestras en un congelador de -20 °C hasta su próximo uso.

2.2.2. Procesamiento de las muestras de agua

Las muestras de agua de río fueron procesadas en el laboratorio del Centro de Referencia Nacional de Resistencia a los Antimicrobianos del Instituto Nacional Investigación en Salud Pública (INSPI). Se descongelaron las muestras de agua gradualmente, primero en una refrigeradora a -4 °C y posteriormente a temperatura ambiente esto con el fin de evitar un cambio drástico de temperatura que pudiera afectar a los bacteriófagos. Finalmente se dejaron sedimentar las muestras por 24 horas para así quitar cualquier resto sólido presente en la muestra y se filtró el agua por una membrana de nitrocelulosa de 0.2 µm.

2.2.3. Enriquecimiento y curva de densidad óptica

Para el enriquecimiento, en tubos Falcon de 50 mL se colocaron 18 mL del agua procesada, 2 mL de medio TB y 2 mL de cultivo en fase exponencial de *Listeria* spp, se incubó a 37 °C por 30 minutos. Seguidamente, se procedió a medir la densidad óptica para garantizar la presencia de fagos en las muestras en un espectrofotómetro (Eppendorf ® BioPhotometer plus).

Se incluyó un grupo control que constituyó de 18 mL de agua destilada, 2 mL de medio TB y 2 mL de cultivo en fase exponencial y como blanco se utilizaría un tubo con 2 mL de TB y 20 mL de agua destilada. Todas las mediciones se realizaron a una densidad óptica de 600 nm, se tomó una primera medición y la segunda después de 60 minutos y posteriormente en intervalos de 15 minutos durante cuatro horas. La muestra que presentó una disminución en algún punto de la curva se priorizó ya que esta podría tener bacteriófagos que inhiben el crecimiento de la bacteria.

Las muestras enriquecidas se dejaron incubar 24 horas a 37 °C, posteriormente se centrifugaron a 5000 rpm durante 20 minutos. El sobrenadante se traspasó a un nuevo tubo Falcon.

2.3. Titulación de los bacteriófagos

Se prepararon diluciones seriadas de las muestras enriquecidas, para esto se colocaron 5 tubos estériles en una gradilla, al primer tubo se adicionó 9 mL de medio TB y 1 mL de la muestra de agua enriquecida, para así obtener la dilución $\times 10^{-1}$, se agitó y posteriormente de esta dilución se tomó 1 mL y se colocó en el segundo tubo con 9 mL de medio TB logrando la dilución $\times 10^{-2}$, se siguió este procedimiento hasta obtener la dilución $\times 10^{-5}$.

Se realizó el cultivo en doble capa para obtener los bacteriófagos para esto se procedió a derretir el top agar (LEM, 0.9 %) a una temperatura de 50 °C a 60 °C en una plancha de calentamiento, también, se colocaron las placas con bottom agar (LEM 1.7%) en la incubadora a 37 °C para que estas se calienten y así no colocar el top agar con las diluciones en placas frías, a continuación, en tubos estériles se colocó 1mL de cada dilución respectivamente y 2 mL de cultivo en fase exponencial en cada tubo para lo cual se escogieron 4 de los 11 grupos de bacterias identificadas los cuales comprenden las tres especies de *Listeria* spp, así como todos los patrones de resistencia y sensibilidad a los antibióticos con el fin de diferenciar los tipos de bacteriófagos obtenidos. Los grupos utilizados fueron: Grupo 11 (cepa 3 que representa a la especie *Listeria welshimeri* resistente a múltiples antibióticos); Grupo 9 (cepa 4 que representa a la especie *Listeria innocua* resistente a un antibiótico); Grupo 7 (cepa 39 que representa a la especie *Listeria monocytogenes* resistente a todos los antibióticos); Grupo 3 (cepa 50 que representa a la especie *Listeria monocytogenes* sensible a todos los antibióticos). Estas mezclas se incubaron a 37 °C por 30 minutos para garantizar la confrontación de los fagos con la bacteria. Pasado este tiempo se colocó 10 mL de top agar (LEM 0,9 %) en cada tubo, se homogenizó las mezclas en un vórtex durante 2 minutos y se vertió cada una de las mezclas en placas con bottom agar (LEM 1.7 %) se dejó reposar durante 10 minutos para que el top agar se solidificara y se incubó a 37 °C durante 24 horas.

Transcurrido el tiempo de incubación se evaluaron las placas en búsqueda de calvas de lisis conocidas como unidades formadoras de placa (UFP), en cada una de las diluciones probadas. Cada calva fue extraída del top y bottom agar, con una punta estéril de micropipeta cortándola aproximadamente al diámetro de la calva y se colocaron en tubos eppendorf que contenía 1 mL del buffer SM junto con 5 µL de cloroformo para su conservación obteniendo la suspensión de bacteriófagos en medio SM, que fue almacenado a 4 °C.

2.4. Evaluación de la capacidad lítica de los bacteriófagos

Para evaluar la capacidad que tienen los bacteriófagos de inhibir el crecimiento bacteriano se realizaron los siguientes ensayos: prueba de la gota y rango de hospedero, en ambos ensayos se busca la presencia de halos de inhibición. Para interpretar los resultados obtenidos en ambos ensayos se tomó como criterio de clasificación el aclaramiento de la zona formada por las gotas de las suspensiones de los bacteriófagos sobre un césped bacteriano que se muestra en la (Tabla 4).

Tabla 4.

Características para interpretar los halos de lisis formados en el ensayo de la gota y rango de hospedero.

Características de los halos de inhibición	Clasificación	Modo de acción de la bacteria en presencia del fago
Totalmente Translucido	++++	Muy Sensible
Translucido	+++	Sensible
Poco Translucido	++	Sensible
Opaco	+	Poco Sensible
Sin halo	-	Resistente

Elaborado por: (Los autores, 2021).

2.4.1. Prueba de la gota

Se colocaron placas con bottom agar (LEM 1.7 %) en la incubadora para que se calienten, posteriormente en un tubo de ensayo estéril se colocó 1 ml de cultivo en fase exponencial de la bacteria junto con 10 mL de top agar (LEM 0.9%), se vertió la mezcla en el bottom agar (LEM 1.7 %), se dejó secar por unos minutos y con una micropipeta se colocó 20 μ L de cada fago ubicados a lo largo de la placa. Las placas se dejaron secar alrededor de la zona estéril del mechero y se incubó a 37 °C durante 24 horas. Pasado el tiempo se evaluaron las placas para observar halos de lisis formados por los bacteriófagos.

2.4.2. Rango del hospedero

Se probó la capacidad lítica que tienen los bacteriófagos aislados, para inhibir el crecimiento de otras bacterias Gram negativas. Para esto se preparó un cultivo en fase exponencial de las siguientes bacterias ATCC: *Escherichia coli* (25922) y *Klebsiella pneumoniae* (1705), estos cultivos exponenciales fueron utilizados para enfrentar los bacteriófagos aislados con dichas bacterias, esto para asegurar la replicación de los fagos dentro de las bacterias, para lo cual se colocó 1 mL del cultivo en fase exponencial y 200 μ L de los fagos aislados, se dejó incubar esta mezcla a 37 °C por 24 h, pasado este tiempo se colocó 1 ml de medio líquido LEM y 200 μ L de los bacteriófagos, y se incubo nuevamente a 37 °C por 24 h. Finalizado el tiempo de incubación se centrifugo a 5000 rpm por 10 minutos, el sobrenadante se traspasó a un tubo Eppendorf estéril.

Posteriormente se colocaron cajas con bottom agar a la incubadora a 37 °C, a continuación se tomó 1 ml de esta mezcla y se agregó 10 mL de top agar (LEM 0.9%), esta mezcla se vertió sobre las cajas con bottom agar (LEM 1.7 %) y se dejó solidificar por 10 minutos alrededor del mechero, pasado este tiempo se colocó 20 μ L de los lisados fágicos, se dejó secar las gotas por 10 minutos y se incubo a 37 °C por 24 h. Al día siguiente se observaron las cajas para identificar la presencia o ausencia de halos de inhibición.

2.5. Concentración de los bacteriófagos

Es importante aumentar la concentración de los bacteriófagos para esto se tomó 2 mL de cultivo en fase exponencial de la bacteria más susceptible a los antibióticos que se probaron anteriormente, junto con 200 μ L de la suspensión de bacteriófagos en medio SM, esto se dejó incubar a 37 °C durante 24 horas, pasado este tiempo se volvió a colocar 200 μ L de la suspensión de fagos con 1 mL de medio líquido LEM, se incubó nuevamente a 37 °C durante 24 horas. Transcurrido el tiempo

se centrifugó a 500 rpm durante 10 minutos, el sobrenadante se pasó a otro tubo y se volvió a centrifugar a 5000 rpm por 10 minutos. El sobrenadante se pasó a otro tubo al cual se le adicionó 10 μ L de cloroformo y se almacenó a 4 °C, esto con el fin de obtener lisados fágicos. Para determinar la concentración de los lisados fágicos obtenidos se utilizó la siguiente fórmula:

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

Se debe contar las placas de lisis que se observaron y se multiplicará por la inversa de la dilución a la que pertenece, finalmente el resultado se expresa en Unidades Formadoras de Placa (UFP) por mililitro.

2.6. Titulación de los lisados fágicos

Se realizó la titulación de los lisados fágicos, para esto se realizó diluciones seriadas tomando 100 μ L de los lisados fágicos que se colocaron en 900 μ L de medio TB obteniendo la dilución 10^{-1} se siguió este procedimiento hasta llegar a la dilución 10^{-3} , posteriormente se colocó en cada dilución 300 μ L de cultivo en fase exponencial de la bacteria más susceptible y finalmente se adicionó a la mezcla 3 ml de top agar. Estas mezclas se sembraron mediante el método de doble capa y se incubó a 37 °C por 24 horas, pasado este tiempo se verificó la presencia de calvas lo cual indica la presencia de bacteriófagos en los lisados fágicos utilizados.

2.7. Evaluación de la capacidad lítica de los lisados fágicos

2.7.1. Cinética de infección

Se elaboró la cinética de infección de los fagos aislados, para esto se tomó 200 μL de los lisados fágicos y se agregó 2 mL de cultivo bacteriano en fase exponencial, se dejó incubar a 37 °C durante 30 minutos y se midió la densidad óptica a 600 nm en intervalos de 15 minutos durante 6 horas. Se usó grupos controles con 2 mL de bacteria y un blanco con 2 mL de medio LEM.

2.8. Conservación y almacenamiento de los bacteriófagos y de los lisados fágicos

Los bacteriófagos y los lisados fágicos se almacenaron a 4 °C y se realizó la prueba de resistencia al cloroformo con el fin de determinar la cantidad necesaria para evitar cualquier otro tipo de contaminación bacteriana que no afecte a los fagos.

2.8.1. Resistencia al cloroformo.

Para comprobar la resistencia que tienen los bacteriófagos de *Listeria* spp. al cloroformo se colocó diferentes concentraciones de cloroformo en los fagos almacenados en medio SM y los lisados fágicos, para ello se tomó 1mL de los fagos y se colocó en un tubo Eppendorf con 15 μL de cloroformo, al segundo tubo se le añadió 10 μL de cloroformo y al último tubo se le colocó 5 μL de cloroformo. Además, se realizó una mezcla sin cloroformo utilizada como blanco. Posteriormente, se tomó 200 μL de las mezclas y se colocó sobre cajas Petri con bottom y top agar y un césped bacteriano de *Listeria* spp, se dejó reposar por 1 hora y se incubó por 24 horas a 37 °C.

2.8.2. Almacenamiento

Se almacenó los bacteriófagos en buffer SM y los lisados fágicos en medio LEM a una temperatura de 4 °C.

3. Resultados y Discusión

3.1. Cepas bacterianas

Una vez finalizada la búsqueda de las cepas de *Listeria* spp. en la base de datos del CRN-RAM cumpliendo con los criterios establecidos. Se obtuvo una lista de 50 cepas (Anexo 5), sin embargo, de las 50 cepas seleccionadas 49 de estas se lograron reactivar a partir de métodos de descongelamiento y posterior resiembra en agar sangre. Luego de realizar las respectivas pruebas bioquímicas (Anexo 6), se obtuvo un total de 3 cepas de *Listeria welshimeri*, 1 cepa de *Listeria innocua* y 45 cepas de *Listeria monocytogenes*. Para determinar la resistencia de las cepas a los diversos antibióticos se siguió los parámetros establecidos en el manual del EUCAST ya que en el manual CLSI no se encuentran puntos de corte para esta bacteria (EUCAST, 2020), en el (Anexo 7) se evidencia el perfil antibiótico de cada una de las bacterias.

Con el propósito de aislar y realizar las respectivas pruebas para determinar la actividad lítica de los bacteriófagos se clasificó a estas cepas de *Listeria* spp en 11 grupos los cuales fueron: grupo 1 representa a la especie de *Listeria monocytogenes* resistente a penicilina, eritromicina, meropenem y trimetoprima/sulfametoxazol dentro de este grupo se obtuvo un total de 5 cepas. El grupo 2 representa a la especie *Listeria monocytogenes* resistente solo a penicilina dentro de este grupo se obtuvo un total de 3 cepas. El grupo 3 representa a la especie *Listeria monocytogenes* sensible a todos los antibióticos probados para este estudio, donde se obtuvo un total de 6 cepas. El grupo 4 representa a la especie *Listeria monocytogenes* resistente a penicilina y meropenem con un total de 2 cepas dentro de este grupo. El grupo 5 de igual manera es la especie *Listeria monocytogenes* resistente a penicilina y trimetoprima/sulfametoxazol con un total de 7 cepas. El grupo 6 representa a la especie *Listeria monocytogenes* resistente a trimetoprima/sulfametoxazol con un total de 20 cepas siendo este el grupo con mayor cantidad

de cepas. El grupo 7 representa a la especie *Listeria monocytogenes* resistente a todos los antibióticos probados en este estudio con una cepa. El grupo 8 representa a la especie *Listeria monocytogenes* resistente a eritromicina y meropenem con una cepa. El grupo 9 representa a *Listeria innocua* resistente a trimetoprima/sulfametoxazol con una cepa. El grupo 10 y 11 representan a la especie *Listeria welshimeri*, el grupo 10 resistente a trimetoprima/sulfametoxazol y el grupo 11 resistente a penicilina, eritromicina, meropenem y trimetoprima/sulfametoxazol. Se escogió una cepa por cada grupo. A continuación, en la (Tabla 5), se muestran los grupos y las cepas escogidas por cada grupo.

Tabla 5.

Principales grupos de cepas bacterianas.

Grupo	Especie	Perfil de resistencia a los antimicrobianos	#de cepas por grupo	Cepa seleccionada por grupo
Grupo 1	<i>L.monocytogenes</i>	P, ERI, MEM, SXT	5	28
Grupo 2	<i>L.monocytogenes</i>	P	4	38
Grupo 3	<i>L.monocytogenes</i>		6	23,50
Grupo 4	<i>L.monocytogenes</i>	P, MEM	2	48
Grupo 5	<i>L.monocytogenes</i>	P, SXT	6	35
Grupo 6	<i>L.monocytogenes</i>	SXT	20	8
Grupo 7	<i>L.monocytogenes</i>	P, ERI, MEM, SXT, AMP	1	39
Grupo 8	<i>L.monocytogenes</i>	ERI, MEM	1	40
Grupo 9	<i>L.innocua</i>	SXT	1	4
Grupo 10	<i>L.welshimeri</i>	SXT	2	2
Grupo 11	<i>L.welshimeri</i>	P, ERI, MEM, SXT	1	3
Total			49	12

Nota: P: penicilina; ERI: eritromicina; MEM: meropenem; SXT: trimetoprima/sulfametoxazol; AMP: ampicilina. Elaborado por: (Los autores, 2021).

3.2. Aislamiento de bacteriófagos de las muestras de agua enriquecidas.

El enriquecimiento del agua de río con dos grupos de *Listeria* spp, Grupo 7 (cepas resistentes a todos los antibióticos) y Grupo 3 (Cepas sensibles a todos los antibióticos) tuvieron como resultado lo siguiente: en el caso del Grupo 3 se escogió la cepa 23 donde se observó un descenso en el patrón de crecimiento a los 165 minutos teniendo una absorbancia de 0.24, por otra parte también, se observa que la curva de la cepa 23 enriquecida con agua destilada tiene un crecimiento generando una absorbancia de 0.27. Se observó un patrón muy parecido en el caso del Grupo 7 con la cepa 39, a los 180 minutos la muestra que fue enriquecida con agua del río Machángara tuvo un descenso generando una absorbancia de 0.20, mientras que la muestra enriquecida con agua destilada tuvo un crecimiento con una absorbancia de 0.27. Por lo que se determinó la presencia de fagos en las muestras de agua de río, ya que como lo menciona (Egas, 2016), en su investigación, el potencial de infectividad de los fagos presentes en el agua se evidencia al comparar las curvas de crecimiento microbiano de las muestras con los controles, donde se observó que las curvas enriquecidas con agua de río tuvieron descenso en por lo menos un punto de la curva, lo cual quiere decir que existen fagos que evitan el crecimiento exponencial de las bacterias.

Los bacteriófagos se aislaron de muestras de agua del río Machángara de la ciudad de Quito, el cual se caracteriza por tener niveles elevados de contaminación y poca posibilidad de tratamiento de sus aguas (Reinoso, 2015), los niveles de pH en el río ronda valores de 7 a 8 es decir, cercano a la neutralidad, la presencia de coliformes totales y bacterias por cada 100 mL de agua es de 337777 NMP/100 mL (Campaña, Gualoto, & Chiluisa, 2017), estas características resultaron de gran importancia para el aislamiento de bacteriófagos. En aguas residuales se encuentra una gran cantidad de microorganismos que provienen de excremento de humanos y desechos de industrias alimenticias (C. López, Buitrón, García, & Cervantes, 2017), lo que garantiza la presencia de

bacteriófagos en este tipo de aguas, ya que la existencia de fagos está relacionada con la presencia de sus bacterias hospederas. Estos fagos son capaces de adaptarse y usar estas células como hospedero para su replicación (Alegre, 2019). La concentración de *Listeria spp* en aguas residuales es de aproximadamente 10^4 microorganismos por 100 mL (C. López et al., 2017). Por lo que los bacteriófagos tendrían la capacidad de infectar a un gran número de cepas de este género. Estudios similares mencionan el aislamiento de bacteriófagos para bacterias como: *Acinetobacter baumannii* y *Escherichia coli*, a partir de muestras del río Machángara (Egas, 2016; D. López, 2015; S. Torres, 2017), esto garantizó que existe la presencia de bacteriófagos que tienen la capacidad de desarrollarse en distintos hospederos. Por lo que este río tuvo las condiciones para encontrar bacteriófagos que tengan actividad lítica contra cepas de *Listeria spp*.

A continuación, se pueden observar las gráficas (Figura 5 y Figura 6) obtenidas.

Cinética de Infección Bacteriófagos

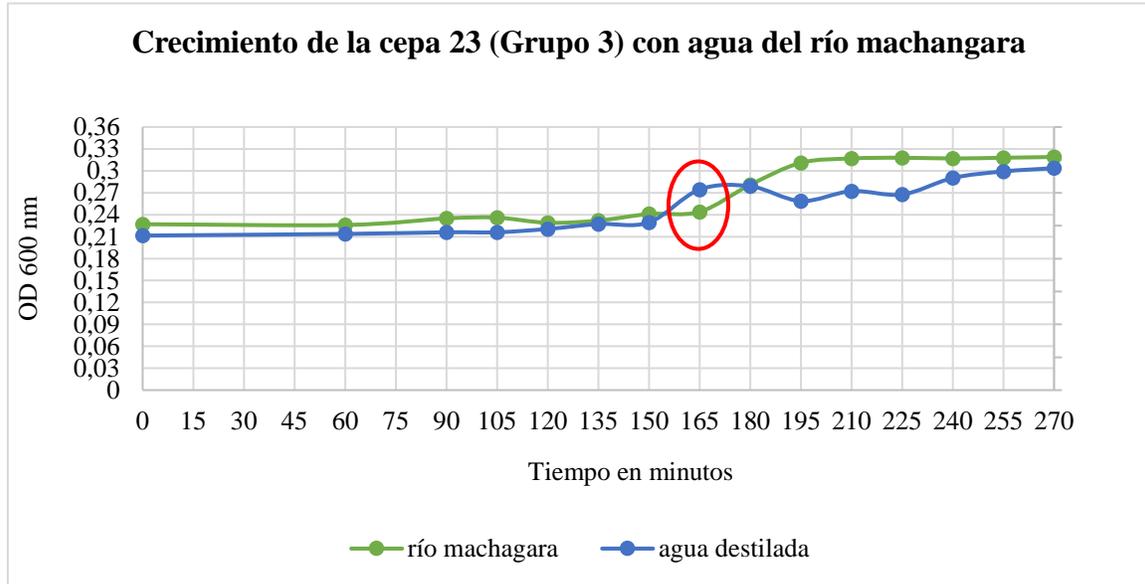


Figura 5. Curva de densidad óptica de la cepa #23 (que representa al grupo 3 una cepa sensible a todos los antibióticos testeados), enriquecida con agua del río Machángara

Elaborado por: (Los autores, 2021).

Cinética de Infección Bacteriófagos

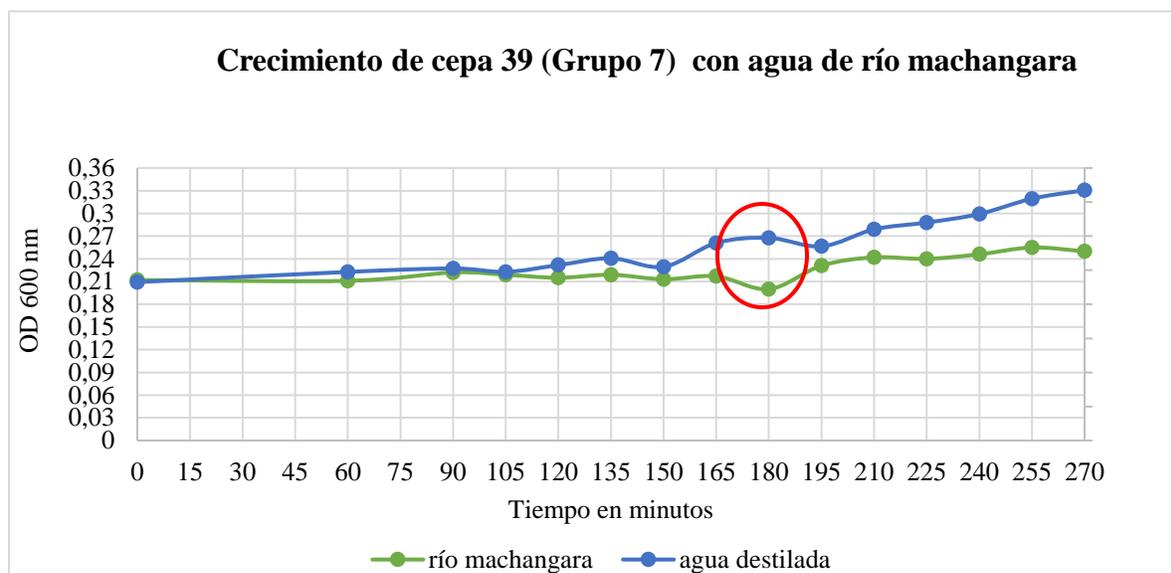


Figura 6. Curva de densidad óptica de la cepa #39 (que representa a una cepa resistente a todos los antibióticos testeados), enriquecida con agua de río Machángara.

Elaborado por: (Los autores, 2021).

3.3. Titulación de fagos

Por medio del ensayo de cultivo en doble capa se obtuvo calvas de lisis formadas por los bacteriófagos sobre el césped bacteriano de 4 grupos de cepas de *Listeria* spp. Los grupos seleccionados para esta prueba fueron Grupo 3, 7, 9 y 11 ya que representan todas las opciones de resistencia y sensibilidad a los antibióticos, así como también a las tres especies de *Listeria* spp utilizados en el presente estudio. La presencia de calvas de lisis fue positiva en cuatro diluciones independientemente del grupo de bacterias utilizadas en esta prueba. Se obtuvo presencia de calvas de lisis en la dilución 10^{-2} y 10^{-5} , en el Grupo 11, también se evidenció calvas de lisis en la dilución 10^{-5} , en los Grupos 9 y 3. En el Grupo 7 por otra parte no se evidenció calvas

en ninguna de las diluciones realizadas. Es importante aclarar que después de varios ensayos realizados la preparación de las diluciones de las muestras enriquecidas solo se realizaron hasta la dilución $\times 10^{-5}$ en comparación a diversos ensayos que realizan una mayor cantidad de diluciones (Flores, 2017), esto se debe a que no se observó calvas en las siguientes diluciones por lo que no se consideró tomarlas en cuenta. También, en este ensayo se observó mejores resultados modificando la concentración de agar para la preparación del medio LEM usando una concentración de 0.9 % para el top agar y una concentración de agar de 1.9 % para el bottom agar en comparación con otras publicaciones (Egas, 2016).

El ensayo en doble capa también sirvió para determinar la concentración aproximada de los bacteriófagos en cada dilución. Para esto se procedió a contabilizar las UFP, estas representan el número de partículas infecciosas de una muestra viral en forma de placas de lisis sobre un capa de células (Burlison, Chambers, & Wiedbrauk, 1992), según bibliografía, este es un método sencillo y fiable para la valoración cuantitativa de infectividad de suspensiones virales.

El Grupo 11 con la dilución 10^{-2} tuvo un total de 2 UFP y una concentración de 2×10^5 UFP/mL considerándose como el bacteriófago 1, de igual manera en este grupo se obtuvo calvas en la dilución 10^{-5} contabilizando un total de 5 UFP y una concentración de 5×10^5 UFP/mL considerándose como el fago 2. En el caso del Grupo 9 se contabilizó en la dilución 10^{-5} un total de 140 UFP y una concentración de 1.4×10^7 UFP/mL considerándose a este como el bacteriófago 4. Finalmente, en el Grupo 3 se contabilizó un total de 96 UFP con una concentración de 9.6×10^3 UFP/mL considerándose esta como el bacteriófago 10. Según bibliografía la concentración de fagos aislados de aguas residuales puede ir de 10^8 UFP/mL y 10^{10} UFP/mL (Alegre, 2019), es por esta razón que se decidió aumentar la concentración de bacteriófagos. Si se quisiera utilizar estos fagos en un enfoque clínico la concentración de estos varía entre 10^5 y 10^{11} UFP, por lo tanto, los

resultados obtenidos resultarían favorables (E García & López, 2002). Cabe recalcar que fueron cuatro las diluciones que presentaron calvas en la prueba de doble capa por lo que se consideró a cada una de las diluciones como una bacteriófago, obteniendo un total de cuatro bacteriófagos para *Listeria* spp. A continuación, en la (Tabla 6) se muestran los resultados obtenidos en este ensayo.

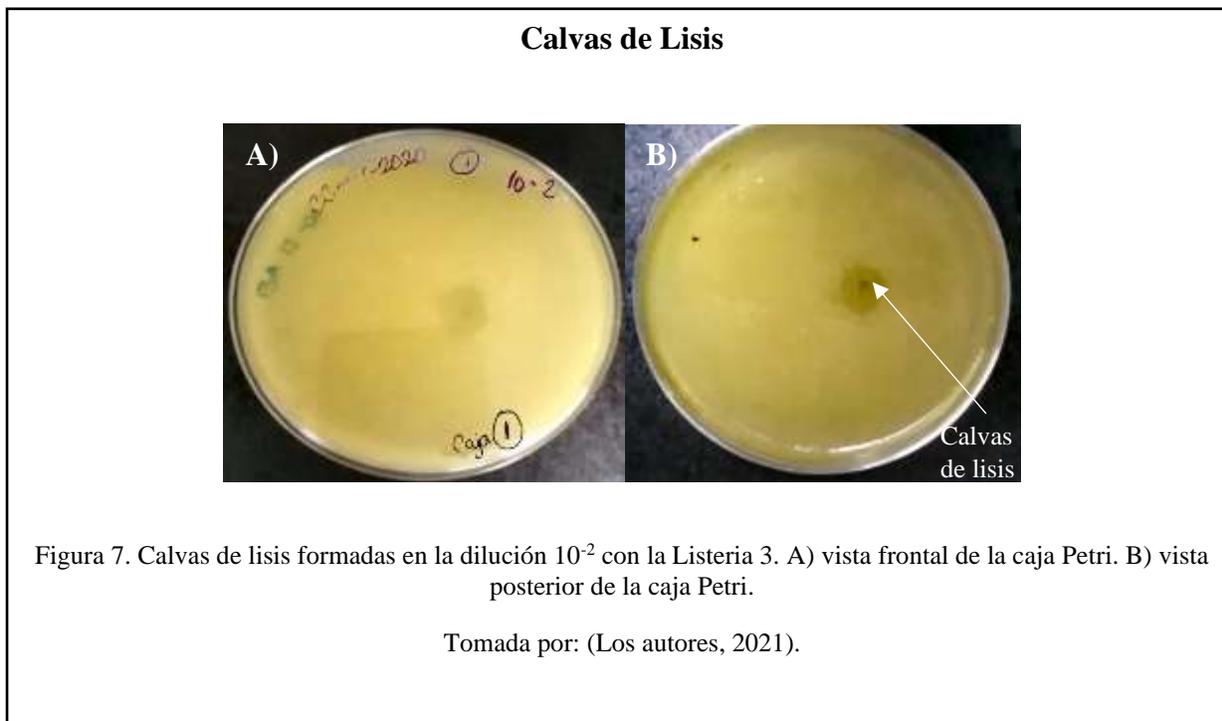
Tabla 6.

Unidades formadoras de placa obtenidas.

Listeria	Dilución	#UFP	Concentración (UFP/mL)
Listeria 3 Grupo 11 (fago1)	10^{-2}	2	2×10^5
Listeria 3 Grupo 11 (fago 2)	10^{-5}	5	5×10^5
Listeria 4 Grupo 9 (fago 4)	10^{-5}	140	1.4×10^7
Listeria 50 Grupo 3 (fago 10)	10^{-5}	96	9.6×10^3

Nota: “UFP”: unidades formadoras de placa. Elaborado por: (Los autores, 2021).

Las placas Petri con las calvas de lisis se pueden observar en la (Figura 7, Figura 8, Figura 9 y Figura 10).



Calvas de Lisis

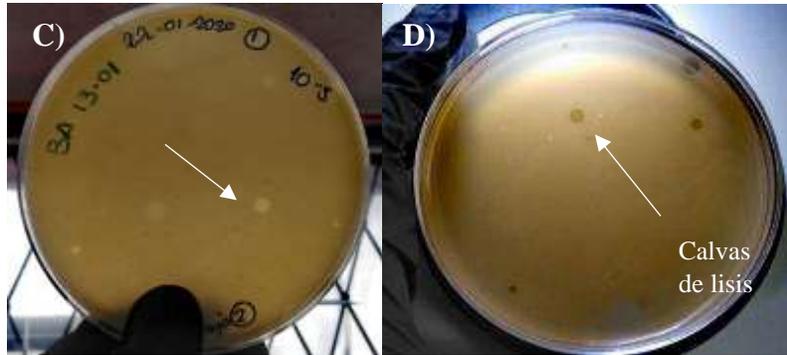


Figura 8. Calvas de lisis formadas en la dilución 10^{-5} con la Listeria 3. C) vista frontal de la caja Petri D) vista posterior de la caja Petri.

Tomada por: (Los autores, 2021).

Calvas de Lisis

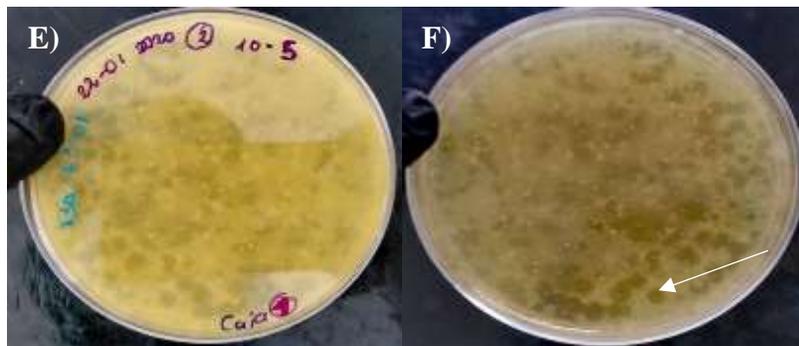


Figura 9. Calvas de lisis formadas en la dilución 10^{-5} con la Listeria 4. E) vista frontal de la caja Petri F) vista posterior de la caja Petri.

Tomada por: (Los autores, 2021)

Calvas de Lisis

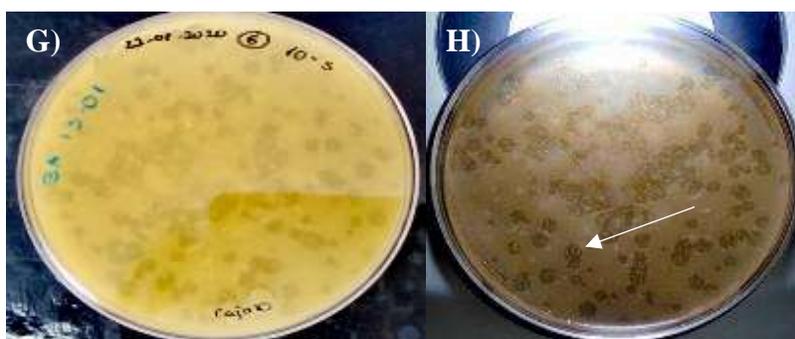


Figura 10. Calvas de lisis formadas en la dilución 10^{-5} con la *Listeria* 50. G) vista frontal de la caja Petri H) vista posterior de la caja Petri.

Tomada por: (Los autores, 2021).

3.4. Evaluación de la capacidad lítica de los fagos

3.4.1. Prueba de la gota

Tres de los cuatro bacteriófagos aislados tuvieron una gran actividad lítica (F2, F4, F10), la cual se evidencio con la presencia de halos de inhibición sobre el césped bacteriano de 10 de los 11 grupos de *Listeria* spp. Sin embargo, en el fago 1 (F1) no se evidenció ninguna actividad lítica, por lo que no se tomó en cuenta para posteriores análisis. Los halos de inhibición mediante la prueba de la gota fueron clasificados según la intensidad del aclaramiento de la zona donde se colocó la suspensión de fagos. Los resultados de los halos de inhibición se evidencian desde el (Anexo 9). En el presente estudio, los fagos aislados presentaron un amplio espectro de actividad lítica, ya que, al comparar los halos de inhibición obtenidos, según bibliografía estos representan a dos tipos de infecciones causadas por fagos. La mayoría de los halos obtenidos son halos translucidos lo que significa que las bacterias son sensibles a los fagos, posesionando a estos en la categoría de

infección lisogénica la cual implica la replicación del fago, pero no la producción o liberación de viriones conservando la viabilidad bacteriana. Por otra parte también se observan halos totalmente translucidos que implica una infección de tipo lítica lo que significa que esta infección termina después de la producción del virión generando lisis inducida por el fago del huésped bacteriano (Abedon, 2008), creando así placas de lisis. A continuación, en la siguiente (Tabla 7) se observa los resultados de la prueba de la gota en los 11 grupos de *Listeria* spp.

Tabla 7.

Resultados de la prueba de la gota de los lisados fágicos.

Grupo	# Ceba	Especie	Características	Fago 1	Fago 2	Fago 4	Fago 10
1	28	<i>Listeria monocytogenes</i>	Resistente: P, ERI, SXT, MEM	-	+	++	+
2	38	<i>Listeria monocytogenes</i>	Resistente: P	-	++	++	++
3	23	<i>Listeria monocytogenes</i>	Sensible a todos los antibióticos probados	-	++	+++	++
4	48	<i>Listeria monocytogenes</i>	Resistente: P, MEM	-	+++	+++	+++
5	35	<i>Listeria monocytogenes</i>	Resistente: P, SXT	-	+++	++++	+++
6	8	<i>Listeria monocytogenes</i>	Resistente: SXT	-	+++	++++	+++

7	39	<i>Listeria monocytogenes</i>	Resistente: P, ERI, AMP, MEM, SXT	-	++	+++	++
8	40	<i>Listeria monocytogenes</i>	Resistente: ERI, MEM	-	++	+++	++
9	4	<i>Listeria innocua</i>	Resistente: SXT	-	++	+	+
10	2	<i>Listeria welshimeri</i>	Resistente: SXT	-	-	-	-
11	3	<i>Listeria welshimeri</i>	Resistente: P, ERI, MEM, SXT	-	++	++	+

Nota: “++++”: halo totalmente translucido (muy sensible); “+++”: halo translucido (sensible); “++”: halo poco translucido (sensible); “+”: halo opaco (poco sensible); “-”: sin halo (resistente). Elaborado por: (Los autores, 2021).

3.4.2. Rango de hospedero

Se evaluó el rango de hospedero para los bacteriófagos (F2, F4 y F10) a partir de la prueba de la gota, los resultados obtenidos se basaron en la zona de lisis que forman las gotas de las suspensiones de fagos y su aclaramiento sobre el césped bacteriano de: *Escherichia coli* (25922) y *Klebsiella pneumoniae* (1705). A pesar de que en otras publicaciones han descrito que *Listeria* spp, presenta un rango de hospedadores limitado, debido a su homoinmunidad al portar profagos o restos de profagos (Klumpp & Loessner, 2013), en este estudio se logró evidenciar que las cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* son sensibles a los tres bacteriófagos aislados. Además, existen estudios donde bacterias como *Salmonella typhimurium* y *Vibrio cholerae* también han mostrado sensibilidad en menor grado a bacteriófagos aislados de *Listeria monocytogenes*, por lo que se recomendaría probar los bacteriófagos (F2, F4 y F10), con estas bacterias para determinar si también pueden inhibir su crecimiento. En el (Anexo 19 y 20), se muestran imágenes de los halos

de inhibición obtenidos en las bacterias: *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*. Los resultados obtenidos según la zona de aclaramiento formada por la suspensión de fagos se muestran en la siguiente Tabla 8.

Tabla 8.

Resultados del rango de hospedero.

Fagos	Bacteria	
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
F2	++	++
F4	++	++
F10	++	++

Nota: “++++”: totalmente translucido (muy sensibles); “+++”: translucido (sensibles); “++”: poco translucido (sensibles); “+”: opaco (poco sensible); “-”: sin halo (resistente). Elaborado por: (Los autores, 2021).

3.5. Concentración de los bacteriófagos

La concentración se logró gracias a la confrontación de los bacteriófagos aislados anteriormente de las muestras de agua del río Machángara con un cultivo en fase exponencial de la cepa 23 perteneciente al Grupo 3 (cepa sensible a todos los antibióticos), esto logró que se obtuviera una mayor cantidad de UFP, y por ende una mayor concentración. Posteriormente se centrifugó para eliminar los restos bacterianos y así se obtuvo tres lisados fágicos provenientes de los bacteriófagos aislados.

3.6. Titulación de los lisados fágicos

La titulación de los lisados fágicos aumento las UFP y también se comprobó una mayor concentración de bacteriófagos. En este caso solo se interpretó los resultados de las diluciones 10^{-2} y 10^{-3} , porque las cajas con las diluciones 10^{-1} , presentaron valores incontables.

En la Tabla 9 se muestra las calvas de lisis (UFP) y la concentración en UFP/mL, obtenidas al concentrar los bacteriófagos aislados. En el lisado fágico del bacteriófago 2 aumento la cantidad de calvas en la dilución 10^{-2} a 1200 UFP, con una concentración final de 1.2×10^5 (UFP/mL), en la dilución 10^{-3} se contabilizo 450 UFP con una concentración de 4.5×10^5 (UFP/mL), en el lisado fágico 4 en la dilución 10^{-2} se contabilizo 2000 UFP con una concentración de 2×10^5 (UFP/mL), y en la dilución 10^{-3} se contó 720 UFP con una concentración de 7.2×10^5 (UFP/mL), en cuanto al lisado fágico 10 en la dilución 10^{-2} se contabilizo 5000 UFP con una concentración de 5×10^5 (UFP/mL), y en la dilución 10^{-3} un total de 3000 UFP con una concentración de 3×10^6 .

Tabla 9.

Unidades formadoras de placa (UFP) después de concentrar a los fagos a partir de los lisados fágicos.

Lisados fágicos	Dilución			
	10^{-2}		10^{-3}	
	# UFP	Concentración	# UFP	Concentración
Lisado fágico 2	1200	1.2×10^5	450	4.5×10^5
Lisado fágico 4	2000	2×10^5	720	7.2×10^5
Lisado fágico 10	5000	5×10^5	3000	3×10^6

Elaborado por: (Los autores, 2021).

Las calvas de lisis (UFP) obtenidas después de la concentración se muestran en la (Figura 12, Figura 13, Figura 14, Figura 15 y Figura 16).

Calvas de Lisis obtenidas posterior a la concentración de bacteriófagos

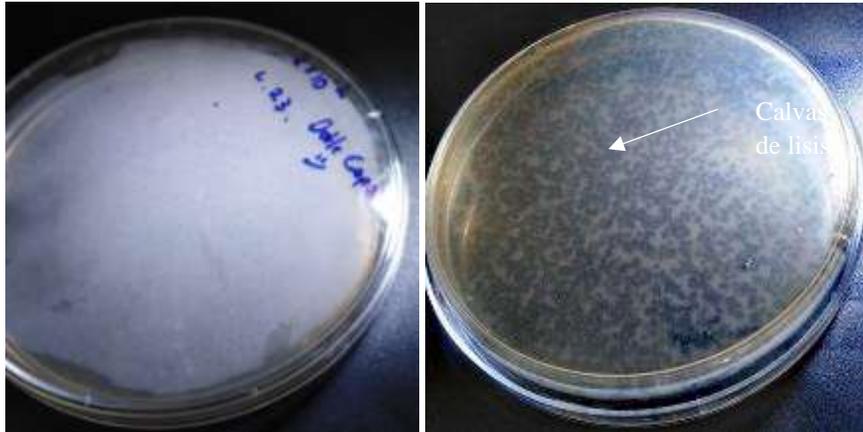


Figura 11. Calvas de lisis producidas por el lisado fágico 2 con la dilución 10^{-2} .

Tomada por: (Los autores, 2021).

Calvas de Lisis obtenidas posterior a la concentración de bacteriófagos



Figura 12. Calvas de lisis producidas por el lisado fágico 2 con la dilución 10^{-3} .

Tomada por: (Los autores, 2021).

Calvas de Lisis obtenidas posterior a la concentración de bacteriófagos



Figura 13. Calvas de lisis producidas por el lisado fágico 4 con la dilución 10^{-2} .

Tomada por: (Los autores, 2021).

Calvas de Lisis obtenidas posterior a la concentración de bacteriófagos

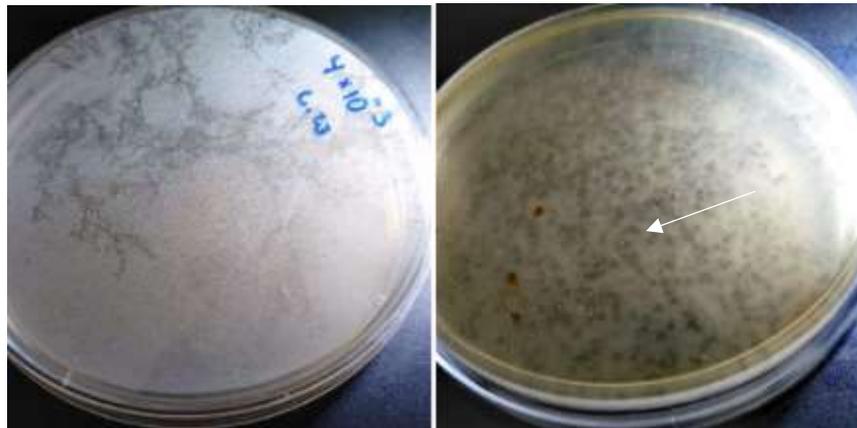


Figura 14. Calvas de lisis producidas por el lisado fágico 4 con la dilución 10^{-3} .

Tomada por: (Los autores, 2021).

Calvas de Lisis obtenidas posterior a la concentración de bacteriófagos



Figura 15. Calvas de lisis producidas por el lisado fágico 10 con la dilución 10^{-2}

Tomada por: (Los autores, 2021).

Calvas de Lisis obtenidas posterior a la concentración de bacteriófagos



Figura 16. Calvas de lisis producidas por el lisado fágico 10 con la dilución 10^{-3}

Tomada por: (Los autores, 2021).

3.7. Evaluación de la capacidad lítica de los lisados fágicos

3.7.1. Cinética de infección

Fueron probados los tres lisados fágicos, contra cuatro grupos de cepas de bacterias (Grupos, 3, 7, 9, 11), que representan a las tres especies diferentes de *Listeria* spp estudiadas, así como también abarcan todos los patrones de susceptibilidad antimicrobiana.

La cinética fue realizada mediante la medición de la densidad óptica. Se observó un descenso de la curva bacteriana en los ensayos con bacteriófagos en comparación del grupo control lo cual evidencia que los fagos aislados provocan la inhibición del crecimiento bacteriano.

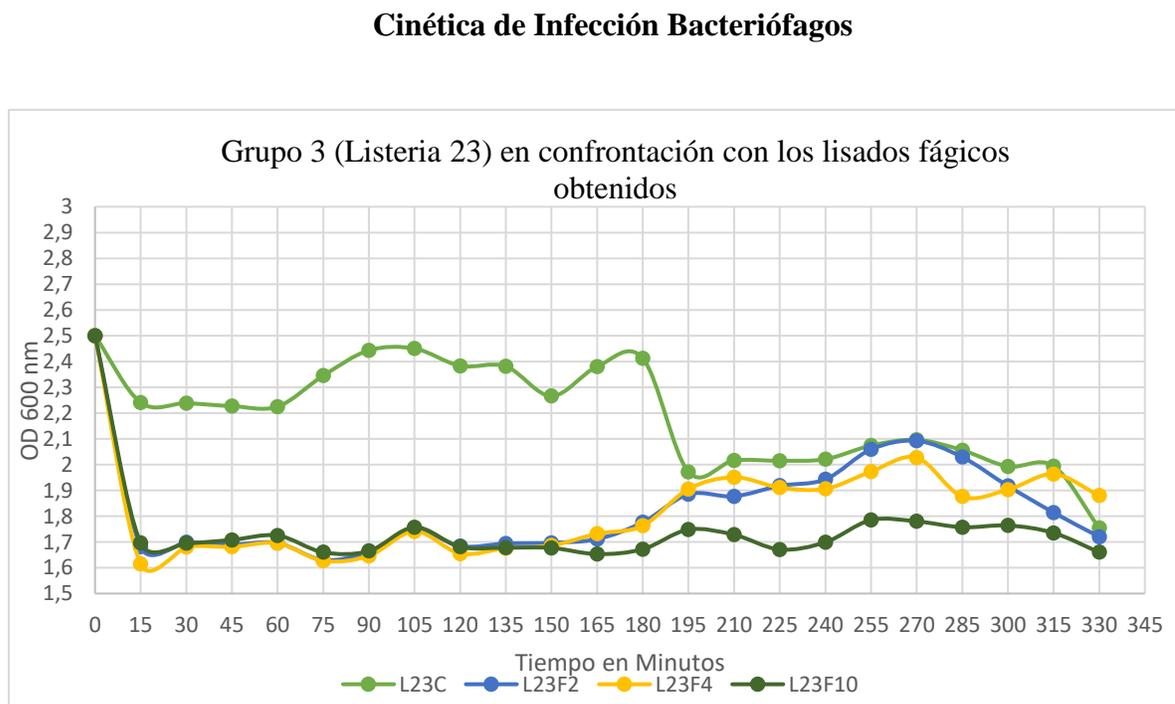


Figura 17. Cinética fágica con el grupo 3 de bacterias.

Nota: “L23C”: listeria 23 usada como control; “L23F2”: listeria 23 confrontada con el lisado fágico 2; “L23F4”: listeria 23 confrontada con el lisado fágico 4; “L23F10”: listeria 23 confrontada con el lisado fágico 10. Elaborado por: (Los autores, 2021).

En la (Figura 17) se evidencia la actividad lítica de los tres lisados fágicos obtenidos contra la *Listeria 23* (Grupo 3), el crecimiento bacteriano es detenido debido a la acción de los fagos, todas las muestras incluyendo el control inician con una absorbancia de 2.5, sin embargo, al pasar los primeros 15 minutos de medición todas las muestras con bacteria y bacteriófagos presentan un descenso considerable en la medición llegando en la muestra con el bacteriófago 2 y 10 a un valor de 1.7 de absorbancia y con el bacteriófago 4 a 1.6 de absorbancia, comparado con el control el cual sigue con valores de absorbancia superior a 2. Se observa de igual manera que el control comienza el descenso de la absorbancia a los 180 minutos esto se debe a que las bacterias comienzan su fase de muerte, en este punto se iguala a las muestras con los lisados fágicos, sin embargo se observa que las DO de las muestras con bacteriófagos existe un ligero ascenso de los valores en la curva, al comparar nuestros datos con bibliografía se evidencia que una vez transcurrido el tiempo de la infección los bacteriófagos generaron la lisis de la bacteria y estos comienzan a tener su periodo de crecimiento por lo que aumenta la densidad óptica como se muestra en las curvas obtenidas (V. Muñoz, Garcés, & Davila, 1979). La muestra con el lisado 4 y 2 son similares en su forma de actuar contra la bacteria ya que poseen valores similares de absorbancia, mientras, que el lisado 10 es el más efectivo porque los valores de absorbancia son menores es decir ataca e inhibe mejor a esta bacteria. De igual manera al comparar las (Figuras 5 y la Figura 6) del enriquecimiento de agua de río, se observa un descenso significativo por lo que al aumentar la concentración de los bacteriófagos también se evidencia una mejor actividad lítica de los fagos.

Análisis de Varianza de la cinética fágica con el Grupo 3 (*Listeria* 23)

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	2,80	3	0,93	25,39	<0,0001
Bacteriofago	2,80	3	0,93	25,39	<0,0001
Error	3,23	88	0,04		
Total	6,03	91			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,14806

Error: 0,0368 gl: 88

Bacteriofago	Medias	n	E.E.	
L23C	2,19	23	0,04	A
L23F2	1,83	23	0,04	B
L23F4	1,83	23	0,04	B
L23F10	1,74	23	0,04	B

Medias con una letra común no son significativamente d:

Figura 18. ANOVA de los valores de densidad óptica obtenidos en la cinética de infección de los bacteriófagos aislados sobre la bacteria *Listeria* #23.

Elaborado por: (Los autores, 2021).

El análisis de varianza de la cinética de infección de los bacteriófagos (Figura 18), se obtuvo un p-valor <0.0001 esto quiere decir que existe una diferencia significativa entre los valores de densidad óptica de los tres tipos de bacteriófagos con la bacteria de *Listeria* #23 testada, al realizar la prueba de comparación Tukey se obtuvo que existe diferencia significativa de los tres bacteriófagos con el grupo control lo cual nos indica que los bacteriófagos si tienen la capacidad de actuar sobre la bacteria disminuyendo su crecimiento, sin embargo, por los valores medios podemos decir que el bacteriófago más eficaz es el F10 debido a que presenta el menor valor lo que nos indica que con este bacteriófago el valor de densidad óptica que hace referencia al crecimiento bacteriano disminuyó mayormente que los otros dos fagos en estudio.

Cinética de Infección Bacteriófagos

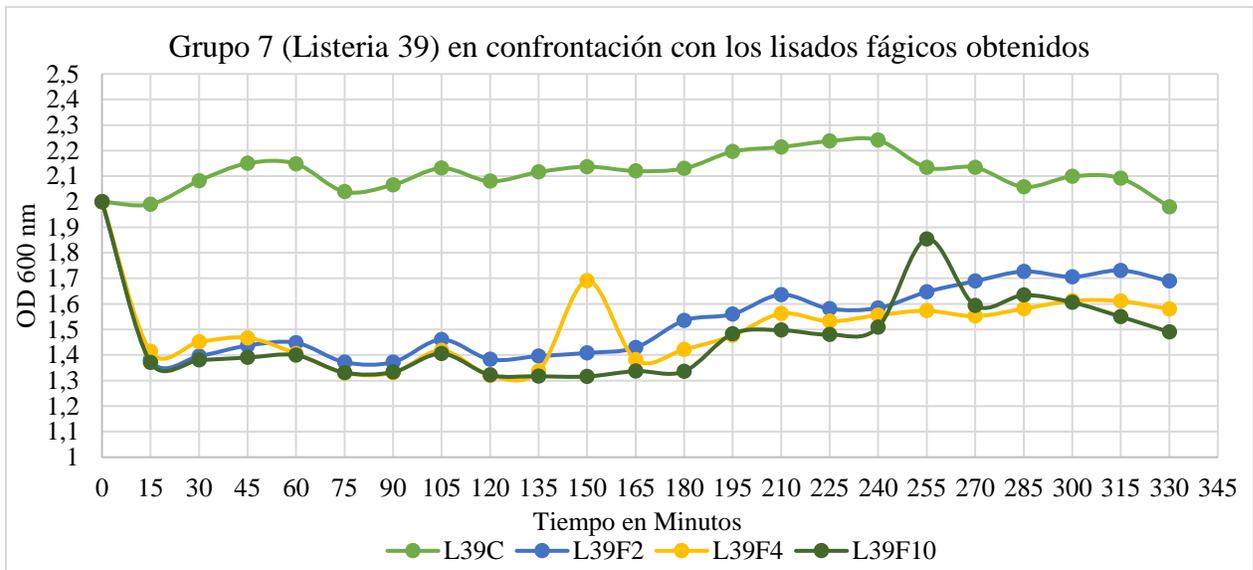


Figura 19. Cinética fágica con el grupo 7 de bacterias.

Nota: “L39C”: listeria 39 usada como control; “L39F2”: listeria 39 confrontada con el lisado fágico 2; “L39F4”: listeria 39 confrontada con el lisado fágico 4; “L39F10”: listeria 39 confrontada con el lisado fágico 10.

Elaborado por: (Los autores, 2021).

En la (Figura 19) comparada con la (Figura 17), se evidencia de menor manera la actividad lítica de los bacteriófagos ya que como se muestra en la (Figura 19) el crecimiento bacteriano siempre tiene valores de absorbancia superiores a las muestras que poseen los bacteriófagos, a pesar de que todas muestras inician con una absorbancia de 2 esto se debe a que los lisados fágicos evitan el crecimiento de la *listeria 39*. La muestra con el lisado fágico 4 y 10 son similares en su forma de actuar contra la bacteria ya que poseen valores similares de absorbancia, sin embargo, presenta picos de crecimiento los cuales son considerados como puntos atípicos que se pueden deber a

fallas en la medición de DO en el espectrofotómetro más no es una evidencia de que las bacterias aumentaron su densidad óptica, mientras que el lisado 2 es el más efectivo porque los valores de absorbancia son menores es decir ataca e inhibe mejor a esta bacteria y actúa constantemente mientras transcurre el tiempo.

Análisis de Varianza de la cinética fágica con el Grupo 7 (Listeria 39)

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	6,33	3	2,11	99,28	<0,0001
Bacteriofago	6,33	3	2,11	99,28	<0,0001
Error	1,87	88	0,02		
Total	8,20	91			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,11261

Error: 0,0213 gl: 88

Bacteriofago	Medias	n	E.E.	
L39C	2,11	23	0,03	A
L39F2	1,55	23	0,03	B
L39F4	1,50	23	0,03	B
L39F10	1,48	23	0,03	B

Medias con una letra común no son significativamente d.

Figura 20. ANOVA de los valores de densidad óptica obtenidos en la cinética de infección de los bacteriófagos aislados sobre la bacteria Listeria #23.

El análisis de varianza realizado con la cepa #39 (Figura 20), se obtuvo un p-valor $>0,0001$ por lo tanto podemos decir que existe diferencia significativa entre el grupo control y los tres tipos de bacteriófagos, sin embargo, en la prueba de comparación de Tukey se evidencia que efectivamente el grupo control es diferente a las muestras con los tres bacteriófagos. Las muestras con fagos no presentan una diferencia significativa entre ellos, pero por el análisis de los valores medios se puede decir que el F10 es el que actúa de mejor manera con esta bacteria ya que presenta el valor más bajo de densidad óptica lo cual nos indica que disminuyó en mayor cantidad la concentración bacteriana.

Cinética de Infección Bacteriófagos

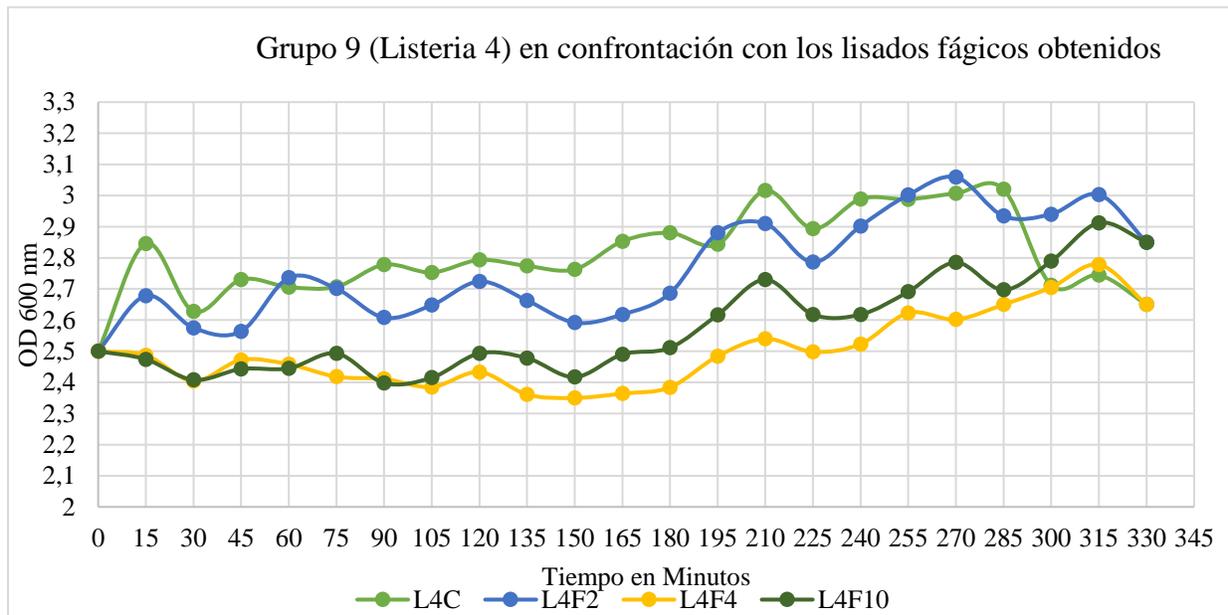


Figura 21. Cinética fágica con el grupo 9 de bacterias.

Nota: “L39C”: listeria 4 usada como control; “L4F2”: listeria 4 confrontada con el lisado fágico 2; “L4F4”: listeria 4 confrontada con el lisado fágico 4; “L4F10”: listeria 4 confrontada con el lisado fágico 10. Elaborado por: (Los autores, 2021).

En la (Figura 21) se encuentra la curva de crecimiento de la bacteria *Listeria 4* (*Listeria innocua* resistente a antibióticos) y se evidencia como actúan los bacteriófagos al inhibir el crecimiento bacteriano, todas las muestras inician con una absorbancia de 2.5, sin embargo, el grupo control aumenta considerablemente al pasar los primeros 15 minutos. La muestra con el lisado fágico 2 aunque que se encuentra por debajo del control el actuar de este lisado no es tan significativo, los lisados fágico 4 y 10 si demuestran una inhibición más notoria ya que desde el minuto 30 descienden por debajo del control. Al minuto 280 se evidencia la muerte celular en grupo control esto debido a que la bacteria perdió todo el alimento dentro del medio de cultivo y por lo tanto comienza a morir, mientras que en las muestras con bacteriófagos aumenta la densidad óptica de igual manera debido a los bacteriófagos que ahora se encuentran en la muestra y se han replicado

con éxito. De igual manera se evidencia que los bacteriófagos actúan de manera diferente según el tipo de cepa en este caso se usó una cepa de *Listeria innocua*, por lo que, no se observa de manera detallada el descenso del grupo control, sin embargo, este está por encima de las muestras que poseen el bacteriófago.

Análisis de Varianza de la cinética fágica con el Grupo 9 (Listeria 4)

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1,50	3	0,50	23,95	<0,0001
Bacteriofago	1,50	3	0,50	23,95	<0,0001
Error	1,84	88	0,02		
Total	3,34	91			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,11159

Error: 0,0209 gl: 88

Bacteriofago	Medias	n	E.E.	
L4C	2,81	23	0,03	A
L4F2	2,76	23	0,03	A
L4F10	2,58	23	0,03	B
L4F4	2,50	23	0,03	B

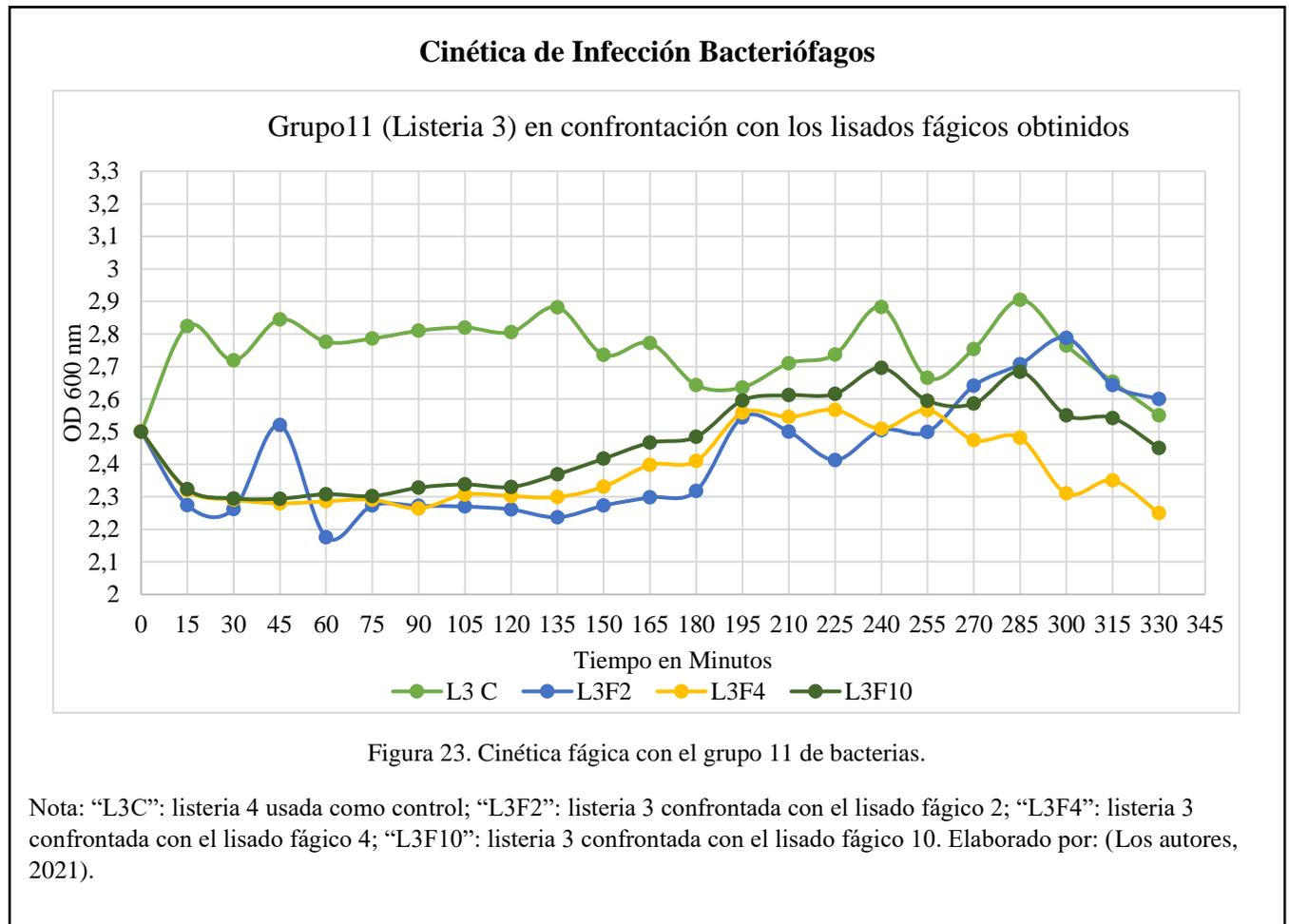
Medias con una letra común no son significativamente diferentes.

Figura 22. ANOVA de los valores de densidad óptica obtenidos en la cinética de infección de los bacteriófagos aislados sobre la bacteria *Listeria* #23.

Elaborado por: (Los autores, 2021).

El análisis de varianza realizado con la cepa #39 (Figura 20), se obtuvo un p-valor >0,0001 por lo tanto podemos decir que existe diferencia significativa, sin embargo, en la prueba de comparación de Tukey se evidencia el grupo control tiene diferencia significativa solo con el F4 y F10, mientras que con el F2 no tiene diferencia significativa esto quiere decir que este bacteriófago no actuó correctamente con esta cepa de *Listeria*. Las muestras con los fagos F4 y F10, no presentan una diferencia significativa entre ellos, pero por el análisis de los valores medios se puede decir que el

F4 es el que actúa de mejor manera con esta bacteria ya que presenta el valor más bajo de densidad óptica lo cual nos indica que disminuyo en mayor cantidad la concentración bacteriana.



En la (Figura 23) se observa la actividad lítica de los bacteriófagos en comparación con el grupo control que corresponde a la bacteria 3 *Listeria welshimeri* resistente a los antibióticos, a pesar de que de todas las muestras inician con una absorbancia de 2.5, es evidente que las muestras con los bacteriófagos impiden el crecimiento bacteriano y por ende se observan curvas con valores menores de absorbancia. En este caso en particular los lisados fágicos tienen un modo de confrontarse con la bacteria muy similar.

Análisis de Varianza de la cinética fágica con Grupo11 (Listeria 3)

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
DO	92	0,54	0,52	5,36

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1,85	3	0,62	34,22	<0,0001
Bacteriófago	1,85	3	0,62	34,22	<0,0001
Error	1,59	88	0,02		
Total	3,44	91			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,10376

Error: 0,0181 gl: 88

Bacteriófago	Medias	n	E.E.
L3 C	2,75	23	0,03 A
L3F10	2,46	23	0,03 B
L3F2	2,42	23	0,03 B
L3F4	2,39	23	0,03 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Figura 24. ANOVA de los valores de densidad óptica obtenidos en la cinética de infección de los bacteriófagos aislados sobre la bacteria Listeria #3.

Elaborado por: (Los autores, 2021).

El análisis de varianza de la cinética de infección de los bacteriófagos (Figura 24), se obtuvo un p-valor <0,0001 esto quiere decir que existe una diferencia significativa entre los valores de densidad óptica de los tres tipos de bacteriófagos con la bacteria de Listeria testada, al realizar la prueba de comparación Tukey se obtuvo que existe diferencia significativa de los tres bacteriófagos con el grupo control lo cual nos indica que los bacteriófagos si tienen la capacidad de actuar sobre la bacteria disminuyendo su crecimiento, sin embargo por los valores medios podemos decir que el bacteriófago más eficaz es el F4 debido a que presenta el menor valor lo que nos indica que con este bacteriófago el valor de densidad óptica que hace referencia al crecimiento bacteriano disminuye mayormente que los otros dos fagos en estudio.

3.8. Conservación y almacenamiento

3.8.1. Resistencia al cloroformo

Los bacteriófagos almacenados en medio SM y los lisados fágicos fueron sensibles al cloroformo cuando se usó cantidades de 10 y 15 μL . El cloroformo es un compuesto químico que se utiliza para la esterilización y conservación de los bacteriófagos (Alegre, 2019). Sin embargo, la cantidad que se va a usar de este solvente orgánico puede llegar a desintegrar la membrana lipídica que presentan algunos virus y por ende llegar a eliminar los fagos aislados (D. López, 2015), aunque algunos estudios han demostrado tener éxitos con cantidades que varían entre 50 - 500 μL de esta sustancia (Chenard, Chan, Vincent, & Suttle, 2015), en este caso se determinó que los bacteriófagos y los lisados fágicos lograron sobrevivir a cantidades de 5 μL una cantidad necesaria para eliminar a las bacterias y no generar ningún daño en los bacteriófagos, lo cual se evidenció con la formación de halos de inhibición donde se colocaron los fagos demostrando su actividad lítica sobre el césped bacteriano de *Listeria* spp. De igual manera al comparar los resultados de las muestras sin cloroformo con otros estudios se evidencia la contaminación de los fagos lo que impide que estos sean como utilizados para tratamiento de infecciones bacterianas (D. López, 2015). A continuación (Tabla 10) se muestran los resultados obtenidos en cuanto a la resistencia del cloroformo en los bacteriófagos almacenados en medio SM.

Tabla 10.

Resistencia a diferentes concentraciones de cloroformo de fagos almacenados en medio SM.

Concentración de cloroformo	5 μ L	10 μ L	15 μ L
Fago 2	+	-	-
Fago 4	+	-	-
Fago 10	+	-	-

Nota: “+”: Bacteriófagos líticos activos y resistentes a la concentración de cloroformo, “-” Bacteriófagos líticos muertos y no resistentes a la concentración de cloroformo. Elaborado por: (Los autores, 2021).

En la siguiente (Tabla 11) se muestran los resultados obtenidos de la resistencia al cloroformo de los lisados fágicos, como se evidencia estos mostraron resistir a una concentración de 5 uL, sin embargo, al aumentar la concentración de este compuesto los lisados fágicos al igual de los bacteriófagos almacenados en medio SM no lograron resistir. Por lo que la cantidad necesaria para evitar contaminación bacteriana y que los fagos mantengan su actividad lítica es de 5uL de cloroformo.

Tabla 11.

Resistencia a diferentes concentraciones de cloroformo de los lisados fágicos.

Concentración de cloroformo	5 μ L	10 μ L	15 μ L
Lisado Fágico 2	+	-	-
Lisado Fágico 4	+	-	-
Lisado Fágico 10	+	-	-

Nota: “+”: Bacteriófagos líticos activos y resistentes a la concentración de cloroformo, “-” Bacteriófagos líticos muertos y no resistentes a la concentración de cloroformo. Elaborado por: (Los autores, 2021).

Una vez que se comprobó la concentración adecuada de cloroformo para el almacenamiento de los bacteriófagos y lisados fágicos estos se almacenaron a medio LEM a 4 °C, permaneciendo estables por varios meses.

Conclusiones

Se logró establecer un protocolo adecuado para el aislamiento de bacteriófagos con resultados favorables, generando una opción adecuada para combatir la resistencia antibiótica no solo en el ámbito clínico sino en la salud de los animales y también en el medio ambiente.

La recolección de muestras de agua residual del río Machángara del sector “La Recoleta”, en la ciudad de Quito fueron propicias para la obtención de bacteriófagos inhibidores de *Listeria* spp esto se debe a las características de contaminación que el río presenta, sin embargo, el manejo de las muestras resultó ser importante para obtener un correcto aislamiento de los bacteriófagos, teniendo en cuenta que se deben considerar algunos lineamientos como sedimentar la muestra al menos por 24 horas para eliminar residuos sólidos, así como también filtrar para evitar contaminación bacteriana indeseada.

Los bacteriófagos fueron aislados adecuadamente por el método de doble capa obteniendo unidades formadoras de placa cuando se confrontó con un césped bacteriano de *Listeria* spp, se obtuvo tres bacteriófagos que se diferencian de la especie de *Listeria* spp, así como también al patrón de susceptibilidad, la actividad lítica se comprobó adecuadamente gracias al ensayo de la prueba de la gota observando halos de inhibición en cada uno de los 11 grupos de *Listeria* spp utilizados en el estudio por lo tanto, se determina que los bacteriófagos aislados tienen una adecuada capacidad lítica para inhibir el crecimiento de la bacteria así como también un amplio rango de lisis en distintas especies de *Listeria* spp con distintos patrones de sensibilidad y resistencia antimicrobiana. La cinética fágica permitió corroborar la actividad lítica de los bacteriófagos aislados ya que como se mostró en los resultados las muestras que poseen los bacteriófagos en

comparación con los controles, se observó una disminución en el crecimiento exponencial bacteriano.

El cultivo en doble capa es una metodología fácil y eficaz para el aislamiento y observación de la forma de actuación de los bacteriófagos sobre las bacterias y puede ser utilizada para investigación y aplicación académica.

Recomendaciones

Concentrar los bacteriófagos aislados para generar una mayor cantidad de estos y así poder realizar las pruebas respectivas como la prueba de la gota y el rango del hospedero.

Es indispensable ampliar la investigación para lo cual es necesario realizar una caracterización molecular de los bacteriófagos obtenidos, para esto sería necesario utilizar primers específicos de ORF de bacteriófagos de *Listeria* secuenciados anteriormente.

Realizar una identificación de los bacteriófagos a partir de microscopía electrónica y así mediante su morfología determinar que bacteriófagos se aislaron y a que familia pertenecen.

Secuenciar el genoma total de los bacteriófagos aislados para determinar si son aptos para ser usados en fagoterapia y verificar si posee o no genes de lisogenia.

Conocer la dosis y la concentración mínima inhibitoria para eliminar a las bacterias y determinar si los bacteriófagos aislados inhiben a otras bacterias gram positivas y gram negativas.

Referencias

- Abedon, S. (2008). *Bacteriophage Ecology. Population Growth, Evolution, Impact of Bacterial Viruses*. Retrieved from [https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=gtPZsPXBBqIC&oi=fnd&pg=PP2&dq=+confrontation+of+bacteriophages+against+bacteria&ots=MiwJBQRYI9&sig=3LYXi0fKYbzuhYkj3TzJULaS-34#v=onepage&q=confrontation of bacteriophages against bacteria&f=false](https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=gtPZsPXBBqIC&oi=fnd&pg=PP2&dq=+confrontation+of+bacteriophages+against+bacteria&ots=MiwJBQRYI9&sig=3LYXi0fKYbzuhYkj3TzJULaS-34#v=onepage&q=confrontation+of+bacteriophages+against+bacteria&f=false)
- Acha, P., & Szyfres, B. (2001). Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales Tercera edición. *Bacteriosis y Micosis*, 1(580), 1–420. Retrieved from <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2017/Acha-Zoonosis-Spa.pdf>
- Ackermann, H. W. (2000). Frequency of morphological phage descriptions in the year 2000. *Archives of Virology*, 146(5), 843–857. <https://doi.org/10.1007/s007050170120>
- Alegre, A. (2019). *Aislamiento y caracterización de un bacteriófago lítico de Listeria monocytogenes*.
- Ausgustyn, A., Bauer, P., Duignan, B., Eldridge, A., Gregersen, E., McKenna, A., ... Zelazko, A. (2018). Bacteriófago. In *Encyclopedia Britannica*. Retrieved from <https://www.britannica.com/science/bacteriophage>
- Becroft, D., Farmer, K., Seddon, R., Sowden, R., Stewart, J., Vines, A., & Wattie, D. (1971). Epidemic Listeriosis in the Newborn. *British Medical Journal*, 3(5777), 747–751. <https://doi.org/10.1136/bmj.3.5777.747>
- Benadof, D. (2008). *Listeria monocytogenes*. 25(5), 2008.

- Burleson, F., Chambers, T., & Wiedbrauk, D. (1992). *Virology, a laboratory manual* (A. Press, Ed.). San Diego.
- Campaña, A., Gualoto, E., & Chiluisa, V. (2017). Evaluación físico-química y microbiológica de la calidad del agua de los ríos Machángara y Monjas de la red hídrica del distrito metropolitano de Quito. *Bionatura*, 2(2), 305–310. <https://doi.org/10.21931/rb/2017.02.02.6>
- Carrascal, A., Castaño, M., Cortes, M., Correa, D., Olivares, M., Pérez, T., & Suárez, M. (2011). Evaluación de Riesgos de *Listeria monocytogenes* en queso fresco en Colombia. In *INS, Ministerio de Salud y Protección Social Unidad de Evaluación de Riesgos para la Inocuidad de los Alimentos UERIA Instituto Nacional de Salud*.
- Carter, J., & Saunders, V. (2007). *Virology: Principles and Applications*. Retrieved from https://books.google.com.ec/books?hl=es&lr=&id=EKRgZCdr-74C&oi=fnd&pg=PR15&dq=Virology:+principles+and+applications.&ots=ty5tA9uHU3&sig=Mjbo_wD6jVy0vVZQb1QwgUStxiA#v=onepage&q=ADN o ARN&f=false
- Chenard, C., Chan, A., Vincent, W., & Suttle, C. (2015). El cianófago polar de agua dulce S-EIV1 representa un nuevo linaje evolutivo generalizado de fagos. *ISME Volumen 9*. Retrieved from <https://www.nature.com/articles/ismej201524>
- Chiluisa, V., Cabrera, M., & Valladares, P. (2017). Detección de *Listeria* spp. y *Listeria monocytogenes* en muestras de leche cruda y quesos artesanales respectivamente, mediante PCR en Tiempo Real. 22(2), 67–75.
- Cires, M. (2002). La resistencia a los antimicrobianos, un problema mundial. *Revista Cubana de Medicina General Integral*, 18(2), 165–168. Retrieved from http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-

21252002000200012&lng=es&nrm=iso&tlng=es

Clokie, M., & Kropinski, A. (2009). Bacteriophages. Methods and Protocols. Volume 1. In H. Press (Ed.), *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* (Ilustrada, Vol. 502).

https://doi.org/10.1007/978-1-60327-565-1_1

Daza, R. (1998). Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria. *Inf Ormación Terapeutica Del Sistema Nacional de Salud*, 22(3), 57–67. Retrieved from

<http://www.msc.es/fr/biblioPublic/publicaciones/docs/bacterias.pdf>

Díaz, M., Chávez, M., & Saucedo, E. (2012). *Listeria monocytogenes* en leche y queso fresco como vehículo transmisor de listeriosis humana en la Provincia de Trujillo, Perú. *Ciencia y Tecnología*, 9(2), 23–38.

Dini, C. (2011). *Aislamiento y caracterización molecular de bacteriófagos de bacterias enteropatógenas para biocontrol de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA)*.

Dwivedi, B., Schmieder, R., Goldsmith, D., Edwards, R., & Breitbart, M. (2012). PhiSiGns: an online tool to identify signature genes in phages and design PCR primers for examining phage diversity. *BMC Bioinformatics*, 13(1), 37. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-37>

Egas, P. (2016). Caracterización fenológica y genotípica del bacteriófago 5Q18 activo contra *Escherichia coli* enteropatógena multirresistente. Retrieved from

<http://bibdigital.epn.edu.ec/handle/15000/10479>

Estrada, E., Strawn, L., Williams, R., & Moreno, A. (2019). Investigating the Prevalence, Persistence, and Diversity of *Listeria monocytogenes* and *Listeria species* in Produce Packinghouses. (Vol. 53). <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

- EUCAST. (2019). *Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 9.0, 2019*. 0–99. Retrieved from <http://www.eucast.org>.
- EUCAST. (2020). *Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 10.0, 2020*. Retrieved from <http://www.eucast.org>.
- Fernández, L., Gutiérrez, D., Rodríguez, A., & García, P. (2020). *Los bacteriófagos. Los virus que combaten infecciones*. Retrieved from <https://books.google.com.ec/books?id=pPjrDwAAQBAJ&pg=PT25&dq=bacteriófagos&hl=es-419&sa=X&ved=2ahUKEwiorYHK8ITrAhURVN8KHdTIBegQ6wEwAHoECAUQAQ#v=onepage&q&f=false>
- Fernández, M. (2016). *Control microbiológico de Listeria monocytogenes en alimentos para consumo destinado a lactantes*.
- Ferreira, V., Wiedmann, M., Teixeira, P., & Stasiewicz, M. (2013). *Listeria monocytogenes* persistence in food-associated environments: Epidemiology, strain characteristics, and implications for public health. *Journal of Food Protection*, 77(1), 150–170.
<https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-13-150>
- Flores, V. (2017). Aislamiento y caracterización de un bacteriófago con actividad lítica para *Vibrio fluvialis*. *Lima – Perú*, 62.
- Fundación Vasca para la Seguridad Agroalimentaria. (2006). *Listeria monocytogenes. Elika*.
- García, E., & López, R. (2002). Los bacteriófagos y sus productos génicos como agentes antimicrobianos. *Revista Española de Quimioterapia*, 15(Nº 4), 306–312.

- García, Ernesto. (2014). *Evaluación del producto fágico LISTEX TM P100 en la eliminación de biofilms de Listeria monocytogenes*.
- Gaviria, G., González, M., & Castaño, J. (2017). Técnica para aislamiento de bacteriófagos específicos para E.coli DH5 α a partir de aguas residuales. *Revista MVZ Córdoba*, 17(1), 2852. <https://doi.org/10.21897/rmvz.253>
- Giedraitienė, A., Vitkauskienė, A., Naginienė, R., & Pavilonis, A. (2011). Resistance Mechanisms of Clinically Important Bacteria. *REVIEW Medicina (Kaunas)*, 47(3), 137–183.
- Gill, J., & Hyman, P. (2010). Phage Choice, Isolation, and Preparation for Phage Therapy. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 11(1), 2–14. <https://doi.org/10.2174/138920110790725311>
- Granda, F. (2018). *Listeria monocytogenes*: transmisión, formas y tratamientos efectivos. *Elsevier*, 4. Retrieved from <https://www.elsevier.com/es-es/connect/medicina/listeria-monocytogenes-listeriosis-transmision-tratamiento>
- Hernández, A. (2007). Aislamiento, caracterización y detección precoz de bacteriófagos de *Streptococcus thermophilus* en la industria láctea.
- Herrera, M., Vargas, A., Moya, T., Herrera, J., Marín, J., Rodríguez, R., & Herrera, M. (2001). Cepas de *Listeria monocytogenes* con resistencia antimicrobiana. *Revista Médica Del Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera*, 36(1–2), 31–35. Retrieved from http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1017-85462001000100004&lng=en&nrm=iso&tlng=es
- Hof, H., Nichterlein, T., & Kretschmar, M. (1997). Management of listeriosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 10(2), 345–357. <https://doi.org/10.1128/cmr.10.2.345>

- Inal, J. (2003). *Phage Therapy : a Reappraisal of Bacteriophages as Antibiotics*. 237–244.
- INEN. (2014). *Directrices sobre la aplicación de principios generales de higiene de los alimentos para el control de Listeria monocytogenes en los alimentos (CAC/GL 61-2007, IDT)*.
- Klumpp, J., & Loessner, M. (2013). Listeria phages : Genomes, evolution, and application. *Bacteriophage*, 3(3), e26861. <https://doi.org/10.4161/bact.26861>
- Kopper, G., Calderón, G., Schneider, S., Domínguez, W., & Gutiérrez, G. (2009). Enfermedades transmitidas por alimentos y su impacto socioeconómico. In *Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación*. Retrieved from <http://www.fao.org/docrep/pdf/011/i0480s/i0480s.pdf>
- Kutter, E., & Sulakvelidze, A. (2004). *Bacteriophages. Biology and Applications*.
- Leitner, L., Kessler, T., & Klumpp, J. (2019). Bacteriophages: a Panacea in Neuro-Urology? *European Urology Focus*, 6(3), 518–521. <https://doi.org/10.1016/j.euf.2019.10.018>
- Lewin, B. (2008). *GENES IX* (9na editio). Retrieved from <https://es.slideshare.net/100000190894480/lewin-benjamin-genes-ix>
- Loera, P., López, C., Romero, C., Luévanos, M., & Balagurusamy, N. (2016). Mecanismos de resistencia intrínseca y adquirida a antibióticos en bacterias. *Revista Medicina de Torreón*, (January 2016).
- López, C., Buitrón, G., García, H., & Cervantes, F. (2017). *Tratamiento biológico de aguas residuales: Principios, modelación y diseño*. Retrieved from <https://bibliotecas.ups.edu.ec:2708/lib/upsal/reader.action?docID=5188465&ppg=46>

- López, D. (2015). *Bacteriófagos como alternativa para eliminar cepas de Acinetobacter baumannii resistente a antibióticos presentes en tres hospitales del Ecuador*.
- Madigan, M., Martinko, J., Bender, K., Buckley, D., & Stahl, D. (2015). *Brock. Biología de los microorganismos* (14 a edición). España.
- Megía, R. (2020). Estructura de un virus. Retrieved from <https://genotipia.com/virus-estructura/>
- Mena, M. (2010). “ *Evaluación de la prevalencia de Listeria monocytogenes en productos lácteos y embutidos en tres mercados de la ciudad de Quito mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real*.”
- Monk, A., Rees, C., Barrow, P., Hagens, S., & Harper, D. (2010). Bacteriophage applications: Where are we now? *Letters in Applied Microbiology*, 51(4), 363–369.
<https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2010.02916.x>
- MSPE. (2019). *Enfermedades transmitidas por agua y alimentos Ecuador, SE 1-23, 2019*.
- Muñoz, A., Vargas, M., Otero, L., Díaz, G., & Guzmán, V. (2011). *Presencia de Listeria monocytogenes en alimentos listos para el consumo, procedentes de plazas de mercado y delicatessen de supermercados de cadena, Bogotá, D.C, 2002-2008*.
- Muñoz, V., Garces, F., & Davila, C. (1979). *Estudio del rendimiento en fagos para los procesos de lisis bacteriana*. Retrieved from
https://inis.iaea.org/collection/NCLCollectionStore/_Public/39/046/39046975.pdf
- Murphy, F., Fauquet, C., Bishop, D., Ghabrial, S., Jarvis, A., Martelli, G., ... Summers, M. (1995). *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses*. Retrieved from
<https://books.google.com.ec/books?hl=es&lr=&id=zNvzCAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA1&d>

q=Virus+Taxonomy:+Classification+and+Nomenclature+of+Viruses&ots=FnuveCAldv&si
g=zWyC0l7WtQ2_ehF2b6sfY0tF4No#v=onepage&q&f=false

Niño, L. J. (2012). *Estudio de resistencia antimicrobiana en cepas de Listeria monocytogenes aisladas de cortes de carne de origen porcino.*

OIE (Organización Mundial de la Sanidad Animal). (2018). *Listeria monocytogenes*. Retrieved from
https://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/3.09.06_Listeria_monocytogenes.pdf

OMS. (2015). Estimaciones de la OMS sobre la carga mundial de enfermedades de transmisión alimentaria. © *World Health Organization 2015*, 1–255.
<https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.07.009>

Orlova, E. V. (2012). Bacteriophages and Their Structural Organisation. *Bacteriophages*, (August). <https://doi.org/10.5772/34642>

Orsi, R., & Wiedmann, M. (2016). Characteristics and distribution of *Listeria* spp., including *Listeria* species newly described since 2009. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *100*(12), 5273–5287. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7552-2>

Oteo, J., & Alós, J. (2009). *Listeria* y *Listeriosis*. *Profesión Veterinaria*, *Abr-Jul*(71), 58–67.
Retrieved from <http://europa.sim.ucm.es/compludoc/AA?articuloId=705418>

Plaza, L. (2013). *Escuela Superior Politécnica Del Litoral Ingeniero De Alimentos*. Retrieved from <https://www.dspace.espol.edu.ec/retrieve/89758/D-79753.pdf>

Prada, C., Holguin, A., González, A., & Vives, M. (2015). Fagoterapia, alternativa para el control

- de las infecciones bacterianas. Perspectivas en Colombia. *Universitas Scientiarum*, 20(1), 43. <https://doi.org/10.11144/javeriana.sc20-1.faci>
- Punil, R. (2017). *Caracterización de un bacteriófago específico de Escherichia coli aislado de aguas residuales de “ La Taboada .”*
- Reina, J., & Reina, N. (2018). Fagoterapia ¿una alternativa a la antibioticoterapia? *Rev Esp Quimioter*, 31(2), 101–104.
- Reinoso, I. (2015). *Evaluación Ambiental del Río Machángara*. Retrieved from <http://bibdigital.epn.edu.ec/handle/15000/10479>
- Rivera, D. (2016). *Caracterización de patrones de resistencia en cepas de Listeria monocytogenes y asociación de riesgo según: origen, matriz alimentaria y serotipo*.
- Robinson, T., Bu, D., Carrique-Mas, J., Fèvre, E., Gilbert, M., Grace, D., ... Woolhouse, M. (2016). Antibiotic resistance is the quintessential One Health issue. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 110(7), 377–380. <https://doi.org/10.1093/trstmh/trw048>
- Rodríguez, J. (2018). Panorama de la infección por *Listeria monocytogenes*. *Revista Chilena de Infectología*, 35(6), 649–657. <https://doi.org/10.4067/s0716-10182018000600649>
- Rohwer, F., & Edwards, R. (2002). The phage proteomic tree: A genome-based taxonomy for phage. *Journal of Bacteriology*, 184(16), 4529–4535. <https://doi.org/10.1128/JB.184.16.4529-4535.2002>
- Romero, J. (2015). *Fagoterapia: alternativa para el control de enfermedades bacterianas*. (July). <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.3008.3689>

- Schöbitz, R., Ciampi, L., & Nahuelquin, Y. (2009). *Listeria monocytogenes* un peligro latente para la industria alimentaria. *Agro Sur*, 37(1), 1–8.
<https://doi.org/10.4206/agrosur.2009.v37n1-01>
- Segundo, N., Hernández, E., López, O., & Torres, O. (2010). Los bacteriófagos como una alternativa en el tratamiento de enfermedades infecciosas bacterianas (fagoterapia). *Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas*, 41(3), 17–26.
- Skowron, K., Kwiecińska-Piróg, J., Grudlewska, K., Świeca, A., Paluszak, Z., Bauza-Kaszewska, J., ... Gospodarek-Komkowska, E. (2018). The occurrence, transmission, virulence and antibiotic resistance of *Listeria monocytogenes* in fish processing plant. *International Journal of Food Microbiology*, 282(February), 71–83.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.06.011>
- Staley, J., Boone, D., Brenner, D., De Vos, P., Garrity, G., Goodfellow, M., ... Schleifer, H. (2005). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*.
- Tafur, J., Torres, J., & Villegas, M. (2008). *Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas*.
- Torres, C. (2018). The disparate effects of bacteriophages on antibiotic-resistant bacteria. *Emerging Microbes and Infections*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41426-018-0169-z>
- Torres, K., Sierra, S., Poutou, R., Carrascal, A., & Mercado, M. (2005). *Patogenesis de Listeria monocytogenes, microorganismo zoonotico emergente*. (1), 511–543.
- Torres, S. (2017). Aislamiento e identificación de fagos líticos para *Salmonella entérica*. *USFQ*.
- USDA. (2013). Las enfermedades transmitidas por los alimentos: lo que necesitan saber los

consumidores. Retrieved from <https://www.fsis.usda.gov/wps/portal/informational/en-espanol/hojasinformativas/enfermedades-por-alimentos/enfermedades-transmitidas-alimentos>

Vignoli, R., & Seija, V. (2006). Principales mecanismos de resistencia antibiótica. In *Temas de Bacteriología y Virología Médica* (pp. 649–662).

White, H., & Orlova, E. (2016). Bacteriophages: Their Structural Organisation and Function. In *Intech*. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.5772/57353>

Anexos

Anexo 1. Convenio Marco de colaboración científico-técnica entre Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública-INSPI-Dr. Leopoldo Izquieta Pérez y La Universidad Politécnica Salesiana.

CONVENIO MARCO DE COLABORACIÓN CIENTÍFICO-TÉCNICA ENTRE INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA – INSPI – DR. LEOPOLDO IZQUIETA PEREZ Y LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

Comparecen a la celebración del presente acuerdo, por una parte la UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA representada legalmente por Javier Herán Gómez, en calidad de Rector conforme lo acredita con la copia certificada del nombramiento que adjunta, y por así disponer el Estatuto Universitario el Dr. Jeffrey Zúñiga en calidad de Procurador, a quienes en adelante se designará La UPS. Por otra parte, interviene la Sra. MGS. TANIA JACQUELINE DE FÁTIMA MORI LUCERO, en su calidad de Directora Ejecutiva (Encargada), con cédula de ciudadanía No. 0809082581 y representante legal del INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA – INSPI – DR. LEOPOLDO IZQUIETA PEREZ, que de aquí en adelante se designará INSPI, conforme lo acredita con la copia certificada de la Acción de Personal No.1461 de fecha 21 de Noviembre de 2016, que acompaña como documento habilitante, quienes acuerdan celebrar este convenio de colaboración para potenciar la capacidad de las dos instituciones en la investigación científica, bajo las siguientes cláusulas:

CLÁUSULA PRIMERA: Antecedentes.

- a) El INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA – INSPI – DR. LEOPOLDO IZQUIETA PEREZ es la institución ejecutora de la investigación, ciencia, tecnología e innovación en el área de salud humana y el laboratorio de referencia nacional de la red de salud pública. Fue creado mediante Decreto Ejecutivo N° 1290 del jueves 13 de septiembre de 2012, según consta en el Suplemento del Registro Oficial N° 788 donde se publicó la creación del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública como persona jurídica de derecho público, con independencia administrativa, económica y financiera, adscrita al Ministerio de Salud Pública.
- b) La UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA, es una Institución de educación superior de derecho privado sin fines de lucro, creada mediante ley No. 63, expedida por el Congreso Nacional y publicada en el Registro Oficial No. 499 del 5 de agosto de 1994, con domicilio principal en la ciudad de Cuenca y con competencia de funcionamiento a nivel nacional. Dentro de sus actividades pueden desarrollar programas y suscribir convenios de apoyo con otras instituciones, como parte de su compromiso social, contribuye al fortalecimiento de capacidades y recursos personales, organizacionales e

institucionales, mediante sus acciones, en pro del desarrollo de la comunidad y de los profesionales que se desempeñan en ella.

- c) Mediante informe y actas de reuniones de trabajo con fecha 26 de enero del año 2017 en la ciudad de San Francisco de Quito entre miembros de la Universidad Politécnica Salesiana y el Instituto Nacional de Investigación En Salud Pública – INSPI – Dr. Leopoldo Izquierda Pérez. Donde se trató la urgente necesidad de regularización de los tesisistas de la Universidad Politécnica Salesiana que forma parte del programa PROPAD.
- d) Se enfatizó por parte de la Universidad Politécnica Salesiana, la necesidad de la firma un Convenio Marco entre ambas instituciones para avalar jurídicamente las tesis que se encuentran llevando a cabo en el INSPI, con el fin de que los estudiantes puedan continuarlas y culminarlas, a su vez, se puedan generar convenios específicos para elaboración de trabajos de titulación, proyectos de investigación en las áreas y líneas de investigación prioritarias y definidas por el Ministerio de salud Pública, visitas técnicas y otras actividades que conlleven a potenciar las destrezas existentes a nivel de talento humano.

CLÁUSULA SEGUNDA: Objeto.

El objeto del presente Convenio es establecer un marco general referencial a fin de que las partes puedan promover la colaboración en intercambio científico, la transferencia de tecnología y del conocimiento para el desarrollo de habilidades y destrezas en el campo de salud humana; la realización de investigaciones conjuntas; el intercambio de información científico-técnica y de personal especializado, procurando la complementación de acciones conjuntas en áreas de competencia de ambas partes.

Las áreas de interés mutuo pueden incluir:

- Desarrollar proyectos conjuntos de investigación en disciplinas y campos de interés mutuo, cuyos resultados sean compartidos, a fin de atender las demandas, requerimientos y necesidades institucionales.
- Participar y organizar conferencias, seminarios y eventos científico-técnicos;
- Facilitar el intercambio de información relacionada con estudios de investigación.
- Transferencia científico-técnica y difusión de resultados de proyectos de investigación en conjunto;
- Capacitación teórico-práctica para personal del INSPI y de la Universidad Politécnica Salesiana.
- Incorporar a los estudiantes en actividades vinculadas con el desarrollo de los sectores sociales. Para el cumplimiento de este propósito, los estudiantes de las diversas áreas de la UPS, podrán realizar sus visitas técnicas en el INSPI de acuerdo con los requisitos que esta formule al respecto.

- Poner a disposición de los temas de investigación para el desarrollo de proyectos de grado previas a la obtención del título profesional.

CLÁUSULA TERCERA: Implementación.

Para asegurar el cumplimiento del presente Convenio de Colaboración Científico-Técnica, cada institución designará, respectivamente, a los funcionarios responsables para coordinar la gestión, alcance y dirección de las actividades, quienes facilitarán acuerdos suplementarios y/o específicos que cubrirán el desarrollo y la operación de los programas y proyectos, en áreas de interés mutuo. En ausencia de especificaciones contrarias, dichos acuerdos, en la medida de lo posible, se adherirán a los principios generales de este Convenio de Colaboración Científico-Técnica.

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA y el INSPI, promoverán las actividades de este Convenio, según los acuerdos suplementarios entre sus investigadores científicos y divulgarán información correspondiente.

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA y el INSPI, estimularán al personal científico y técnico para que participen activamente en desarrollo, implementación y ejecución de los programas y proyectos materia de este convenio.

La implementación de este Convenio y de cualquier acuerdo suplementario estará sujeta a la disponibilidad física, presupuestaria y a la capacidad de respuesta UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA y el INSPI.

CLÁUSULA CUARTA: Plazo.

El presente Convenio tendrá validez a partir de su suscripción y tendrá un plazo de vigencia de cinco (5) años, renovable por períodos iguales, siempre que las partes señalen su voluntad de hacerlo mediante notificaciones expresas y suscritas por la máxima autoridad de cada una de ellas, con tres (3) meses de antelación al vencimiento.

CLÁUSULA QUINTA: Autoría y Confidencialidad.

Se establecerán acuerdos específicos donde se indicarán los términos y condiciones relacionados a la confidencialidad.

Las partes se comprometen a separar todos los materiales confidenciales e identificarlos como tales. Estos elementos de carácter reservado, se mantendrán de esta forma por período definido por la legislación nacional e internacional.

Los resultados de los proyectos y programas que puedan ser objeto de patente u otra protección bajo los sistemas de propiedad intelectual y/o eventuales aprovechamientos económicos,

serán objeto de acuerdo separado entre ambas partes.

CLÁUSULA SÉXTA: Litigio.

Ante cualquier desacuerdo que pudiera surgir entre las partes, las mismas se comprometen a resolverlo amigablemente, sin recurrir a ninguna otra instancia, dado el carácter de cooperación que los anima.

En caso de no llegar a un acuerdo requerido, las partes podrán dirigirse al Centro de Mediación y Arbitraje de la Procuraduría General del Estado, en los términos previstos en el artículo 190 de la Constitución de la República del Ecuador.

CLÁUSULA SEPTIMA: Terminación.

El presente Convenio terminará por las siguientes condiciones:

- Incumplimiento de los objetivos y obligaciones del presente convenio y/o del programa o proyecto de investigación;
- Por decisión de una de las partes, con antelación a su vencimiento mediante aviso escrito a la contraparte, notificándola con no menos de sesenta (60) días de anticipación;
- Por vencimiento del plazo de vigencia, sin intención manifestada de renovación;
- Por acuerdo mutuo de las partes;
- Por causa de fuerza mayor o caso fortuito que, conforme lo dispuesto en el artículo 30 del Código Civil, por mutuo entendimiento, haga imposible su cumplimiento y ejecución del presente Convenio.

Se dará por terminado una vez que las partes hubieren cumplido con sus respectivas obligaciones y vencido el plazo estipulado.

Concluido el plazo de ejecución, se suscribirá entre las partes un informe final de todas las actividades y resultados obtenidos dentro del presente Convenio de Colaboración Interinstitucional.

El mencionado Informe debe ser elaborado y suscrito por cada una de las partes, y presentado a la Máxima Autoridad de cada institución dentro de los tres (3) meses anteriores al vencimiento del Convenio.

CLÁUSULA OCTAVA: Delegados Responsables

Cada institución designará un coordinador para promover y hacer cumplir las condiciones:

➤ Delegado por la UPS

Nombre: Michael Venegas

Cargo: Docente responsable de vinculación de la Carrera de Ingeniería en

Biotecnología de los Recursos Naturales.

Dirección: Av. 12 de octubre N24-22 y Wilson
 Teléfono: 3962 800/ 3962 900 ext. 2298
 E-mail: mvrenegas@ups.edu.ec
 Website: www.ups.edu.ec

➤ Delegado por el INSPI

Nombre: Dr. Solón Alberto Orlando Narváez
 Cargo: Director Técnico de Investigación, Desarrollo e Innovación (Encargado)
 Dirección: Av. Julián Coronel 905 entre Esmeraldas y José Mascote
 Teléfono: 04 2288097 ext 232
 E-mail: asolando@inspi.gob.ec
 Website: www.inspi.gob.ec

Los delegados realizarán también las actividades de monitoreo y seguimiento con el objetivo de velar por el cumplimiento de los términos, compromisos, obligaciones y derechos establecidos en el presente Convenio y en los acuerdos suplementarios.

Cualquier cambio de delegado responsable deberá ser notificado por escrito sin necesidad de modificación del convenio.

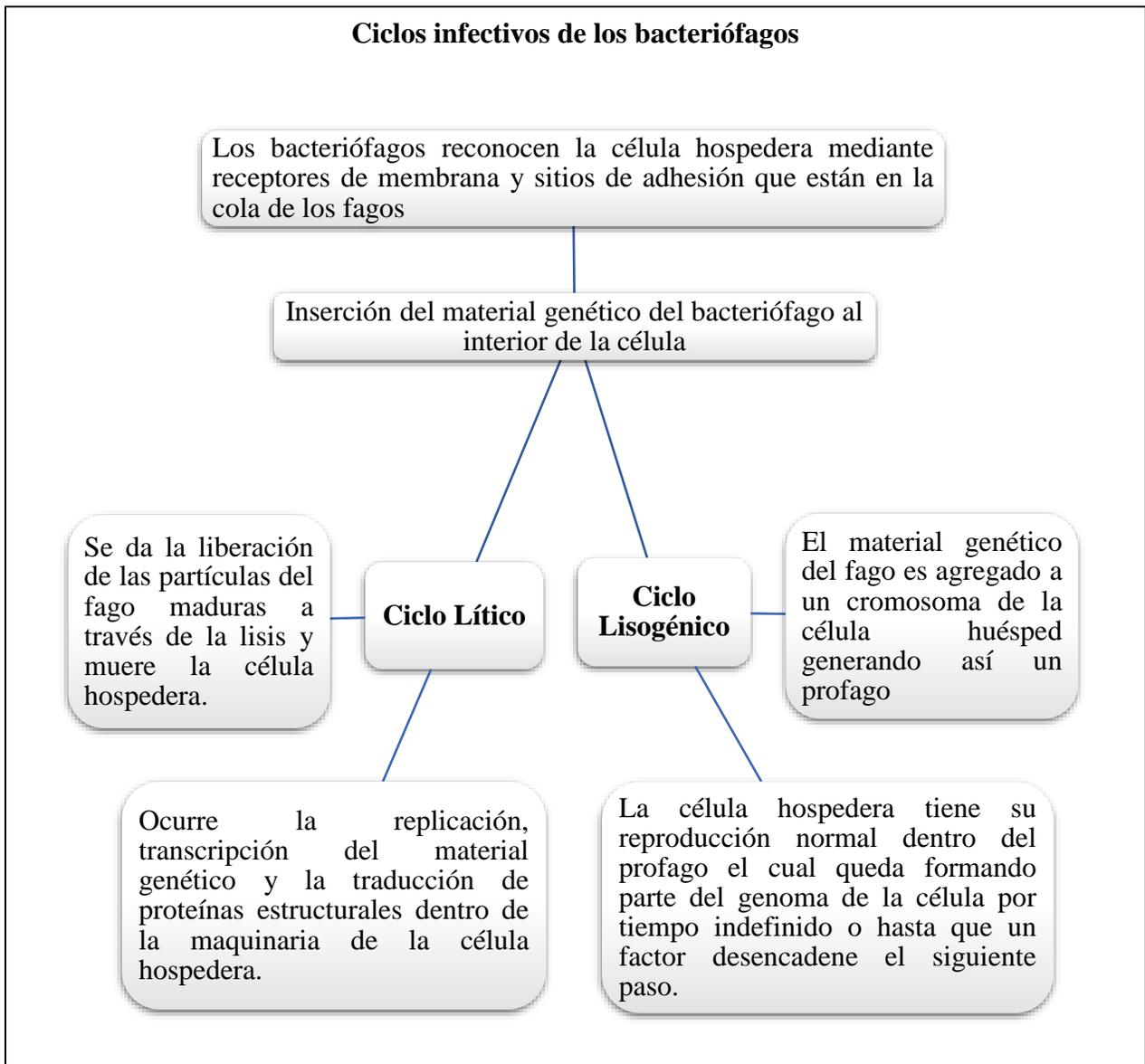
El delegado de cada Institución deberá presentar, cada 6 (seis) meses un informe correspondiente al desarrollo y cumplimiento del presente Convenio y de los acuerdos suplementarios, de ser el caso.

CLÁUSULA NOVENA: Comunicaciones

Para efecto de las comunicaciones que se necesitan entre las partes, se establecen las siguientes direcciones:

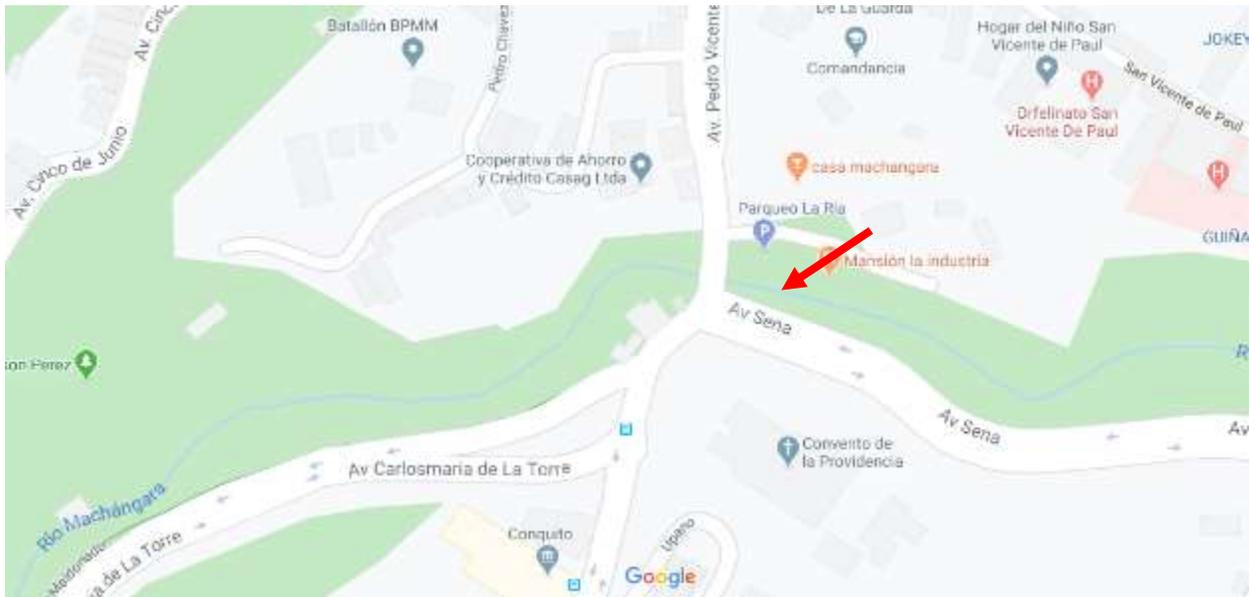
Instituto Nacional De Investigación En Salud Pública – INSPI – Dr. Leopoldo Izquierdo Pérez	Iquique y Yaguachi Barrio "El Dorado" INSPI QUITO Av. Julian Coronel 905 INSPI GUAYAQUIL Av. Huayna Capac 2162 INSPI CUENCA
Universidad Politécnica Salesiana	Av. 12 de octubre N24-22 y Wilson, sede Quito Calle Vieja 12-30 y Eja Liu, sede Cuenca. Robles 107 y Chambers, sede Guayaquil.

Anexo 2. Ciclos infectivos de los bacteriófagos.



Fuente: (Tortora et al., 2010). Libro "Microbiology: an introduction" décima edición.

Anexo 3. Muestreo de agua en el río Machángara, sector “La Recolecta”



Fuente: Google Maps. Elaborado por: (Los autores, 2021).

Anexo 4. Muestreo en el sector de “La Recolecta”.



Fuente: Google Maps. Tomada por: (Los autores, 2021).

Anexo 5. Cepas seleccionadas para el estudio.

Cepa	Código del INSPI	Nuevo código asignado	Cepa	Código del INSPI	Nuevo código asignado
1	369	1	26	ARCSA 616-0518 RAM-Q	26
2	410	2	27	ARCSA 627-0518 RAM-Q	27
3	521	3	28	ARCSA 628-0518 RAM-Q	28
4	524	4	29	ARCSA 629 -0518 RAM-Q	29
5	694	5	30	ARCSA 753-0518 RAM-Q	30
6	HEE 354-0816 RAM-Q	6	31	ARCSA 754 -0518 RAM-Q	31
7	HBO 979-0816 RAM-Q	7	32	HSQ 780-0518 RAM-Q	32
8	HPA 1184-0916 RAM-Q	8	33	HBO 784-0518 RAM-Q	33
9	HEG 057	9	34	HDL 862-0618 RAM-Q	34
10	HNA 120	10	35	ARCSA 871-0618 RAM-Q	35
11	HEE 572	11	36	HDR 999-0718 RAM-Q	36
12	HDC 624	12	37	HDR 1030-0718 RAM-Q	37
13	HLA 999	13	38	ARCSA 1127-0718 RAM-Q	38
14	ARCSA 1120-0817 RAM-Q	14	39	ARCSA 1128-0718 RAM-Q	39
15	ARCSA 1201-0817 RAM-Q	15	40	ARCSA 1129-0718 RAM-Q	40

16	ARCSA 1217-0817 RAM-Q	16	41	HNA 1158-0718 RAM-Q	41
17	ARCSA 1258-0817 RAM-Q	17	42	ARCSA 1189-0819 RAM-Q	42
18	HDC 1510-1017 RAM-Q	18	43	HDR 1271-0818 RAM-Q	43
19	HSQ 1769-1117 RAM-Q	19	44	HEG 1314-0818 RAM-Q	44
20	ARSA 1893-1217 RAM-Q	20	45	HSQ 1382-0918 RAM-Q	45
21	HDC 077-0118 RAM- Q	21	46	HEE 042-0119 RAM-Q	46
22	HEE 354-0318 RAM- Q	22	47	HDR 299-0319 RAM-Q	47
23	HDC 529-0818 RAM- Q	23	48	HEE 767-0519 RAM-Q	48
24	ISD 546-0418 RAM- Q	24	49	HSF 972-0619 RAM-Q	49
25	HPY 559- 0418 RAM- Q	25	50	HBO 1124-0719 RAM-Q	50

Elaborado por: (Los autores, 2021).

Anexo 6. Perfil Bioquímico de las cepas de *Listeria* spp.

INSPI	Cepa código	kligger	LIA	citrato	urea	MR	VP	motilid 25°C	motilid 35°C	manitol	camp	catalasa	tipo de Listeria	Grupo
369	1	A/A	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	<i>L.welshimeri</i>	10
410	2	A/A	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	<i>L.welshimeri</i>	10
521	3	A/A	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	<i>L.welshimeri</i>	11
524	4	A/A	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	<i>L.inocua</i>	9
694	5	A/A	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	<i>L.monocytogenes</i>	6
354	6	A/A	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	<i>L.monocytogenes</i>	6
1184	8	A/A	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	<i>L.monocytogenes</i>	6
57	9	A/A	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	<i>L.monocytogenes</i>	6
120	10	A/A	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	<i>L.monocytogenes</i>	3
572	11	A/A	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	<i>L.monocytogenes</i>	1
624	12	A/A	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	<i>L.monocytogenes</i>	6
999	13	A/A	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	<i>L.monocytogenes</i>	3
1120	14	A/A	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	<i>L.monocytogenes</i>	6
1201	15	A/A	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	<i>L.monocytogenes</i>	6
1217	16	A/A	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	<i>L.monocytogenes</i>	6
1258	17	A/A	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	<i>L.monocytogenes</i>	3
1510	18	A/A	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	<i>L.monocytogenes</i>	6
1769	19	A/A	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	<i>L.monocytogenes</i>	6
1893	20	A/A	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	<i>L.monocytogenes</i>	6
77	21	A/A	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	<i>L.monocytogenes</i>	6
354	22	A/A	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	<i>L.monocytogenes</i>	6
529	23	A/A	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	<i>L.monocytogenes</i>	3
546	24	A/A	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	<i>L.monocytogenes</i>	6
559	25	A/A	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	<i>L.monocytogenes</i>	6
616	26	A/A	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	<i>L.monocytogenes</i>	6

627	27	A/A	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	<i>L.monocytogenes</i>	1
628	28	A/A	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	<i>L.monocytogenes</i>	1
629	29	A/A	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	<i>L.monocytogenes</i>	1
753	30	A/A	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	<i>L.monocytogenes</i>	5
754	31	A/A	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	<i>L.monocytogenes</i>	5
780	32	A/A	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	<i>L.monocytogenes</i>	6
784	33	A/A	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	<i>L.monocytogenes</i>	6
862	34	A/A	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	<i>L.monocytogenes</i>	6
871	35	A/A	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	<i>L.monocytogenes</i>	5
999	36	A/A	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	<i>L.monocytogenes</i>	2
1030	37	A/A	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	<i>L.monocytogenes</i>	3
1127	38	A/A	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	<i>L.monocytogenes</i>	2
1128	39	A/A	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	<i>L.monocytogenes</i>	7
1129	40	A/A	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	<i>L.monocytogenes</i>	8
1158	41	A/A	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	<i>L.monocytogenes</i>	5
1189	42	A/A	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	<i>L.monocytogenes</i>	5
1271	43	A/A	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	<i>L.monocytogenes</i>	5
1314	44	A/A	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	<i>L.monocytogenes</i>	6
1382	45	A/A	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	<i>L.monocytogenes</i>	4
42	46	A/A	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	<i>L.monocytogenes</i>	2
299	47	A/A	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	<i>L.monocytogenes</i>	1
767	48	A/A	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	<i>L.monocytogenes</i>	4
972	49	A/A	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	<i>L.monocytogenes</i>	2
1124	50	A/A	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	<i>L.monocytogenes</i>	3

Nota: “+”: positivo para la prueba bioquímica; “-“: negativo para la prueba bioquímica. “A/A”: existe fermentación de azúcares; “MR”: rojo de metilo; “VP”:

Voges –Proskauer; Elaborado por: (Los autores, 2021).

Anexo 7. Perfil de resistencia y susceptibilidad de las cepas de *Listeria* spp.

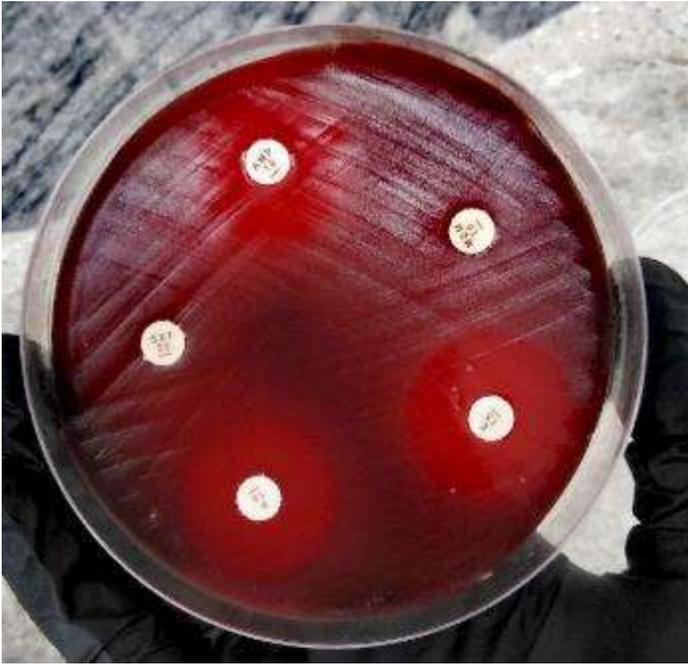
INSPI	CÓD	P (mm)	punto de corte P		AMP (mm)	punto de corte AMP(mm)		ERI (mm)	punto de corte ERI		MEM (mm)	punto de corte MEM		SXT (mm)	punto de corte SXT	
			S (>=13)	R (<13)		S (>=16)	R (<16)		S (>=25)	R (<25)		S (>=26)	R (<26)		S (>=29)	R (<29)
369	1	21	X		40	X		31	X		38	X		24		X
410	2	21	X		40	X		30	X		39	X		25		X
521	3	11		X	23	X		20		X	25		X	20		X
524	4	17	X		28	X		27	X		30	X		25		X
694	5	17	X		26	X		25	X		30	X		23		X
354	6	16	X		30	X		28	X		30	X		25		X
979	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1184	8	15	X		26	X		26	X		30	X		25		X
57	9	17	X		30	X		26	X		30	X		25		X
120	10	18	X		32	X		27	X		36	X		32	X	
572	11	12		X	22	X		22		X	16		X	6		X
624	12	15	X		28	X		27	X		30	X		24		X
999	13	16	X		30	X		29	X		30	X		31	X	
1120	14	16	X		26	X		26	X		30	X		25		X
1201	15	15	X		28	X		27	X		30	X		25		X
1217	16	19	X		34	X		30	X		35	X		6		X
1258	17	16	X		30	X		27	X		32	X		30	X	
1510	18	19	X		26	X		27	X		31	X		28		X
1769	19	20	X		29	X		26	X		31	X		25		X
1893	20	17	X		28	X		26	X		31	X		28		X
77	21	17	X		30	X		22	X		30	X		26		X
354	22	19	X		30	X		26	X		31	X		29		X
529	23	18	X		31	X		26	X		32	X		31	X	
546	24	18	X		30	X		27	X		30	X		28		X

559	25	16	X		30	X		26	X		30	X		28		X
616	26	20	X		34	X		28	X		35	X		28		X
627	27	6		X	27	X		6		X	18		X	15		X
628	28	12		X	27	X		25		X	17		X	6		X
629	29	6		X	24	X		23		X	14		X	6		X
753	30	8		X	22	X		27	X		28	X		26		X
754	31	10		X	27	X		6	X		31	X		28		X
780	32	19	X		30	X		25	X		31	X		26		X
784	33	17	X		28	X		22	X		31	X		28		X
862	34	21	X		32	X		25	X		33	X		27		X
871	35	11		X	30	X		26	X		30	X		27		X
999	36	12		X	30	X		25	X		31	X		32	X	
1030	37	16	X		30	X		26	X		32	X		31	X	
1127	38	12		X	26	X		26	X		30	X		31	X	
1128	39	8		X	12		X	20		X	23		X	28		X
1129	40	20	X		18	X		23		X	22		X	30	X	
1158	41	8		X	20	X		21	X		27	X		25		X
1189	42	10		X	24	X		25	X		27	X		26		X
1271	43	10		X	20	X		23	X		29	X		28		X
1314	44	13	X		24	X		24	X		28	X		28		X
1382	45	11		X	20	X		18	X		25		X	29	X	
42	46	11		X	26	X		30	X		28	X		30	X	
299	47	12		X	21	X		24		X	24		X	28		X
767	48	8		X	23	X		27	X		25		X	32	X	
972	49	11		X	24	X		24	X		28	X		30	X	
1124	50	15	X		24	X		30	X		30	X		35	X	

Nota: “S”: sensible; “R”: resistente; “P”: penicilina; “MEM”: meropenem; “AMP”: ampicilina; “ERI”: eritromicina; “SXT”: trimetoprima/sulfametoxazol

Elaborado por: (Los autores, 2021).

Anexo 8. Perfil de resistencia y susceptibilidad en agar sangre.



Tomada por: (Los autores, 2021).

Anexo 9. *Listeria monocytogenes*. Grupo 1: cepa 28(Resistente: P, ERI, SXT, MEM).



Nota: “Halo de la izquierda”: Bacteriófago 2; “Halo central”: Bacteriófago 4; “Halo de la derecha”: Bacteriófago 10.
Tomada por: (Los autores, 2021).

Anexo 10. *Listeria monocytogenes*. Grupo 2: cepa 38(Resistente: P).



Nota: "Halo de la izquierda": Bacteriófago 2; "Halo central": Bacteriófago 4; "Halo de la derecha": Bacteriófago 10. Tomada por: (Los autores, 2021).

Anexo 11. *Listeria monocytogenes*. Grupo 3: cepa 23 (Sensible a todos los antibióticos probados).



Nota: “Halo de la izquierda”: Bacteriófago 2; “Halo central”: Bacteriófago 4; “Halo de la derecha”: Bacteriófago 10. Tomada por: (Los autores, 2021).

Anexo 12. *Listeria monocytogenes*. Grupo 4: cepa 48 (Resistente: P, MEM).



Nota: “Halo de la izquierda”: Bacteriófago 2; “Halo central”: Bacteriófago 4; “Halo de la derecha”: Bacteriófago 10. Tomada por: (Los autores, 2021).

Anexo 13. *Listeria monocytogenes*. Grupo 5: cepa 35 (Resistente: P, SXT).



Nota: “Halo de la izquierda”: Bacteriófago 2; “Halo central”: Bacteriófago 4; “Halo de la derecha”:
Bacteriófago 10. Tomada por: (Los autores, 2021).

Anexo 14. *Listeria monocytogenes*. Grupo 6: cepa 8 (Resistente: SXT).



Nota: “Halo de la izquierda”: Bacteriófago 2; “Halo central”: Bacteriófago 4; “Halo de la derecha”:
Bacteriófago 10. Tomada por: (Los autores, 2021).

Anexo 15. *Listeria monocytogenes*. Grupo 7: cepa 39 (Resistente: P, ERI, AMP, MEM, SXT).



Nota: “Halo de la izquierda”: Bacteriófago 2; “Halo central”: Bacteriófago 4; “Halo de la derecha”:
Bacteriófago 10. Tomada por: (Los autores, 2021).

Anexo 16. *Listeria monocytogenes*. Grupo 8: cepa 40 (Resistente: ERI, MEM).



Nota: "Halo de la izquierda": Bacteriófago 2; "Halo central": Bacteriófago 4; "Halo de la derecha": Bacteriófago 10. Tomada por: (Los autores, 2021).

Anexo 17. *Listeria innocua*. Grupo 9: cepa 4 (Resistente: SXT).



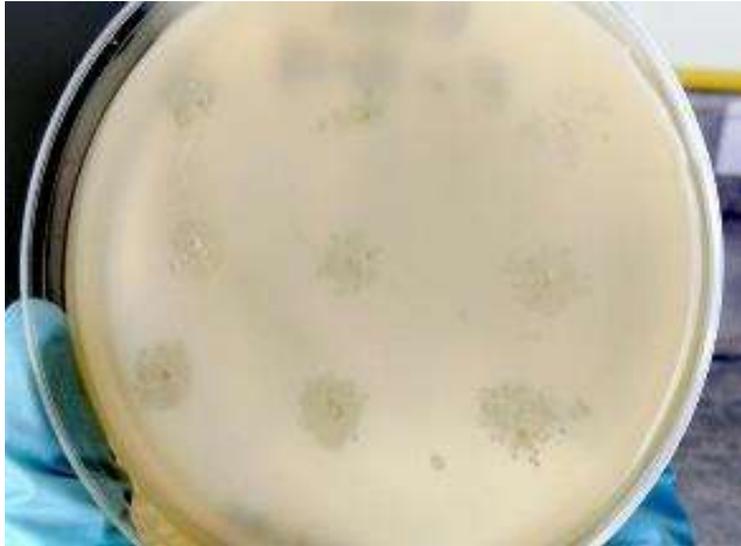
Nota: "Halo de la izquierda": Bacteriófago 2; "Halo central": Bacteriófago 4; "Halo de la derecha": Bacteriófago 10. Tomada por: (Los autores, 2021).

Anexo 18. *Listeria welshimeri*. Grupo 11: cepa 3 (Resistente: P, ERI, MEM, SXT).



Nota: “Halo de la izquierda”: Bacteriófago 2; “Halo central”: Bacteriófago 4; “Halo de la derecha”:
Bacteriófago 10. Tomada por: (Los autores, 2021).

Anexo 19. Rango del hospedero en *Escherichia coli*.



Prueba de gota en *Escherichia coli* con los fagos (F10-F18) en orden desde la esquina izquierda hacia abajo.

Tomada por: (Los autores, 2021).

Anexo 20. Rango del hospedero en *Klebsiella pneumoniae*.



Prueba de gota en *Klebsiella pneumoniae* con los fagos (F02 en la posición caja 1; F04 en la posición caja 2 y F10 de la posición caja 3)

Tomada por: (Los autores, 2021).

Anexo 21. Medios de Cultivo y Buffer.

Los medios de cultivo y buffer fueron adaptados de (López, 2015).

LEM- LB modificado 1L

- Extracto de Levadura 5 g
- NaCl 5 g
- Bacto Triptona 10 g
- 1M MgSO₄ 10 mL

Top Agar

- Agregar Agar-Agar al medio LEM en una concentración del 0.9 %

Bottom Agar

- Agregar Agar-Agar al medio LEM en una concentración del 1.7 %

Terrific Broth TB modificado 100 mL

- Peptona 10 g
- Extracto levadura 5 g
- K₂HPO₄ 48 g
- Ajustar pH a 7.6 HCl

Buffers: SM 1L

- NaCl 5.8 g
- MgSO₄ & H₂O 2.0 g
- 1M Tris HCl
- pH 7.4 50 mL
- Agar-Agar 0,1 g

Todos los medios de cultivo y buffers fueron esterilizados a una presión de 15 PSI, durante 15 minutos.

Anexo 22. Protocolo de Aislamiento de Bacteriófagos

