

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



TESIS

**DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD LÍTICA DE BACTERIÓFAGOS
OBTENIDOS DE AGUAS DE LA CUENCA DEL RÍO HUATANAY CONTRA
CEPAS DE *Escherichia coli* MULTIDROGO RESISTENTES**

PRESENTADO POR:

Br. WANDERLEY ACUÑA URETA

Br. BRISEIDA PECEROS ORTEGA

**PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL
DE BIÓLOGO**

ASESORA:

Mgt. ELSA GLADYS AGUILAR ANCORI

**FINANCIADO POR EL PROGRAMA
YACHAYNINCHIS WIÑARINANPAQ-
UNSAAC**

CUSCO-PERÚ

2024

INFORME DE ORIGINALIDAD

(Aprobado por Resolución Nro.CU-303-2020-UNSAAC)

El que suscribe, **Asesora** del trabajo de investigación/tesis titulada:

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD LÍTICA DE BACTERIÓFAGOS OBTENIDOS DE AGUAS DE LA CUENCA DEL RÍO HUATANAY CONTRA CEPAS DE *Escherichia coli* MULTIDROGO RESISTENTES

Presentado por: **Wanderley Acuña Ureta** con DNI Nro 70666940 y **Briseida Peceros Ortega** con DNI Nro**73376836** para optar el título profesional BIOLOGO.

Informo que el trabajo de investigación ha sido sometido a revisión por 02 veces, mediante el Software Antiplagio, conforme al Art. 6° del **Reglamento para Uso de Sistema Antiplagio de la UNSAAC** y de la evaluación de originalidad se tiene un porcentaje de 6%.

Evaluación y acciones del reporte de coincidencia para trabajos de investigación conducentes a grado académico o título profesional, tesis

Porcentaje	Evaluación y Acciones	Marque con una (X)
Del 1 al 10%	No se considera plagio.	X
Del 11 al 30 %	Devolver al usuario para las correcciones.	
Mayor a 31%	El responsable de la revisión del documento emite un informe al inmediato jerárquico, quien a su vez eleva el informe a la autoridad académica para que tome las acciones correspondientes. Sin perjuicio de las sanciones administrativas que correspondan de acuerdo a Ley.	

Por tanto, en mi condición de asesora, firmo el presente informe en señal de conformidad y **adjunto** las primeras páginas del reporte del Sistema Antiplagio.

Cusco, 06 de marzo de 2025


.....
MSc. Elsa Gladys Aguilar Ancori
Nro. de DNI 23859957
ORCID 0000-0002-8942-8868

Se adjunta:

1. Reporte generado por el Sistema Antiplagio.
2. Enlace del Reporte Generado por el Sistema Antiplagio:

<https://unsaac.turnitin.com/viewer/submissions/oid:27259:436849627?locale=es-MX>

WANDERLEY ACUÑA URETA BRISEIDA PECEROS O...

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD LÍTICA DE BACTERIÓFAGOS OBTENIDOS DE AGUAS DE LA CUENCA DEL...

 Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco

Detalles del documento

Identificador de la entrega

trn:oid:::27259:436849627

Fecha de entrega

6 mar 2025, 7:49 a.m. GMT-5

Fecha de descarga

6 mar 2025, 8:02 a.m. GMT-5

Nombre de archivo

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD LÍTICA DE BACTERIÓFAGOS OBTENIDOS DE AGUAS DE LA CUE.....pdf

Tamaño de archivo

6.6 MB

166 Páginas

35,797 Palabras

203,225 Caracteres

6% Similitud general

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para ca...

Filtrado desde el informe

- Bibliografía
- Texto citado
- Texto mencionado
- Coincidencias menores (menos de 10 palabras)

Fuentes principales

- 6%  Fuentes de Internet
- 1%  Publicaciones
- 4%  Trabajos entregados (trabajos del estudiante)

Marcas de integridad

N.º de alertas de integridad para revisión

No se han detectado manipulaciones de texto sospechosas.

Los algoritmos de nuestro sistema analizan un documento en profundidad para buscar inconsistencias que permitirían distinguirlo de una entrega normal. Si advertimos algo extraño, lo marcamos como una alerta para que pueda revisarlo.

Una marca de alerta no es necesariamente un indicador de problemas. Sin embargo, recomendamos que preste atención y la revise.

FUENTE DE FINANCIAMIENTO

La presente tesis intitulada “Determinación de la actividad lítica de bacteriófagos obtenidos de aguas de la cuenca del río Huatanay contra cepas de *Escherichia coli* multidrogo resistentes” fue subvencionada mediante el PROGRAMA YACHAYNINCHIS WIÑARINANPAQ, bajo Resolución Nro. R-1653-2023-UNSAAC.

DEDICATORIA

A Dios por darme la fortaleza y no dejar que me rindiera en este proceso, a mis queridos padres Edwin y Felicitas por todo el amor, apoyo y compañía.

A mis hermanos George, Anabel y Danilo, por siempre estar pendientes de mí y apoyarme incondicionalmente; en especial mi querida hermanita, por ser mi compañera durante todos estos años que vivimos juntas en Cusco, por alentarme siempre y nunca dejarme sola a pesar de todas las adversidades que pasamos.

A Wanderley, mi compañero de tesis y vida.

DEDICATORIA

A mi madre Yovana Ureta Garay que me enseñó a nunca rendirme, todo siempre por ella y para ella

A toda mi familia

A mis amigos

A Briseida

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, a la Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela Profesional de Biología, por habernos acogido durante todos los años de formación académica y culminación de tesis.

A nuestra mentora y asesora la MSc. Elsa Gladys Aguilar Ancori, por toda la enseñanza impartida a lo largo de nuestra formación académica, por el apoyo incondicional, la paciencia, fortaleza, la confianza, los consejos dados y por prepararnos para la vida profesional.

A nuestra co-asesora la MSc. Marishani Marín Carrasco, por apoyarnos siempre durante la realización del presente trabajo y por la amistad brindada.

A nuestro co-asesor el MSc. Antori Alegre Quijano, por el apoyo brindado durante todo el proceso de realización de la tesis.

A la MSc. Mayday Stacey Soto Alvarez por el acompañamiento y consejos brindados durante la elaboración de la presente tesis.

Al Laboratorio de Virología Clínica y Molecular de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos dirigido por el Dr. Enrique Walter Mamani Zapana y a su equipo de trabajo, por el cálido recibimiento y el apoyo brindado en sus instalaciones para desarrollar una sección de la parte experimental de la tesis.

Al Dr. Abraham Omar Espinoza Culupú, por apoyarnos en el análisis bioinformático de las secuencias del material genético de los bacteriófagos.

Al Laboratorio Institucional de Microbiología e Inmunología, por acogernos en sus instalaciones y brindarnos todas las facilidades, así como también a todos los integrantes que en algún momento nos brindaron su apoyo y amistad.

INDICE

RESUMEN	I
INTRODUCCIÓN	II
PROBLEMA	IV
JUSTIFICACIÓN	VI
OBJETIVOS	VIII
HIPÓTESIS	IX
VARIABLES	X
CAPITULO I	1
MARCO TEÓRICO	1
1.1 Antecedentes	1
1.1.1 Internacionales	1
1.1.2 Nacionales	4
1.2 Generalidades de los bacteriófagos	5
1.2.1 Clasificación taxonómica	6
1.2.2 Estructura de los bacteriófagos	8
1.2.3 Ciclo de replicación de los bacteriófagos	10
1.2.3.1 Adsorción	11
1.2.3.2 Penetración	12
1.2.3.3 Replicación	13
1.2.3.4 Ensamblaje	13
1.2.3.5 Lisis y Liberación	14
1.3 Caracterización biológica de los bacteriófagos	14
1.3.1 Rango de hospedero de los bacteriófagos	14
1.3.2 Multiplicidad óptima de infección (MOI) de los bacteriófagos	15
1.3.3 Curva de un paso de los bacteriófagos	15
1.4 Caracterización fisicoquímica de los bacteriófagos	16
1.4.1 Termo estabilidad de los bacteriófagos	16
1.4.2 Estabilidad al pH de los bacteriófagos	16
1.4.3 Sensibilidad al cloroformo	17

1.5	Aplicaciones de los bacteriófagos.....	17
1.6	Aspecto general de <i>Escherichia coli</i>	17
1.6.1	Taxonomía.....	19
1.6.2	Resistencia a los antibióticos.....	19
CAPITULO II.....		24
MATERIALES Y METODOS.....		24
2.1	Área de estudio	24
2.1.1	Ubicación geográfica.....	24
2.1.2	Determinación de puntos de muestreo	24
2.2	Materiales.....	27
2.2.1	Material biológico	27
2.2.2	Equipos.....	27
2.2.3	Medios de cultivo	28
2.2.4	Reactivos	28
2.2.5	Material de laboratorio	28
2.2.6	Material de campo.....	29
2.2.7	Otros	29
2.3	Tipo de investigación:.....	30
2.4	Flujograma	31
2.5	Métodos	32
2.5.1	Recolección de muestras de aguas de la cuenca del rio Huatanay	32
2.5.2	Activación de cepas de <i>Escherichia coli</i> NCTC 13476 y <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218 multidrogo resistentes (MDR)	33
2.5.3	Curva de crecimiento de <i>Escherichia coli</i> NCTC 13476 y <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	34
2.5.4	Aislamiento de bacteriófagos líticos a partir de muestras de aguas de la cuenca del rio Huatanay usando como hospedero a <i>Escherichia coli</i> NCTC 13476 y <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	35
2.5.5	Prueba en Zona (Spot Test).....	36
2.5.6	Método de la bicapa de agar.....	37
2.5.7	Purificación de bacteriófagos líticos	38

2.5.8	Amplificación de bacteriófagos	38
2.5.9	Titulación de bacteriófagos	39
2.5.10	Caracterización biológica de los bacteriófagos líticos aislados.....	39
2.5.10.1	Rango de hospedero de bacteriófagos líticos contra <i>Escherichia coli</i> NCTC 13476, <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218, cepas clínicas de <i>Escherichia coli</i> MDR y cepas de diferentes especies MDR	39
2.5.10.2	Multiplicidad Optima de Infección (MOI) de los bacteriófagos líticos HEc4I, HEc5I, HEc2II y HEc7II.....	41
2.5.10.3	Constante de adsorción de los bacteriófagos líticos HEc4I, HEc5I, HEc2II y HEc7II.....	42
2.5.10.4	Curva de un paso de los bacteriófagos líticos HEc4I, HEc5I, HEc2II y HEc7II	43
2.5.11	Caracterización Fisicoquímica de los bacteriófagos líticos HEc4I, HEc5I, HEc2II y HEc7II usando como hospedero a <i>Escherichia coli</i> NCTC 13476 y <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	45
2.5.11.1	Termo estabilidad de los bacteriófagos líticos HEc4I, HEc5I, HEc2II y HEc7II.....	45
2.5.11.2	Resistencia al pH de los bacteriófagos líticos HEc4I, HEc5I, HEc2II y HEc7II	45
2.5.11.3	Sensibilidad al Cloroformo de los bacteriófagos líticos HEc4I, HEc5I, HEc2II y HEc7II.....	46
2.5.12	Identificación por biología molecular de los bacteriófagos líticos.....	47
CAPITULO III		49
RESULTADOS Y DISCUSION		49
3.1	Activación de cepas de <i>Escherichia coli</i> NCTC 13476 y <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218 multidrogo resistentes (MDR).....	49
3.2	Curva de crecimiento de <i>Escherichia coli</i> NCTC 13476 y <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218 multidrogo resistentes (MDR).....	49
3.3	Aislamiento de bacteriófagos líticos a partir de muestras de aguas de la cuenca del rio Huatanay usando como hospedero a <i>Escherichia coli</i> NCTC 13476 y <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218.....	53

3.4	Aislamiento de bacteriófagos por el método de la bicapa de agar usando como hospedero a <i>Escherichia coli</i> NCTC 13476 y <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218.....	57
3.5	Purificación y Amplificación de bacteriófagos.....	60
3.6	Caracterización biológica de los bacteriófagos líticos aislados.....	63
3.6.1	Rango de hospedero de bacteriófagos líticos contra <i>Escherichia coli</i> NCTC 13476, <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218, cepas clínicas de <i>Escherichia coli</i> MDR y cepas de diferentes especies MDR	63
3.6.2	Multiplicidad óptima de infección (MOI) de los bacteriófagos líticos HEc4I, HEc5I, HEc2II y HEc7II.....	72
3.6.3	Constante de adsorción de los bacteriófagos líticos HEc4I, HEc5I, HEc2II, HEc7II	74
3.6.4	Curva de un paso de los bacteriófagos líticos HEc4I, HEc5I, HEc2II, HEc7II	77
3.7	Caracterización Fisicoquímica de los bacteriófagos líticos HEc4I, HEc5I, HEc2II y HEc7II usando como hospedero a <i>Escherichia coli</i> NCTC 13476 y <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218.....	81
3.7.1	Termo estabilidad de los bacteriófagos líticos HEc4I, HEc5I, HEc2II y HEc7II	81
3.7.2	Resistencia al pH de los bacteriófagos HEc4I, HEc5I, HEc2II y HEc7II ...	85
3.7.3	Sensibilidad al Cloroformo de los bacteriófagos HEc4I, HEc5I, HEc2II y HEc7II	89
3.8	Identificación por biología molecular de los bacteriófagos líticos	91
	CONCLUSIONES.....	98
	RECOMENDACIONES	100
	BIBLIOGRAFIA.....	101
	ANEXOS.....	119

INDICE DE TABLAS

Tabla 1 Taxonomía de la clase Caudoviricetes según la taxonomía internacional del ICTV	8
Tabla 2 Coordenadas UTM de los puntos de muestreo	25
Tabla 3 Codificación de los puntos de muestreo de aguas de la cuenca del rio Huatanay	32
Tabla 4 Curva de crecimiento de <i>Escherichia coli</i> NCTC 13476	50
Tabla 5 Curva de crecimiento de <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	51
Tabla 6 Actividad lítica de bacteriófagos usando como hospedero a <i>Escherichia coli</i> presentes en las muestras de agua de la cuenca del rio Huatanay correspondiente a época de secas (mes de agosto)	53
Tabla 7 Actividad lítica de bacteriófagos de <i>Escherichia coli</i> presentes en las muestras de agua de la cuenca del rio Huatanay correspondiente a época de lluvias (mes de marzo)	55
Tabla 8 Bacteriófagos aislados a partir de placas de lisis por medio del método de la bicapa de agar para <i>Escherichia coli</i>	57
Tabla 9 Características macroscópicas de las placas de lisis o calvas de los bacteriófagos purificados para <i>Escherichia coli</i>	61
Tabla 10 Rango de hospedero de 34 bacteriófagos expresado en número y porcentaje contra 48 cepas lisadas de <i>Escherichia coli</i> multidrogo resistentes (MDR) aislados de pacientes hospitalarios	64
Tabla 11 Recodificación de bacteriófagos líticos contra <i>Escherichia coli</i>	68
Tabla 12 Rango de hospedero de los bacteriófagos F4, F11, F20 y F28 contra cepas bacterianas multidrogo resistentes (MDR) de diferentes especies	69
Tabla 13 Bacteriófagos líticos seleccionados para la caracterización biológica y fisicoquímica	71
Tabla 14 Multiplicidad óptima de infección (MOI) de bacteriófagos líticos HEc4I, HEc5I, HEc2II y HEc7II para <i>Escherichia coli</i>	72
Tabla 15 Ensayos de adsorción de bacteriófagos líticos HEc4I y HEc5I usando como hospedero a <i>Escherichia coli</i> NCTC 13476	74
Tabla 16 Ensayos de adsorción de bacteriófagos líticos HEc2II y HEc7II usando como hospedero a <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	75

Tabla 17 Curva de un paso de los bacteriófagos líticos HEc4I y HEc5I, HEc2II y HEc7II para <i>Escherichia coli</i>	77
Tabla 18 Termo estabilidad de bacteriófagos líticos HEc4I y HEc5I usando como hospedero <i>Escherichia coli</i> NCTC 13476	82
Tabla 19 Termo estabilidad de bacteriófagos líticos HEc2II y HEc7II usando como hospedero a <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	83
Tabla 20 Resistencia al pH de los bacteriófagos líticos HEc4I y HEc5I usando como hospedero a <i>Escherichia coli</i> NCTC 13476	85
Tabla 21 Resistencia al pH de los bacteriófagos líticos HEc2II y HEc7II usando como hospedero a <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	87
Tabla 22 Sensibilidad al cloroformo de los bacteriófagos líticos HEc4I y HEc5I usando como hospedero a <i>Escherichia coli</i> NCTC 13476	89
Tabla 23 Sensibilidad al cloroformo de los bacteriófagos líticos HEc2II y HEc7II usando como hospedero a <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	89
Tabla 24 Prueba de Normalidad de Shapiro-Wilk.....	130
Tabla 25 Prueba no paramétrica de Rangos de Wilcoxon.....	130
Tabla 26 Rango de hospedero de los 34 bacteriófagos líticos frente a cepas de <i>Escherichia coli</i> multidrogo resistentes (MDR)	131
Tabla 27 Tabla cruzada de los hospederos <i>Escherichia coli</i> NCTC 13476 y <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218 mediante la actividad lítica de los 34 bacteriófagos.	133
Tabla 28 Pruebas estadística de chi-cuadrado	133

INDICE DE FIGURAS

Figura 1 Estructura morfológica de bacteriófagos	10
Figura 2 Ciclo infeccioso de los bacteriófagos.....	11
Figura 3 Proceso de adsorción de los bacteriófagos e inyección del genoma viral.....	12
Figura 4 Esquema de la curva de un paso	16
Figura 5 Mapa de los doce puntos de muestreo de la cuenca del río Huatanay	26
Figura 6 Flujograma para la determinación de la actividad lítica de bacteriófagos obtenidos de aguas de la cuenca del río Huatanay	31
Figura 7 Diagrama de la activación de cepas liofilizadas de <i>Escherichia coli</i>	33
Figura 8 Diagrama del experimento de la curva de crecimiento de <i>Escherichia coli</i>	34
Figura 9 Diagrama del aislamiento de bacteriófagos a partir de muestras de aguas de la cuenca del río Huatanay usando como hospedero a <i>Escherichia coli</i> NCTC 13476 y <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	35
Figura 10 Diagrama de la Prueba en Zona (Spot Test)	36
Figura 11 Diagrama del método de la bicapa de agar	37
Figura 12 Diagrama de la purificación de bacteriófagos de <i>Escherichia coli</i>	38
Figura 13 Diagrama de la amplificación de bacteriófagos de <i>Escherichia coli</i>	39
Figura 14 Diagrama de la reactivación de cepas clínicas de <i>Escherichia coli</i> multidrogo resistentes (MDR) y cepas de diferentes especies	41
Figura 15 Diagrama del experimento de la determinación de la Multiplicidad Óptica de Infección (MOI) de los bacteriófagos HEc4I, HEc5I, HEc2II y HEc7II	42
Figura 16 Diagrama del experimento de la constante de adsorción de los bacteriófagos HEc4I, HEc5I, HEc2II y HEc7II.....	43
Figura 17 Diagrama del experimento de la curva de un paso de los bacteriófagos HEc4I, HEc5I, HEc2II y HEc7II	44
Figura 18 Diagrama del experimento de termo estabilidad de los bacteriófagos HEc4I, HEc5I, HEc2II y HEc7II	45
Figura 19 Diagrama del experimento de la resistencia al pH de los bacteriófagos HEc4I, HEc5I, HEc2II y HEc7II	46
Figura 20 Diagrama del experimento de la sensibilidad al Cloroformo de los bacteriófagos HEc4I, HEc5I, HEc2II y HEc7II.....	47
Figura 21 Colonias características de <i>Escherichia coli</i> en agar MacConkey.....	49
Figura 22 Curva de crecimiento de <i>Escherichia coli</i> NCTC 13476, mostrando la absorbancia a OD600 del cultivo versus el tiempo de crecimiento (horas)	50

Figura 23 Curva de crecimiento de <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218, mostrando la absorbancia a OD600 del cultivo versus el tiempo de crecimiento (horas)	51
Figura 24 Prueba en zona (spot test) de bacteriófagos usando como hospedero <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218 en época de secas (mes de agosto).....	54
Figura 25 Prueba en zona (spot test) de bacteriófagos usando como hospedero a <i>Escherichia coli</i> NCTC 13476 época de lluvias (mes de marzo).....	55
Figura 26 Prueba en zona (spot test) de bacteriófagos usando como hospedero a <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218 época de lluvias (mes de marzo).....	56
Figura 27 Placas de lisis de bacteriófagos obtenidas mediante el método de la bicapa de agar usando como hospedero a <i>Escherichia coli</i> NCTC 13476	58
Figura 28 Enfrentamiento bacteriófago versus bacteria en caldo TSB	62
Figura 29 Porcentaje de capacidad lítica de bacteriófagos frente a cepas <i>Escherichia coli</i> multidrogo resistente (MDR).....	65
Figura 30 Rango de hospedero de bacteriófagos líticos contra cepas de <i>Escherichia coli</i> multidrogo resistente (MDR) aislados de pacientes hospitalarios.....	66
Figura 31 Rango de hospedero de los bacteriófagos F4, F11, F20 y F28 contra cepas bacterianas multidrogo resistentes (MDR) de diferentes especies	69
Figura 32 Multiplicidad óptima de infección (MOI) de bacteriófagos líticos HEc4I y HEc5I usando como hospedero a <i>Escherichia coli</i> NCTC 13476.....	72
Figura 33 Multiplicidad óptima de infección (MOI) de bacteriófagos líticos HEc2II y HEc7II usando como hospedero a <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	73
Figura 34 Ensayos de adsorción de bacteriófagos líticos HEc4I y HEc5I usando como hospedero a <i>Escherichia coli</i> NCTC 13476	75
Figura 35 Ensayos de adsorción de bacteriófagos líticos HEc2II y HEc7II usando como hospedero a <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	76
Figura 36 Curva de un paso del bacteriófago lítico HEc4I usando como hospedero a <i>Escherichia coli</i> NCTC 13476	78
Figura 37 Curva de un paso del bacteriófago lítico HEc5I usando como hospedero a <i>Escherichia coli</i> NCTC 13476	78
Figura 38 Curva de un paso del bacteriófago lítico HEc2II usando como hospedero a <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	79
Figura 39 Curva de un paso del bacteriófago lítico HEc7II usando como hospedero a <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	80

Figura 40 Termo estabilidad de bacteriófagos líticos HEc4I y HEc5I usando como hospedero a <i>Escherichia coli</i> NCTC 13476	82
Figura 41 Termo estabilidad de bacteriófagos líticos HEc2II y HEc7II usando como hospedero a <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	83
Figura 42 Resistencia al pH de los bacteriófagos líticos HEc4I y HEc5I usando como hospedero a <i>Escherichia coli</i> NCTC 13476	86
Figura 43 Resistencia al pH de los bacteriófagos líticos HEc2II y HEc7II usando como hospedero a <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	87
Figura 44 Porcentaje de reducción de sensibilidad al cloroformo de los bacteriófagos líticos HEc4I y HEc5I usando como hospedero <i>Escherichia coli</i> NCTC 13476 y HEc2II y HEc7II usando como hospedero <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218.....	89
Figura 45 Tabla de comparación del bacteriófago HEc4I.....	92
Figura 46 Tabla de comparación del bacteriófago HEc5I.....	93
Figura 47 Dendrograma circular donde se observa a los bacteriófagos HEc4I y HEc5I	95
Figura 48 Climatodiagrama del año 2023	128
Figura 49 Climatodiagrama del año 2024	129
Figura 50 Fotografías de muestreo de aguas de la cuenca del rio Huatanay	134
Figura 51 Fotografías de filtrado de aguas obtenidas de la cuenca del rio Huatanay ..	135
Figura 52 Fotografía del enriquecimiento de aguas de la cuenca del rio Huatanay	135
Figura 53 Fotografías del procesamiento por el método de bicapa de agar para el aislamiento de bacteriófagos	136
Figura 54 Fotografías de procesamiento de rango de hospedero de bacteriófagos	137
Figura 55 Fotografías de procedimientos de caracterización físico química de los bacteriófagos.....	138

TABLA DE ANEXOS

Anexo 1 Ficha técnica de información de <i>Escherichia coli</i> NCTC 13476	119
Anexo 2 Ficha técnica de información de <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	123
Anexo 3 Datos meteorológicos del año 2023.....	128
Anexo 4 Datos meteorológicos del año 2024.....	129
Anexo 5 Pruebas estadísticas para la comparación de los bacteriófagos aislados en época de lluvias (mes de marzo 2024) y época de secas (mes de agosto 2023).....	130
Anexo 6 Tabla 26 Rango de hospedero de los 34 bacteriófagos líticos frente a cepas de <i>Escherichia coli</i> multidrogo resistentes (MDR)	131
Anexo 7 Pruebas estadísticas para la comparación de la actividad lítica de los 34 bacteriófagos frente a los hospederos <i>Escherichia coli</i> NCTC 13476 y <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	133
Anexo 8 Fotografías de muestreo y procesamiento	134
Anexo 9 Secuencia de nucleótidos del material genético del bacteriófago HEc4I	139
Anexo 10 Secuencia de nucleótidos del material genético del bacteriófago HEc5I	140

RESUMEN

Escherichia coli es una bacteria Gram negativa perteneciente a la microbiota natural del ser humano y animales homeotermos, en su estado patógeno es causante de enfermedades cuyo tratamiento es el uso de antibióticos; pero, en los últimos años se viene registrando resistencia bacteriana provocando miles de muertes a nivel mundial, por lo que se busca estrategias para controlar este problema con el uso de bacteriófagos. Los bacteriófagos son virus de bacterias y se vienen utilizando en diferentes industrias para el control y eliminación de cepas contaminantes y patógenas de *Escherichia coli*. Los bacteriófagos al encontrarse en todos los entornos del planeta, su aislamiento es más sencillo que la elaboración de nuevos antibióticos. En el presente estudio se aislaron 34 bacteriófagos a partir de muestras de aguas de la cuenca del río Huatanay utilizando el método de la bicapa de agar, siendo los bacteriófagos HEc4I, HEc5I, HEc2II y HEc7II elegidos por presentar mayor actividad lítica contra cepas de *Escherichia coli* multidrogo resistentes aislados de pacientes clínicos. Se realizó la caracterización biológica de cada uno de ellos resultando ser específicos para cepas de *Escherichia coli*; los bacteriófagos mencionados tuvieron una Multiplicidad Óptima de Infección (MOI) de 0.01, la constante de adsorción varía de 10 a 20 minutos, en la curva de crecimiento HEc4I, HEc5I, HEc2II y HEc7II presentaron periodos de latencia de 5, 5, 10 y 5 minutos y tamaños de explosión entre 376, 111, 3256 y 9 UFP/célula infectada respectivamente. En la caracterización físico química, presentaron termo estabilidad de 30°C a 50°C incluida la temperatura ambiente, teniendo descenso a 60°C e inactivándose completamente a 70°C y 80°C; además, presentan estabilidad en un rango de pH 3-11, siendo inactivado a valores superiores e inferiores a estos, a excepción de HEc5I que presentó actividad lítica a pH 12, los 4 bacteriófagos presentaron resistencia al cloroformo. El bacteriófago HEc4I posee 137,691 nucleótidos y HEc5I 137,919 nucleótidos, fueron identificados por secuenciamiento Illumina NGS perteneciendo al género *Vequintavirus*.

Palabras clave: Bacteriófagos, *Vequintavirus*, *Escherichia coli*, rango de hospedero, actividad lítica.

INTRODUCCIÓN

Uno de los microorganismos más versátiles a nivel mundial es la bacteria *Escherichia coli*, perteneciente a la microbiota intestinal normal de humanos y animales homeotermos, que en su estado comensal llega a ser beneficiosa para su huésped (Necel et al., 2021). Esta bacteria puede ser un contaminante o un patógeno, este último se presenta cuando adquiere genes de virulencia capaces de causar un vasto espectro de enfermedades intestinales y extraintestinales (Pakbin et al., 2021), donde el tratamiento por excelencia es el uso de antibióticos; la automedicación, administración empírica y una errada prescripción médica, son factores de riesgo que a lo largo de los años vienen acarreado la aparición de la resistencia bacteriana a los antibióticos (Sulayyim et al., 2022), otro medio para la aparición de la resistencia bacteriana es el ambiente, entorno en el cual las bacterias se relacionan unas con otras, permitiendo la transferencia de genes de resistencia por diferentes mecanismos genéticos como plásmidos, integrones y transposones (Larsson & Flach, 2022), estos factores llevaron a una alta presión evolutiva natural donde las bacterias adquieren resistencia con la finalidad de sobrevivir (Pulingam et al., 2022), ocasionando que estas no respondan de manera efectiva a tratamientos con antibióticos.

La OMS viene implementado terapias utilizando agentes biológicos no tradicionales como complemento y alternativa al uso de antibióticos, como bacteriófagos, anticuerpos, agentes antivirulencia y agentes inmunomoduladores (OMS, 2024b). Los bacteriófagos tienen una distribución amplia y cantidad aproximada de 10^{31} en el planeta (Macdonald et al., 2020) que por su gran número y diversidad en tamaño, forma, complejidad y rango de hospedero son capaces de infectar a una célula bacteriana de forma específica, desempeñando un papel muy importante en procesos biológicos y medio ambientales (Keen, 2015).

La capacidad replicativa del bacteriófago mediante su ciclo infeccioso permite eliminar una célula bacteriana específica, de modo que los bacteriófagos pueden ser considerados como agentes antibacterianos potenciales; más aún, contra infecciones producidas por bacterias multidrogo resistentes (MDR), representando así una posible solución (Gibb & Hadjiargyrou, 2021). De este modo, el uso terapéutico de bacteriófagos se plantea como un tratamiento alternativo para detener el avance de bacterias resistentes a los antibióticos en diferentes ámbitos, que abarcan campos de sanidad vegetal, salud animal, industria alimentaria y salud humana, este último aún

se encuentra en estudios de fase I y II (Huang et al., 2022). El uso de bacteriófagos depende de la especificidad, la concentración y la estabilidad que estos poseen para ser candidatos a estudios terapéuticos (Malik et al., 2017).

La presente investigación se realizó en los ambientes del Laboratorio Institucional de Microbiología e Inmunología (LIMI) de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco. Se aislaron bacteriófagos líticos a partir de las aguas de la cuenca del río Huatanay, utilizando cepas de *Escherichia coli* NCTC 13476 (resistente a carbapenemasa) y *Escherichia coli* ATCC 35218 (resistente a betalactamasa de espectro extendido) como hospederos, también se enfrentaron los bacteriófagos contra cepas de pacientes clínicos de *Escherichia coli* multidrogo resistentes y cepas de diferentes especies pertenecientes al cepario del Laboratorio Institucional de Microbiología e Inmunología (LIMI), donde se determinó la actividad lítica de los bacteriófagos contra estas cepas bacterianas. Por otro lado, se realizó la caracterización biológica y fisicoquímica de los bacteriófagos, además de la identificación molecular de 2 bacteriófagos.

PROBLEMA

La resistencia bacteriana a los antibióticos es un problema crónico de salud pública a nivel mundial, influenciando de diferente manera en países desarrollados y en vías de desarrollo; cada año mueren miles de personas a causa de enfermedades causadas por bacterias resistentes a los antibióticos, se estima que para el año 2050 habrá 10 millones de muertes en todo el mundo a causa de la resistencia a los antibióticos según el estudio realizado por O'Neill (Tang et al., 2023). En un estudio realizado por la Universidad de Washington en el 2019, reportaron que 4,95 millones de muertes en el mundo están relacionadas a la resistencia bacteriana, destacando a *Escherichia coli* como uno de los principales patógenos (Murray et al., 2022), esta bacteria está considerada dentro de la lista de patógenos bacterianos prioritarios de la OMS para el año 2024, catalogándola como un agente causante de mortalidad media a alta por su resistencia a carbapenémicos y cefalosporinas de tercera generación, perteneciendo a los microorganismos de peligro crítico (OMS, 2024a), por la capacidad que tiene este patógeno de causar infecciones intrainestinales y extraintestinales (Pakbin et al., 2021). Los datos asociados a decesos a causa de *Escherichia coli* resistente a antibióticos y bacterias de otras especies se presenta con mayor influencia en países del continente africano con 27,3 muertes por cada 100000 habitantes y más baja en Australasia (Australia, Melanesia y Nueva Zelanda) con 6,5 muertes por cada 100000 habitantes, donde las muertes directas por *Escherichia coli* representa el 23,4 % asociado a la resistencia de los antibióticos (Antimicrobial Resistance Collaborators, 2022) y en Estados Unidos de un aproximado de 2,8 millones de infecciones por bacterias resistentes a los antibióticos mueren 35000 personas a causa de ello (FDA, 2024).

En el Perú existe una creciente presencia de cepas con resistencia a los antibióticos, donde Prieto (2024) en su estudio reporta que de 111 muestras el 65,8% presenta resistencia a diversos antibióticos por parte de *Escherichia coli*; por otro lado, se aislaron un total de 70 cepas de *Escherichia coli* de hospitales públicos del Perú, incluido Cusco, los cuales presentaron niveles altos de resistencia a los antibióticos (Marcos-Carbajal et al., 2021). Otra investigación realizada en Urubamba y Moyobamba durante los años 2014 y 2015 determinaron la resistencia a antibióticos de 179 cepas de *Escherichia coli* obteniendo un 34,0% de resistencia (Alzamora et al., 2019).

El aumento de resistencia bacteriana, la reciente manifestación de patógenos virulentos y la carencia de nuevos antibióticos eficaces ha reforzado la importancia del uso de bacteriófagos líticos en terapias por su alta actividad antibacteriana que muestran (Montso et al., 2019). Por ello se vienen desarrollando diversos tipos de terapias con bacteriófagos en campos como la sanidad vegetal donde se utilizan estos agentes para reducir enfermedades ocasionadas por bacterias en plantas, en la industria ganadera se apunta al control de bacterias patógenas que causan daños en animales utilizando bacteriófagos o cócteles de bacteriófagos; en la salud alimentarias los bacteriófagos están siendo considerados una alternativa natural y ecológica para asegurar la inocuidad alimentaria; por último, en la salud humana se vienen desarrollando estudios para la aplicación de bacteriófagos como terapia complementaria al uso de antibióticos, estando aún estos estudios en fases clínicas de tipo I y II (Huang et al., 2022). Los bacteriófagos al ser muy específicos tienen la ventaja de realizar menos daño a la microbiota y ecología del cuerpo humano y animales, a comparación del uso de antibióticos (Domingo-Calap & Delgado-Martínez, 2018).

Los bacteriófagos pueden ser aislados de diferentes fuentes de aguas y debido a su disponibilidad en el ambiente, pueden ser considerados como una alternativa para el control de bacterias resistentes a los antibióticos (Sada & Tessema, 2024), como en los campos ya mencionados anteriormente.

En este contexto, se registran para el Perú una gran cantidad de cepas con resistencia a los antibióticos y surge la necesidad de realizar investigaciones más profundas y específicas para nuestra región, como el presente trabajo de investigación donde se aislaron y caracterizaron bacteriófagos con actividad lítica obtenidos de las aguas de la cuenca del río Huatanay frente a *Escherichia coli* multidrogo resistentes. En consecuencia, nuestra pregunta de investigación fue:

¿Se podrá determinar la actividad lítica de bacteriófagos obtenidos de las aguas de la cuenca del río Huatanay contra cepas de *Escherichia coli* multidrogo resistentes?

JUSTIFICACIÓN

Diversas organizaciones gubernamentales como la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura (FAO), la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) introdujeron el termino de “One Health” mediante el sistema mundial de vigilancia de la resistencia y el uso de antimicrobianos para combatir este problema (Tang et al., 2023), los antibióticos están perdiendo eficacia frente al tratamiento de infecciones bacterianas recurrentes donde estas pueden convertirse en infecciones mortales (Mestrovic et al., 2022), este aumento progresivo de resistencia exige el desarrollo de nuevos antibióticos y programas de control de uso (LaPlante et al., 2022), ya que muchos de estos llegan a ser acumulativos en el ambiente (Zhuang et al., 2021).

En este contexto se busca desarrollar alternativas nuevas, donde el uso de bacteriófagos líticos en terapias parece ser un tratamiento seguro y eficaz por la especificidad del huésped y la seguridad ecológica (Huang et al., 2022) (Żaczek et al., 2022). Los bacteriófagos tienen aplicaciones heterogéneas que van desde la elaboración de productos biopesticidas como AgriPhageTM, Biolyse[®] y agriPHIXTM para tratar patógenos en vegetales; en la industria ganadera se comercializa productos a base de bacteriófagos como Ecolicida[®], EcolicidaPXTM, Finalyse[®] y BAFACOLTM que reducen la contaminación de *Escherichia coli* 0157:H7 en animales (Huang et al., 2022); por otro lado, en la industria alimentaria se comercializan productos a base de bacteriófagos para eliminar patógenos en alimentos de origen animal (productos cárnicos y lácteos) y vegetal (verduras y frutas) (Alomari et al., 2021) como EcoShieldPXTM, PhageGuardETM y SecureShieldE1, siendo estos productos mencionados aprobados por la FDA, EPA, USDA, FSIS y EFSA para su uso y comercialización (Huang et al., 2022). En humanos la terapia a base de bacteriófagos no está aprobado por la FDA, pero pueden llegar a ser usados en situaciones de emergencia como último recurso para tratar infecciones bacterianas resistentes a los antibióticos, como lo viene implementando el Instituto Hirsfeld en Polonia, donde pacientes de diferentes países incluido Perú, buscaron ayuda en el instituto (Żaczek et al., 2022) para encontrar una solución a las enfermedades causadas por bacterias resistentes a los antibióticos. A pesar del éxito que se espera de esta nueva terapia alternativa, es importante demostrar que el uso de bacteriófagos sea segura y no tóxica en humanos (Liu et al., 2021).

Existen reportes de resistencia antimicrobiana de *Escherichia coli* (Murray et al., 2022), frente a este problema, se busca una respuesta efectiva utilizando bacteriófagos como agentes terapéuticos y/o profilácticos para tratar infecciones de bacterias resistentes a los antibióticos (Alomari et al., 2021).

Al tener escasa información sobre bacteriófagos líticos para la región del Cusco, en el presente trabajo se aisló a partir de aguas de la cuenca del río Huatanay bacteriófagos usando como hospedero *Escherichia coli* multidrogo resistente, proponiéndolos como posibles candidatos para desarrollar futuras terapias.

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar la actividad lítica de bacteriófagos obtenidos de aguas de la cuenca del río Huatanay contra cepas de *Escherichia coli* multidrogo resistentes.

Objetivos específicos

- 1 Aislar bacteriófagos líticos a partir de muestras de agua usando como hospedero a cepas de *Escherichia coli* NCTC 13476 y *Escherichia coli* ATCC 35218 multidrogo resistentes.
- 2 Determinar las características biológicas de los bacteriófagos líticos aislados
- 3 Determinar las características fisicoquímicas de los bacteriófagos líticos usando como hospedero a cepas de *Escherichia coli* NCTC y *Escherichia coli* ATCC 35218 multidrogo resistentes.
- 4 Identificar por biología molecular a los bacteriófagos líticos que presentaron características biológicas y fisicoquímicas estables.

HIPÓTESIS

Los bacteriófagos aislados de aguas de la cuenca del río Huatanay tienen actividad lítica contra cepas de *Escherichia coli* multidrogo resistentes.

VARIABLES

Dependiente

- Bacteriófagos líticos contra *Escherichia coli*

Independiente

- Rango de hospedero
- Temperatura
- pH
- Concentración de cloroformo

CAPITULO I

MARCO TEÓRICO

1.1 Antecedentes

1.1.1 Internacionales

Litt & Jaroni (2017), en Oklahoma, obtuvieron 7 bacteriófagos (P-1 a P-7) con actividad lítica a partir de muestras de agua y heces bovinas, para el aislamiento utilizaron la técnica de agar de doble capa. Los bacteriófagos mostraron actividad lítica contra 50 aislados de *Escherichia coli* 0157:H7. Determinaron los ensayos de adsorción, donde todos los bacteriófagos necesitaron de 20 a 80 minutos para que la población inicial se adsorbiera en la superficie de la célula huésped. En la cinética de crecimiento de un solo paso, los bacteriófagos tuvieron un periodo de latencia de 12 a 23 minutos, otros tuvieron un periodo de latencia de 20 a 30 minutos y el tamaño de explosión fue entre 89 y 631 viriones por célula infectada. Probaron la estabilidad de los bacteriófagos sometiéndolos a parámetros fisicoquímicos como pH y temperatura; donde, determinaron su estabilidad a condiciones acidas y alcalinas sometiéndolos durante 24 horas en un rango de pH 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11, mostrando mayor estabilidad a pH 5, sobreviviendo a pH 7 y 9. En cuanto a la termo estabilidad, sometieron a los bacteriófagos a 40°C, 60°C, 70°C y 90° C, resultando estables en el rango de temperatura de 40 a 60 °C, perdiendo la viabilidad entre 70° y 90° C.

Lee et al. (2020), en Corea, aislaron, identificaron y caracterizaron al bacteriófago KFS-EC usando como huésped a *Escherichia coli* 0157:H7 a partir de aguas residuales por el método de bicapa de agar y prueba en zona. En la prueba del rango de hospedero indicaron que era estrictamente específico contra cepas de *Escherichia coli*. Analizaron el efecto de la temperatura a -70°C, -20°C, 4°C, 10°C, 20°C, 30°C, 40°C, 50°C, 60°C y 70°C, determinaron que fue estable entre 4 a 40°C, disminuyendo su actividad 50°C y perdiendo su actividad lítica a 60 y 70°C. Midieron el efecto del pH sometiendo a pH 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12, mostrando actividad lítica relativamente estable a pH 3 y 11, perdiendo actividad a pH 1, 2 y 12. Exponieron a KFS-EC a cloroformo, mostrándose estable a este. Realizaron la curva de un paso con una MOI de 0.01, presentando un periodo de latencia de 30 minutos y un tamaño de ráfaga aproximado de 150 UFP por célula infectada. Los análisis filogenéticos revelaron que pertenece al género

Rb49virus, subfamilia *Tevenrinae* de la familia *Myoviridae*, además el secuenciamiento reveló que posee un genoma de 164.725 pb con un contenido de 40.5 % de GC, además de no tener genes de lisogénica y patogenicidad.

Sjahriani et al. (2021), En Indonesia, aislaron 8 bacteriófagos líticos utilizando como hospedero a *Escherichia coli* 0157:H7 a partir de muestras de aguas residuales ambientales, usaron la técnica de la bicapa de agar para el aislamiento y purificación de los bacteriófagos. En cuanto al rango de hospedero, el fago 3, fago 4 y fago 8 infectaron a *Escherichia coli* diarreica atípica y el fago 1, fago 2, fago 3 y fago 5 lisaron de forma significativa a *Escherichia coli* 0157:H7.

Ullah et al. (2021), en Pakistán, del efluente de aguas residuales aislaron y purificaron al fagoAS1 utilizando como hospedero a *Escherichia coli* S2 por el método de prueba en zona y el método de bicapa de agar. Mediante el método de prueba en zona determinaron el rango de hospedero del fagoAS1 utilizando cepas de *Escherichia coli*, además de otras cepas Gram positivas y negativas, mostrando alta especificidad solo por su hospedero. Para la termo estabilidad del fagoAS1 fue sometido a temperaturas 25°C, 37°C, 50°C, 60°C, 70°C y 80°C, donde de 25°C a 60°C tuvo una óptima actividad lítica, reduciéndose a 70°C y perdiendo la actividad a 80°C. También expusieron al fagoAS1 a rangos de pH 1, 3, 5, 7, 9, 11, y 13, donde tuvo una actividad lítica óptima en un rango de pH 5 a 11, inactivándolo a pH 1, 3 y 13.

Abdelrahman et al. (2022), en Egipto, aislaron y caracterizaron a los bacteriófagos ZCEC10, ZCEC11, ZCEC12 obtenidos de aguas residuales, usando como hospedero *Escherichia coli* O18 utilizando el método de bicapa de agar. Determinaron el rango de hospedero usando el método de prueba en zona contra cepas de *Escherichia coli* y *Salmonella spp*, resultando ser líticos contra 5 cepas de *Escherichia coli*. Evaluaron la termo estabilidad sometiéndolos a temperaturas de -20°C, 4°C, 37°C, 50°C, 60°C, 70°C, 75°C y 80°C, el título de los 3 bacteriófagos se mantuvieron estables a -20°C, 4°C, 37°C, 50°C, 60°C, a 70°C, el título se mantuvo estable para ZCEC12 a 70°C y disminuyó el título para ZCEC10 y ZCEC11, a 80°C los 3 bacteriófagos tuvieron una caída drástica de los títulos. Expusieron a valores de pH 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12, donde, ZCEC12 fue viable de pH 4 a pH 11 a comparación de ZCEC10 y ZCEC11 que disminuyeron en sus títulos; a pH 2, 3 y 12 los bacteriófagos se inactivaron

completamente. En el análisis bioinformático del secuenciamiento del material genético de los bacteriófagos demostraron que poseen genoma de ADN bicatenario de 45 kpb, revelando que pertenecen al orden *Caudovirales*, familia *Siphoviridae*.

Fikadu et al. (2024), en Jimma (Etiopía), aislaron 3 bacteriófagos líticos VBO-*E. coli* 4307, VBW-*E. coli* 4191 y VBA-*E. coli* 4307R a partir de aguas residuales utilizando 2 cepas de *Escherichia coli* MDR como hospederos, determinaron la actividad lítica de los bacteriófagos mediante la prueba en zona. Aislaron y purificaron los bacteriófagos por medio del método de bicapa de agar, donde obtuvieron placas de lisis con diámetro aproximado de 1-2 mm. En el rango de hospedero enfrentaron a los bacteriófagos contra cepas de *Escherichia coli* MDR y *Escherichia coli* sensibles, además de cepas de otras especies, donde VBO-*E. coli* 4307 y VBO-*E. coli* 4191 lisaron al 50% de los aislados de *Escherichia coli*, exceptuando las otras especies. Para la prueba de termo estabilidad incubaron a temperaturas de 25°, 37°, 50°, 70° y 90° C, donde a 37°C se obtuvieron títulos más altos, a 50°C los bacteriófagos tuvieron el título más bajo y a 90°C no se obtuvieron placas de lisis. Expusieron a los bacteriófagos a pH 2, 4, 7, 10 y 12, obteniendo un título alto a pH 7, pocas placas de lisis a pH 4 y 10 pero no se observaron placas de lisis a pH 2 y 12. También sometieron a los bacteriófagos a cloroformo al 99 %, donde los bacteriófagos tratados con este solvente mostraron un efecto menor en comparación al control.

Nazir et al. (2024), en China, estudiaron a dos bacteriófagos IME177 e IME267 que fueron aislados a partir de aguas residuales de un hospital, usando como hospederos a *Escherichia coli* 1.054 y *Escherichia coli* 1.731 MDR. Determinaron el rango de hospedero utilizando 59 de cepas clínicas de *Escherichia coli*. Presentaron MOI óptima de 0.01, el periodo de latencia para IME177 fue de 60 min y para IME267 fue de 80 minutos aproximadamente. Ambos bacteriófagos mantuvieron su termo estabilidad a 40°C y 50°C, reduciendo su título entre 60°C y 70°C e inactivándose a los 80°C. Evaluaron la estabilidad de los bacteriófagos de pH 2 a 14, donde fueron estables de pH 4 a 10, reduciendo su título a pH menores y pH 11, inactivándose a pH 12 y 13. Los bacteriófagos presentaron ligera sensibilidad al cloroformo. Identificaron a los bacteriófagos mediante secuenciamiento, indicando que pertenecen al género

Kayfunavirus y *Suceptinavirus* de la familia *Autographiviridae* y subfamilia *Gordonclarkvirinae*, además ambos bacteriófagos poseen un DNA bicatenario, donde IME177 tuvo un genoma de 39.224 pb con un contenido de GC de 50%, mientras que IME267 un genoma de 76.631 pb con 40 % de GC.

Sada & Tessema (2024), en Addis Abeba (Etiopia), a partir de diversas fuentes de agua obtuvieron 17 bacteriófagos usando como hospederos 6 cepas *Escherichia coli* diarreogénicas MDR utilizando el método de bicapa de agar. Realizaron el rango de hospedero contra cepas de *Escherichia coli* y 3 cepas patógenas como *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, *Klebsiella pneumoniae* mediante la prueba en zona. Los bacteriófagos presentaron MOI óptimas de 1, 0.1 y 0.01. En la curva de un paso los bacteriófagos tuvieron un periodo de latencia entre 10 y 15 minutos, con un tamaño de explosión de 87 y 364 viriones por célula. Determinaron la sensibilidad de los bacteriófagos a pH 3, 5, 7, 9 y 11, donde mostraron viabilidad de pH 5 a 9, disminuyendo sus títulos a pH 3 y 11. Para la termo estabilidad incubaron a los bacteriófagos a temperaturas de 25°C, 37°C, 70°C y 90°C, donde permanecieron estables entre 25° y 70°C, teniendo una viabilidad óptima de 37°C. Mediante biología molecular identificaron que los bacteriófagos pertenecen al orden *Caudovirales*, donde 11 pertenecen a la familia *Myoviridae* y 6 pertenecen *Siphoviridae* y *Podoviridae*.

1.1.2 Nacionales

Punil (2017), en Lima, aisló a partir de muestras de aguas residuales de la planta de tratamiento “La Taboada” y de un camal frigorífico “La Colonial” al bacteriófago Φ GF1, usando como hospedero a *Escherichia coli* ATCC 25922. Aisló y purificó al bacteriófago por el método de la bicapa de agar. Efectuó el rango de hospedero de Φ GF1 contra cepas de *Escherichia coli* y cepas de otras especies, como *Shigella*, *Salmonella*, *Proteus* y *Enterobacter*, incluyendo otras Gram negativas y positivas, siendo Φ GF1 lítico contra cepas de *Escherichia coli* y *Shigella sonnei* ATCC 25931. Además, determinó la curva de un paso con una MOI optima de 0.01, teniendo un periodo de latencia de 15 minutos y un tamaño de explosión aproximado de 85 bacteriófagos por célula infectada. Para la termo estabilidad Φ GF1 fue expuesto a temperaturas de 40°C, 50°C, 60°C, 70°C y 80°C, donde a 40°C y 50°C no hubo una reducción del título de Φ GF1, a 60°C tuvo una reducción significativa en el título, siendo inactivado completamente a 70°C y

80°C. Para la resistencia a la acidez y alcalinidad, ΦGF1 fue sometido a pH 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10, manteniéndose estable a pH 5, 6, 7 y 8, a pH 9 redujo su título hasta un 33%, a pH 10 en un 54% y a pH 3 y 4 fue afectado notablemente. Estimó la sensibilidad al cloroformo, mostrándose ΦGF1 resistente a este solvente orgánico.

1.2 Generalidades de los bacteriófagos

Los virus actualmente son denominados como nanoestructuras que buscan persistir en el universo. Carecen de organelos y son incapaces de replicarse por su cuenta debido a que necesitan de la maquinaria metabólica de su huésped para su replicación, cuando se encuentran de manera libre son denominadas “viriones”. Su material genético puede ser DNA o RNA a partir del cual inicia el proceso de replicación sintetizando proteínas y enzimas, necesarias para generar su progenie viral. A pesar de ser sencillamente estructurales a comparación de bacterias, protozoarios, plantas y animales poseen características sobresalientes como: contar con material genético (DNA o RNA), evolución constante, alta especificidad y alta variabilidad (Pérez, 2020; López, 2020 & Córdoba, 2022).

De acuerdo a la especificidad existen virus capaces de infectar células bacterianas denominados bacteriófagos, considerados como parásitos obligados. Estos virus son los más abundantes de la tierra con una población estimada de 10^{31} (Macdonald et al., 2020). Están presentes en humanos, animales, agua, suelo y son capaces de mantener un equilibrio entre el ambiente controlando la sobrepoblación de bacterias evitando así, su proliferación exacerbada (Talavera-González & Talavera-Rojas, 2021). Los bacteriófagos actúan como modelos y herramientas que facilitan el entendimiento de procesos biológicos (Węgrzyn, 2022) cumpliendo un papel importante en la composición de las comunidades bacterianas impactando en la regulación de la homeostasis en entornos naturales (Batinovic et al., 2019).

Los primeros reportes oficiales de los bacteriófagos lo propone el científico Frederick William Twort, que planteó la hipótesis que existía un virus ultramicroscópico transmisible con habilidad lítica sobre bacterias y el término “bacteriófago” fue acuñado por Félix Hubert d’Herelle cuando trataba de sintetizar una vacuna contra la bacteria *Shigella*, en sus investigaciones describe a estos virus como microbios invisibles que combatían exclusivamente a estos (Talavera-González & Talavera-Rojas, 2021).

1.2.1 Clasificación taxonómica

La primera clasificación fue realizada por David Baltimore en función de las vías de expresión genómica, tomando en cuenta la estructura del ácido nucleico y el proceso de síntesis de ARNm. Los virus al no contar con genes conservados se les declara polifiléticos, siendo complicado rastrear su historia evolutiva (Koonin et al., 2021) (Córdoba, 2022). Este autor dividió la clasificación de los virus en 7 clases.

- a. Virus DNA de doble cadena: DNA (ds)
- b. Virus DNA monocatenario: DNA (ss)
- c. Virus RNA de doble cadena: RNA (ds)
- d. Virus RNA de sentido positivo: RNA (+)
- e. Virus RNA de sentido negativo: RNA (-)
- f. Virus de RNA de sentido positivo retrotranscrito: RNA (+) RT
- g. Virus de DNA de doble cadena retrotranscrito: DNA (ds) RT

La clasificación taxonómica actual de los virus está determinada por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) regido por los Estatutos aprobados por la División de Virología bajo el mando del comité de la División de Virología de la Unión Internacional de Sociedades Microbiológicas (IUMS) (ICTV, 2023).

Los bacteriófagos con cola están incluidos en el reino Duplodnaviria junto a herpesvirus de animales y los bacteriófagos sin cola están incluidos en el reino Varidnaviria junto a virus de eucariotas. En ambos reinos también se incluyen virus de arqueas (Koonin et al., 2021).

Históricamente los bacteriófagos fueron clasificados de acuerdo a su morfología, la primera taxonomía se dio de acuerdo al tipo de cola y se dividió en 3 morfotipos que son, A, B y C que corresponden a cola contráctil, cola larga no contráctil y cola corta no contráctil respectivamente (Turner et al., 2021). Para determinar el tipo de cola se utilizan microscopios electrónicos que sentaron las bases para la clasificación universal de bacteriófagos (Adriaenssens & Brister, 2017). Los clasificadores morfológicos de acuerdo al tipo de cola como son *Miovirus* (A), *Siphovirus* (B) y *Podovirus* (C) no tienen relevancia para su identificación taxonómica actual y solo son usados de forma distintiva e histórica para tratar de forma libre a los bacteriófagos (Turner et al., 2021).

En la actualidad no es suficiente la observación por el microscopio electrónico para su identificación y se están desarrollando nuevas técnicas para la nueva clasificación de los bacteriófagos, basados en el secuenciamiento de su genoma (Turner et al., 2021). Estos virus al no contar con genes marcadores universales conservados, hay muchos de ellos que no han sido clasificados hasta la actualidad (Koonin et al., 2021; Abd-El Wahab et al., 2023) y se mantiene en grupos flotantes. Los genomas secuenciados se pueden clasificar y analizar en árboles proteómicos de fagos, redes de fagos, agrupamientos basados en genes característicos o agrupamientos basados en el genoma completo (Adriaenssens & Brister, 2017). De acuerdo al material genético los bacteriófagos ampliamente distribuidos poseen DNA de doble cadena (dsDNA) en su gran mayoría y DNA de cadena simple (ssDNA) (Harada et al., 2018).

En 2021 se introdujo un sistema de escritura binomial uniforme para la denominación de las especies de virus, cambiando el nombre de las especies sin afectar el nombre de los virus, proceso que continua para la edición 2023-2024 del sistema de clasificación de virus (Walker et al., 2022).

En la actualidad el cambio en la clasificación de los bacteriófagos por medio del secuenciamiento del material genético, permitió obtener la clase *Caudoviricetes* que representan virus con cola y dsDNA (Turner et al., 2023), esta clase posee 1 orden no asignado y 7 órdenes con 74 familias, 121 subfamilias, 1497 géneros y 4840 especies asignadas, (ICTV, 2023). En la Tabla 1 se muestra la clase *Caudoviricetes* que comprende 7 órdenes asignados con las familias más representativas y cantidad de subfamilias, género y especies de estas; además de 1 orden no asignado donde se acumulan los bacteriófagos que vienen siendo descubiertos.

Tabla 1

Taxonomía de la clase Caudoviricetes según la taxonomía internacional del ICTV

Clase	Orden	Familia	Subfamilias	Genero	Especie
Caudoviricetes	Crassvirales	<i>Crevaviridae</i>	2	3	4
		<i>Intestiviridae</i>	4	12	19
		<i>Steigviridae</i>	1	12	17
		<i>Suoliviridae</i>	5	16	36
	Juravirales	<i>Yangangviridae</i>		3	3
		<i>Yanlukaviridae</i>		1	1
	Kirjokansivirales	<i>Graaviviridae</i>		2	2
		<i>Haloferuviridae</i>		3	3
		<i>Pyrstoviridae</i>		1	1
		<i>Shortaselviridae</i>		1	1
	Magrovirales	<i>Aoguangviridae</i>		1	1
	Methanobavirales	<i>Anaeroviridae</i>		1	1
		<i>Armatusviridae</i>		1	1
		<i>Kairosviridae</i>		1	1
		<i>Leisingerviridae</i>		1	1
		<i>Pigerviridae</i>		1	1
	Nakonvirales	<i>Ahpuchviridae</i>		1	1
		<i>Ekchuahviridae</i>		1	2
	ThumLeimavirales	<i>Druskaviridae</i>		2	2
		<i>Hafunaviridae</i>		4	10
		<i>Halomagnusviridae</i>		1	1
		<i>Soleiviridae</i>		1	1
	No asignado	En estudio		En estudio	En estudio

Nota: (ICTV, 2023), recuperado el 22 de septiembre del 2024 de <https://ictv.global/taxonomy>
versión 3, 19 de junio del 2024

1.2.2 Estructura de los bacteriófagos

Los bacteriófagos están conformados por un solo ácido nucleico como la mayoría de virus convencionales, predominando DNA de doble cadena (dsDNA). El ácido nucleico de los bacteriófagos posee generalmente bases modificadas cuya función es protegerlo durante su ciclo de infección, también poseen tamaños que oscilan entre 24 y 200 nm el más grande. Están conformados de una cabeza, denominada cápside de diferentes formas y tamaños, desde icosaédricos hasta filamentosos. La cápside es la estructura responsable de proteger el material genético. La cola que en algunos casos está unida a la cápside es un tubo cilíndrico hueco por el cual se produce la transferencia del material genético durante el proceso de infección, siendo contráctil, no contráctil, larga o corta dependiendo de la

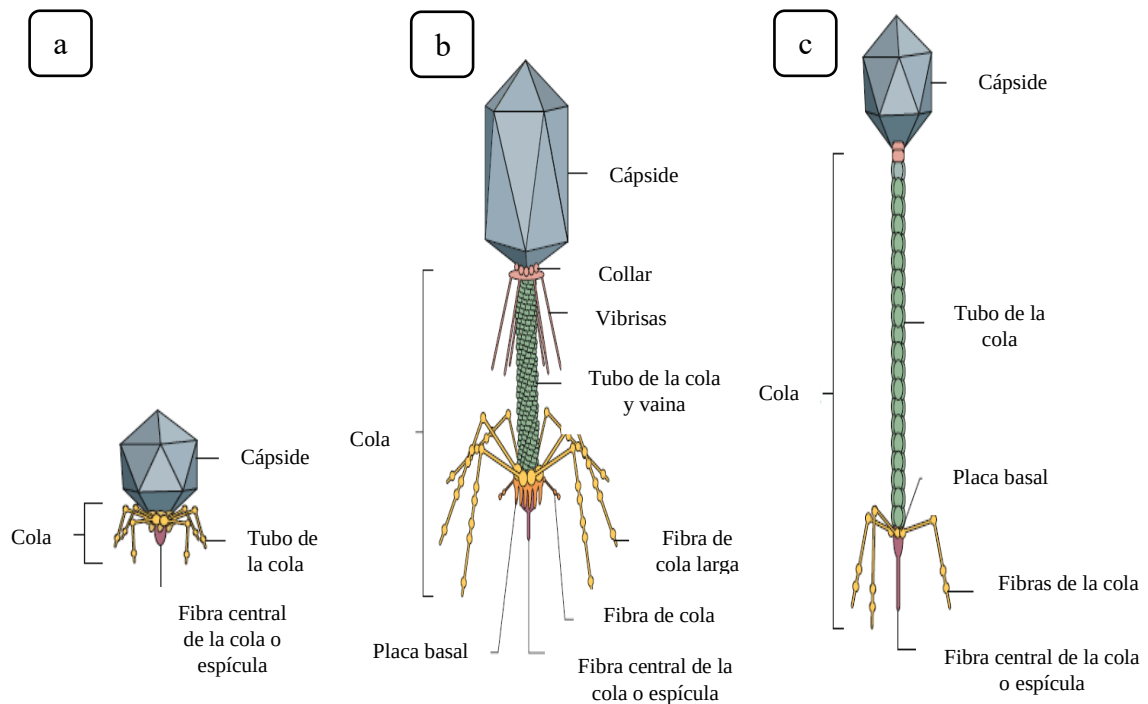
estructura viral, en su base tiene placas y fibras las cuales son responsables de la unión específica e irreversible con receptores de la pared celular bacteriana como lipopolisacáridos, ácidos teicoicos, proteínas de membrana externa o bombas de eflujo. Esta adherencia permite la alta especificidad de los bacteriófagos con su célula huésped (Mayer, 2015; Córdoba, 2022 & Guzzi, 2023).

La Clase Caudoviricetes es el grupo de bacteriófagos más abundantes y diversos, estos poseen genomas de DNA de doble cadena (dsDNA) que codifican una proteína de la cápside distintiva (MCP), todos los integrantes cuentan con el pliegue HK97 y una enzima de empaquetamiento que permite resistir una gran cantidad de genoma dentro de la cápside (Gulyaeva et al., 2022). Para diferenciar la estructura morfológica de los bacteriófagos se divide en:

- A. Podovirus:** No cuentan con placa basal, poseen cola corta no contráctil ni flexible, como se muestra en la Figura 1 (Leprince & Mahillon, 2023).
- B. Myovirus:** La característica principal es la presencia de cola contráctil, como se presenta en la Figura 1. La cápside y la placa basal están unidos mediante el tubo de la cola que está constituido por anillos hexaméricos. La placa basal se divide en dos partes, una es el complejo central y la otra parte de la placa conformada por seis cuñas periféricas (Leprince & Mahillon, 2023).
- C. Siphovirus:** Estos virus comparten 3 proteínas específicas que son: proteína distal de la cola (Dit), lisina de la cola (Tal) y la proteína de la cinta métrica (TMP) que juntas forman el complejo iniciador. Algunos poseen proteínas Dit evolucionadas que ayudan en el proceso de adsorción reversible (Leprince & Mahillon, 2023). Ver Figura 1.

Figura 1

Estructura morfológica de bacteriófagos



Nota: (a) Podovirus, (b) Myovirus, (c) Siphovirus

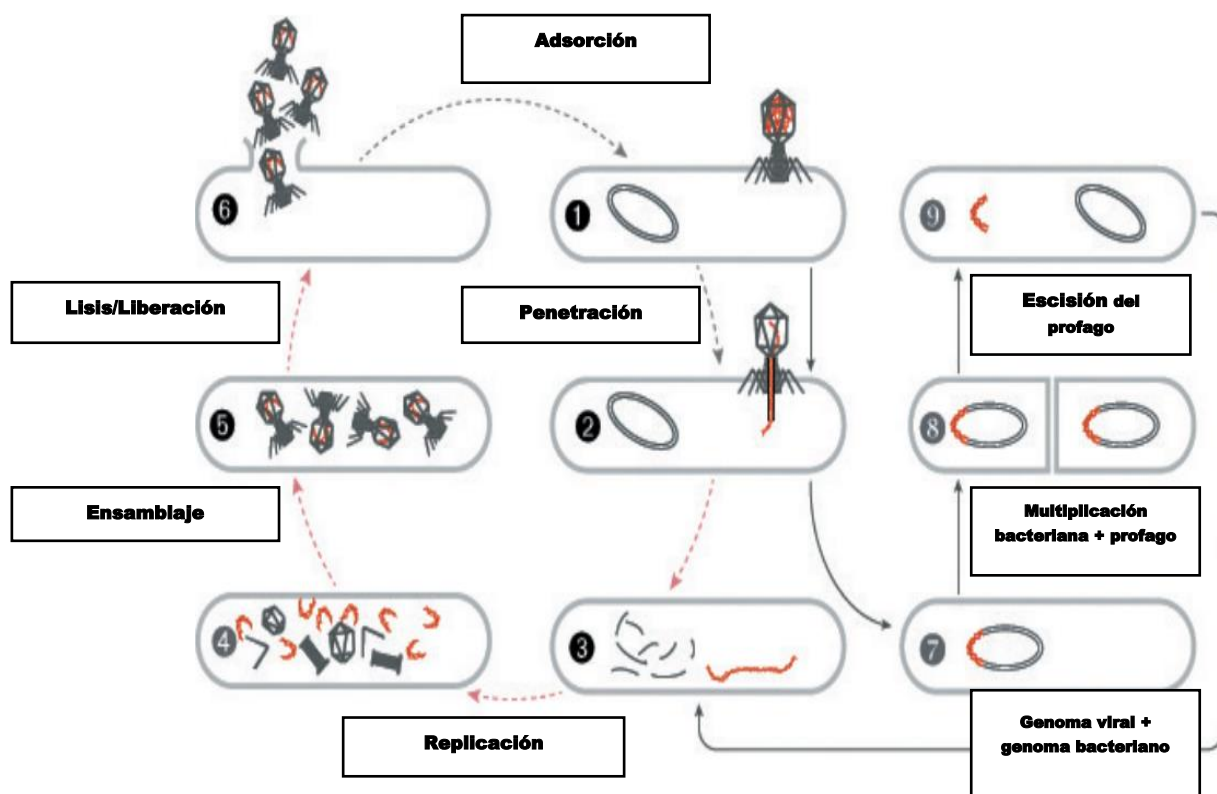
Fuente: Modificado de Nobrega et al. (2018)

1.2.3 Ciclo de replicación de los bacteriófagos

Los bacteriófagos inician el proceso de infección que bajo determinadas condiciones son capaces de iniciar el ciclo lítico o virulento y ciclo lisogénico, latente o atemperado; la variabilidad del ciclo lítico depende del huésped, estado metabólico, condiciones ambientales e interacción bacteriófagos-huésped. En el ciclo lítico el bacteriófago inyecta su genoma, expresa sus genes, se produce un nuevo ensamblamiento de partículas virales y estas se liberan al medio mediante lisis celular, por otro lado en el ciclo lisogénico la inserción del genoma viral se dirige al cromosoma bacteriano en forma de profago, transmitiéndose de manera horizontal a las siguientes generaciones durante la división celular, pero en condiciones de estrés fisiológico o perturbaciones ambientales el genoma se escinde y continúa con el ciclo lítico (Blanco Picazo, 2022; Guzzi, 2023). Observar Figura 2.

Figura 2

Ciclo infeccioso de los bacteriófagos



El ciclo lítico (paso 1-6) y ciclo lisogénico (paso 1 a 2 y 7 a 9). Paso 1: Adsorción. Paso 2: Penetración. Paso 3 y 4: Replicación. Paso 5: Ensamblaje. Paso 6: Lisis y Liberación. Paso 7: Inserción del material genético del bacteriófago al cromosoma bacteriano. Paso 8: Multiplicación bacteriana con el profago en su genoma. Paso 9: Escisión del profago y activación del ciclo lítico.

Fuente: Tomado y modificado de Prada et al. (2015).

1.2.3.1 Adsorción

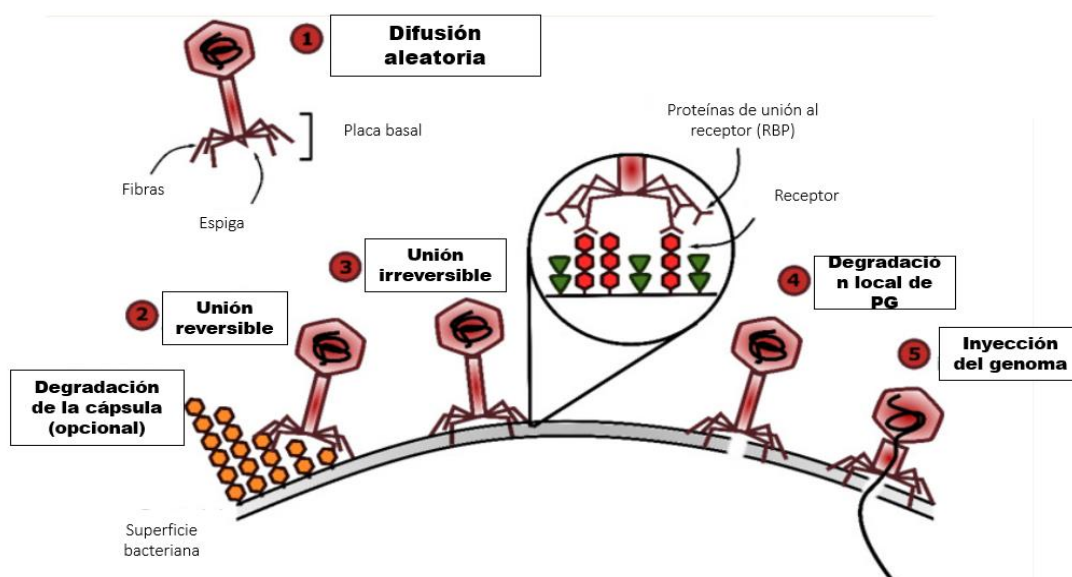
Este proceso está dado por la interacción específica de las proteínas de unión al receptor (RBP) del bacteriófago y los receptores bacterianos. Mediante movimientos brownianos, difusión en el medio y colisiones aleatorias, los bacteriófagos encuentran a su huésped y seguidamente se produce la primera interacción que es reversible entre RBP y receptores primarios de la superficie celular bacteriana, permitiendo buscar un receptor secundario produciéndose la interacción irreversible. El proceso de adsorción es asistido por despolimerasas que facilitan el acceso a los receptores bacterianos escindiendo enzimáticamente la pared celular y ectolisinas que degradan localmente el peptidoglicano (PG) facilitando la inyección del genoma viral, como muestra la Figura 3. Las RBP de los bacteriófagos que pertenecen a la clase *Caudoviricetes* son proteínas de la placa basal, fibras de la cola o espigas, presentes en la parte distal de la cola.

La naturaleza, accesibilidad, densidad y localización del receptor influye notablemente en el proceso de adsorción, así como también la presencia de cofactores como iones de calcio o magnesio, condiciones de pH, concentración de bacteriófagos y presencia de bacterias circundantes en el medio (Blanco Picazo, 2022; Leprince & Mahillon, 2023).

La coexistencia bacteriófago-bacteria permite una evolución continua de ambos, el lado bacteriano desarrolla mecanismos de resistencia para evitar la infección viral mediante bloqueos, mutaciones y pérdidas de sus receptores o inclusive produciendo una matriz extracelular. Por el lado viral se producen mutaciones de los genes presentes en RBP para reconocer el nuevo receptor y adaptación de enzimas capaces de degradar polisacáridos (Leprince & Mahillon, 2023).

Figura 3

Proceso de adsorción de los bacteriófagos e inyección del genoma viral



Tomado y modificado de (Leprince & Mahillon, 2023)

1.2.3.2 Penetración

Después de la adsorción irreversible del bacteriófago, este inyecta su material genético, generando un poro en la membrana citoplasmática de la célula huésped por cambios en su proteína basal, contrayendo su vaina y penetrando el material genético, yendo desde la cápside hacia la cola, dejando la partícula viral fuera y solo conservando su genoma (Letellier et al., 2004; Blanco Picazo, 2022). La

cola es un elemento muy importante porque permite mediante acciones enzimáticas, penetrar la capa de peptidoglicano y la membrana interna bacteriana, para liberar el genoma viral (Guttman et al., 2005; Córdoba, 2022). El genoma al encontrarse en el interior de la célula huésped es la encargada de activar la expresión genética para la síntesis y replicación de futuros bacteriófagos (Azeredo & Sutherland, 2008).

1.2.3.3 Replicación

La replicación mediada por enzimas específicas se da en el citoplasma, produciendo copias genómicas que formaran la progenie viral (Córdoba, 2022).

El proceso de replicación está determinado mediante dos periodos: el primero denominado periodo de eclipse, definido como el tiempo que transcurre desde la infección hasta la formación de partículas virales infectivas; y el segundo denominado periodo de latencia, que es el tiempo que transcurre desde la infección hasta la liberación de las partículas virales (Clokier & Kropinski, 2009; Córdoba, 2022). Cuando el DNA se encuentra dentro de la célula huésped se recirculariza evitando la acción de las exonucleasas permitiendo el inicio de la replicación viral (Flores, 2017). Esta se da mediante la transcripción temprana donde se sintetizan copias del material genético y la transcripción tardía, donde se codifican las proteínas estructurales (Segundo et al., 2010). El ácido nucleico del virus se apropia de la maquinaria metabólica del huésped elaborando RNAm y proteínas específicas del bacteriófago. Los RNAm tempranos codifican proteínas tempranas que son necesarias para la síntesis del DNA del bacteriófago e inactivar la biosíntesis del DNA, RNA y proteínas del huésped, pudiendo inclusive degradar su cromosoma. Cuando el DNA del bacteriófago se sintetiza se fabrican RNAm y proteínas tardías, estas proteínas son las encargadas de conformar estructuralmente al bacteriófago (Mayer, 2015).

1.2.3.4 Ensamblaje

Durante el proceso de ensamblaje se da la formación de nuevas partículas virales mediante sistemas de control codificados por el bacteriófago, las proteínas virales que forman la cápside están constituidas por una o más de una decena de subunidades estructurales distintas denominadas capsómeros y el material genético sintetizado previamente se empaqueta al interior de la cápside (Blanco Picazo, 2022; Córdoba, 2022). La cola que varía de acuerdo al bacteriófago,

constan de tubos extensos y flexibles de varios tamaños unidos entre sí, siendo esta estructura encargada de proporcionar la propiedad infectiva (Guttman et al., 2005). Cuando los componentes virales se encuentran ensamblados se forma el virión infeccioso listo para producir la lisis de la pared celular.

1.2.3.5 Lisis y Liberación

Las proteínas sintetizadas en la fase de replicación como las endolisinas, son las encargadas de lisar la capa de peptidoglicano de manera local (Leprince & Mahillon, 2023), así también las holinas son las responsables de desorganizar la membrana interna de la célula huésped, donde el proceso de liberación se da en coordinación mediante las proteínas mencionadas, la endolisina divide los enlaces del peptidoglicano por acción de la presión osmótica interna del huésped y las holinas forman los poros para que la endolisina pueda actuar (Guttman et al., 2005; Blanco Picazo, 2022). Una vez que la estructura bacteriana se ve afectada se libera la nueva progenie viral, empezando un nuevo ciclo.

La fase lisogénica de los bacteriófagos inicia cuando el genoma del bacteriófago denominado profago, se integra al genoma bacteriano y se replica junto con su DNA (Young, 2013) que puede ser descrito como una convivencia (Brady et al., 2021). La integración de ambos genomas se transfiere a los nuevos bacteriófagos que se van a ensamblar e inclusive al siguiente linaje de células huésped (Garriss & Henriques-Normark, 2020) hasta que condiciones como: temperatura, acidez del ambiente, salinidad e iones inducen al genoma viral a separarse del genoma bacteriano y entrar a la fase lítica (Jończyk et al., 2011; Young, 2013).

Las células huésped que contiene el genoma viral integrado al suyo son considerados agentes evolutivos que median la diversidad microbiana ya que contiene genes de virulencia y diversos tipos de proteínas que provienen del genoma del bacteriófago, inclusive son capaces de adquirir resistencia a los antibióticos (Dini, 2011).

1.3 Caracterización biológica de los bacteriófagos

1.3.1 Rango de hospedero de los bacteriófagos

El rango de hospedero se define como la interacción entre el bacteriófago y su huésped, donde los bacteriófagos son capaces de infectar una especie o a diferentes especies bacterianas, la especificidad de la interacción depende de las

proteínas virales que se unen a receptores específicos bacterianos (Leprince & Mahillon, 2023). Es deseable que un bacteriófago tenga un rango de hospedador estrecho a una sola especie para evitar dañar la microbiota circundante, de modo que este puede ser utilizado para tratar de manera “segura” infecciones bacterianas (Hyman, 2019). En bacterias Gram negativas los receptores preferidos por los bacteriófagos son los lipopolisacáridos (LPS), tanto la parte del lípido A, núcleo y el antígeno O (Leprince & Mahillon, 2023), pero en condiciones desfavorables los receptores no cumplen su función a la totalidad (Jończyk et al., 2011).

1.3.2 Multiplicidad óptima de infección (MOI) de los bacteriófagos

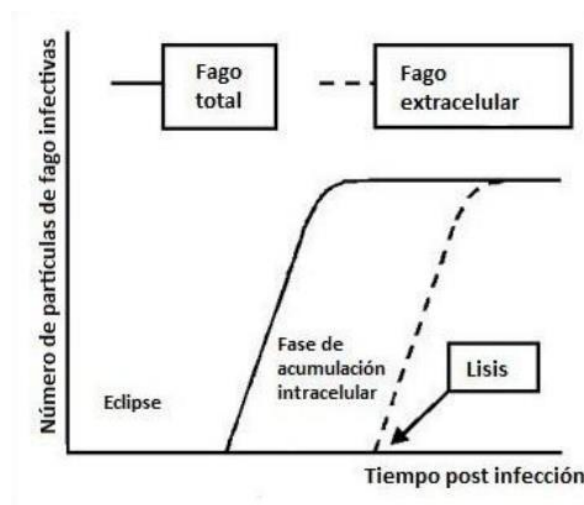
La multiplicidad óptima de infección (MOI) se entiende como la relación entre el número de bacteriófagos y el número de bacterias hospedadoras existentes en un espacio y tiempo definido, empleado para la obtención de títulos máximos mediante la proliferación de bacteriófagos. Representa el número de partículas de bacteriófagos agregados por célula bacteriana en cultivo (Sada & Tessema, 2024). La MOI puede cambiar de acuerdo a las condiciones ambientales variando su eficiencia (Hyman, 2019). El valor de la MOI es importante para el uso de la terapia con bacteriófagos y para determinar los impactos de los títulos de bacteriófagos en las bacterias (Węgrzyn, 2022).

1.3.3 Curva de un paso de los bacteriófagos

La curva de un paso muestra el tiempo de replicación de los virus en un tiempo y espacio determinado con un hospedero específico. El proceso de adsorción es el paso previo y más importante para que este se lleve a cabo. En esta curva se observa el periodo de eclipse que es el tiempo desde la infección hasta la formación de partículas virales (Clokier & Kropinski, 2009; Córdoba, 2022), el periodo de latencia se define como el tiempo entre la adsorción y el inicio de la ráfaga inicial (Nazir et al., 2024) y el tamaño de explosión es el paso donde se libera la máxima cantidad de progenie viral (Dini, 2011; Punil, 2017), como se observa en la Figura 4.

Figura 4

Esquema de la curva de un paso



Fuente: (Dini, 2011)

1.4 Caracterización fisicoquímica de los bacteriófagos

1.4.1 Termo estabilidad de los bacteriófagos

La temperatura es un factor importante en la replicación de los bacteriófagos influenciando en la adsorción, penetración, replicación y duración del periodo de latencia de su ciclo infeccioso, temperaturas muy inferiores o superiores a la óptima determina la cantidad de material genético que ingresa a la célula huésped, siendo la mayoría de bacteriófagos resistentes a altas temperaturas. Para estudios aplicativos de los bacteriófagos la temperatura de almacenamiento es un factor crucial que determina la supervivencia y actividad de estos (Jończyk et al., 2011). El ensamblamiento de las proteínas virales esta inducida por cambios de estabilidad térmica del ambiente que lo rodea, de modo que si la temperatura no es la correcta no será posible este proceso (Harada et al., 2018).

1.4.2 Estabilidad al pH de los bacteriófagos

Al igual que la temperatura, las sustancias ácidas o básicas presentes en el medio donde habita el hospedero son importantes para que los bacteriófagos puedan desarrollar su ciclo infeccioso de manera correcta. Jończyk et al. (2011) recopila información de varios estudios donde manifiestan que la estabilidad de los bacteriófagos en diferentes tampones varía de acuerdo al tipo de virus estudiado, siendo el pH muy cercano a la neutralidad el óptimo. Estas observaciones ponen de manifiesto que el pH es un factor que condiciona la interacción entre bacterias y bacteriófagos (Fikadu et al., 2024).

1.4.3 Sensibilidad al cloroformo

La sensibilidad al cloroformo está determinada por la presencia de lípidos en la estructura de los bacteriófagos, es decir, si los bacteriófagos poseen envoltura lipídica en la cápside y el cloroformo actúa sobre ellos, estos virus son sensibles, si no actúa son resistentes, además el cloroformo permite la remoción de bacterias presentes en el medio (Fikadu et al., 2024).

1.5 Aplicaciones de los bacteriófagos

Los bacteriófagos son virus capaces de eliminar células bacterianas, inclusive aquellas que presentan resistencia a diferentes antibióticos y su uso es visto como una posible alternativa en comparación al uso de antibióticos (Alomari et al., 2021). Los bacteriófagos al ser específicos contra un género de bacterias o hasta inclusive contra una sola especie, no producen alteraciones de la microbiota natural (Pérez, 2021), pero al ser elementos de tipo biológico deben someterse a rigurosos procesos de control de calidad para disminuir los efectos secundarios que pueden llegar a ocasionar (Reina & Reina, 2018).

Los bacteriófagos se vienen aplicando en el campo de la industria alimentaria para eliminar bacterias presentes en productos cárnicos, lácteos, frutas y verduras (Huang et al., 2022), debido a que el uso de antibióticos puede alterar la composición físico química de los alimentos. Diversas investigaciones dan a conocer su efectividad contra bacterias patógenas, donde algunas empresas privadas han comenzado a comercializar a los bacteriófagos individuales o en forma de cócteles para controlar algunos tipos de infecciones y contaminaciones bacterianas en agricultura y ganadería (Prada et al., 2015; Reina & Reina, 2018; Huang et al., 2022). Actualmente, existen ensayos clínicos para establecer la seguridad del uso de bacteriófagos como terapia complementaria a los antibióticos, pretendiendo establecer la seguridad y eficacia de estos para ser usados mediante una administración adecuada y sean capaces de controlar infecciones en humanos (Reina & Reina, 2018), para la actualidad el uso de bacteriófagos en humanos se encuentran en estudios de fase I y II (Huang et al., 2022) que se pueden revisar a detalle en <https://clinicaltrials.gov/search?intr=Phage%20Therapy>.

1.6 Aspecto general de *Escherichia coli*

Es un bacilo Gram negativo anaerobio facultativo perteneciente a la clase *Gamma proteobacteria* familia *Enterobacteriaceae*, es una de las bacterias más estudiadas,

en condiciones óptimas de crecimiento puede dividirse cada 20 minutos (Jang et al., 2017), debido a este rápido crecimiento, a su fácil manipulación y rentabilidad (Rosano et al., 2019), *Escherichia coli* es la bacteria modelo para determinar la construcción de células microbianas que ayuden en la investigación de mecanismos de regulación, además es aplicado en la industria y medicina (Wang et al., 2021). En los últimos 10 años se han identificado genes de *Escherichia coli* que codifican a más de 140 proteínas pequeñas, definidas como aquellas que contienen más o menos 50 aminoácidos y existen pruebas contundentes que quedan muchas más por descubrir (Hemm et al., 2020). Habita como comensal en la capa mucosa del colon formando parte de la microbiota intestinal natural de humanos y animales homeotermos, donde la coexistencia con su huésped es de mutuo beneficio (Riley, 2020).

En un humano sano la concentración aproximada de *Escherichia coli* por gramo de heces se encuentra en un rango de 10^7 a 10^9 y en animales domésticos se encuentra en un rango de 10^4 a 10^5 (Tenaillon et al., 2010); es expelido al medio ambiente a través de las heces, donde algunas cepas pueden sobrevivir largos periodos de tiempo y reproducirse en ambientes extraintestinales (Jang et al., 2017).

Algunas cepas de *Escherichia coli* han evolucionado para volverse patógenas (Newell & La Ragione, 2018), debido a la adquisición de una combinación de elementos genéticos móviles por la transferencia horizontal de genes, integración en el cromosoma por medio de bacteriófagos o elementos transponibles, incluso a causa de la pérdida de ciertos genes como es el caso de *Escherichia coli* enteroinvasiva, muchos de estos genes que codifican factores de virulencia se depositan en los plásmidos (Croxen et al., 2013).

Las cepas patógenas de *Escherichia coli* se propagan a través de la vía fecal-oral por la ingestión de alimentos o agua contaminada en humanos (Allocati et al., 2013), abarcando un amplio espectro de infecciones, desde enfermedades gastrointestinales y extraintestinales que comprometen el torrente sanguíneo, el tracto urinario y el sistema nervioso central (Riley, 2020), donde algunas cepas tienen un sistema de infección que involucra a las células diana, el asentamiento de la mucosa, la incursión de las defensas del huésped, la proliferación y el daño al hospedero (Ortiz et al., 2021). En mascotas y animales de granja es causante de la diarrea (Allocati et al., 2013).

Existen variantes de *Escherichia coli* las cuales se asocian en patotipos, definido como una variante patógena de un grupo de microorganismos relacionados taxonómicamente que colonizan asintóticamente un huésped, el patotipo puede llegar a causar una enfermedad en el mismo sitio donde habita su homólogo comensal o en un sitio fuera del hábitat natural del huésped del comensal (Riley, 2020), esta agrupación se debe a las combinaciones de las características de virulencia, así como los modos de transmisión, preferencias por el huésped, prevalencia global y la carga de la enfermedad que pueden llegar a producir (Nataro & Kaper, 1998)

1.6.1 Taxonomía

Dominio: Bacteria

Filo: Proteobacteria

Clase: Gamma Proteobacteria

Orden: Enterobacteriales

Familia: Enterobacteriaceae

Género: *Escherichia*

Especie: *Escherichia coli*

Fuente: Tomado de Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology
(Garrity et al., 2005)

1.6.2 Resistencia a los antibióticos

Los antibióticos son definidos como agentes de origen farmacológico con efecto bactericida y bacteriostático (Bisso, 2018). Los antibióticos más usados hoy en día no vienen siendo eficientes para tratar infecciones producidas por bacterias, generando una pérdida de la eficacia de las terapias convencionales, obligando a desarrollar nuevos tipos de tratamientos alternativos al uso de estos (Frieri et al., 2017). La resistencia de los patógenos microbianos viene dando problemas en la salud pública afectando a todos los seres humanos, representando así una crisis a nivel global. Los patógenos resistentes a múltiples fármacos se asocian a entornos hospitalarios y comunitarios, sugiriendo que los nuevos reservorios se encuentran fuera de ambientes clínicos (Munita & Arias, 2016) de modo que recientes investigaciones ponen de manifiesto que el medio ambiente es el principal componente para la transferencia y aparición de patógenos resistentes (Bengtsson-Palme et al., 2018).

El incremento de la resistencia a antibióticos no solo ocurre por el mal manejo de estos, sino que también por prácticas deficientes en el control y epidemiología del agente patógeno (Akova, 2016) donde la “supervivencia del más apto” genera plasticidad de tipo genético desencadenando mutaciones, adquisiciones y alteraciones del material genético, produciendo resistencia a múltiples fármacos (Munita & Arias, 2016).

Existen diferentes niveles de clasificación de la resistencia a los antibióticos en bacterias con importancia en salud pública, basado en la disponibilidad y relevancia de los fármacos (Jiménez et al., 2019). Los términos más empleados en la literatura médica para caracterizar la resistencia a los antibióticos son los de multidrogo resistentes (MDR), extremadamente resistentes (XDR) y pandrogo resistentes (PDR). Estos términos fueron definidos por la Administración de drogas y alimentos de los Estados Unidos (FDA), el Comité Europeo de pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos (EUCAST) y el Instituto de Estándares de Laboratorio Clínico (CLSI) donde definieron que, MDR se refiere a la no sensibilidad adquirida a al menos un agente en tres o más categorías de antibióticos (Magiorakos et al., 2012), teniendo como mayor relevancia a 12 géneros de patógenos entre los cuales destacan *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomona aeruginosa*, *Escherichia coli* y demás especies de la familia Enterobacteriaceae (Jiménez et al., 2019).

El incremento de la contaminación de antibióticos y el intercambio lateral de genes de resistencia a generado cepas de *Escherichia coli* resistentes a los antibióticos, alcanzando un nivel de crisis donde estos no son eficaces (Kaushik et al., 2022). *Escherichia coli* muestra una mayor tasa de resistencia a las cefalosporinas de amplio espectro productora de β -lactamasa de espectro extendido (BLEE), siendo susceptible a menudo a fosfomicina (Y. Liu et al., 2021).

A. Antibióticos β -Lactámicos

Los β -lactámicos son un grupo de antibióticos que impiden la síntesis de la pared celular bacteriana, inhibiendo las transpeptidasas (Proteínas de unión a Penicilinas o PBP) a través de la acilación de una serina del sitio activo en estas enzimas que son necesarias para la multiplicación bacteriana. Presentan un anillo betalactámico con capacidad de unirse a Proteínas de unión a Penicilina (PBP).

Este grupo está conformado por penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos y carbapenémicos (De Angelis et al., 2020).

B. Resistencia bacteriana

a. Resistencia intrínseca: Llamada también resistencia natural, este mecanismo está ubicado en el cromosoma bacteriano y es característico de todos los miembros de una sola especie, los genes de este tipo de resistencia se expresan de forma constitutiva o son inducidos por fármacos antimicrobianos (Arbab et al., 2022). Por ejemplo, *Escherichia coli* es resistente intrínsecamente a la penicilina G (Allocati et al., 2013).

b. Resistencia extrínseca: Llamada también resistencia adquirida. Este mecanismo se da por medio de mutaciones o pueden provenir de otras bacterias a través de vías plasmídicas o incorporación de genes mediante mecanismos de transferencia horizontal de genes (THG), ejerciendo una presión selectiva de resistencia (Arbab et al., 2022; Blanco Picazo, 2022). Los elementos móviles pueden ser:

- **Plásmidos:** Moléculas de DNA extracromosómicos de tamaño variables, circularizado, con un origen de replicación, presentan genes para la supervivencia bacteriana pero no esenciales para la vida (Blanco Picazo, 2022).
- **Transposones:** Secuencias de DNA móviles dentro del cromosoma, modula la expresión génica provocando mutaciones (Blanco Picazo, 2022).
- **Integrone:** Elementos genéticos que permiten la adquisición y expresión genética (Blanco Picazo, 2022)
- **Elementos de integración conjugativa:** Unidos al cromosoma bacteriano, son autotransferibles por conjugación y poseen genes para su integración y escisión (Blanco Picazo, 2022).
- **Islas genómicas:** Fragmentos de DNA móviles o no (cuando se requiera) con capacidad de integrarse en el cromosoma bacteriano, escindirse y transferirse de una bacteria a otra (Blanco Picazo, 2022).
- **Agentes de transferencia de genes:** Son virus bacterianos que transfieren aleatoriamente fragmentos de DNA del cromosoma bacteriano (Blanco Picazo, 2022).

- **Bacteriófagos:** Agentes que transfieren genes por medio de su ciclo replicativo lisogénico (Blanco Picazo, 2022).

C. Mecanismos de resistencia a los antibióticos

Los mecanismos de resistencia pueden ser naturales o adquiridos. Las bacterias utilizan tres mecanismos y son capaces de transferir horizontalmente estos elementos de resistencia (Arbab et al., 2022), que son:

- Bombas de Eflujo:** Mediado por proteínas de transporte activo que expulsan el antibiótico del interior de la célula al exterior (Arbab et al., 2022), como las bombas Tet que se unen a Tetraciclinas (Blanco Picazo, 2022).
 - Modificación de la diana del antibiótico:** Cuando el fármaco pierde el sitio de unión específico a la molécula diana (Arbab et al., 2022).
 - Modificación del antibiótico:** Mediado por enzimas que inmovilizan al fármaco y lo degradan (Arbab et al., 2022), como las enzimas modificadoras de aminoglúcidos (Blanco Picazo, 2022). Las enzimas de mayor interés son las β -lactamasas, las carbapenemasas, las metalo- β -lactamasas y las oxiciclinasas.
- ❖ **β -lactamasas:** Hidrolizan el anillo β -lactámico, codificados en gran medida por plásmidos. Esta enzima se encuentra en su gran mayoría en bacterias Gram negativas, incluyendo la familia *Enterobacteriaceae*, predominando en *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* (De Angelis et al., 2020). Se clasifican en 4 grupos que son:
- **Clase A:** Pertenecen a la familia de hidrolasas serina-reactivas, se incluyen las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) y los genes más representativos son: TEM (Temoroina), SHV (Sulfhidrilo variable) y CTX-M (Cefotaximasa Munich) (De Angelis et al., 2020). TEM-1 y TEM-3 poseen actividad penicilinasa, pero TEM-3 hidroliza cefalosporinas de tercera generación, por otra parte CTX-M se transfiere mediante la transferencia horizontal de genes (THG) (Blanco Picazo, 2022). *Escherichia coli* es resistente a la ampicilina gracias a TEM-1 (De Angelis et al., 2020).

- **Clase B:** Hacen uso de un ion metálico (zinc) para degradar el anillo β -lactámico, siendo efectivos contra carbapenémicos (Blanco Picazo, 2022). Conocidos como metalo- β -lactamasas.
 - **Clase C:** Pertenecen a la familia de hidrolasas serina-reactivas, estas enzimas confieren resistencia y penicilinas y cefalosporinas, la enzima AmpC codificada por el gen ampC es la más representativa y se encuentra en el cromosoma bacteriano o codificado por plásmidos (Blanco Picazo, 2022).
 - **Clase D:** Pertenecen a la familia de hidrolasas serina-reactivas, conocidas como oxaciclinasas por hidrolizar la oxaciclina (Blanco Picazo, 2022), en este grupo se encuentran los genes OXA, siendo OXA 48 la más abundante en la familia *Enterobacteriaceae* (De Angelis et al., 2020).
- ❖ **Carbapenemasas:** Codificadas cromosómicamente, por plásmidos o por ambas. Incluyen las enzimas tipo KPC (carbapenemasa de *Klebsiella pneumoniae*), SME (enzima de *Serratia marcescens*), Nmc-A (no metalo carbapenemasa-A), IMI (imipenemasa), NDM (metalo- β -lactamasas de Nueva Delhi), VIM (metalo- β -lactamasas Interferón Verona) (De Angelis et al., 2020).

CAPITULO II

MATERIALES Y METODOS

2.1 Área de estudio

La cuenca del Río Huatanay tiene una longitud de 43,58 Km (Municipalidad Provincial del Cusco, 2013) desde su nacimiento en el río Huancaro del distrito de Santiago, abarcando en todo su recorrido los distritos de Cusco, Wanchaq, San Sebastián, San Jerónimo, Saylla, Oropesa y Lucre, desembocando en el río Vilcanota en el sector denominado Huambutio. Durante su recorrido recibe numerosas descargas de aguas, generando deterioro de la calidad ambiental del río, presentando alta concentración de materia orgánica, cloruros, detergentes y diversos agentes patógenos (SEDACUSCO, 2017).

2.1.1 Ubicación geográfica

País: Perú

Región: Cusco

Provincias: Cusco y Quispicanchi

Distritos: Santiago, Cusco, Wanchaq, San Sebastián, San Jerónimo, Saylla, Oropesa y Lucre.

Fuente: (Tito, 2021).

2.1.2 Determinación de puntos de muestreo

Se recolectaron muestras de 12 puntos de muestreo pre establecidos, donde se obtuvieron 12 muestras para la época de secas (mes de agosto 2023) y 12 muestras para la época de lluvias (mes de marzo 2024). Se utilizó un GPS para la georreferenciación de los puntos a lo largo de la cuenca del río Huatanay, como se muestra en la Tabla 2 y Figura 5.

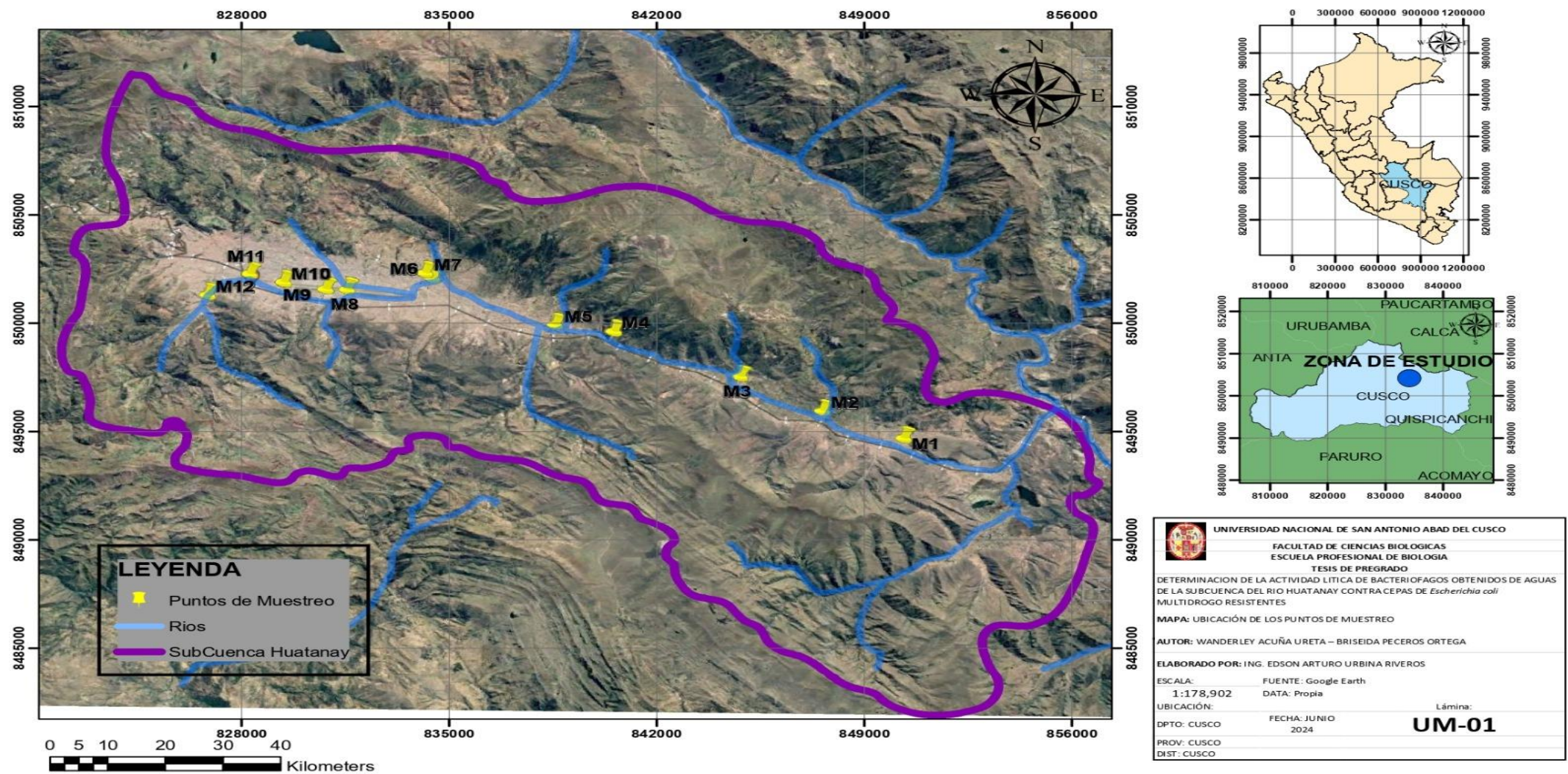
Para determinar las épocas de muestreo, se tomaron los datos meteorológicos del SENANMI, reportados para el mes de agosto de 2023 el promedio de precipitación aproximado fue de 0,3mm y para el mes de marzo de 2024 el promedio de precipitación aproximado fue de 4,31 mm los cuales fueron recolectados de la Estación: Granja Kayra, como se muestra en el Anexo 3, Figura 48 y Anexo 4, Figura 49

Tabla 2*Coordenadas UTM de los puntos de muestreo*

N°	Zona	Este	Norte	Altitud	Descripción
M1	19	201015,07	8494813,79	3094	Oropesa
M2	19	198201,72	8496015,78	3105	Centro recreacional de abogados Tipon
M3	19	195354,95	8497541,05	3128	Puente Condebambilla (Saylla)
M4	19	190993.73	8499542.97	3192	Universidad Continental
M5	19	188999.17	8499800.8	3247	Camal Kayra
M6	19	184779,16	8501863,24	3249	Cachimayo
M7	19	184526,49	8502086,04	3255	Coviduc
M8	19	181890,07	8501254,14	3286	Urb. Los Nogales
M9	19	181162,44	8501250,28	3302	Urb. Santa María
M10	19	179730,04	8501531,19	3321	Molino II
M11	19	178570,86	8501876,91	3346	Reina de Belén
M12	19	177168.59	8500873.74	3366	Huancaro

Figura 5

Mapa de los doce puntos de muestreo de la cuenca del rio Huatanay



2.2 Materiales

2.2.1 Material biológico

- Muestras de agua superficial de la cuenca del río Huatanay
- Cepa de *Escherichia coli* ATCC 35218 (resistente a betalactamasa de espectro extendido)
- Cepa de *Escherichia coli* NCTC 13476 (resistentes a carbapanemasa)
- 2 cepas de *Enterobacter cloacae* MDR (Caracterizadas en los hospitales mediante VITEK® 2)
- 1 cepa de *Pseudomonas aeruginosa* MDR (Caracterizadas en los hospitales mediante VITEK® 2)
- 1 cepa de *Proteus spp.* MDR (Caracterizadas en los hospitales mediante VITEK® 2)
- 1 cepa de *Klebsiella pneumoniae* ATCC Baa 2814
- 1 cepa de *Acinetobacter spp.* MDR
- 1 cepa de *Salmonella infantis* MDR
- 46 cepas de *Escherichia coli* multidrogo resistentes (MDR) clínicas obtenidas de pacientes del hospital ESSALUD Hospital Adolfo Guevara Velasco y del Hospital Regional caracterizadas mediante VITEK® 2, pertenecientes al cepario del Laboratorio Institucional de Microbiología e Inmunología (LIMI)
- Bacteriófagos

2.2.2 Equipos

- Centrifuga refrigerada (Biofuge Primo R)
- Autoclave modelo (Austester)
- Horno Pasteur (Binder)
- Incubadora (Binder)
- Vórtex (Labnet)
- Espectrofotómetro (Eppendorf)
- Bomba al vacío (Value)
- Campana de bioseguridad clase II (Telsar)
- Baño maría (Lab Companion)
- pH metro (Hanna)
- Microscopio óptico (Nikon)
- Balanza analítica (Ohaus)

- Balanza de precisión (A&D Company Limited)
- Destilador de agua (GLP)
- Refrigeradora (Coldex)
- Congeladora -20°C (Coldex)
- Congeladora -80°C (Fiocchetti)
- Micropipetas de 1000, 100, 20 y 10 microlitros (Santorini)
- GPS (Garmin)

2.2.3 Medios de cultivo

- Agar MacConkey (BD)
- Agar TSA (Agar Tripticasa de Soya) (HKM)
- Agar Bacteriológico (HKM)
- Caldo TSB (Caldo Tripticasa de Soya) (HKM)
- Caldo BHI (Infusión cerebro corazón) (OXOID)

2.2.4 Reactivos

- Cloruro de sodio (NaCl)
- Cloruro de potasio (KCl) (MERCK)
- Fosfato de disodio (Na_2HPO_4) (OXOID)
- Fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4) (OXOID)
- Hidróxido de sodio (NaOH 1M) (MERCK)
- Ácido clorhídrico (HCl 1M) (MERCK)
- Cloroformo al 99% (MERCK)
- Glicerol
- Alcohol a 90°

2.2.5 Material de laboratorio

- Tubos de vidrio de 150 x 15 mm
- Probeta de vidrio de 100mL y 50mL
- Pipetas de vidrio de 10mL, 5mL y 1mL
- Matraz de Kitasato 500mL y 1000mL
- Placas de Petri de 100 x 15 mm
- Frascos tapa rosca de 500mL, 250mL y 100mL
- Embudo
- Propipeta

- Puntas de 1000, 100, 20 y 10 microlitros
- Tubos cónicos Falcon de 15mL y 50mL
- Tubos de micro centrífuga
- Filtros de 0,22 micro metros
- Jeringas de 3, 5 y 10 cc
- Pinzas
- Gradillas
- Asa de siembra
- Mechero bunsen

2.2.6 Material de campo

- Frascos de primer uso de capacidad de 1 litro
- Guardapolvo
- Guantes de látex
- Libreta de campo
- Lapicero
- Cuerda
- Balde de 4 litros
- Embudo
- Cooler
- Refrigerantes

2.2.7 Otros

- Mascarilla
- Gorro quirúrgico
- Alcohol a 70°
- Lejía
- Papel Craft
- Papel aluminio
- Cúter
- Tijera
- Cinta maskin
- Cinta indicadora de esterilidad
- Plumón marcador
- Detergente

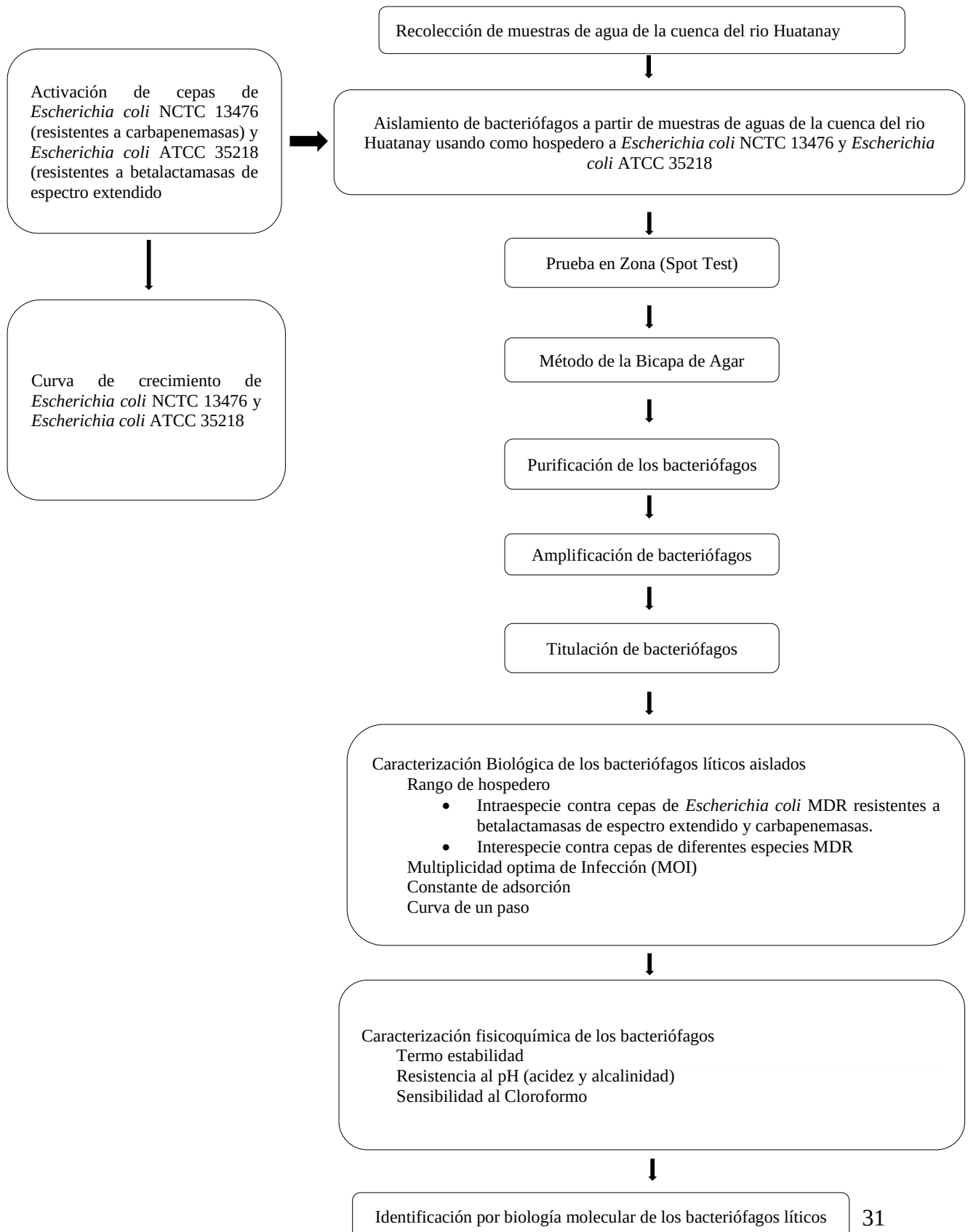
2.3 Tipo de investigación:

El presente trabajo corresponde a un estudio cuasi experimental (Fernández et al., 2023; Benmarhnia & Fuller, 2020).

2.4 Flujoograma

Figura 6

Flujoograma para la determinación de la actividad lítica de bacteriófagos obtenidos de aguas de la cuenca del rio Huatanay



2.5 Métodos

2.5.1 Recolección de muestras de aguas de la cuenca del río Huatanay

El muestreo de aguas se realizó en condiciones asépticas según el Protocolo Nacional de Calidad de Recursos Hídricos Superficiales (Resolución Jefatural N° 010-2016-ANA) (ANA, 2016). Se recolectó una muestra de agua por cada punto de muestreo pre establecidos a lo largo de la cuenca del río Huatanay, haciendo un total de 12 muestras para la época de secas (mes de agosto 2023) y 12 muestras para la época de lluvias (mes de marzo 2024), como se observa en la Tabla 3.

Tabla 3

Codificación de los puntos de muestreo de aguas de la cuenca del río Huatanay

PUNTOS DE MUESTREO		Codificación	
		EPOCA DE SECAS (MES DE AGOSTO)	EPOCA DE LLUVIAS (MES DE MARZO)
1	Oropesa	CHB1S	CHB1L
2	Centro Recreacional Abogados	CHB2S	CHB2L
3	Puente Condebambilla	CHB3S	CHB3L
4	Universidad Continental	CHB4S	CHB4L
5	Camal Kayra	CHB5S	CHB5L
6	Cachimayo	CHB6S	CHB6L
7	Coviduc	CHB7S	CHB7L
8	Urb. Los Nogales	CHB8S	CHB8L
9	Urb. Santa María	CHB9S	CHB9L
10	Molino II	CHB10S	CHB10L
11	Reina de Belén	CHB11S	CHB11L
12	Huancaro	CHB12S	CHB12L
SUBTOTAL		12	12
TOTAL		24	

Nota: C (cuenca), H (Huatanay), B (Botella), 1-12 (número de punto de muestreo), S (época de secas), L (época de lluvias).

Según ANA (2016), para la toma de muestras de aguas de la cuenca del río Huatanay se colocó la indumentaria de protección personal como botas de jebe,

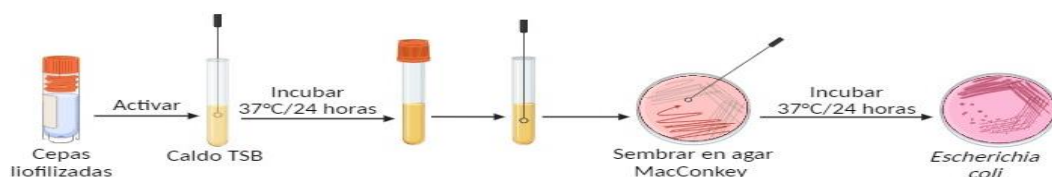
mandil descartable, cofia y mascarilla. Para la toma y manipulación de las muestras se usó guantes de látex estériles con las manos previamente desinfectadas con alcohol. La toma de muestra se realizó en el punto medio del cauce del río y en contra del flujo de agua con un balde de 4L atado a una cuerda que se bajó y enjuagó 3 veces antes de la toma de muestra, seguidamente se llenó con la muestra de agua evitando suspender los sedimentos del fondo del cauce y sin contaminar la muestra. Se usó un embudo previamente desinfectado con alcohol y se llenó cada una en botellas de un litro de capacidad hasta las $\frac{3}{4}$ partes y se cerraron, seguidamente se codificaron y colocaron en un cooler para ser transportado en cadena de frío a 4°C al Laboratorio Institucional de Microbiología e Inmunología C-222 ubicado en el segundo piso del pabellón de la Escuela Profesional de Biología de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco. Las tomas de muestra se realizaron en 2 épocas, época de secas (mes agosto 2023) y época de lluvias (mes de marzo 2024), tomando en cuenta los datos del SENAMHI, como se muestra en el Anexo 3 y Anexo 4, con sus respectivos Climatodiagramas que se observan en la Figura 48 y Figura 49.

2.5.2 Activación de cepas de *Escherichia coli* NCTC 13476 y *Escherichia coli* ATCC 35218 multidrogo resistentes (MDR)

Las cepas de *Escherichia coli* NCTC 13476 (resistentes a carbapenemasas) y *Escherichia coli* ATCC 35218 (resistente a betalactamasas de espectro extendido) con perfil de resistencia a antibióticos fueron obtenidos del cepario del Laboratorio Institucional de Microbiología e Inmunología (LIMI). Estas cepas se encontraban liofilizadas a 4°C y fueron activadas en caldo tripticasa de soya (TSB) e incubadas a 37°C por 24 horas, pasado el tiempo de incubación se sembró cada una en agar MacConkey y se incubaron a 37°C por 24 horas para determinar la pureza y viabilidad de las cepas, como se muestra en la Figura 7.

Figura 7

Diagrama de la activación de cepas liofilizadas de Escherichia coli



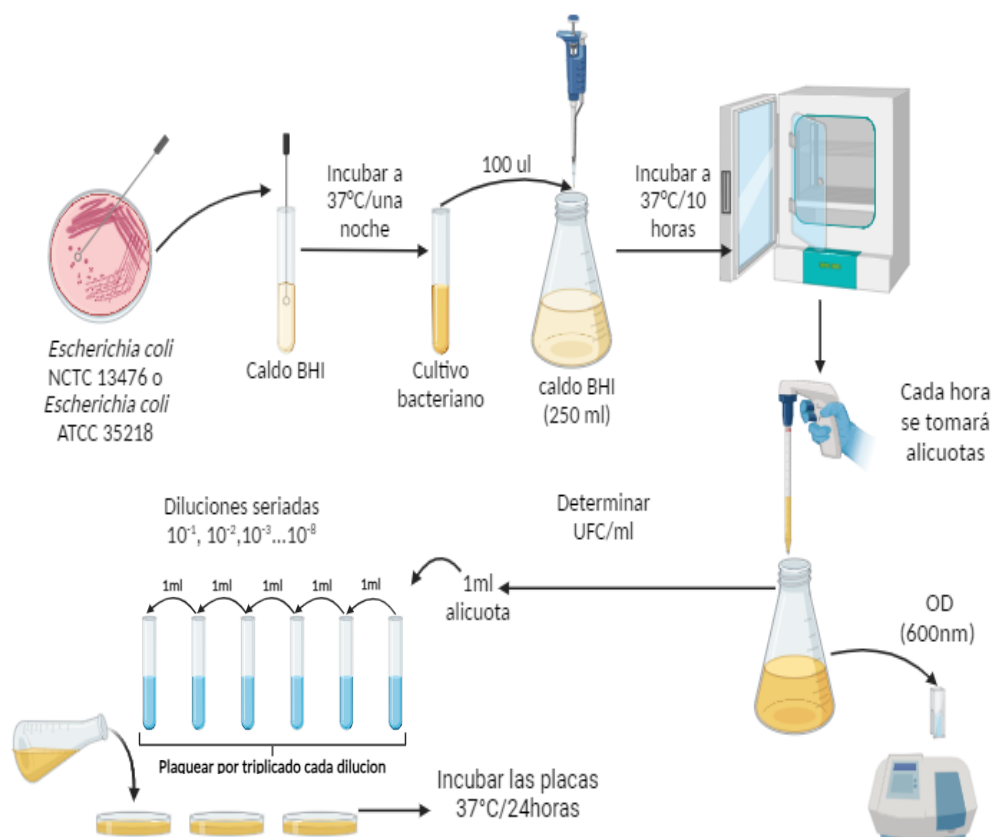
Fuente: Se hizo uso del programa BioRender.com para la creación del diagrama

2.5.3 Curva de crecimiento de *Escherichia coli* NCTC 13476 y *Escherichia coli* ATCC 35218

Se realizó la curva de crecimiento de la cepa de *Escherichia coli* NCTC 13476 y *Escherichia coli* ATCC 35218 según (Punil, 2017) modificado. Se incubó por separado las cepas de *Escherichia coli* ATCC 35218 y *Escherichia coli* NCTC 13476 en caldo BHI a 37°C durante una noche. Individualmente para la curva de crecimiento se añadió 100µL de bacteria a 250mL de caldo BHI y se incubó a 37°C durante 10 horas. Se tomó muestras de 5mL a partir de este caldo y se midió la absorbancia a OD₆₀₀ nm al inicio de la inoculación (tiempo 0) y a cada hora (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10). A la par se determinó las Unidades Formadoras de Colonias por mililitro (UFC/mL) mediante la técnica de incorporación en agar TSA de cada dilución seriada realizada, este procedimiento se realizó en cada hora durante 10 horas, como se ve en la Figura 8. Cabe resaltar que la medida de 10⁸ bacterias/mL es un equivalente a 0,3-0,4 de absorbancia a OD₆₀₀.

Figura 8

Diagrama del experimento de la curva de crecimiento de Escherichia coli



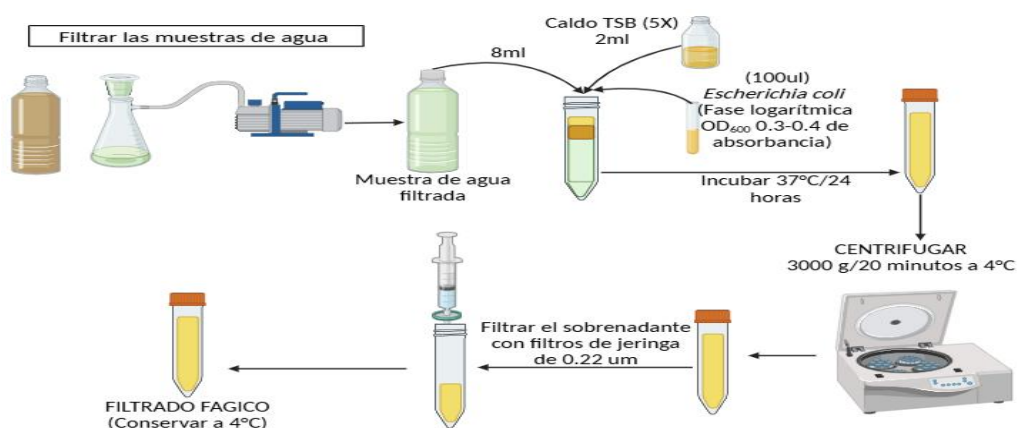
Fuente: Se hizo uso del programa BioRender.com para la creación del diagrama

2.5.4 Aislamiento de bacteriófagos líticos a partir de muestras de aguas de la cuenca del río Huatanay usando como hospedero a *Escherichia coli* NCTC 13476 y *Escherichia coli* ATCC 35218

Las botellas que contiene muestras de agua recolectadas de la cuenca del río Huatanay fueron procesadas un día después de la recolección total de las 12 muestras por cada época, donde se filtraron haciendo uso de una bomba al vacío con filtros de papel Whatman de grado 1 para la eliminación de residuos sólidos (Punil, 2017). De la muestra filtrada se extrajo 8mL en un tubo cónico Falcon estéril de capacidad de 15mL, se añadió 100µL de la bacteria *Escherichia coli* NCTC 13476 o *Escherichia coli* ATCC 35218 en fase logarítmica OD₆₀₀ 0,3-0,4 de absorbancia y 2mL de caldo TSB a 5X y se incubó durante 24 horas a 37°C (Ullah et al., 2021; Cuyutupa, 2022), pasado el tiempo de incubación se centrifugó a 3000g durante 20 minutos a 4°C. El sobrenadante se filtró utilizando una jeringa con filtros de 0,22 micrómetros (Sada & Tessema, 2024) y este filtrado fágico fue conservado a 4°C, ver Figura 9. Se realizó un control negativo que consistió en inocular 100µL del hospedero *Escherichia coli* NCTC 13476 o *Escherichia coli* ATCC 35218 en fase logarítmica OD₆₀₀ 0,3-0,4 de absorbancia, en 10mL de caldo TSB y se incubó a 37°C durante 8 horas (Punil, 2017), el filtrado se observó con menor turbidez que la del control negativo por la presencia de los bacteriófagos líticos.

Figura9

Diagrama del aislamiento de bacteriófagos a partir de muestras de aguas de la cuenca del río Huatanay usando como hospedero a Escherichia coli NCTC 13476 y Escherichia coli ATCC 35218



Fuente: Se hizo uso del programa BioRender.com para la creación del diagrama

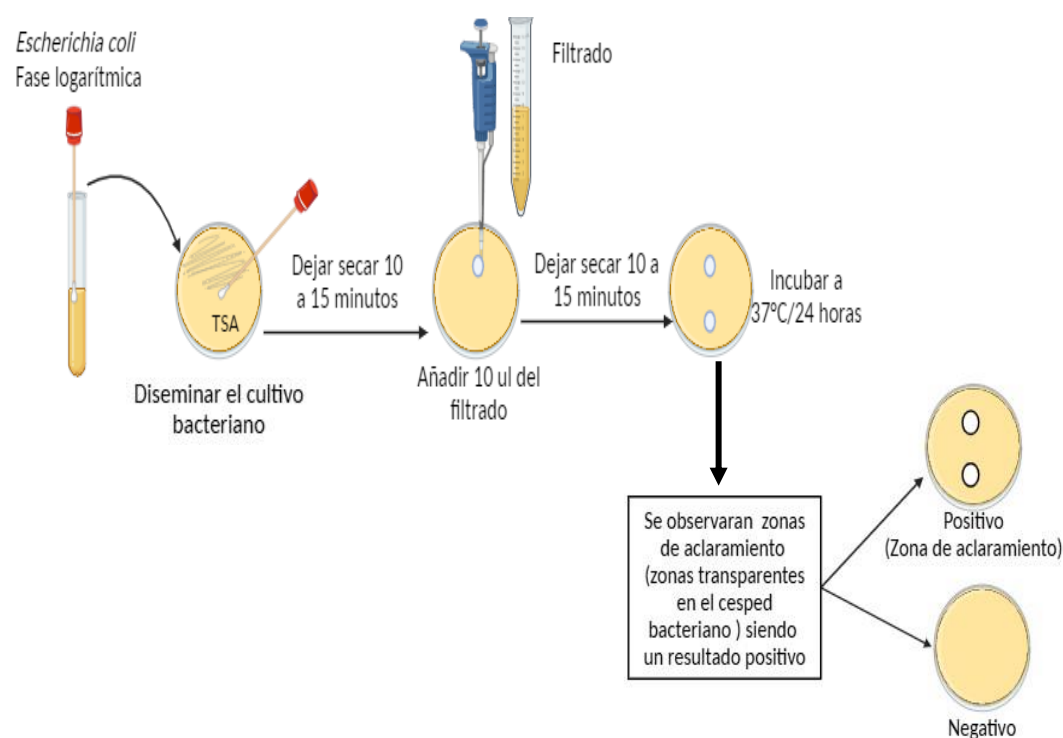
2.5.5 Prueba en Zona (Spot Test)

A partir del filtrado fágico se realizó la prueba en zona (spot test) para la detección cualitativa de bacteriófagos.

Haciendo uso de un hisopo se diseminó el cultivo en fase logarítmica OD₆₀₀ 0,3-0,4 de absorbancia de *Escherichia coli* NCTC 13476 (resistente a carbapenemasas) o *Escherichia coli* ATCC 35218 (resistentes a betalactamasas de espectro extendido) crecidos en caldo TSB a 37°C en placas de Petri que contengan 20mL de agar TSA solidificado (Jamalludeen et al., 2007), luego se añadió 10 µL del filtrado para corroborar la presencia de bacteriófagos líticos y se dejó secar por un tiempo de 10 a 15 minutos, por último, se incubó la placa de Petri a 37°C y se realizó la lectura a las 24 horas (Ullah et al., 2021; Fikadu et al., 2024). Los filtrados que presentaron zonas de aclaramiento después del tiempo de incubación en el agar TSA se consideraron positivos y los que no mostraron zonas de aclaramiento se consideraron negativos, como se evidencia en la Figura 10. Los filtrados positivos fueron almacenados a temperaturas de 4°C.

Figura 10

Diagrama de la Prueba en Zona (Spot Test)



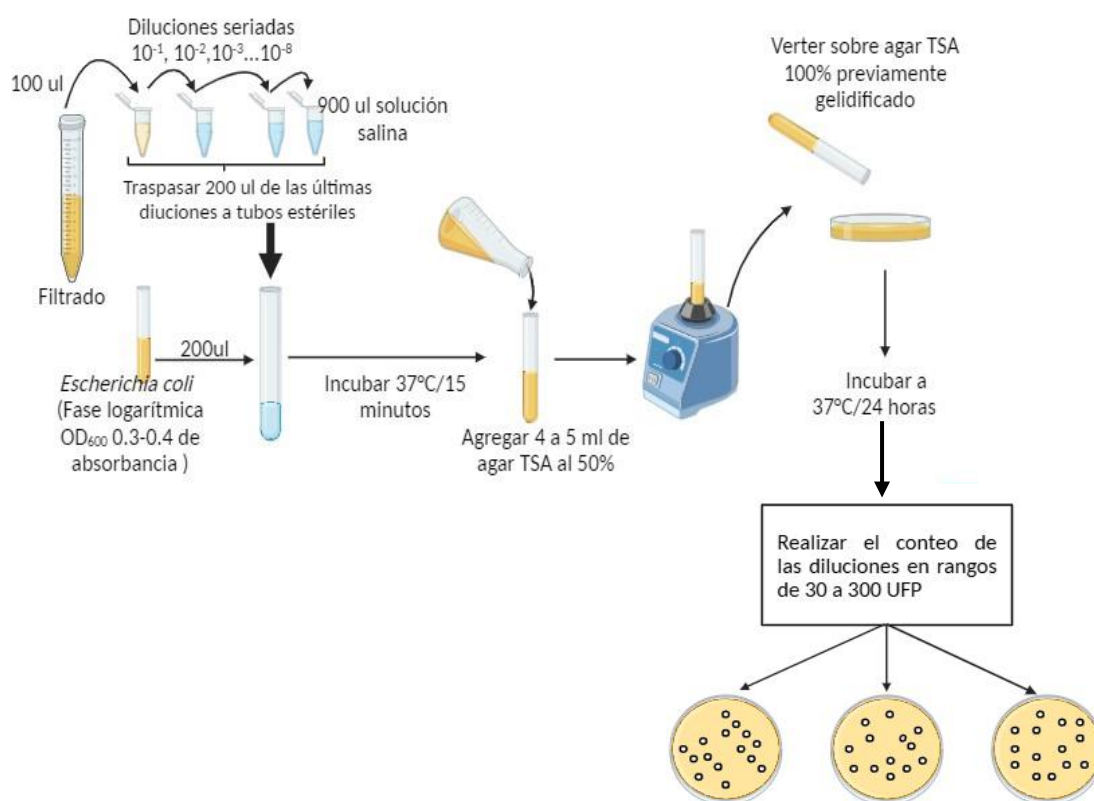
Fuente: Se hizo uso del programa BioRender.com para la creación del diagrama

2.5.6 Método de la bicapa de agar

Del filtrado que presentó una zona de aclaramiento en la prueba en zona (spot test), se realizó la prueba de bicapa de agar para la obtención de placas de lisis por el método de Adams (1959), el método consiste en realizar diluciones seriadas del filtrado, donde, se mezcló 100µL del filtrado en 900µL de solución salina hasta la dilución 10^{-9} . A partir de las diluciones más elevadas (10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} y 10^{-9}) se tomó 200µL y se traspasó de forma individual a tubos estériles para luego agregar 200µL de *Escherichia coli* NCTC 13476 o *Escherichia coli* ATCC 35218 en fase logarítmica OD₆₀₀ 0,3-0,4 de absorbancia, seguidamente se incubó a 37°C por 15 minutos, transcurrido este tiempo se agregó a cada tubo entre 4 a 5mL de agar TSA al 50% templado a $45^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$, se realizó la homogenización en vortex y se vertió sobre placas de Petri con agar TSA 100% previamente solidificado. Se incubó a 37°C durante 24 horas, transcurrido el tiempo se observaron placas de lisis o calvas, las cuales se realizó el recuento entre 30 a 300 UFP (Punil, 2017) (Ullah et al., 2021), como se muestra en la Figura 11.

Figura 11

Diagrama del método de la bicapa de agar



Fuente: Se hizo uso del programa BioRender.com para la creación del diagrama

2.5.7 Purificación de bacteriófagos líticos

De los cultivos que presentaron placas de lisis (calvas) transparentes y características macroscópicas únicas, se tomó una calva con una punta estéril succionando con ayuda de una micropipeta, este contenido se depositó a un tubo de microcentrifuga estéril con solución salina, se pipeteó de arriba hacia abajo para la liberación de los bacteriófagos y se homogenizó mediante Vórtex. El contenido se dejó hasta un máximo de 2 horas a temperatura ambiente con la finalidad de que el bacteriófago se difunda en el medio (Punil, 2017). Por último la muestra se centrifugó a 5000g por 10 minutos y se filtró el sobrenadante con filtros de jeringa de 0,22 micrómetros, este proceso de purificación se repitió un total de 4 veces hasta obtener placas de lisis puras (Cuyutupa, 2022) mediante el método de bicapa de agar (Adams, 1959), como se evidencia en la Figura 12.

Figura 12

Diagrama de la purificación de bacteriófagos de Escherichia coli



Fuente: Se hizo uso del programa BioRender.com para la creación del diagrama

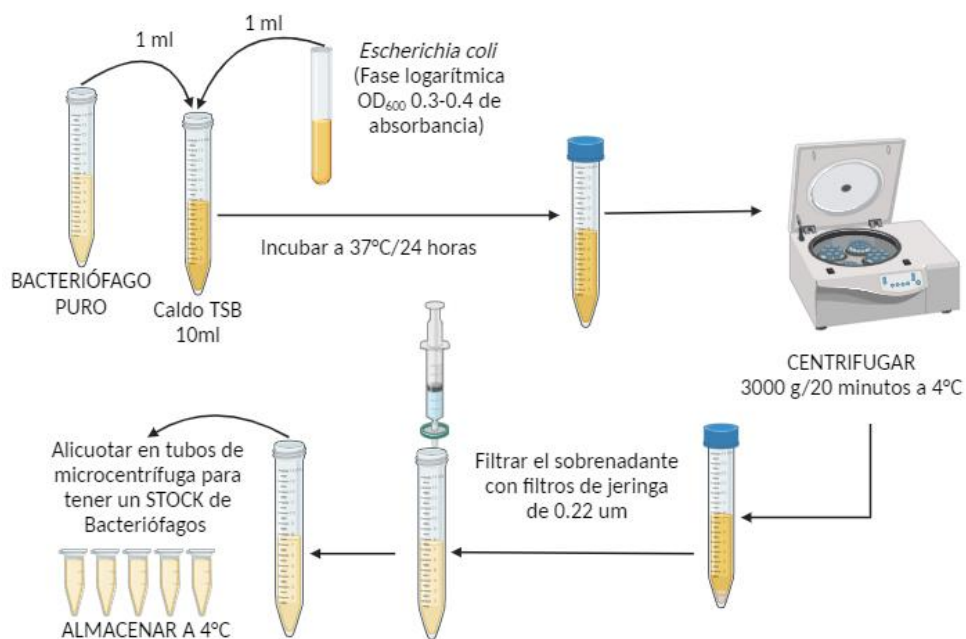
2.5.8 Amplificación de bacteriófagos

El proceso de amplificación consistió en aumentar el número de bacteriófagos en la suspensión, para lo cual se realizó el enfrentamiento bacteriófago versus bacteria (*Escherichia coli* NCTC 13476 (resistente a carbapenemasas) o *Escherichia coli* ATCC 35218 (resistente a betalactamasas de espectro extendido)) en fase logarítmica (Punil, 2017). La amplificación consistió en agregar 1mL de bacteriófago puro y 1mL de bacteria en fase logarítmica OD₆₀₀ 0,3-0,4 de absorbancia (proporción 1:1) a un tubo con 10mL de caldo TSB y se incubó a 37°C por 24 horas, para el control se utilizó 1mL de bacteria en fase logarítmica OD₆₀₀ 0,3-0,4 de absorbancia en 10mL de caldo TSB. Después del

tiempo de incubación se observó un aclaramiento en el tubo que contenía el enfrentamiento a comparación del tubo que solo tenía bacteria (Cuyutupa, 2022). Se prosiguió a centrifugar a 3000g durante 20 minutos a 4°C. El sobrenadante se filtró utilizando filtros de jeringa de 0,22 micrómetros depositando el contenido en un tubo estéril y se almacenó a 4°C para su posterior uso (Sada & Tessema, 2024). El contenido almacenado se alicuotó en tubos de microcentrífuga para tener un stock de trabajo amplio, como se plasma en la Figura 13.

Figura 13

Diagrama de la amplificación de bacteriófagos de Escherichia coli



Fuente: Se hizo uso del programa BioRender.com para la creación del diagrama

2.5.9 Titulación de bacteriófagos

El recuento de placas de lisis se expresa en Unidades Formadoras de Placa (UFP/mL) utilizando la siguiente formula (Sada & Tessema, 2024).

$$\frac{UFP}{ml} = N^{\circ} \text{ de placas de lisis} \times \text{inversa de la dilucion} \times \text{inversa del inoculo}$$

2.5.10 Caracterización biológica de los bacteriófagos líticos aislados

2.5.10.1 Rango de hospedero de bacteriófagos líticos contra *Escherichia coli* NCTC 13476, *Escherichia coli* ATCC 35218, cepas clínicas de *Escherichia coli* MDR y cepas de diferentes especies MDR

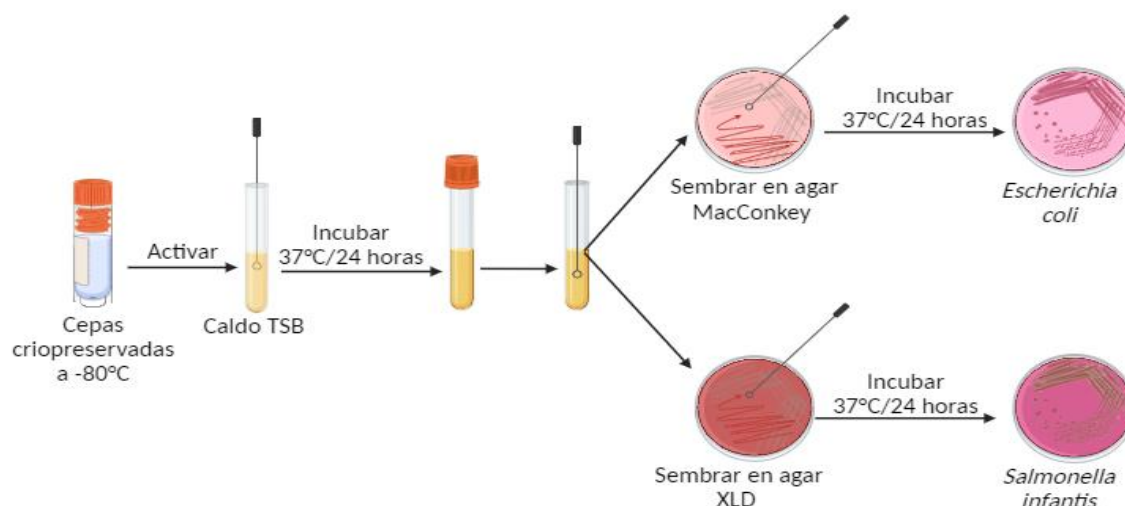
Se determinó el rango de hospedero de los bacteriófagos líticos intraespecie, enfrentándolos contra 46 cepas clínicas de *Escherichia coli* multidrogo resistentes (MDR) obtenidas de pacientes del hospital EsSalud Hospital Adolfo

Guevara Velasco y del Hospital Regional, las cuales fueron caracterizadas mediante VITEK® 2, y 1 cepa de *Escherichia coli* NCTC 13476 (resistente a carbapenemasas) y 1 cepa de *Escherichia coli* ATCC 35218 (resistente a betalactamasa de espectro extendido), haciendo un total de 48 cepas; también se determinó el rango de hospedero interespecie, donde se enfrentó contra 7 cepas (MDR) que son: *Enterobacter cloacae* (2), *Pseudomona aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Klesiella pneumoniae*, *Salmonella infantis* y *Acinetobacter spp* obtenidos de la colección de cepas del Laboratorio Institucional de Microbiología e Inmunología de la Escuela Profesional de Biología de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, estas cepas se encontraban criopreservadas a -80°C y fueron activadas en caldo tripticasa de soya (TSB) e incubadas a 37°C por 24 horas, pasado el tiempo de incubación se sembró cada una de las cepas en agar MacConkey y Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD) solo para *Salmonella infantis*, se incubaron a 37°C por 24 horas para determinar la pureza y viabilidad de las cepas (Campo, 2024), como se observa en la Figura 14. Se tomó una colonia aislada y se transfirió a caldo tripticasa de soya (TSB) y se incubó a 37°C hasta lograr que la cepa alcance OD₆₀₀ 0,3-0,4 de absorbancia, el cual fue leído en el espectrofotómetro, equivalente a 10⁸ bacterias/mL (Sattar et al., 2023). Después de realizar las lecturas se procedió a realizar la técnica de prueba en zona (spot test) previamente explicada, el stock de todos los bacteriófagos utilizados estuvieron en títulos de 10⁷ a 10⁹ UFP/mL (Montso et al., 2019).

Los 4 bacteriófagos fueron seleccionados de acuerdo a los siguientes parámetros: los bacteriófagos que mostraron mayor actividad lítica contra cepas clínicas de *Escherichia coli* MDR; además se tomó en consideración que 2 bacteriófagos fueron aislados en la época de lluvias (mes de marzo 2024) y tuvieron como hospedero a *Escherichia coli* NCTC 13476 y 2 bacteriófagos fueron aislados en la época de secas (agosto 2023) y tuvieron como hospedero a *Escherichia coli* ATCC 35218. Esto se debió a que los hospederos utilizados son muy específicos para cada bacteriófago, lo que permitió realizar las siguientes pruebas restantes de caracterización biológica y fisicoquímica.

Figura 14

Diagrama de la reactivación de cepas clínicas de *Escherichia coli* multidrogo resistentes (MDR) y cepas de diferentes especies



Fuente: Se hizo uso del programa BioRender.com para la creación del diagrama

2.5.10.2 Multiplicidad Optima de Infección (MOI) de los bacteriófagos líticos HEc4I, HEc5I, HEc2II y HEc7II

Para calcular la MOI de forma individual de los 4 bacteriófagos seleccionados, se enfrentó 1mL de cada suspensión de bacteriófagos a concentraciones de 10^6 UFP/mL, 10^7 UFP/mL y 10^8 UFP/mL con 1mL del huésped correspondiente (*Escherichia coli* NCTC 13476 (resistente a carbapenemasas) o *Escherichia coli* ATCC 35218 (resistente a betalactamasas de espectro extendido)) a un OD₆₀₀ 0,3-0,4 de absorbancia equivalente a 10^8 bacterias/mL en 8mL de caldo tripticasa de soya (TSB) contenido en un tubo cónico falcon de capacidad de 15mL, resultando en MOI de 0.01, 0.1 y 1 respectivamente, cada tubo se homogenizó en vortex y se incubó a 37°C durante 4 horas (Punil, 2017; Cuyutupa, 2022). Pasado el tiempo de incubación se centrifugó a 3000g durante 20 minutos a 4°C. El sobrenadante se filtró utilizando filtros de jeringa de 0,22 micrómetros depositando el contenido en un tubo estéril (Sada & Tessema, 2024). Por último, se determinó la concentración de bacteriófagos del tubo filtrado utilizando la técnica de la bicapa de agar (Adams, 1959), como se ve en la Figura 15. Cada ensayo se realizó por triplicado.

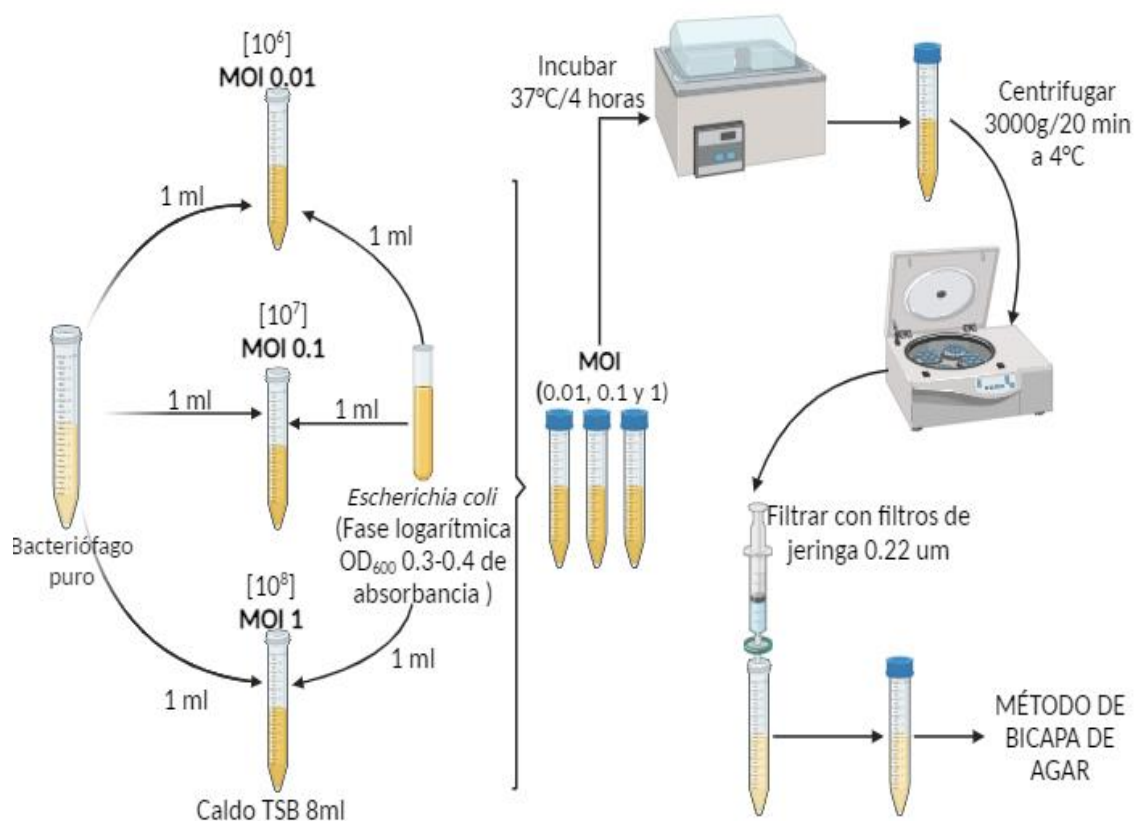
La proporción del enfrentamiento de bacteriófago a concentración de 10^8 UFP/mL con 10^8 de bacteria/mL equivale a una proporción de 1:1 que

corresponde a una MOI de 1, la proporción del enfrentamiento de bacteriófago a concentración de 10^7 UFP/mL con 10^8 de bacteria/mL equivale a una proporción de 1:10 que corresponde a una MOI de 0.1 y la proporción del enfrentamiento de bacteriófago a concentración de 10^6 UFP/mL con 10^8 de bacteria/mL equivale a una proporción de 1:100 que corresponde a una MOI de 0.01.

La MOI se calculó dividiendo el número de partículas virales entre el número de celular a infectar, se consideró la MOI óptima aquella que generó la concentración más alta de bacteriófagos al finalizar el ensayo (Punil, 2017).

Figura 15

Diagrama del experimento de la determinación de la Multiplicidad Óptica de Infección (MOI) de los bacteriófagos HEc4I, HEc5I, HEc2II y HEc7II



Fuente: Se hizo uso del programa BioRender.com para la creación del diagrama

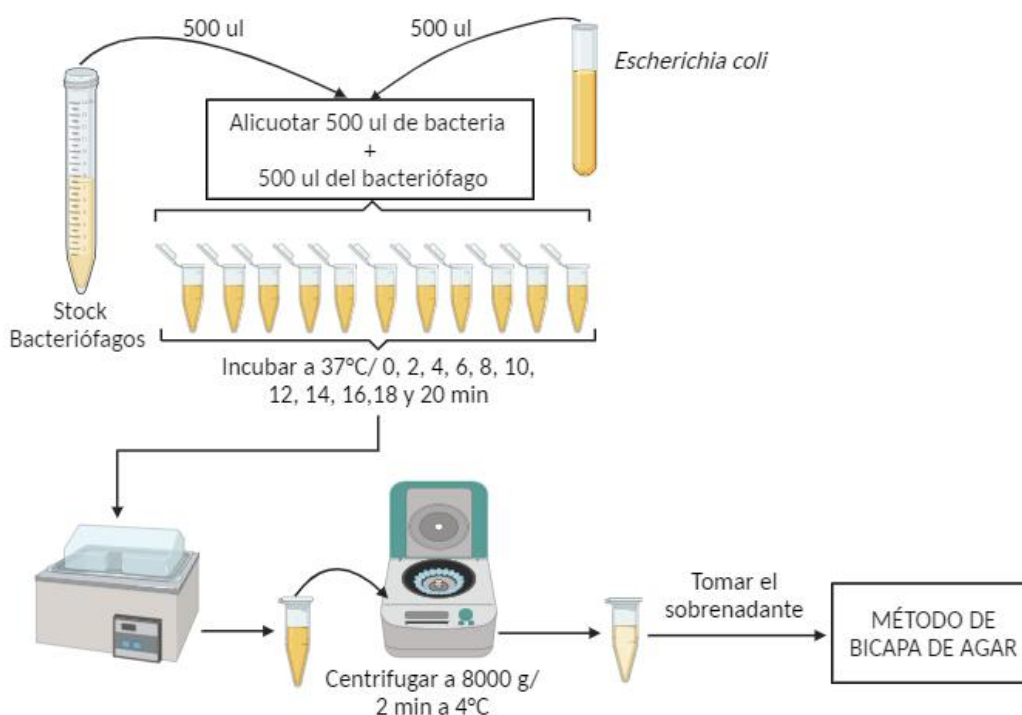
2.5.10.3 Constante de adsorción de los bacteriófagos líticos HEc4I, HEc5I, HEc2II y HEc7II

Para el método de constante de adsorción se siguió el protocolo de Habibinava et al. (2021) modificado, donde se enfrentó 500 µL de bacteria huésped

(*Escherichia coli* NCTC 13476 (resistente a carbapenemasas) o *Escherichia coli* ATCC 35218 (resistente a betalactamasas de espectro extendido)) con 500µL de cada bacteriófago en MOI óptima alicuotados en 11 tubos de microcentrífuga estériles, los cuales fueron incubados a 37°C por 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 y 20 minutos respectivamente, luego de cada tiempo de incubación se centrifugó a 8000g por 2 minutos a 4°C, se tomó el sobrenadante de cada tubo y se realizó el método de bicapa de agar (Adams, 1959) para determinar el título de los bacteriófagos, como se evidencia en la Figura 16. Cada ensayo se realizó por triplicado.

Figura 16

Diagrama del experimento de la constante de adsorción de los bacteriófagos HEc4I, HEc5I, HEc2II y HEc7II



Fuente: Se hizo uso del programa BioRender.com para la creación del diagrama

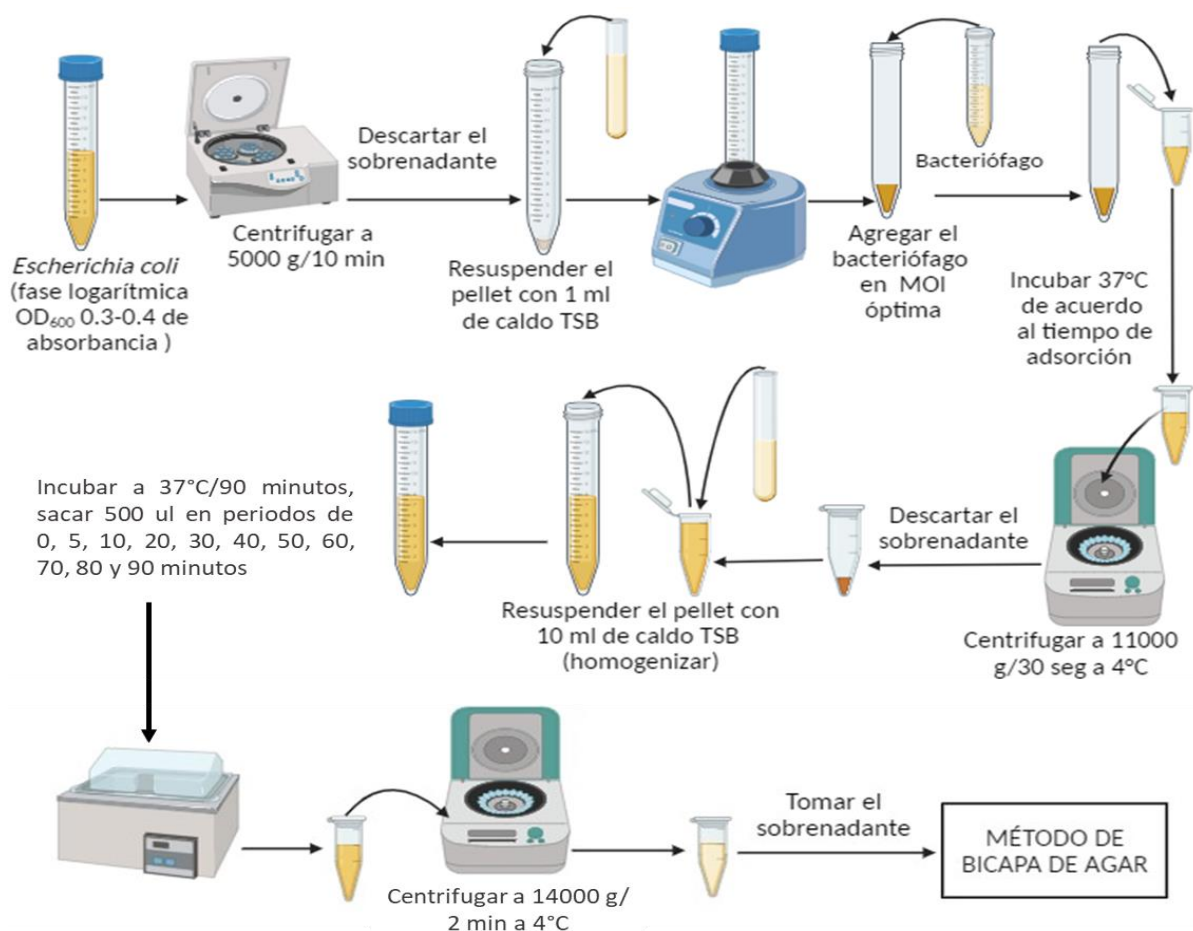
2.5.10.4 Curva de un paso de los bacteriófagos líticos HEc4I, HEc5I, HEc2II y HEc7II

Para este experimento se utilizó las cepas hospederas (*Escherichia coli* NCTC 13476 (resistente a carbapenemasas) o *Escherichia coli* ATCC 35218 (resistente a betalactamasas de espectro extendido)) en 10mL de caldo tripticasa de soya (TSB) en fase logarítmica OD₆₀₀ 0,3-0,4 de absorbancia y se procedió a

centrifugar a 5000g por 10 minutos a 4°C, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet con 1mL de caldo tripticasa de soya (TSB), se homogenizó en vortex, se agregó 100µL de bacteriófago en MOI óptima y se incubó a 37°C tomando en cuenta el resultado del tiempo de adsorción. Transcurrido el tiempo de incubación se centrifugó a 11000g por 30 segundos a 4°C (Habibinava et al., 2021), luego se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet con 10mL de caldo tripticasa de soya (TSB), se homogenizó en vortex y se incubó en baño maría a 37°C durante 90 minutos, se retiraron alícuotas de 500 µL a los 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 y 90 minutos (Salim et al., 2022). Cada alícuota se centrifugó a 14000g por 2 minutos a 4°C e inmediatamente se realizó el método de bicapa de agar (Adams, 1959) para determinar el título de los bacteriófagos, como se muestra en la Figura 17. El ensayo se realizó por triplicado.

Figura 17

Diagrama del experimento de la curva de un paso de los bacteriófagos HEc4I, HEc5I, HEc2II y HEc7II



Fuente: Se hizo uso del programa BioRender.com para la creación del diagrama

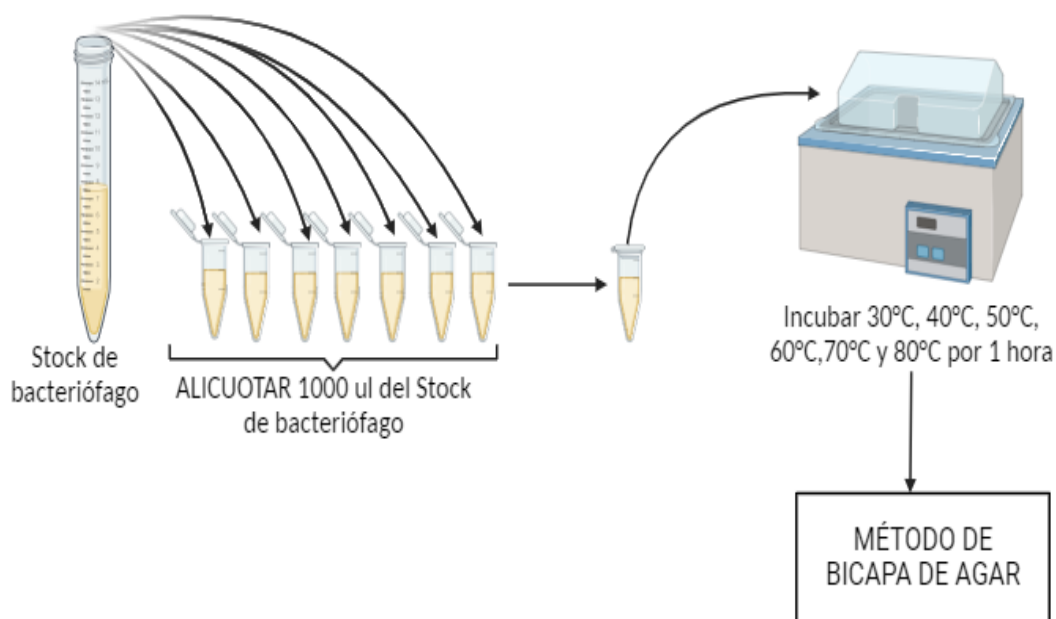
2.5.11 Caracterización Fisicoquímica de los bacteriófagos líticos HEc4I, HEc5I, HEc2II y HEc7II usando como hospedero a *Escherichia coli* NCTC 13476 y *Escherichia coli* ATCC 35218

2.5.11.1 Termo estabilidad de los bacteriófagos líticos HEc4I, HEc5I, HEc2II y HEc7II

En un tubo de microcentrífuga estéril de 1.5mL se colocó 1000 μ L del stock de bacteriófagos a concentraciones determinadas para cada uno ellos, se incubaron en baño maría a temperatura de T°amb (18-20°C), 30°C, 37°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C y 80°C durante 1 hora (Lee et al., 2020; Abdelrahman et al., 2022). Transcurrido el tiempo de incubación se realizó el método de bicapa de agar (Adams, 1959) para determinar el título de los bacteriófagos. El ensayo se realizó por triplicado. Se tomó como control el título del Stock de bacteriófagos almacenados a 4°C, como se evidencia en la Figura 18.

Figura 18

Diagrama del experimento de termo estabilidad de los bacteriófagos HEc4I, HEc5I, HEc2II y HEc7II



Fuente: Se hizo uso del programa BioRender.com para la creación del diagrama

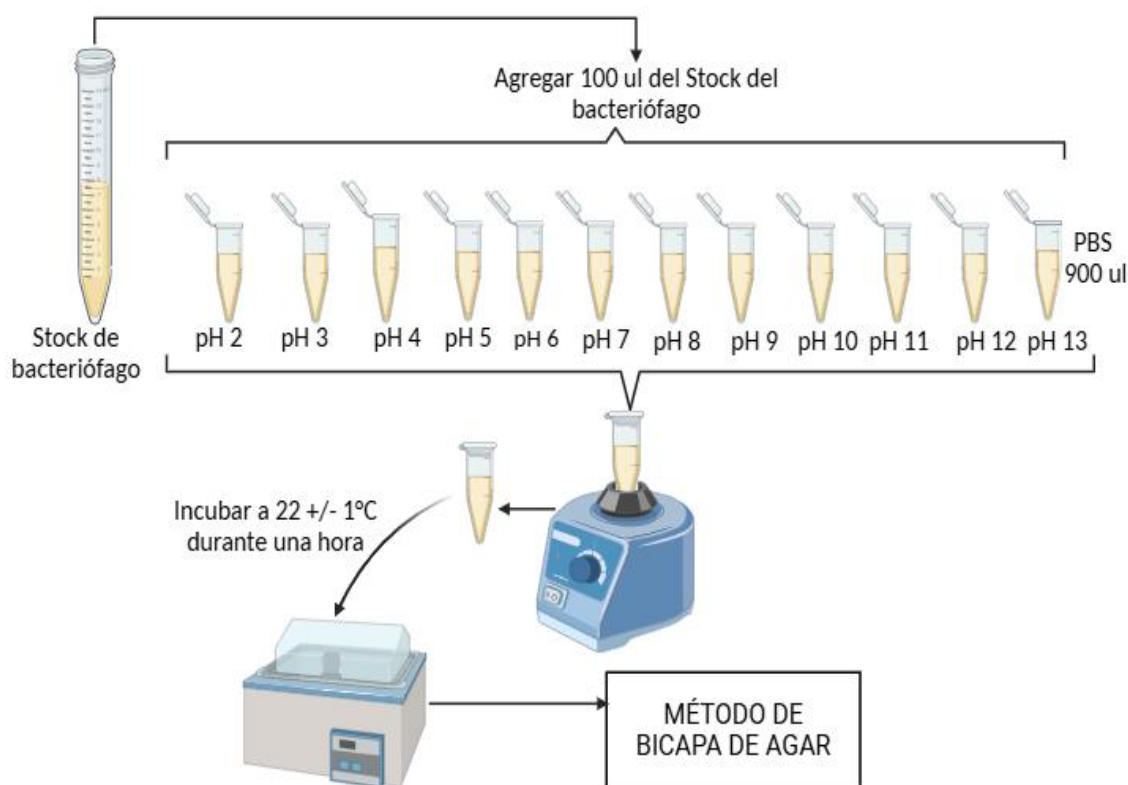
2.5.11.2 Resistencia al pH de los bacteriófagos líticos HEc4I, HEc5I, HEc2II y HEc7II

En un tubo de microcentrífuga estéril de 1,5mL se colocó 100 μ L del stock de bacteriófagos a concentraciones determinadas para cada uno de ellos, más 900 μ L de PBS a pH de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 y 13 (ajustado con HCl

1M y NaOH 1M), se homogenizó la muestra y se incubó a $22 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 1 hora (Lee et al., 2020; Sattar et al., 2023). Transcurrido el tiempo de incubación se realizó el método de bicapa de agar (Adams, 1959) para determinar el título de los bacteriófagos. El ensayo se realizó por triplicado. Se tomó como control el título inicial de los bacteriófagos a pH 7,4, como se muestra en la Figura 19. Se utilizó como base los componentes del Tampon Fوسفato Salino (PBS) por ser no tóxicos para las virus y células en estudio, esto es reafirmado por los estudios realizados por (Litt & Jaroni, 2017).

Figura 19

Diagrama del experimento de la resistencia al pH de los bacteriófagos HEc4I, HEc5I, HEc2II y HEc7II



Fuente: Se hizo uso del programa BioRender.com para la creación del diagrama

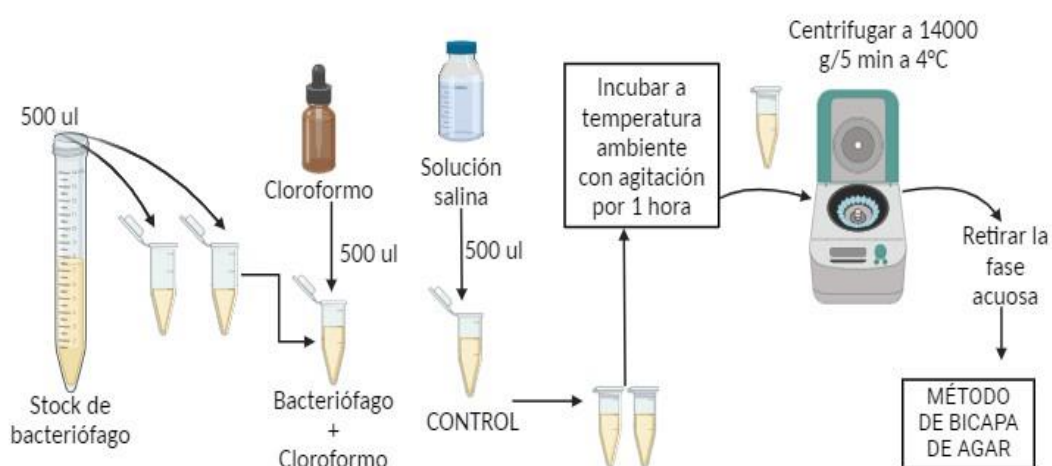
2.5.11.3 Sensibilidad al Cloroformo de los bacteriófagos líticos HEc4I, HEc5I, HEc2II y HEc7II

En un tubo de microcentrifuga estéril de 1,5mL se colocó 500µL del stock de bacteriófagos a concentraciones determinadas para cada uno de ellos, a cada uno se le agregó 500µL de Cloroformo químicamente puro, la mezcla se incubó a temperatura ambiente con agitación constante durante 1 hora, transcurrido el

tiempo se centrifugó a 14000g durante 5 minutos a 4°C, luego la fase acuosa se transfirió a otro tubo de microcentrífuga estéril para eliminar los residuos de cloroformo por evaporación (Punil, 2017). Por último se realizó el método de bicapa de agar (Adams, 1959) para determinar el título de los bacteriófagos. El ensayo se realizó por triplicado. Los controles se prepararon bajo el mismo procedimiento con 500µL del stock de bacteriófagos y 500µL de solución salina (0.85%), como se ve en la Figura 20.

Figura 20

Diagrama del experimento de la sensibilidad al Cloroformo de los bacteriófagos HEc4I, HEc5I, HEc2II y HEc7II



Fuente: Se hizo uso del programa BioRender.com para la creación del diagrama

2.5.12 Identificación por biología molecular de los bacteriófagos líticos

Se solicitó el servicio de secuenciamiento a la empresa BYOSYS S.A.C, para lo cual las muestras de bacteriófagos fueron llevadas a Lima por vía aérea en caldo tripticasa de soya (TSB) a una concentración de 10^8 UFP/mL en cadena de frío a 4°C, la empresa BYOSYS S.A.C. se encargó de realizar los servicios requeridos que incluyen: extracción de DNA y secuenciamiento del material genético por Illumina NGS y de una fase del análisis bioinformático.

Para el servicio de secuenciamiento un paso previo fue alcanzar una concentración mínima de 10^8 UFP/mL, donde solo los bacteriófagos HEc4I y HEc5I, cumplieron este requisito, razón por la cual fueron seleccionados para ser identificados por biología molecular, cabe resaltar estos bacteriófagos presentaron un título estable durante su almacenamiento a 4°C.

Para el análisis bioinformático se siguió los siguientes pasos:

- Una vez obtenida la secuencia completa del material genético de los bacteriófagos HEc4I y HEc5I en formato FASTQ, fue analizado, limpiado y ensamblado. Resultando una secuencia ensamblada de cada bacteriófago en código FASTA.
- La secuencia del material genético completo de los bacteriófagos HEc4I y HEc5I en código FASTA, se sometió en la base de datos del Genbank empleando la herramienta BLAST https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome, donde se comparó con la base de datos de nucleótidos de bacteriófagos similares para determinar secuencias homologas.
- A los bacteriófagos HEc4I y HEc5I se les asignó un RID único en la herramienta BLAST donde permitió determinar la similitud de acuerdo al valor de similaridad con otras secuencias de bacteriófagos disponibles en la base de datos del Genbank.
- Se descargó las secuencias que presentaron mayor similaridad de género con los bacteriófagos HEc4I y HEc5I y se armó una tabla de comparación, la cual fue realizada con ayuda del bioinformático.
- La secuencia que presentó mayor valor de similaridad con los bacteriófagos HEc4I y HEc5I fue buscada en la base de datos del NCBI con la finalidad de conocer la taxonomía, a partir de la cual se contrastó con la información del Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV).
- Se descargó todas las secuencias de bacteriófagos pertenecientes al género encontrado, donde el bioinformático armó un dendrograma circular permitiéndonos realizar comparaciones. El dendrograma se visualizó con iTOL v6.9.1, y fue editado con INKSCAPE

CAPITULO III

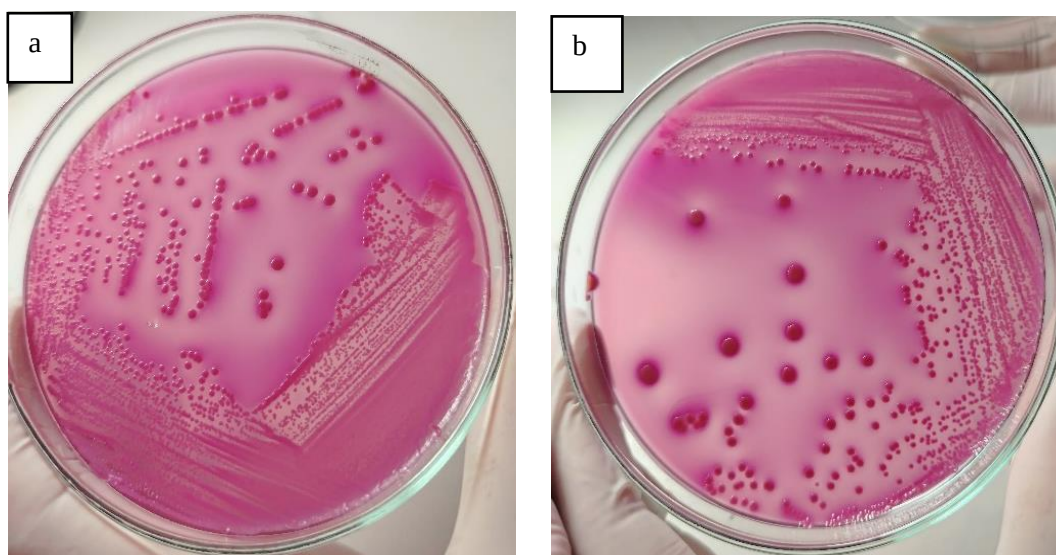
RESULTADOS Y DISCUSION

3.1 Activación de cepas de *Escherichia coli* NCTC 13476 y *Escherichia coli* ATCC 35218 multidrogo resistentes (MDR)

Se activó la cepa *Escherichia coli* NCTC 13476 (resistente a carbapenemasas) y *Escherichia coli* ATCC 35218 (resistente a betalactamasa de espectro extendido) en agar MacConkey y se comprobó la pureza y viabilidad, como se muestra en la Figura 21.

Figura 21

Colonias características de Escherichia coli en agar MacConkey



Nota: (a) *Escherichia coli* NCTC 13476 y (b) *Escherichia coli* ATCC 35218.

3.2 Curva de crecimiento de *Escherichia coli* NCTC 13476 y *Escherichia coli* ATCC 35218 multidrogo resistentes (MDR)

Se realizó la curva de crecimiento de la cepa *Escherichia coli* NCTC 13476 y *Escherichia coli* ATCC 35218, con la finalidad de determinar el tiempo de la fase logarítmica de ambas cepas, la Tabla 4 y Figura 22 corresponden a los resultados de la curva de crecimiento de la bacteria *Escherichia coli* NCTC.

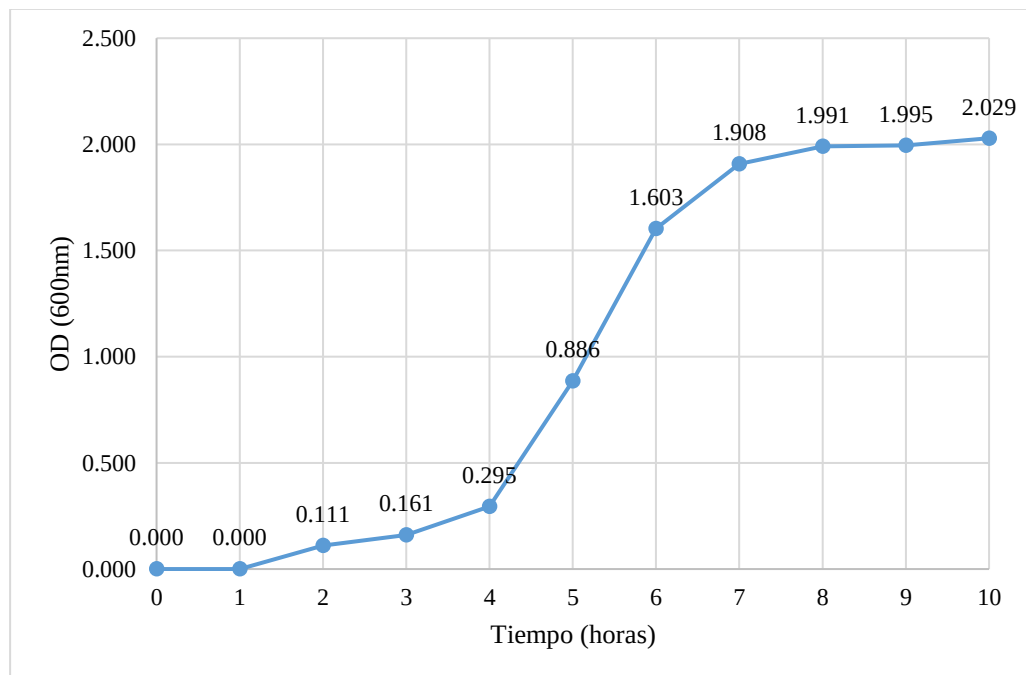
Tabla 4

Curva de crecimiento de Escherichia coli NCTC 13476

<i>Escherichia coli</i> NCTC 13476	
Hora	Absorbancia a OD ₆₀₀
0	0
1	0
2	0.111
3	0.161
4	0.295
5	0.886
6	1.603
7	1.908
8	1.991
9	1.995
10	2.029

Figura 22

Curva de crecimiento de Escherichia coli NCTC 13476, mostrando la absorbancia a OD600 del cultivo versus el tiempo de crecimiento (horas)



Se observa que la fase logarítmica empieza a partir de 4 a 7 horas de incubación a 37°C en caldo BHI, como se observa en la Figura 22.

La Tabla 5 y Figura 23 corresponde a los resultados de la curva de crecimiento de la bacteria *Escherichia coli* ATCC 35218.

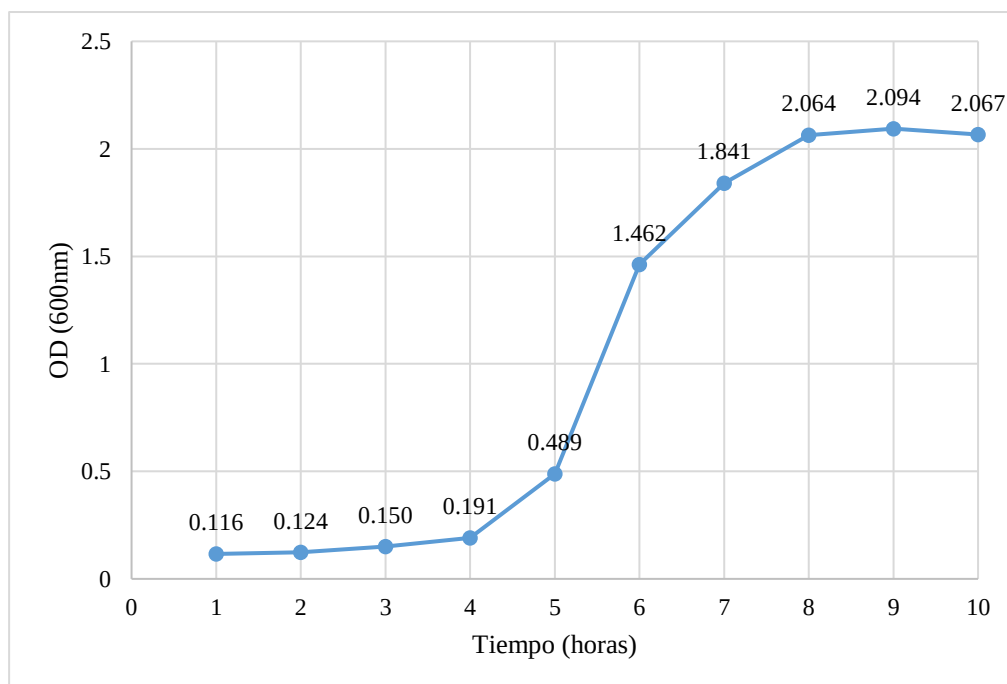
Tabla 5

Curva de crecimiento de Escherichia coli ATCC 35218

<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	
Hora	Absorbancia a OD ₆₀₀
0	0.116
1	0.124
2	0.150
3	0.191
4	0.489
5	1.462
6	1.841
7	2.064
8	2.094
9	2.067
10	2.079

Figura 23

Curva de crecimiento de Escherichia coli ATCC 35218, mostrando la absorbancia a OD600 del cultivo versus el tiempo de crecimiento (horas)



Se observa que la fase logarítmica empieza a partir de 4 a 8 horas de incubación a 37°C en caldo BHI, como se muestra en la Figura 23.

Los resultados de las curvas son similares entre ambas cepas debido a que pertenecen a la especie *Escherichia coli*, pese a tener diferencias en cuanto a características fenotípicas y genotípicas de resistencia a los antibióticos; además, el tiempo de fase logarítmica se puede deber a que la bacteria *Escherichia coli* se multiplica aproximadamente cada 20 minutos en condiciones como: disponibilidad de nutrientes y temperatura óptima de crecimiento. Punil (2017), indica que es necesario determinar la fase logarítmica debido a que las bacterias se encuentran metabólicamente activas facilitando el ciclo replicativo de los bacteriófagos mediante su fase lítica.

Los resultados de la curva de crecimiento de *Escherichia coli* NCTC 13476 y *Escherichia coli* ATCC 35218 en cuanto al tiempo de inicio de la fase logarítmica son similares con los resultados obtenidos por Punil (2017), donde el inicio de la fase logarítmica de *Escherichia coli* comprende de 3 a 8 horas aproximadamente.

3.3 Aislamiento de bacteriófagos líticos a partir de muestras de aguas de la cuenca del rio Huatanay usando como hospedero a *Escherichia coli* NCTC 13476 y *Escherichia coli* ATCC 35218

Se obtuvo un total de 24 muestras de aguas superficiales de la cuenca del rio Huatanay, 12 muestras corresponden a la época de secas (mes de agosto 2023) y 12 muestras a la época de lluvias (mes de marzo 2024), tomando en cuenta los datos del SENAMHI como se ve en el Anexo 3 y Anexo 4, con sus respectivos Climatodiagramas que se observan en la Figura 48 y Figura 49.

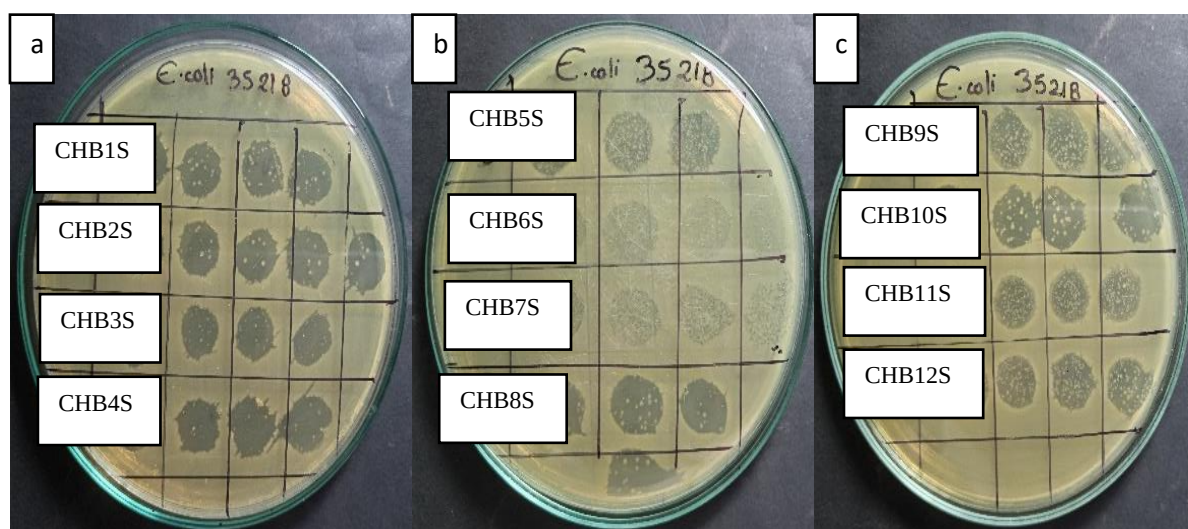
Tabla 6
Actividad lítica de bacteriófagos usando como hospedero a Escherichia coli presentes en las muestras de agua de la cuenca del rio Huatanay correspondiente a época de secas (mes de agosto)

ÉPOCA DE SECAS (MES DE AGOSTO 2023)		
	<i>Escherichia coli</i> NCTC 13476	<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218
MUESTRAS	ZONA DE ACLARAMIENTO	ZONA DE ACLARAMIENTO
CHB1S	-	+
CHB2S	-	+
CHB3S	-	+
CHB4S	-	+
CHB5S	-	+
CHB6S	-	+
CHB7S	-	+
CHB8S	-	+
CHB9S	-	+
CHB10S	-	+
CHB11S	-	+
CHB12S	-	+
TOTAL	0	12
PORCENTAJE (%)	0	100

Nota: C (cuenca), H (Huatanay), B (Botella), 1-12 (número de punto de muestreo), S (época de secas), (+) zona de aclaramiento positivo y (-) zona de aclaramiento negativo

Figura 24

Prueba en zona (spot test) de bacteriófagos usando como hospedero *Escherichia coli* ATCC 35218 en época de secas (mes de agosto)



Nota: (a) zonas de aclaramiento positivo de las muestras CHB1S, CHB2S, CHB3S y CHB4S, (b) zonas de aclaramiento positivo de las muestras CHB5S, CHB6S, CHB7S y CHB8S, (c) zonas de aclaramiento positivo de las muestras CHB9S, CHB10S, CHB11S y CHB12S.

Para las 12 muestras obtenidas en la época de secas (mes de agosto 2023), se utilizaron dos hospederos: *Escherichia coli* NCTC 13476 y *Escherichia coli* ATCC 35218, donde con el hospedero *Escherichia coli* NCTC 13476 no se evidenció ninguna zona de aclaramiento, siendo este un resultado negativo; pero, con el hospedero *Escherichia coli* ATCC 35218 se evidenció 12 zonas de aclaramiento producidos por la presencia de bacteriófagos líticos, siendo este un resultado positivo, como se evidencia en la Tabla 6 y Figura 24.

La presencia de bacteriófagos líticos en hospedero *Escherichia coli* ATCC 35218 es mayor en comparación al hospedero *Escherichia coli* NCTC 13476, probablemente se deba a que los bacteriófagos desarrollaron alta especificidad por bacterias con resistencia a betalactamasas, por tal motivo no se presentaron zonas de aclaramiento por el método de la prueba en zona para el hospedero *Escherichia coli* NCTC 13476 de ninguna de las muestras de aguas obtenidas.

Tabla 7

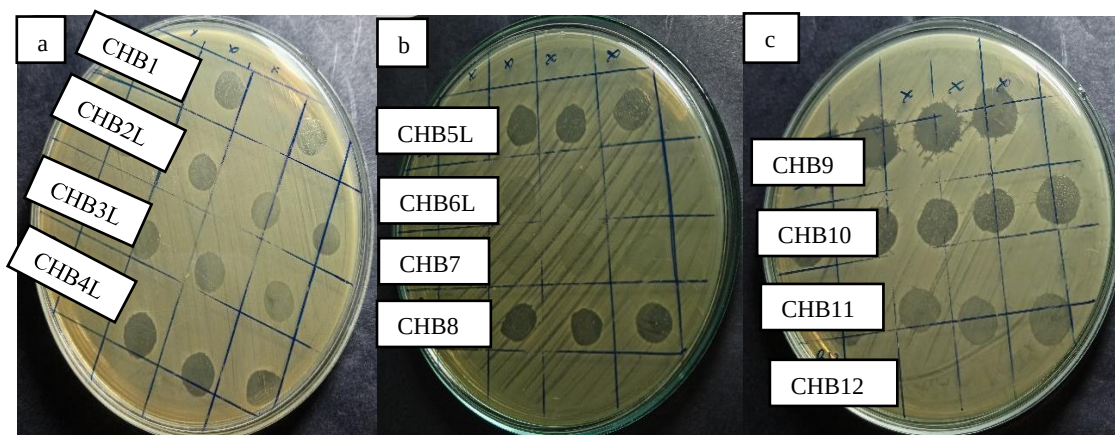
Actividad lítica de bacteriófagos de Escherichia coli presentes en las muestras de agua de la cuenca del rio Huatanay correspondiente a época de lluvias (mes de marzo)

MUESTAS	ÉPOCA DE LLUVIAS (MES DE MARZO 2024)	
	<i>Escherichia coli</i> NCTC 13476	<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218
	ZONA DE ACLARAMIENTO	ZONA DE ACLARAMIENTO
CHB1L	+	+
CHB2L	+	+
CHB3L	+	+
CHB4L	+	+
CHB5L	+	+
CHB6L	-	+
CHB7L	-	-
CHB8L	+	+
CHB9L	+	+
CHB10L	+	+
CHB11L	+	-
CHB12L	-	-
TOTAL	9	9
PORCENTAJE (%)	75	75

Nota: C (cuenca), H (Huatanay), B (Botella), 1-12 (número de punto de muestreo), L (época de lluvias), (+) zona de aclaramiento positivo y (-) zona de aclaramiento negativo.

Figura 25

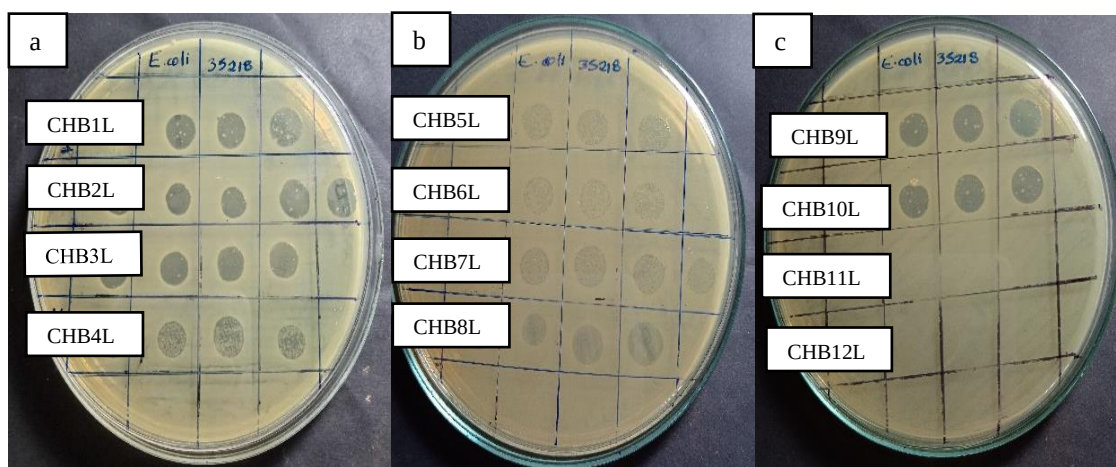
Prueba en zona (spot test) de bacteriófagos usando como hospedero a Escherichia coli NCTC 13476 época de lluvias (mes de marzo)



Nota: (a) zonas de aclaramiento positivo de las muestras CHB1L, CHB2L, CHB3L y CHB4L, (b) zonas de aclaramiento positivo de las muestras CHB5L y CHB8L, (c) zonas de aclaramiento positivo de las muestras CHB9L, CHB10L y CHB11L

Figura 26

Prueba en zona (spot test) de bacteriófagos usando como hospedero a *Escherichia coli* ATCC 35218 época de lluvias (mes de marzo)



Nota: (a) zonas de aclaramiento positivo de las muestras CHB1L, CHB2L, CHB3L y CHB4L, (b) zonas de aclaramiento positivo de las muestras CHB5L, CHB6L y CHB8L, (c) zonas de aclaramiento positivo de las muestras CHB9S y CHB10S.

Para las 12 muestras obtenidas en la época de lluvias (mes de marzo 2024) se utilizaron los mismos hospederos, para el hospedero *Escherichia coli* NCTC 13476 se evidenció 9 zonas de aclaramiento y para el hospedero *Escherichia coli* ATCC 35218 se evidenció también 9 zonas de aclaramiento producidas por la presencia de bacteriófagos líticos, interpretándose como resultados positivos como se ve en la Tabla 7, Figura 25 y Figura 26.

En época de secas, se logró aislar bacteriófagos líticos para el hospedero *Escherichia coli* ATCC 35218 en todos los puntos de muestreo, mientras que en la época de lluvias se logró aislar 9 de 12 puntos de muestreo correspondiente al 75% del total de muestras. Para el hospedero *Escherichia coli* NCTC 13476 se logró aislar bacteriófagos líticos en 9 de 12 puntos de muestreo para la época de lluvias correspondiente al 75% del total de muestras.

Estos resultados se pueden deber a que los bacteriófagos presentes en la época de secas presentaron más afinidad por el hospedero *Escherichia coli* ATCC 35218 por la compatibilidad con los receptores bacterianos a comparación del hospedero *Escherichia coli* NCTC 13476, donde posiblemente no existía la presencia de bacteriófagos específicos para esta cepa. Del mismo modo para la época de lluvias los bacteriófagos fueron específicos en cantidades iguales para ambos hospederos.

El hospedero de *Escherichia coli* resistente a betalactamasas de espectro extendido se encuentra posiblemente en mayor porcentaje en relación al hospedero *Escherichia coli* resistentes a carbapenemasas.

3.4 Aislamiento de bacteriófagos por el método de la bicapa de agar usando como hospedero a *Escherichia coli* NCTC 13476 y *Escherichia coli* ATCC 35218

A partir de las muestras de aguas enriquecidas que presentaron zonas de aclaramiento por la presencia de bacteriófagos líticos en la prueba en zona (spot test), se aislaron por el método de la bicapa de agar un total de 34 bacteriófagos, teniendo en cuenta características únicas como tamaño y presencia o ausencia de halo, como se evidencia en la Tabla 8 y Figura 27. Se tomó en cuenta para el aislamiento individual de los bacteriófagos, aquellos que se mantuvieron viables a temperatura de 4°C (temperatura de almacenamiento), ya que al momento de realizar el método de bicapa de agar de todas las muestras que presentaron zonas de aclaramiento, no en todas se obtuvieron placas de lisis o calvas.

Tabla 8

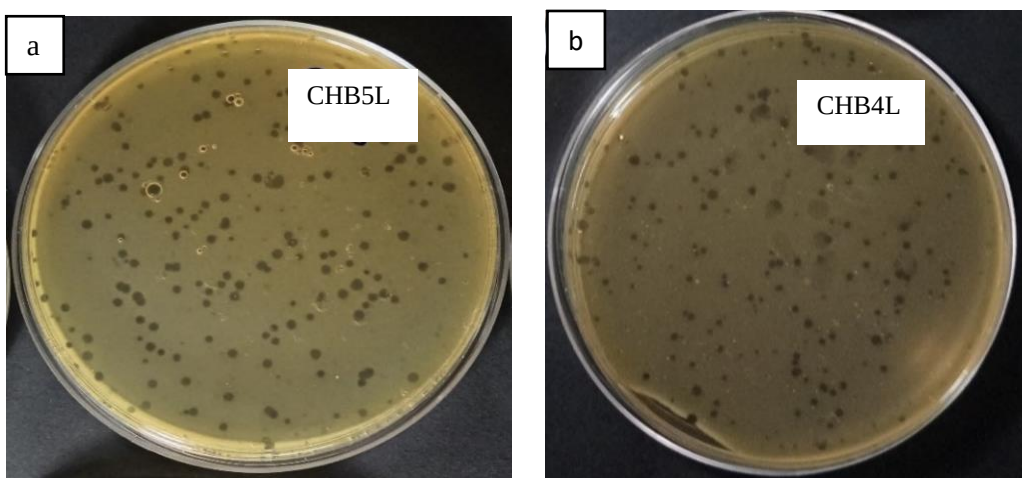
Bacteriófagos aislados a partir de placas de lisis por medio del método de la bicapa de agar para Escherichia coli

MUESTRAS	Época de lluvia (marzo 2024)		MUESTRAS	Época de secas (agosto 2023)
	<i>Escherichia coli</i> NCTC 13476	<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218		<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218
CHB1L	-	-	CHB1S	F19
CHB2L	-	-	CHB2S	F20
CHB3L	-	-	CHB3S	F21 y F22
CHB4L	F1, F2, F3, F4, F5 y F6	-	CHB4S	F23, F24 y F25
CHB5L	F7, F8, F9, F10, F11 y F12	-	CHB5S	F26
CHB6L	-	-	CHB6S	F27
CHB7L	-	-	CHB7S	F28 y F29
CHB8L	-	-	CHB8S	F30
CHB9L	F13, F14, F15 y F16	F17 y F18	CHB9S	F31
CHB10L	-	-	CHB10S	F32
CHB11L	-	-	CHB11S	F33
CHB12L	-	-	CHB12S	F34

Nota: C (cuenca), H (Huatanay), B (Botella), 1-12 (número de punto de muestreo), L (época de lluvias), S (época de secas), (+) zona de aclaramiento positivo y (-) zona de aclaramiento negativo, F (Bacteriófago) y 1-34 (cantidad de bacteriófagos)

Figura 27

Placas de lisis de bacteriófagos obtenidas mediante el método de la bicapa de agar usando como hospedero a Escherichia coli NCTC 13476



Nota: (a) placas de lisis o calvas de la muestra CHB5L y (b) placas de lisis o calvas de la muestra CHB4L

De acuerdo a los resultados de la Tabla 8, se evidencia que para el hospedero *Escherichia coli* NCTC 13476 se aisló 16 bacteriófagos líticos y para el hospedero *Escherichia coli* ATCC 35218 se aisló 2 bacteriófagos líticos, teniendo un total de 18 bacteriófagos líticos para la época de lluvias (mes de marzo 2024). Para la época de secas (mes de agosto 2023) se aisló 16 bacteriófagos líticos para el hospedero *Escherichia coli* ATCC 35218. En total se aisló 34 bacteriófagos líticos para *Escherichia coli*, como se ve en la Figura 27; evidenciando que se encontró más de un bacteriófago lítico por muestra de agua.

Se determinó la poca estabilidad de los bacteriófagos al comparar los resultados obtenidos en la Tabla 6 y Tabla 7 con los resultados de la Tabla 8, donde se evidencia una aparente no coincidencia respecto a las zonas de aclaramiento positivas y/o negativas, esto se debe probablemente a la susceptibilidad de los bacteriófagos a cambios de temperatura en su almacenamiento a 4°C inactivándose por completo, esto se comprobó que al momento de realizar la bicapa de agar no se evidenció placas de lisis en las muestras CHB1L, CHB2L, CHB3L, CHB8L, CHB10L, CHB11L para el hospedero *Escherichia coli* NCTC 13476 y CHB1L, CHB2L, CHB3L, CHB4L, CHB5L, CHB6L, CHB8L y CHB10L para el hospedero *Escherichia coli* ATCC 35218 para la época de lluvias (mes de marzo 2024), debido a esto solo se lograron aislar 34 bacteriófagos en total. Otra condición que determinó que se obtuvieran 18 bacteriófagos para la

época de lluvias se pudo deber a la mayor precipitación pluvial el cual ocasionó mayor arrastre de materia orgánica, sedimentos y posiblemente microorganismos como la *Escherichia coli* al cauce del río Huatanay, incrementando la presencia de bacteriófagos específicos a comparación de la época de secas, donde las aguas de la cuenca del río Huatanay solo reciben poca descargar de sus afluentes naturales disminuyendo el cauce del río.

Según los estudios realizados por Abdelrahman et al. (2022), aislaron 3 bacteriófagos a partir de aguas residuales utilizando como hospedero a *Escherichia coli* O18 MDR, Sjahriani et al. (2021) aislaron 8 bacteriófagos de aguas residuales utilizando como hospedero *Escherichia coli* O157:H7, Sada & Tessema (2024) aislaron 17 bacteriófagos de diversas fuentes de agua utilizando 6 cepas patógenas clínicamente aisladas de *Escherichia coli* MDR. Lee et al. (2020) aislaron un bacteriófago a partir de aguas residuales utilizando como hospedero a *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 43895, además Litt & Jaroni (2017) aislaron de muestras de agua y heces bovinas 7 bacteriófagos utilizando como hospedero *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 43895, de igual forma Fikadu et al. (2024) aislaron 3 bacteriófagos de muestras de aguas residuales, 2 de ellos utilizando como hospedero *Escherichia coli* 4307 y el otro *Escherichia coli* 4194, ambas cepas MDR. Por último Nazir et al. (2024) aislaron de aguas residuales hospitalarias 2 bacteriófagos utilizando *Escherichia coli* 1.054 y *Escherichia coli* 1.731 ambas MDR respectivamente, Punil (2017) aisló un bacteriófago de muestras de aguas residuales utilizando *Escherichia coli* ATCC 25922 y Ullah et al. (2021) aislaron de efluentes de aguas residuales 1 bacteriófago usando como hospedero *Escherichia coli* S2 sensible.

A diferencia de estos resultados, en el presente estudio se lograron aislar un total 34 bacteriófagos, superando en número a los respectivos autores; esta diferencia se puede deber a que los bacteriófagos fueron aislados de aguas de la cuenca de río Huatanay que es el principal receptor de aguas residuales domésticas, municipales, industriales, agrícola y aguas pluviales de la ciudad del Cusco, generando un medio que proporciona las condiciones ideales para el crecimiento y proliferación de *Escherichia coli* y por ende la presencia de bacteriófagos específicos contra esta bacteria.

Según la prueba no paramétrica de Wilcoxon, se determinó que no existe diferencias significativas en el aislamiento de bacteriófagos líticos en cuanto a la época de secas y época de lluvias, ($\text{sig}=0.630$) al 95% de nivel de confianza, como se muestra en el Anexo 5.

3.5 Purificación y Amplificación de bacteriófagos

Se purificaron y amplificaron 34 bacteriófagos de *Escherichia coli* utilizando el método de la bicapa de agar con la finalidad de obtener placas de lisis puras. Cada bacteriófago muestra características macroscópicas únicas en cuanto a tamaño y presencia o ausencia de halo. La placa de lisis (calva) representa un complejo bacteriófago-hospedero específico, como se observa en la Tabla 9. Se realizó la amplificación enfrentando bacteriófago versus bacteria (*Escherichia coli* NCTC 13476 o *Escherichia coli* ATCC 35218) con la finalidad de elevar el título y obtener un stock de trabajo para realizar las siguientes pruebas, se observaron tubos con aclaramientos con respecto al control negativo (bacteria más caldo tripticasa de soya (TSB)); el aclaramiento se produjo posiblemente por la lisis producida por los bacteriófagos frente a su hospedero (*Escherichia coli* NCTC 13476 o *Escherichia coli* ATCC 35218), como se muestra en la Figura 28.

Tabla 9

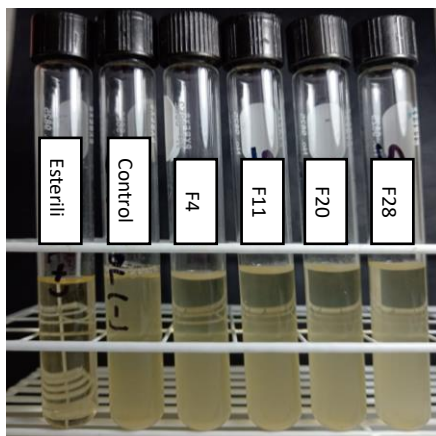
Características macroscópicas de las placas de lisis o calvas de los bacteriófagos purificados para Escherichia coli

BACTERIOFAGOS	CARACTERÍSTICAS DE LA CALVA	TAMAÑO (mm)
<i>Escherichia coli</i> NCTC 13476	F1	Calvas transparentes
	F2	Calvas transparentes
	F3	Calvas transparentes
	F4	Calvas transparentes
	F5	Calvas transparentes
	F6	Calvas transparentes
	F7	Calvas transparentes
	F8	Calvas transparentes
	F9	Calvas transparentes
	F10	Calvas transparentes
	F11	Calvas transparentes
	F12	Calvas transparentes
	F13	Calvas transparentes con halo
	F14	Calvas transparentes
	F15	Calvas transparentes
	F16	Calvas transparentes
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	F17	Calvas transparentes
	F18	Calvas transparentes
	F19	Calvas transparentes con halo
	F20	Calvas transparentes
	F21	Calvas transparentes con halo
	F22	Calvas transparentes
	F23	Calvas transparentes
	F24	Calvas transparentes con halo
	F25	Calvas transparentes con halo
	F26	Calvas transparentes
	F27	Calvas transparentes
	F28	Calvas transparentes
	F29	Calvas transparentes
	F30	Calvas transparentes con halo
	F31	Calvas transparentes con halo
	F32	Calvas transparentes con halo
	F33	Calvas transparentes con halo
	F34	Calvas transparentes con halo

Nota: F (Bacteriófago) y 1-34 (cantidad de bacteriófagos)

Figura 28

Enfrentamiento bacteriófago versus bacteria en caldo TSB



En la Figura 28 se observa el resultado de la amplificación del enfrentamiento bacteriófago versus bacteria (*Escherichia coli* NCTC 13476 o *Escherichia coli* ATCC 35218), donde se muestran ligeros aclaramientos en los tubos que indican la presencia de bacteriófagos líticos como el F4, F11, F20 y F28 en comparación al control, que solo contiene bacteria (*Escherichia coli* NCTC 13476 o *Escherichia coli* ATCC 35218) y caldo tripticasa de soya (TSB); además, se realizó el control del medio para comprobar su esterilidad.

Las características de las placas de lisis o calvas en cuanto a transparencia y presencia o ausencia de halo de cada una de ellas pueden estar relacionadas a que una placa de lisis es un complejo bacteriófago-hospedero específico; además estos fueron aislados de diferentes puntos de muestreo, donde para los 18 primeros bacteriófagos se usó como hospedero a *Escherichia coli* NCTC 13476 y para los 16 restantes se usó como hospedero a *Escherichia coli* ATCC 35218, a pesar de que los hospederos pertenecen a la misma especie estos difieren en cuanto a características fenotípicas y genotípicas de resistencia a los antibióticos.

En la presente investigación la limitante para la amplificación fue que en algunos bacteriófagos el título máximo alcanzado no superaba 10^7 UFP/mL; otro factor determinante fue que al mínimo cambio de temperatura de algunos bacteriófagos no se mantenían estables al título almacenado a 4°C, disminuyendo su título hasta 4 escalas logarítmicas.

3.6 Caracterización biológica de los bacteriófagos líticos aislados

3.6.1 Rango de hospedero de bacteriófagos líticos contra *Escherichia coli* NCTC 13476, *Escherichia coli* ATCC 35218, cepas clínicas de *Escherichia coli* MDR y cepas de diferentes especies MDR

A los 34 bacteriófagos de *Escherichia coli* purificados y amplificados se les realizó la prueba en zona (spot test) enfrentándolos contra 46 cepas clínicas de *Escherichia coli* multidrogo resistentes (MDR) obtenidas de pacientes del EsSalud Hospital Adolfo Guevara Velasco y del Hospital Regional, 1 cepa de *Escherichia coli* NCTC 13476 (resistente a carbapenemasas) y 1 cepa de *Escherichia coli* ATCC 35218 (resistente a betalactamasa de espectro extendido), haciendo un total de 48 cepas, teniendo como resultado en porcentajes la cantidad de bacterias lisadas por los bacteriófagos, como se muestra en la Tabla 10, Figura 29 y Anexo 6, a partir de los resultados de la prueba de rango de hospedero intraespecie se seleccionaron 4 bacteriófagos (F4, F11, F20 y F28) tomando en cuenta la cantidad de cepas clínicas de *Escherichia coli* MDR lisadas y la intensidad de la zona de aclaramiento, como se ve en la Figura 30; a estos bacteriófagos se les realizó el rango de hospedero interespecie, donde fueron enfrentados contra cepas (MDR) que son: *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella infantis* y *Acinetobacter spp.* Las cepas fueron obtenidas de la colección de cepas del Laboratorio Institucional de Microbiología e Inmunología de la Escuela Profesional de Biología de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, como se evidencia en la Tabla 12 y Figura 31.

Tabla 10

Rango de hospedero de 34 bacteriófagos expresado en número y porcentaje contra 48 cepas lisadas de Escherichia coli multidrogo resistentes (MDR) aislados de pacientes hospitalarios

Bacteriófagos	Rango de hospedero intraespecie	
	Nº de bacterias lisadas	Porcentaje de lisados
F1	4	8%
F2	4	8%
F3	3	6%
F4	5	10%
F5	5	10%
F6	5	10%
F7	4	8%
F8	5	10%
F9	2	4%
F10	4	8%
F11	15	31%
F12	5	10%
F13	5	10%
F14	5	10%
F15	5	10%
F16	5	10%
F17	2	4%
F18	3	6%
F19	5	10%
F20	7	15%
F21	1	2%
F22	3	6%
F23	4	8%
F24	6	13%
F25	2	4%
F26	1	2%
F27	7	15%
F28	9	19%
F29	6	13%
F30	1	2%
F31	5	10%
F32	1	2%
F33	1	2%
F34	2	4%

Figura 29

Porcentaje de capacidad lítica de bacteriófagos frente a cepas Escherichia coli multidrogo resistente (MDR)

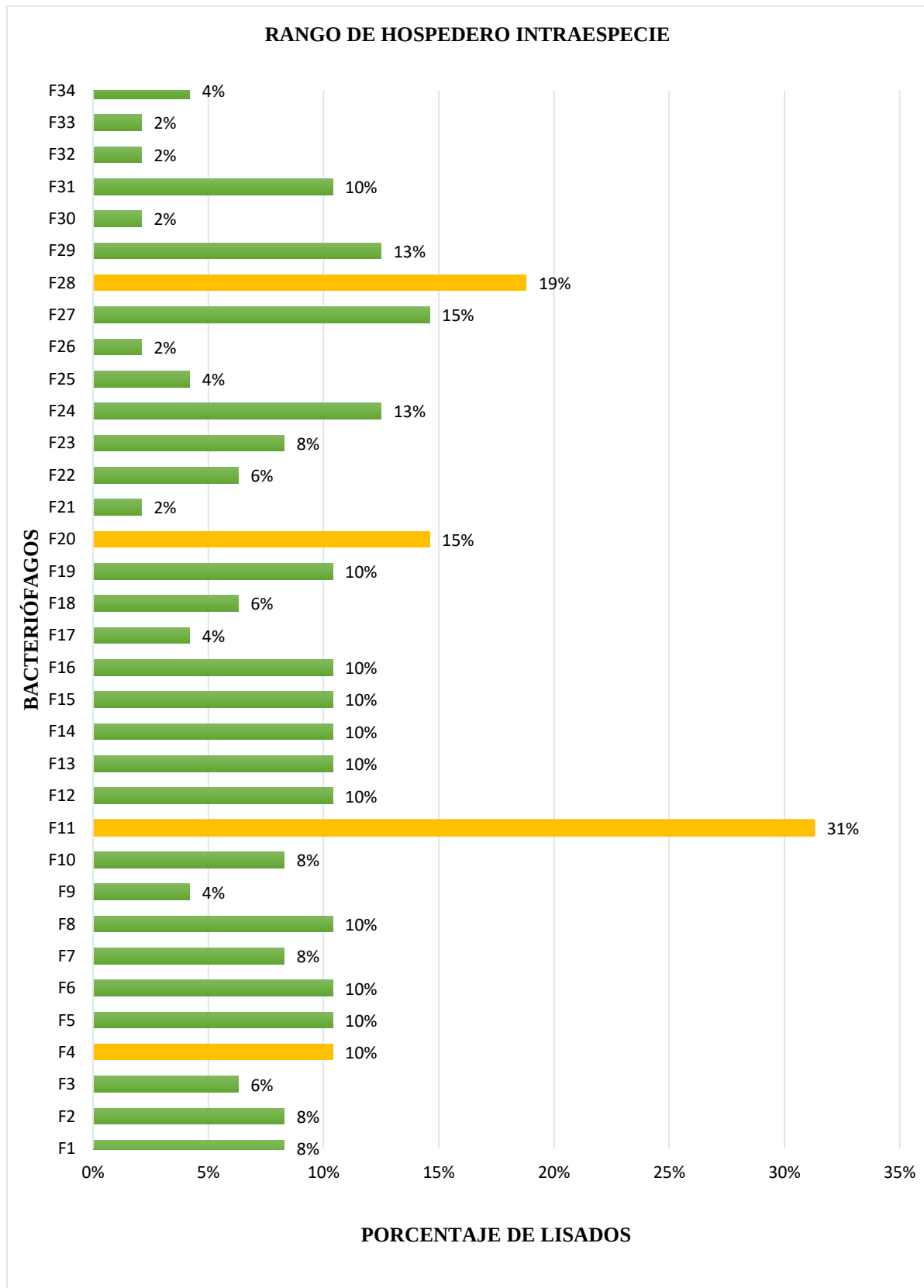
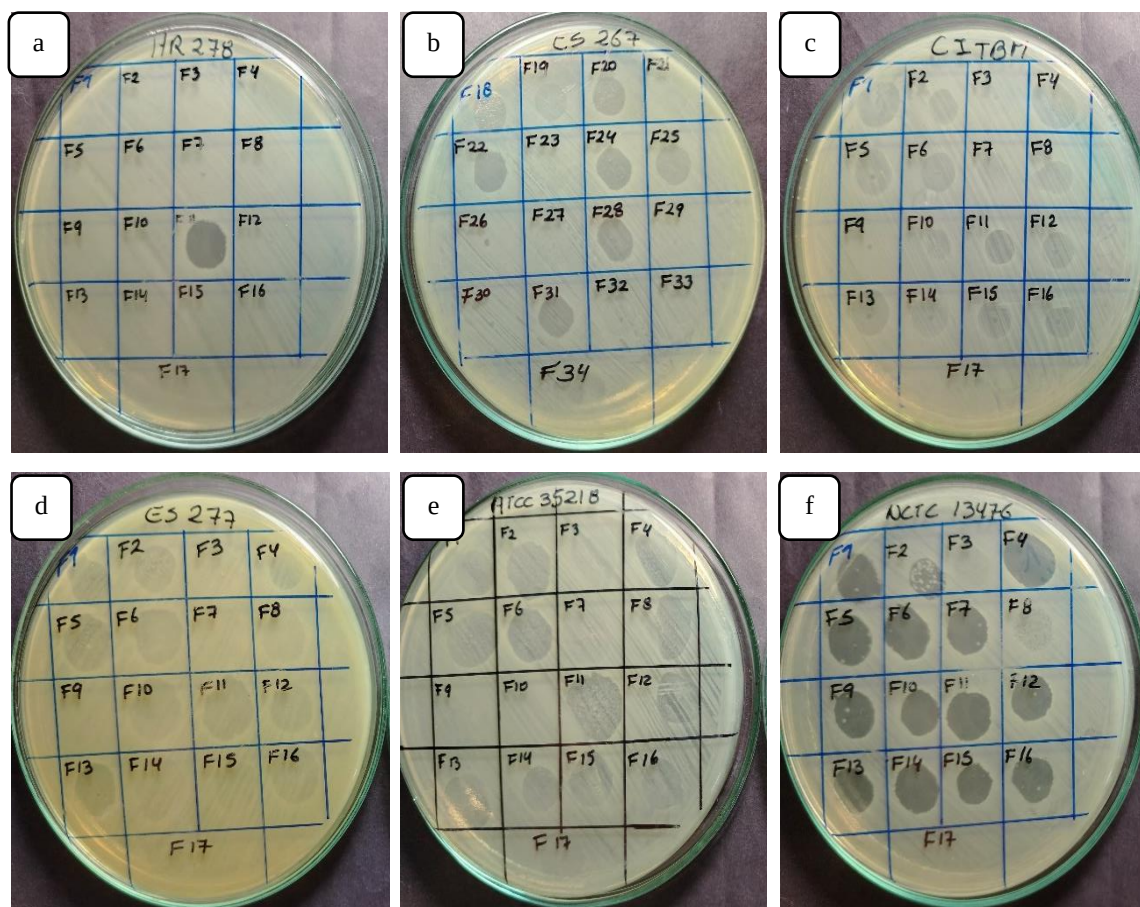


Figura 30

Rango de hospedero de bacteriófagos líticos contra cepas de Escherichia coli multidrogo resistente (MDR) aislados de pacientes hospitalarios



Nota: Cepas de *Escherichia coli* codificados como: (a) HR278, (b) ES267, (c) CITBM, (d) ES277, (e) ATCC 35218 y (f) NCTC 13476 correspondientes a la colección de cepas del Laboratorio Institucional de Microbiología e Inmunología de la Escuela Profesional de Biología de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco.

Los 34 bacteriófagos líticos aislados, al ser sometidos a hospederos de *Escherichia coli* MDR resultaron tener actividad lítica, frente a por lo menos una cepa bacteriana, como se plasma en la Tabla 10 y Figura 29, donde los bacteriófagos F21, F26, F30, F32 y F33 mostraron actividad lítica contra 1 cepa de *Escherichia coli* MDR representando el 2% para cada uno, los bacteriófagos F9, F17, F25 y F34 presentaron actividad lítica contra 2 cepas diferentes de *Escherichia coli* MDR representado el 4% para cada uno, por otro lado los bacteriófagos F3, F18 y F22 tuvieron actividad lítica contra 3 cepas diferentes de *Escherichia coli* MDR representado el 6% para cada uno, también los bacteriófagos F1, F2, F7, F10 y F23 evidenciaron actividad lítica contra 4 cepas diferentes de *Escherichia coli* MDR representado el 8% para cada uno, por otra parte los bacteriófagos F4, F5, F6, F8, F12, F13, F14, F15, F16, F19 y F31 mostraron actividad lítica contra 5 cepas

diferentes de *Escherichia coli* MDR representado el 10% para cada uno, de otra manera los bacteriófagos F24 y F29 presentaron actividad lítica contra 6 cepas diferentes de *Escherichia coli* MDR representado el 13% para cada uno, además los bacteriófagos F20 y F27 tuvieron actividad lítica contra 7 cepas diferentes de *Escherichia coli* MDR representado el 15% para cada uno, el bacteriófago F28 mostró actividad lítica contra 9 cepas diferentes de *Escherichia coli* MDR representado el 19%; por último, el bacteriófago F11 evidenció actividad lítica contra 15 cepas diferentes de *Escherichia coli* MDR representado el 31%.

Según la prueba de chi cuadrado, se determinó que existe diferencias significativas entre la actividad líticas de los 34 bacteriófagos contra *Escherichia coli* ATCC 35218 o *Escherichia* NCTC 13476 ($\text{sig}=0.000$) al 95% de nivel de confianza, como se muestra en el Anexo 7.

Las diferencias de actividad lítica de cada bacteriófago contra cepas clínicas de *Escherichia coli* se pueden deber a que cada bacteriófago fue aislado de diferentes puntos de muestreo en diferentes épocas del año (mes de agosto 2023 – época de secas y mes de marzo 2024 – época de lluvias), también se puede suponer que los bacteriófagos no presentan los mismos receptores unos con otros y por último, las características de los receptores de la pared celular bacteriana de *Escherichia coli* puede diferir de una cepa a otra, a pesar de ser cepas de la misma especie, estos difieren posiblemente por presentar características fenotípicas y genotípicas diferentes de resistencia a los antibióticos.

Los 34 bacteriófagos aislados que representan el 100% mostraron lisis con al menos una cepa de *Escherichia coli* MDR, como muestra el trabajo de Litt & Jaroni (2017) que aislaron 7 bacteriófagos donde evidenciaron actividad lítica también en un 100% con al menos una cepa bacteriana de *Escherichia coli*. También coincide con los estudio de Abdelrahman et al. (2022) que aislaron 3 bacteriófagos con actividad lítica contra 5 cepas de referencia patógena de *Escherichia coli*. Por otra parte este estudio difiere con los estudios realizados por Sada & Tessema (2024), que obtuvieron 17 (100%) bacteriófagos de los cuales 11 (65%) de ellos fueron efectivos y 6 (35%) no demostraron actividad lítica alguna, también difiere con Fikadu et al. (2024) que aislaron 3 (100%) bacteriófagos, de los cuales 2 (66.6%) tuvieron actividad lítica frente a diferentes cepas de *Escherichia coli* MDR y 1 (33.3%) bacteriófago no tuvo actividad lítica con alguna cepa.

De los 34 bacteriófagos aislados se seleccionaron 4 tomando en cuenta el número de cepas clínicas de *Escherichia coli* MDR lisadas, para la F4 (10%), F11 (31%), F20 (15%) y F28 (19%) como se observa en la Tabla 10; la intensidad de la zona de aclaramiento; el hospedero a partir del cual fueron aislados, para F4 y F11 se usó como hospedero a *Escherichia coli* NCTC 13476 y para los bacteriófagos F20 y F28 se utilizó como hospedero a *Escherichia coli* ATCC 35218; también se tomó en cuenta la época de muestreo, siendo los bacteriófagos F4 y F11 pertenecientes a la época de lluvias (mes de marzo 2024), los bacteriófagos F20 y F28 pertenecientes a la época de secas (mes de agosto 2023). Los bacteriófagos F4, F11, F20 y F28 fueron seleccionados para continuar con las pruebas restantes de caracterización biológica y fisicoquímica.

Los 4 bacteriófagos seleccionados F4, F11, F20 y F28 se recodificaron con la finalidad de que el código nuevo contenga la información del lugar donde se recolecto las muestras de agua, el hospedero utilizado, el punto de muestreo y la época, como se muestra en la Tabla 11, a partir de estos se siguió con la caracterización biológica (multiplicidad optima de infección, constante de adsorción y curva de un paso) y la caracterización fisicoquímica (termo estabilidad, resistencia al pH y sensibilidad al cloroformo). Además, en la Tabla 13 se muestran las características macroscópicas de las placas de lisis o calvas de los bacteriófagos seleccionados.

Tabla 11

Recodificación de bacteriófagos líticos contra Escherichia coli

BACTERIOFAGOS	
CODIFICACION ANTIGUA	CODIFICACION ACTUAL
F4	HEc4I
F11	HEc5I
F20	HEc2II
F28	HEc7II

NOTA: (H) Huatanay, (Ec) *Escherichia coli*, (2, 4, 5 y 7) puntos de muestreo, (I) época de lluvia, (II) época de secas.

Se determinó el rango de hospedero interespecie de los 4 bacteriófagos de *Escherichia coli* aislados mediante la prueba en zona (spot test) contra diferentes cepas bacterianas como *Enterobacter cloacae*, *Pseudomona aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Klesiella pneumoniae*, *Salmonella infantis* y *Acinetobacter spp*, como se muestra en la Tabla 12;

donde los bacteriófagos F4 (HEc4I), F11 (HEc5I), F20 (HEc2II) y F28 (HEc7II) no mostraron actividad lítica frente alguna de ellas, ver Figura 31.

Tabla 12

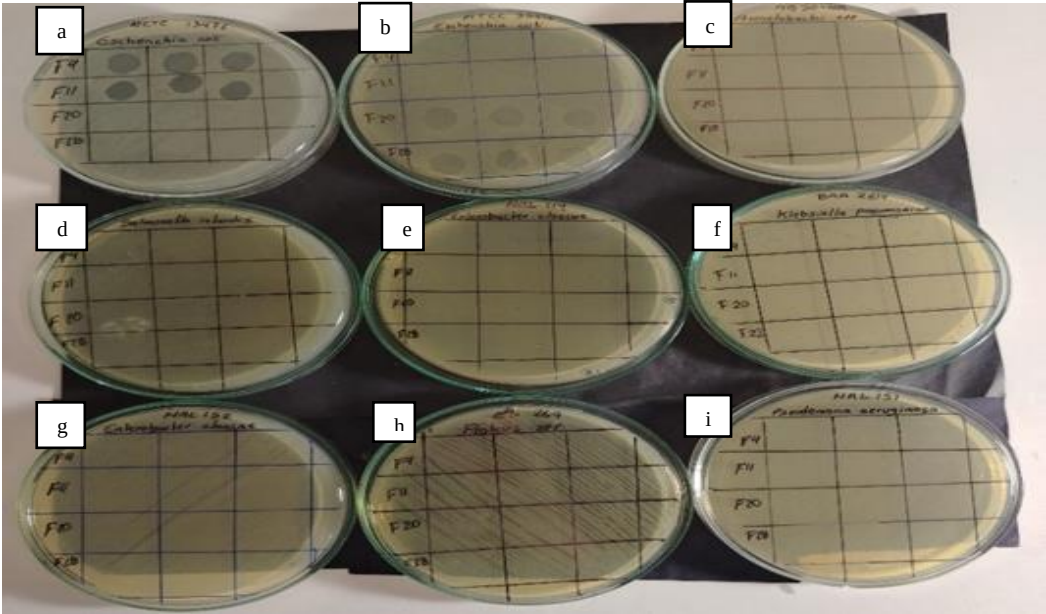
Rango de hospedero de los bacteriófagos F4, F11, F20 y F28 contra cepas bacterianas multidrogo resistentes (MDR) de diferentes especies

RANGO DE HOSPEDERO INTERESPECIE				
CEPAS BACTERIANAS MDR	BACTERIOFAGOS LITICOS			
	F4 (HEc4I)	F11 (HEc5I)	F20 (HEc2II)	F28 (HEc7II)
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	-	-
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	-	-	-	-
<i>Proteus spp.</i>	-	-	-	-
<i>Klebisella pneumoniae</i> (ATCC BAA 2814)	-	-	-	-
<i>Acinetobacter spp.</i>	-	-	-	-
<i>Salmonella infantis</i>	-	-	-	-

Nota: F (bacteriófagos), 4-11-20-28 (número de bacteriófago) y (-) zona de aclaramiento negativo.

Figura 31

Rango de hospedero de los bacteriófagos F4, F11, F20 y F28 contra cepas bacterianas multidrogo resistentes (MDR) de diferentes especies

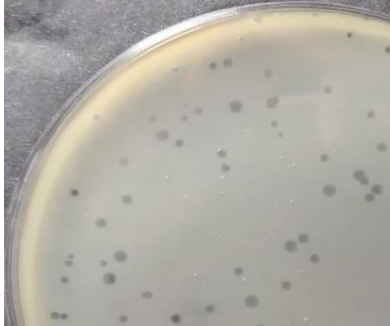
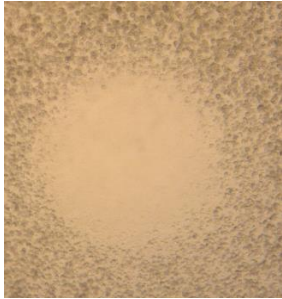
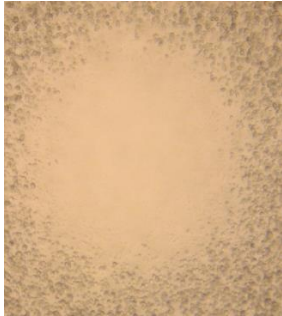
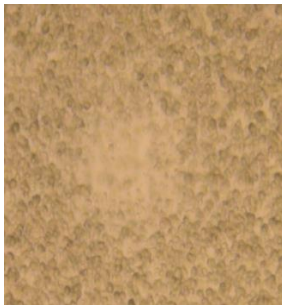


Nota: césped de: (a) *Escherichia coli* NCTC 13476 con zonas de aclaramiento producidos por los bacteriófagos, (b) *Escherichia coli* ATCC 35218 con zonas de aclaramiento producidos por los bacteriófagos, (c) *Acinetobacter spp.* (d) *Salmonella infantis*, (e) *Enterobacter cloacae*, (f) *Klebisella pneumoniae* (ATCC BAA 2814), (g) *Enterobacter cloacae*, (h) *Proteus spp.* y (i) *Pseudomona aeruginosa*.

Los 4 bacteriófagos líticos seleccionados fueron enfrentados contra hospederos de otras especies bacterianas (*Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella infantis* y *Acinetobacter spp*), donde no presentaron actividad lítica, sin embargo son altamente específicos para *Escherichia coli*, puesto que presentaron un rango de hospedero estrecho para esta especie, probablemente su adsorción está dirigida a una parte específica del lipopolisacárido (LPS) en *Escherichia coli* (Leprince & Mahillon, 2023), además, existen estudios donde indican que los bacteriófagos con cola utilizan diferentes proteínas de unión al receptor (RBP), destacando las fibras de la cola, espigas de la cola y la espiga central de la cola para adherirse a *Escherichia coli* (Nobrega et al., 2018). Pese a que las bacterias de diferentes especies pertenecen al grupo de las Gram negativas deberían compartir receptores específicos en la superficie celular bacteriana para que los bacteriófagos se adsorban, pero en el presente estudio se pone de manifiesto que los bacteriófagos obtenidos poseen receptores específicos frente a la especie *Escherichia coli*.

Este trabajo coincide con los estudios realizados por Fikadu et al. (2024) donde los 3 bacteriófagos no presentaron actividad lítica contra cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecium*; así mismo, en el estudio de Abdelrahman et al. (2022) presentaron que los bacteriófagos aislados no presentaron actividad lítica contra cepas de *Salmonella spp*, por último el bacteriófago aislado por Lee et al. (2020) tampoco presentó lisis frente a especies como *Aeromonas spp*, *Bacillus cereus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Listeria spp*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella spp*. Sin embargo estos resultados difieren con el trabajo de Punil (2017), donde el bacteriófago aislado presentó actividad lítica frente a *Shigella sonnei* ATCC 25931. También difiere con los resultados de Sada & Tessema (2024), donde los bacteriófagos aislados tuvieron actividad lítica frente a *Salmonella tiphyurium*, *Shigella flexinari* y *Klebsiella pneumoniae*.

Tabla 13*Bacteriófagos líticos seleccionados para la caracterización biológica y fisicoquímica*

Código del bacteriófago	Calvas en TSA	Calvas vistas a microscopio a 4X	Descripción de calvas
F4 (HEc4I)			Calvas transparentes. Tamaño de calva: 2.2mm
F11 (HEc5I)			Calvas transparentes. Tamaño de calva: 3.0mm
F20 (HEc2II)			Calvas transparentes. Tamaño de calva: 1.0mm
F28 (HEc7II)			Calvas transparentes. Tamaño de calva: 0.9mm

Nota: H (Huatany), Ec (*Escherichia coli*), 4-5-2-7 (punto de muestreo) y I (época de lluvia) y II (época de secas)

Cabe resaltar que los bacteriófagos HEc4I y HEc5I tienen como hospedero específico a *Escherichia coli* NCTC 13476 y los bacteriófagos HEc2II y HEc7II tienen como hospedero específico a *Escherichia coli* ATCC 35218, solo con sus hospederos específicos se pudieron realizar las siguientes pruebas de caracterización biológica y fisicoquímica.

3.6.2 Multiplicidad óptima de infección (MOI) de los bacteriófagos líticos HEc4I, HEc5I, HEc2II y HEc7II

La proporción del enfrentamiento de bacteriófago a concentración de 10^8 UFP/mL con 10^8 de bacteria/mL (1:1) resultó en MOI de 1, la proporción del enfrentamiento de bacteriófago a concentración de 10^7 UFP/mL con 10^8 de bacteria/mL (1:10) resultó en MOI de 0.1 y la proporción del enfrentamiento de bacteriófago a concentración de 10^6 UFP/mL con 10^8 de bacteria/mL (1:100) resultó en MOI de 0.01. Las MOI realizadas tuvieron resultados como se muestra en la Tabla 14, Figura 32 y Figura 33.

Tabla 14

Multiplicidad óptima de infección (MOI) de bacteriófagos líticos HEc4I, HEc5I, HEc2II y HEc7II para Escherichia coli

HOSPEDERO	BACTERIOFAGOS	TITULO DE BACTERIOFAGOS (UFP/mL)		
		0.01	0.1	1
<i>Escherichia coli</i> NCTC 13476	HEc4I	1.33×10^9	8.14×10^8	7.33×10^8
	HEc5I	2.37×10^9	1.37×10^9	6.00×10^8
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	HEc2II	4.00×10^7	6.50×10^6	1.65×10^6
	HEc7II	1.26×10^7	3.00×10^6	3.30×10^5

Figura 32

Multiplicidad óptima de infección (MOI) de bacteriófagos líticos HEc4I y HEc5I usando como hospedero a Escherichia coli NCTC 13476

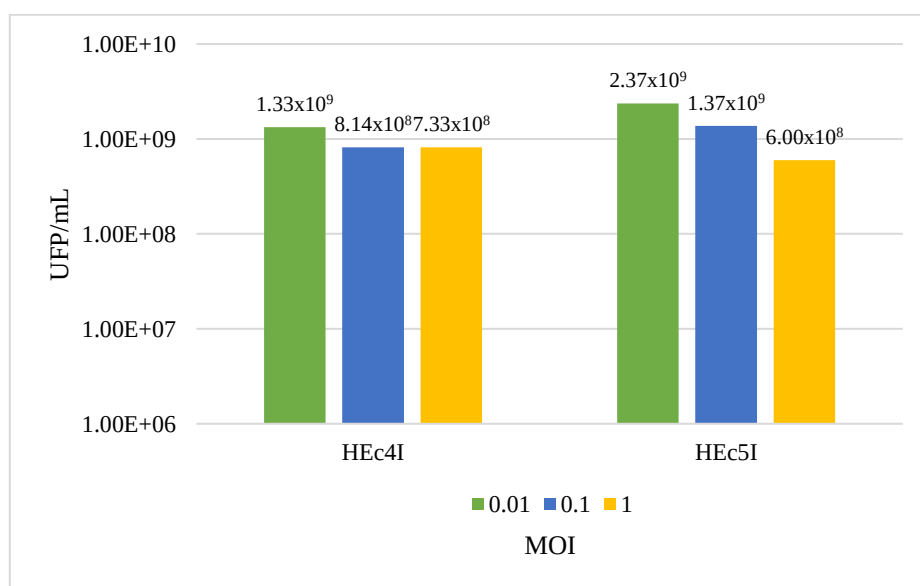
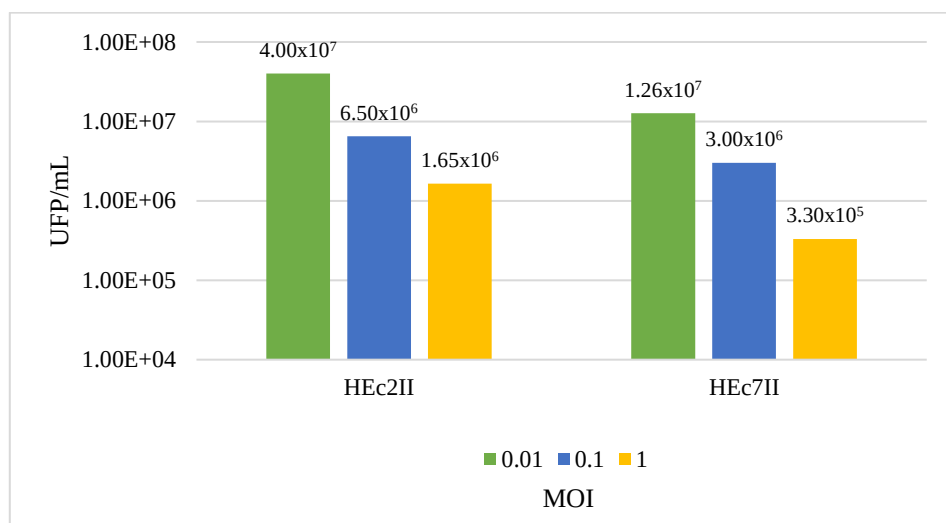


Figura 33

Multiplicidad óptima de infección (MOI) de bacteriófagos líticos HEc2II y HEc7II usando como hospedero a Escherichia coli ATCC 35218



Usando como hospedero *Escherichia coli* NCTC 13476 se realizó la MOI para los bacteriófagos HEc4I y HEc5I, donde para el bacteriófago HEc4I se realizó la MOI de 0.01, 0.1 y 1 obteniendo títulos de 1.33×10^9 UFP/mL, 8.14×10^8 UFP/mL y 7.33×10^8 UFP/mL respectivamente, al bacteriófago HEc5I también se le realizó la MOI de 0.01, 0.1 y 1 obteniendo títulos de 2.37×10^9 UFP/mL, 1.37×10^9 UFP/mL y 6.00×10^8 UFP/mL respectivamente. Para los bacteriófagos HEc2II y HEc7II se usó como hospedero *Escherichia coli* ATCC 35218, donde para el bacteriófago HEc2II se realizó la MOI de 0.01, 0.1 y 1, obteniendo títulos de 4.00×10^7 UFP/mL, 6.50×10^6 UFP/mL y 1.65×10^6 UFP/mL respectivamente y para el bacteriófago HEc7II también se realizó la MOI de 0.01, 0.1 y 1 obteniendo títulos de 1.26×10^7 UFP/mL, 3.00×10^6 UFP/mL y 3.30×10^5 UFP/mL respectivamente, resultando como MOI óptima de 0.01 para los 4 bacteriófagos, como se observa en la Tabla 14.

Por otro lado, la Figura 32 muestra que existe una disminución mínima del título de los bacteriófagos HEc4I y HEc5I con respecto a sus MOI óptima de 0.01; sin embargo, en la Figura 33 el bacteriófago HEc2II muestra la disminución de una escala logarítmica a MOI de 0.1 y 1 con respecto a su MOI óptima de 0.01, por último, el bacteriófago HEc7II muestra la reducción de una escala logarítmica

para MOI de 0.1 y dos escalas logarítmicas para MOI de 1 con respecto a su MOI óptima de 0.01.

La MOI es una característica biológica para cada bacteriófago que de acuerdo a diversas condiciones ambientales como pH y temperatura varían su eficiencia, siendo este valor determinante para cada bacteriófago (Hyman, 2019), la MOI óptima de 0.01 para los 4 bacteriófagos nos indica que se necesita menor concentración de bacteriófagos y mayor concentración de bacterias para generar una mayor progenie de virus. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Punil (2017), Lee et al. (2020), Abdelrahman et al. (2022) y Nazir et al. (2024) donde los bacteriófagos estudiados también tuvieron una MOI óptima de 0.01, sin embargo los resultados de Sada & Tessema (2024) muestran que los bacteriófagos tuvieron diferentes MOI optima de 1, 0.1 y 0.01. El valor de la MOI óptima fue fundamental para elevar el título de los bacteriófagos y para realizar las características biológicas restantes.

3.6.3 Constante de adsorción de los bacteriófagos líticos HEc4I, HEc5I, HEc2II, HEc7II

Para el ensayo de adsorción de los bacteriófagos HEc4I y HEc5I se usó como hospedero *Escherichia coli* NCTC 13476 (resistente a carbapenemasas), como se plasma en la Tabla 15 y Figura 34 para los bacteriófagos HEc2II y HEc7II se usó con hospedero *Escherichia coli* ATCC 35218 (resistentes a betalactamasas de espectro extendido), como se ve en la Tabla 16 y Figura 35.

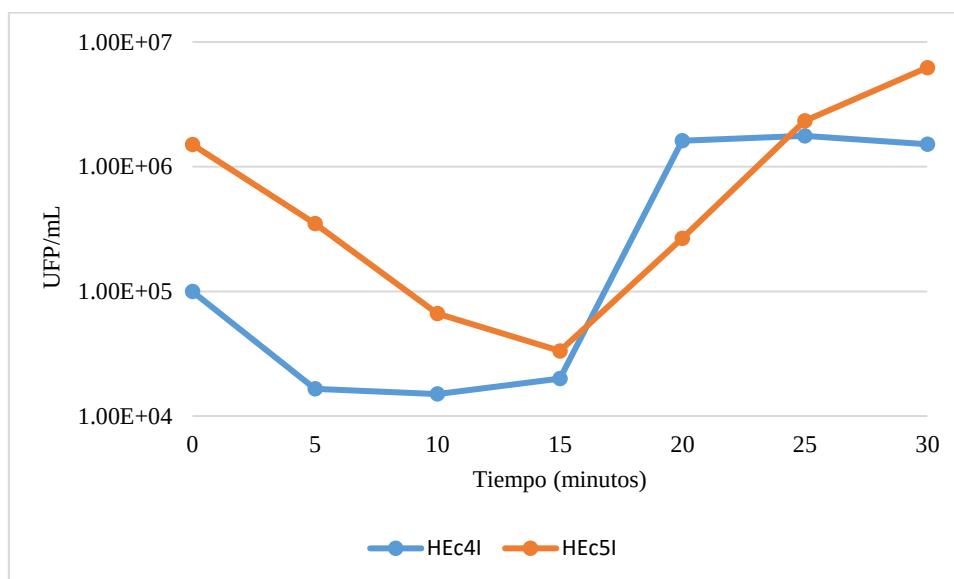
Tabla 15

Ensayos de adsorción de bacteriófagos líticos HEc4I y HEc5I usando como hospedero a Escherichia coli NCTC 13476

TIEMPO(MINUTOS)	Hospedero <i>Escherichia coli</i> NCTC 13476	
	BACTERIOFAGOS (UFP/mL)	
	HEc4I	HEc5I
0	1.00×10^5	1.65×10^7
5	1.65×10^4	3.50×10^5
10	1.50×10^4	6.65×10^4
15	2.00×10^4	3.33×10^4
20	1.62×10^6	2.67×10^5
25	1.77×10^6	2.33×10^6
30	1.52×10^6	6.23×10^6

Figura 34

Ensayos de adsorción de bacteriófagos líticos HEc4I y HEc5I usando como hospedero a Escherichia coli NCTC 13476



Se realizó la prueba de adsorción de los bacteriófagos HEc4I y HEc5I donde los resultados que se ve en la Tabla 15 evidencian la disminución del título en escala logarítmica del minuto 0 hasta el minuto 15 de ambos bacteriófagos y a partir del minuto 15 hay un aumento logarítmico en el título de ambos. Estos resultados indican que ambos bacteriófagos tienen un tiempo de adsorción de 15 minutos, que es el tiempo que los bacteriófagos demoran en adsorberse a la superficie bacteriana del hospedero, como se muestra en la Figura 34.

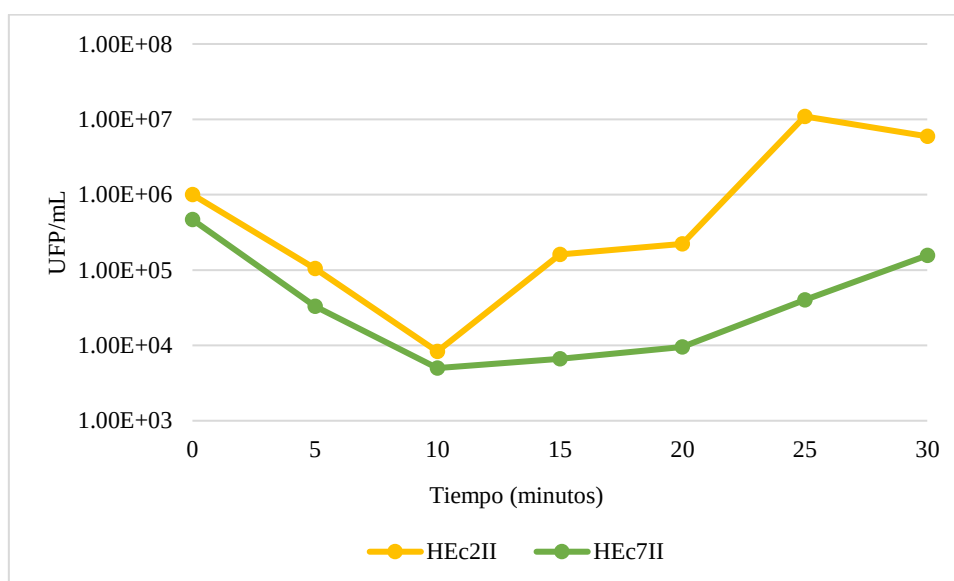
Tabla 16

Ensayos de adsorción de bacteriófagos líticos HEc2II y HEc7II usando como hospedero a Escherichia coli ATCC 35218

TIEMPO(MINUTOS)	Hospedero <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	
	BACTERIOFAGOS (UFP/mL)	
	HEc2II	HEc7II
0	1.00 x 10 ⁶	4.67 x 10 ⁵
5	1.05 x 10 ⁵	3.30 x 10 ⁴
10	8.30 x 10 ³	5.00 x 10 ³
15	1.62 x 10 ⁵	6.65 x 10 ³
20	2.21 x 10 ⁵	9.50 x 10 ³
25	1.09x 10 ⁷	4.00 x 10 ⁴
30	5.97 x 10 ⁶	1.57 x 10 ⁵

Figura 35

Ensayos de adsorción de bacteriófagos líticos HEc2II y HEc7II usando como hospedero a Escherichia coli ATCC 35218



Se realizó la prueba de adsorción de los bacteriófagos HEc2II y HEc7II, donde los resultados que se muestran en la Tabla 16 evidencian la disminución del título en escala logarítmica del minuto 0 hasta el minuto 10 para el bacteriófagos HEc2II y a partir del minuto 10 se evidencia un aumento logarítmico en el título. Sin embargo, el bacteriófago HEc7II muestra disminución del título del minuto 0 al minuto 20 y a partir del minuto 20 presenta un aumento logarítmico en el título. Estos resultados muestran que el bacteriófago HEc2II tiene un tiempo de adsorción de 10 minutos y el bacteriófago HEc7II tiene un tiempo de adsorción de 20 minutos, como se evidencia en la Figura 35.

Las diferencias que muestran los bacteriófagos HEc4I, HEc5I, HEc2II y HEc7II en el tiempo de adsorción, puede deberse a cuanto demoran estos en reconocer los receptores específicos de su hospedero, en realizar la unión reversible y unión irreversible, siendo esta última la responsable de iniciar el proceso infeccioso. Otro factor clave para que el proceso de adsorción se lleve a cabo es la densidad, localización del receptor, concentración del bacteriófago y del hospedero, además de condiciones como temperatura y pH del medio (Leprince & Mahillon, 2023; Fernández et al., 2023), infiriendo que el tiempo de adsorción está directamente relacionado el tiempo en que demoran los bacteriófagos en reconocer los receptores ubicados en la superficie celular bacteriana. El proceso de adsorción

tiene una caída en cuanto al título debido a que los bacteriófagos se encuentran adheridos a la superficie de la célula bacteriana, proceso por el cual no son cuantificables en ese momento, siendo cuantificables solo aquellos bacteriófagos que se encuentran dispersos en el medio.

El resultado del bacteriófago HEc7II coincide con los de Litt & Jaroni (2017), que obtuvieron un tiempo de adsorción de 20 minutos. A diferencia de los bacteriófagos HEc4I y HEc5I que presentan un tiempo de adsorción de 15 minutos y del bacteriófago HEc2II que presentó un tiempo de adsorción de 10 minutos.

3.6.4 Curva de un paso de los bacteriófagos líticos HEc4I, HEc5I, HEc2II, HEc7II

Se realizó la curva de un paso de los bacteriófagos HEc4I y HEc5I con hospedero *Escherichia coli* NCTC 13476 (resistente a carbapenemasas) y para los bacteriófagos HEc2II y HEc7II con hospedero *Escherichia coli* ATCC 35218 (resistente a betalactamasas de espectro extendido), como se ve en la Tabla 17.

Se evidencia el periodo de latencia y el tamaño de explosión para los bacteriófagos HEc4I, HEc5I, HEc2II y HEc7II, como se muestra en la Figura 36, Figura 37, Figura 38 y Figura 39 respectivamente.

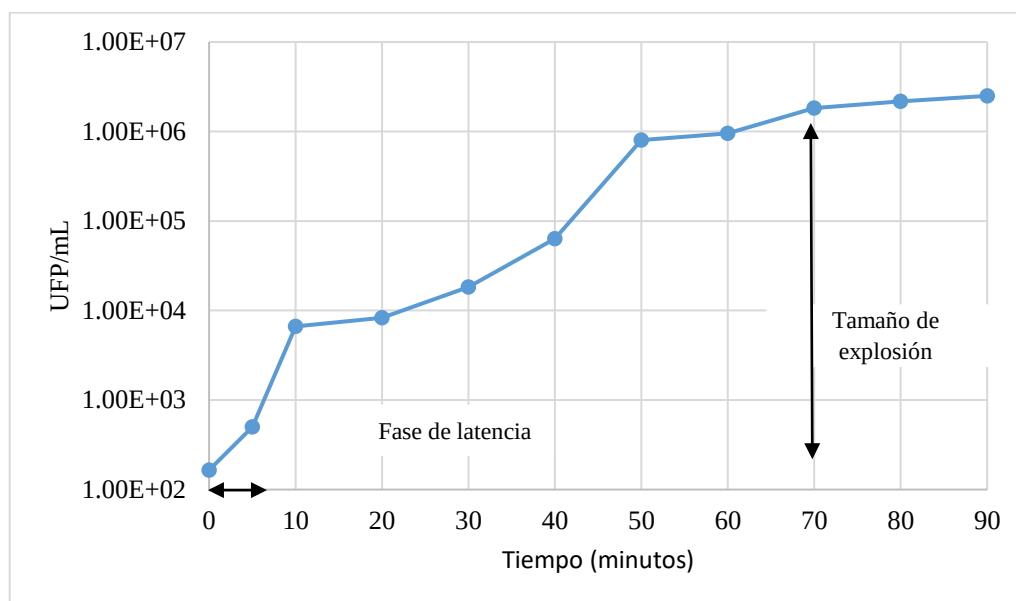
Tabla 17

Curva de un paso de los bacteriófagos líticos HEc4I y HEc5I, HEc2II y HEc7II para Escherichia coli

TIEMPO (MINUTOS)	HOSPEDERO <i>Escherichia coli</i> NCTC 13476		HOSPEDERO <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	
	BACTERIOFAGOS (UFP/mL)		BACTERIOFAGOS (UFP/mL)	
	HEc4I	HEc5I	HEc2II	HEc7II
0	1.65×10^2	1.65×10^2	5.00×10^2	0
5	5.00×10^2	1.65×10^2	1.33×10^3	0
10	6.65×10^3	6.65×10^2	3.16×10^3	2.05×10^3
20	8.30×10^3	4.16×10^4	1.66×10^5	2.66×10^3
30	1.83×10^4	1.16×10^5	1.66×10^5	2.90×10^3
40	6.33×10^4	6.16×10^5	2.16×10^5	5.66×10^3
50	8.00×10^5	1.00×10^6	7.33×10^5	1.66×10^4
60	9.50×10^5	3.30×10^6	4.33×10^6	3.88×10^4
70	1.83×10^6	3.30×10^6	1.35×10^6	1.16×10^4
80	2.17×10^6	4.45×10^6	3.33×10^5	1.33×10^4
90	2.50×10^6	4.63×10^6	1.50×10^5	1.83×10^4

Figura 36

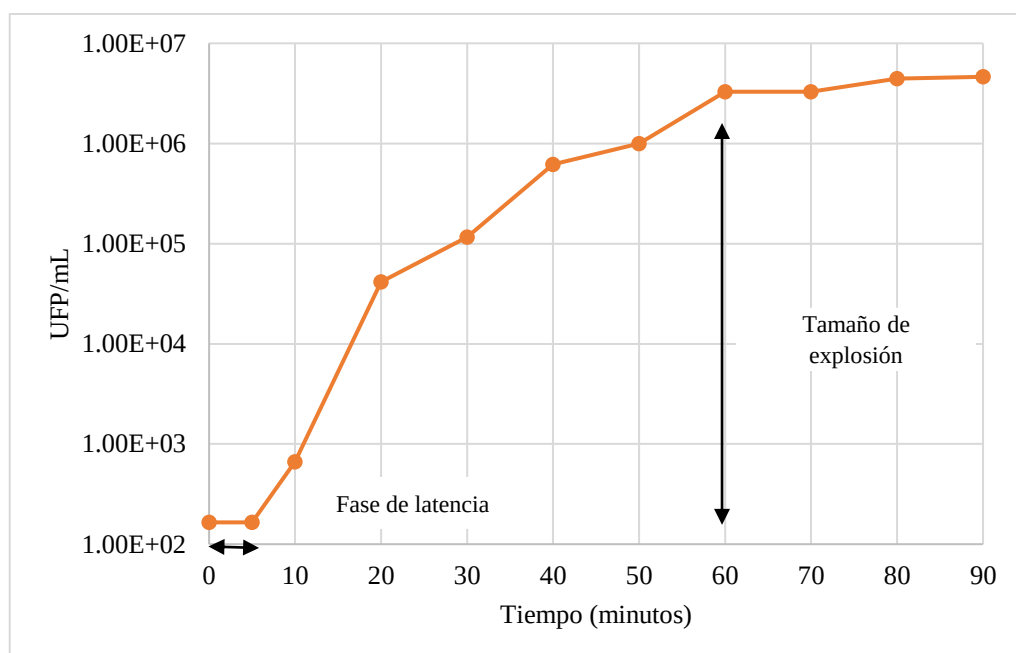
Curva de un paso del bacteriófago lítico HEc4I usando como hospedero a *Escherichia coli* NCTC 13476



La curva de un paso para el bacteriófago HEc4I se realizó utilizando como hospedero a *Escherichia coli* NCTC 13476, donde se determinó que el periodo de latencia tiene una duración de 5 minutos y el tamaño de explosión de 376 UFP por célula infectada, como se ve en la Figura 36.

Figura 37

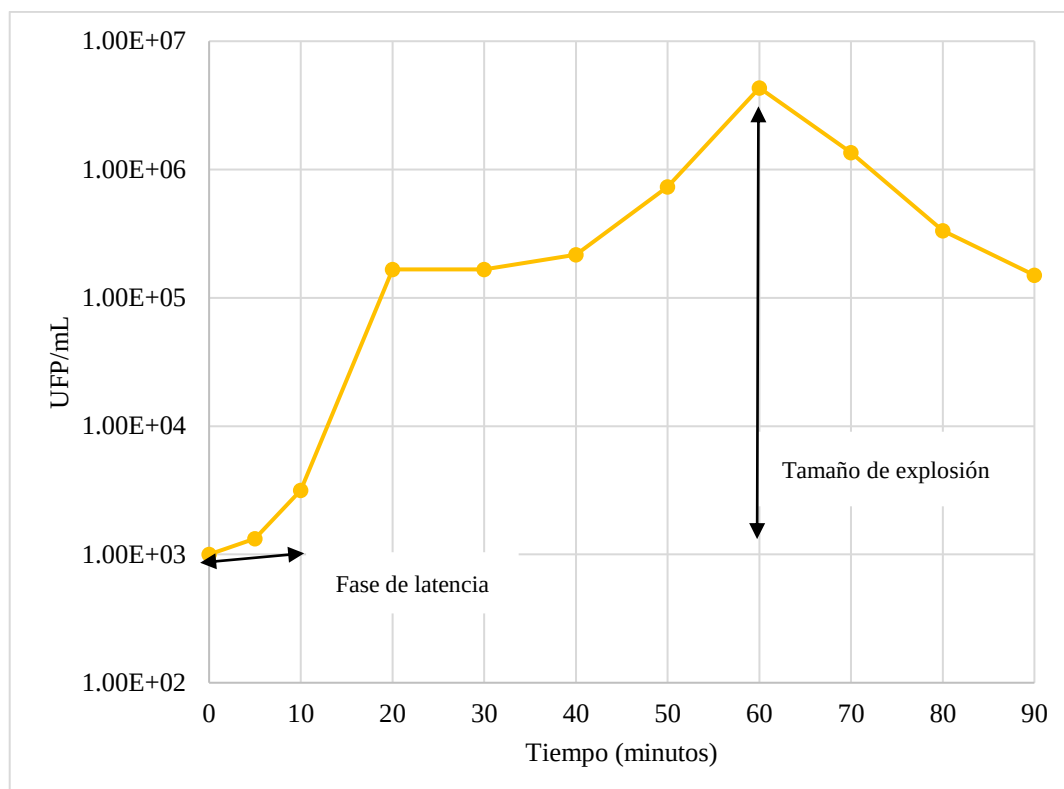
Curva de un paso del bacteriófago lítico HEc5I usando como hospedero a *Escherichia coli* NCTC 13476



La curva de un paso para el bacteriófago HEc5I se realizó utilizando como hospedero a *Escherichia coli* NCTC 13476, donde se determinó que el periodo de latencia tiene una duración de 5 minutos y el tamaño de explosión de 111 UFP por célula infectada, como se observa en la Figura 37.

Figura 38

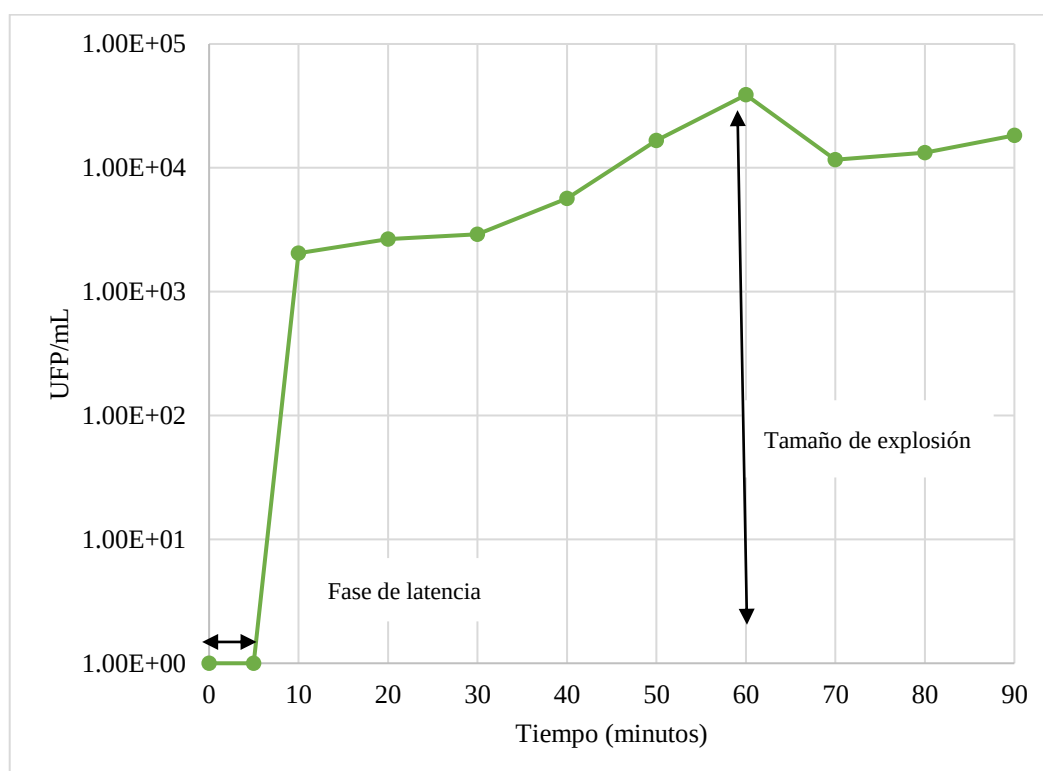
Curva de un paso del bacteriófago lítico HEc2II usando como hospedero a *Escherichia coli* ATCC 35218



La curva de un paso para el bacteriófago HEc2II se realizó utilizando como hospedero a *Escherichia coli* ATCC 35218, donde se determinó que el periodo de latencia tiene una duración de 10 minutos y el tamaño de explosión de 3256 UFP por célula infectada, como se plasma en la Figura 38.

Figura 39

Curva de un paso del bacteriófago lítico HEC7II usando como hospedero a *Escherichia coli* ATCC 35218



La curva de un paso para el bacteriófago HEC7II se realizó utilizando como hospedero a *Escherichia coli* ATCC 35218, donde se determinó que el periodo de latencia tiene una duración de 5 minutos y el tamaño de explosión de aproximadamente 9 UFP por célula infectada, como se observa en la Figura 39.

Se realizó la curva de un paso de los bacteriófagos con la finalidad de determinar sus características de infección como el periodo de latencia y el tamaño de explosión, permitiendo obtener las etapas de un ciclo de infección de los bacteriófagos dentro de una población de células hospederas en un tiempo y lugar determinado, proporcionando datos sobre la evolución de la replicación y la progresión de la infección, estas características son fundamentales para evaluar la eficacia de la infección en un hospedero específico (Sada & Tessema, 2024), el periodo está definido como el tiempo que transcurre desde la infección hasta la liberación de las partículas virales (Clokier & Kropinski, 2009b), donde se observa que los bacteriófagos después de su fase de latencia aumentan el título considerablemente dando paso al tamaño de explosión. Además, las diferencias en el periodo de latencia y el tamaño de explosión de los bacteriófagos se debe al

medio de crecimiento, tolerancia al pH, temperatura de incubación y a los hospederos (Guttman et al., 2005); por otra parte, periodos cortos de latencia y tamaños de explosión elevados convierten a los bacteriófagos como candidatos para biocontrol por generar gran cantidad de viriones en poco tiempo (Fernández et al., 2023; Sada & Tessema, 2024). Además, se observó que los bacteriófagos HEc2II y HEc7II presentaron un comportamiento atípico por la presencia de picos y descensos después del tamaño de explosión, no acorde a una curva de un paso. Esto también se puede deber a que para los bacteriófagos HEc2II y HEc7II se utilizó el hospedero *Escherichia coli* ATCC 35218 y estos difieren el cuanto a la fase de latencia, otro factor podría ser el tiempo de adsorción variando entre ellos.

Los resultados del periodo de latencia y tamaño de explosión obtenidos de los bacteriófagos HEc4I, HEc5I, HEc2II y HEc7II difieren a los resultados de Punil (2017) donde indica un periodo de latencia de 15 minutos y un tamaño de explosión de 85 viriones por célula infectada; Litt & Jaroni (2017), presentaron periodos de latencia 12 a 30 minutos y un tamaño de explosión de 89 a 631 viriones por célula infectada de acuerdo a sus bacteriófagos estudiados. Lee et al. (2020) demostró un tiempo de latencia de 30 minutos y un tamaño de explosión de aproximadamente 150 UFP por célula. Por ultimo Sada & Tessema (2024) obtuvieron un periodo de latencia de 10 a 15 minutos y un tamaño de explosión de 87 a 364 viriones por célula, este resultado del periodo de latencia se asemeja al del bacteriófago HEc2II del presente estudio.

3.7 Caracterización Físicoquímica de los bacteriófagos líticos HEc4I, HEc5I, HEc2II y HEc7II usando como hospedero a *Escherichia coli* NCTC 13476 y *Escherichia coli* ATCC 35218

3.7.1 Termo estabilidad de los bacteriófagos líticos HEc4I, HEc5I, HEc2II y HEc7II

En la prueba de termo estabilidad los bacteriófagos HEc4I y HEc5I con hospedero *Escherichia coli* NCTC 13476 (resistente a carbapenemasas) tuvieron un título inicial 6.00×10^8 UFP/mL y 4.50×10^8 UFP/mL respectivamente, como se muestra en la Tabla 18 y Figura 40 y para los bacteriófagos HEc2II y HEc7II con hospedero *Escherichia coli* ATCC 35218 (resistente a betalactamasas de espectro extendido) con título inicial 2.10×10^6 UFP/mL y 1.68×10^7 UFP/mL

respectivamente, como se observa en la Tabla 19 y Figura 41. Los títulos iniciales se utilizaron como control.

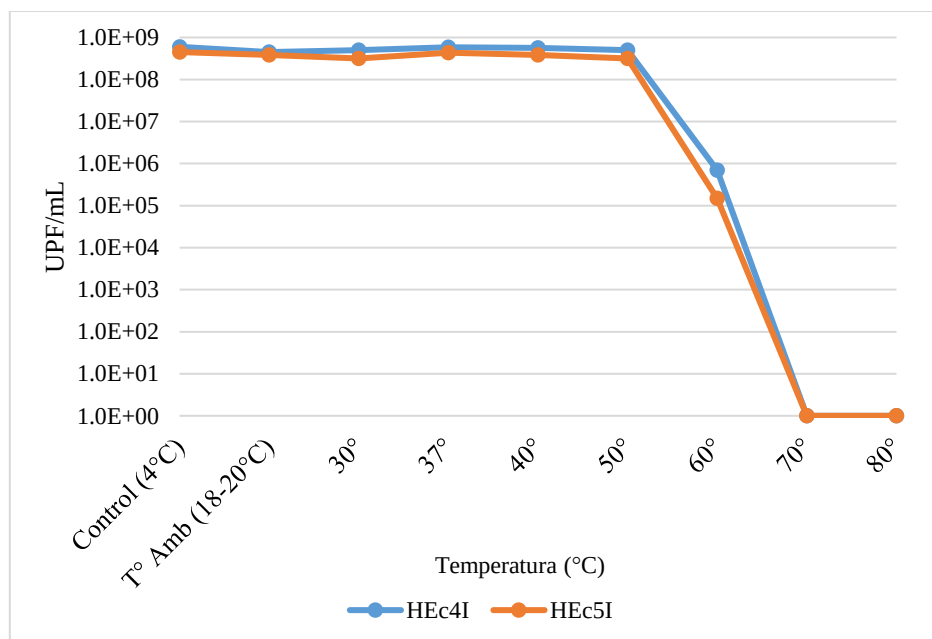
Tabla 18

Termo estabilidad de bacteriófagos líticos HEc4I y HEc5I usando como hospedero Escherichia coli NCTC 13476

TEMPERATURA °C	HOSPEDERO <i>Escherichia coli</i> NCTC 13476	
	BACTERIOFAGOS (UFP/ mL)	
	HEc4I	HEc5I
CONTROL (4°C)	6.00×10^8	4.50×10^8
T° AMB (18-20°C)	4.50×10^8	3.83×10^8
30°	5.00×10^8	3.16×10^8
37°	5.83×10^8	4.33×10^8
40°	5.66×10^8	3.83×10^8
50°	5.00×10^8	3.16×10^8
60°	7.00×10^5	1.50×10^5
70°	0	0
80°	0	0

Figura 40

Termo estabilidad de bacteriófagos líticos HEc4I y HEc5I usando como hospedero a Escherichia coli NCTC 13476



Se determinó la termo estabilidad de los bacteriófagos HEc4I y HEc5I utilizando como hospedero a *Escherichia coli* NCTC 13476, donde se comparó las temperaturas ensayadas con respecto al control. Los bacteriófagos HEc4I y HEc5I se mantuvieron estables a T° amb (18-20°C), 30°C, 37°C, 40°C y 50°C

manteniendo el logaritmo de 10^8 con respecto al control, sufriendo un descenso en 3 logaritmos a 60°C e inactivándose totalmente a 70°C y 80°C, como se ve en la Tabla 18 y Figura 40.

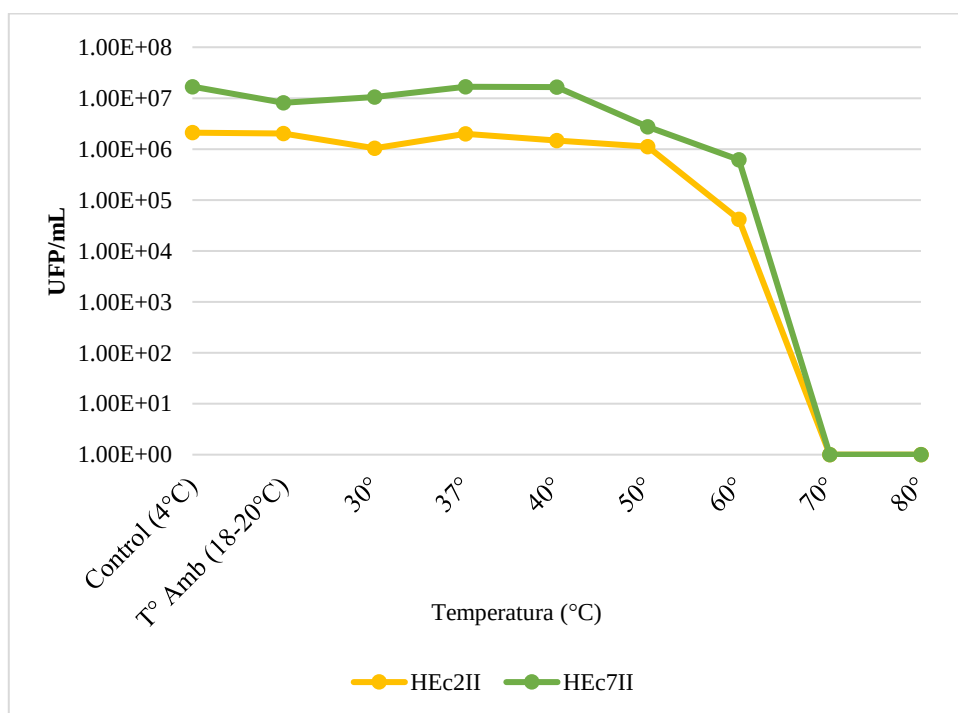
Tabla 19

Termo estabilidad de bacteriófagos líticos HEc2II y HEc7II usando como hospedero a Escherichia coli ATCC 35218

TEMPERATURA °C	HOSPEDERO <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	
	BACTERIOFAGOS (UFP/ mL)	
	HEc2II	HEc7II
CONTROL (4°C)	2.10×10^6	1.68×10^7
T° AMB (18-20°C)	2.03×10^6	8.16×10^6
30°	1.03×10^6	1.04×10^7
37°	1.98×10^6	1.68×10^7
40°	1.46×10^6	1.66×10^7
50°	1.11×10^6	2.73×10^6
60°	4.16×10^4	6.16×10^5
70°	0	0
80°	0	0

Figura 41

Termo estabilidad de bacteriófagos líticos HEc2II y HEc7II usando como hospedero a Escherichia coli ATCC 35218



Se determinó la termo estabilidad de los bacteriófagos HEc2II y HEc7II utilizando como hospedero a *Escherichia coli* ATCC 35218, donde se comparó las

temperaturas ensayadas con respecto al control, como muestra la Tabla 19. El bacteriófago HEc2II se mantuvo estable a T° amb (18-20°C), 30°C, 37°C, 40°C y 50°C manteniendo el logaritmo de 10⁶ con respecto al control, disminuyendo 2 logaritmos a 60°C e inactivándose completamente a 70°C y 80°C, como se observa en la Figura 14. Por otro lado, el bacteriófago HEc7II se mantuvo estable a 30°C, 37°C, 40°C con respecto al control, disminuyendo 1 logaritmo a T° amb (18-20°C) y 50°C; así mismo, disminuyendo 2 logaritmos a 60°C e inactivándose totalmente a 70°C y 80°C, como se evidencia en la Figura 41.

La capacidad parasitaria de los bacteriófagos depende de la estabilidad que muestran hacia los factores externos como la temperatura (Park et al., 2021), donde los bacteriófagos específicos para *Escherichia coli*, denominados colifagos, dependen directamente de este parámetro para adsorberse a su hospedero (Abedon, 2023), infiriendo que, los bacteriófagos deben de adaptarse a los rangos de temperatura a la cual su hospedero tolera para desarrollar su actividad lítica de forma óptima (Lee et al., 2020). Estas características de termo estabilidad permiten que los bacteriófagos sean candidatos para aplicaciones terapéuticas y de biocontrol (Sattar et al., 2023). A temperaturas muy elevadas los bacteriófagos se inactivan debido a la desnaturalización de sus proteínas y ácidos nucleicos, además las altas temperaturas alteran la morfología del bacteriófago liberando el DNA de la cápside proteica y separando la cabeza de la cola (Marcó et al., 2019).

Los resultados de termo estabilidad obtenidos de los bacteriófagos HEc4I, HEc5I y HEc2II, coincide con los resultados obtenidos por Nazir et al (2024), donde los bacteriófagos se mantuvieron estables a 40°C y 50°C, reduciendo su estabilidad con el descenso drástico del título a 60°C y a 70°C, perdiendo su viabilidad total a 80°C. Por otra parte poseen similitud con los estudios realizados por Litt & Jaroni (2017), donde los bacteriófagos mantuvieron su título estable de 40 a 60°C, perdiendo viabilidad a 70°C y 80°C, Punil (2017) demostró que el bacteriófago estudiado es estable hasta 50°C, disminuyendo progresivamente su título a 60°C y 70°C, no mostrando actividad a 80°C. Los resultados de termo estabilidad obtenidos para el bacteriófago HEc7II tienen semejanza con el trabajo hecho por Lee et al (2020), donde hasta 40°C se mantuvo estable, a 50°C el título mostró un descenso perdiendo viabilidad a 60 y 70°C, del mismo modo Fikadu et al (2024)

reportó una ligera pérdida del título a 50°C y a 70°C tuvo un descenso abrupto, perdiendo viabilidad a temperaturas mayores a 80°C.

Los resultados de termo estabilidad de los 4 bacteriófagos contra *Escherichia coli* estudiados en el presente trabajo difieren con los estudios de Ullah et al (2021) donde los bacteriófagos mostraron estabilidad a 60°C, además Abdelrahman et al (2022) y Sada & Tessema (2024) que en sus respectivos trabajos los bacteriófagos mostraron estabilidad hasta 70°C.

3.7.2 Resistencia al pH de los bacteriófagos HEc4I, HEc5I, HEc2II y HEc7II

En la prueba de resistencia al pH de los bacteriófagos HEc4I y HEc5I con hospedero *Escherichia coli* NCTC 13476 (resistente a carbapenemasas) tuvieron un título inicial (control) de 1.00×10^7 UFP/mL y 2.70×10^8 UFP/mL respectivamente, como muestra la Tabla 20 y Figura 42, y para los bacteriófagos HEc2II y HEc7II con hospedero *Escherichia coli* ATCC 35218 (resistente a betalactamasas de espectro extendido) con título inicial (control) de 1.90×10^6 UFP/mL y 2.00×10^6 UFP/mL respectivamente, como se observa en la Tabla 21 y Figura 43.

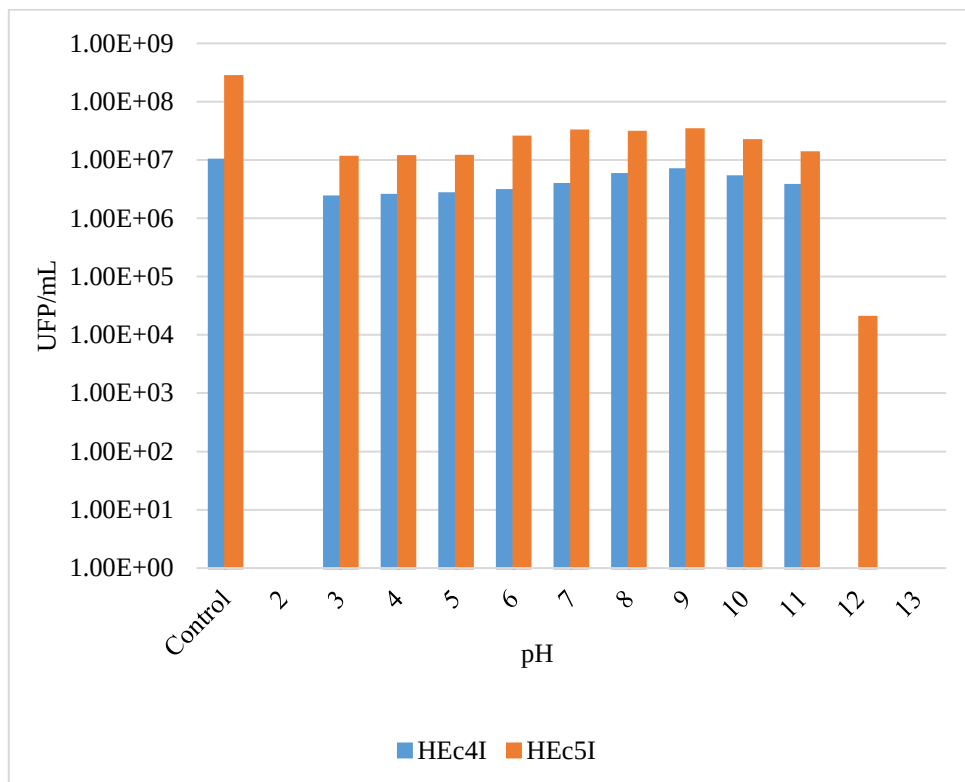
Tabla 20

Resistencia al pH de los bacteriófagos líticos HEc4I y HEc5I usando como hospedero a Escherichia coli NCTC 13476

HOSPEDERO <i>Escherichia coli</i> NCTC 13476		
BACTERIOFAGOS UFP/ mL		
pH	HEc4I	HEc5I
Control	1.00×10^7	2.70×10^8
2	0	0
3	2.33×10^6	1.11×10^7
4	2.50×10^6	1.15×10^7
5	2.66×10^6	1.16×10^7
6	3.00×10^6	2.50×10^7
7	3.83×10^6	3.16×10^7
8	5.66×10^6	3.00×10^7
9	6.83×10^6	3.33×10^7
10	5.16×10^6	2.16×10^7
11	3.66×10^6	1.33×10^7
12	0	2.00×10^4
13	0	0

Figura 42

Resistencia al pH de los bacteriófagos líticos HEc4I y HEc5I usando como hospedero a Escherichia coli NCTC 13476



Para la prueba de resistencia al pH de los bacteriófagos HEc4I y HEc5I se usó como hospedero a *Escherichia coli* NCTC 13476 (resistentes a carbapenemasas), se utilizó como control el título inicial, donde el bacteriófago HEc4I mostró ser relativamente estable entre pH 3 a pH 11, disminuyendo solamente 1 escala logarítmica a comparación del control (10^7 a 10^6). Por otro lado, el bacteriófago HEc5I mostró ser relativamente estable entre pH 3 a pH 11, disminuyendo solamente 1 escala logarítmica a comparación del control (10^8 a 10^7), sin embargo, a pH 12 disminuyó 4 escalas logarítmicas (10^8 a 10^4), como se ve en la Tabla 20 y Figura 42.

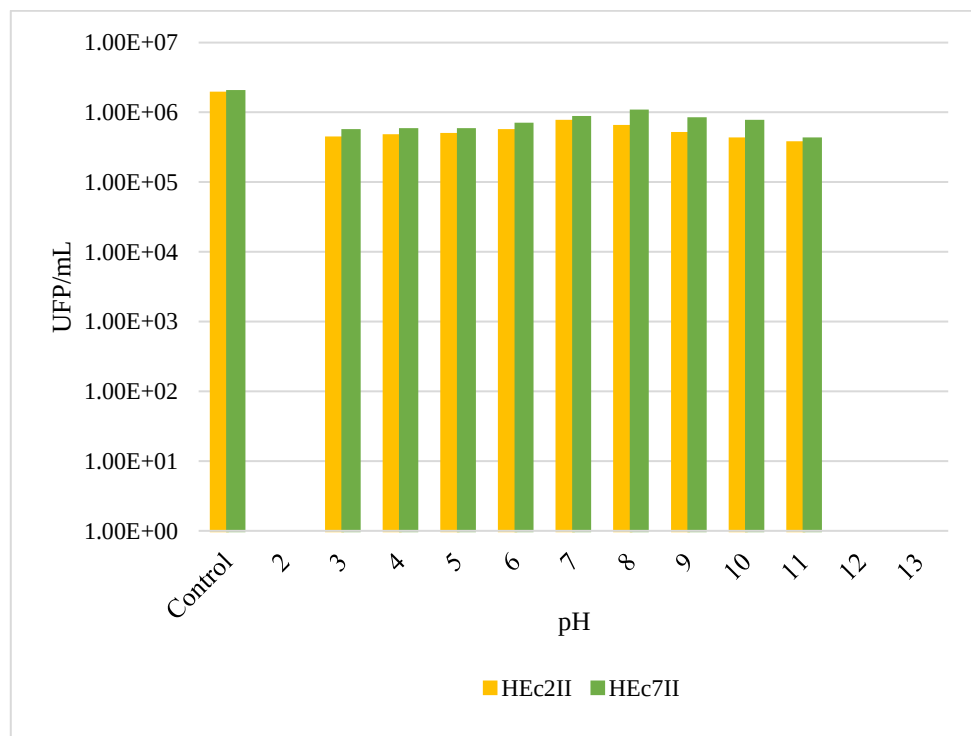
Tabla 21

Resistencia al pH de los bacteriófagos líticos HEc2II y HEc7II usando como hospedero a Escherichia coli ATCC 35218

pH	Hospedero <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	
	BACTERIOFAGOS UFP/ mL	
	HEc2II	HEc7II
Control	1.90×10^6	2.00×10^6
2	0	0
3	4.33×10^5	5.50×10^5
4	4.66×10^5	5.66×10^5
5	4.83×10^5	5.66×10^5
6	5.50×10^5	6.83×10^5
7	7.50×10^5	8.50×10^5
8	6.33×10^5	1.05×10^6
9	5.00×10^5	8.16×10^5
10	4.16×10^5	7.50×10^5
11	3.66×10^5	4.16×10^5
12	0	0
13	0	0

Figura43

Resistencia al pH de los bacteriófagos líticos HEc2II y HEc7II usando como hospedero a Escherichia coli ATCC 35218



Para la prueba de resistencia al pH de los bacteriófagos HEc2II y HEc7II se usó como hospedero *Escherichia coli* ATCC 35218 (resistentes a betalactamasas de espectro extendido), se utilizó como control el título inicial, donde el bacteriófago HEc2II mostró ser relativamente estable entre pH 3 a pH 11, disminuyendo solamente 1 escala logarítmica a comparación del control (10^6 a 10^7). Por otro lado, el bacteriófago HEc7II mostró ser estable a pH 8 no variando la escala logarítmica (10^6) en comparación con el control, disminuyendo 1 escala logarítmica entre pH 3 a pH 11 (10^6 a 10^5), como muestra la Tabla 21 y Figura 43.

Al igual que la temperatura, los bacteriófagos dependen de la estabilidad que muestran hacia los factores externos como el pH (Park et al., 2021), en ambientes ácidos los bacteriófagos específicos para *Escherichia coli* pierden su viabilidad por la desnaturalización de sus proteínas (Sada & Tessema, 2024); sin embargo, los que toleran pH extremos son capaces de persistir en ambientes extremófilos (Jończyk et al., 2011), estas características permiten que los bacteriófagos puedan ser candidatos para diferentes aplicaciones ambientales (Jamal et al., 2015), como en la industria alimentaria (Litt & Jaroni, 2017).

Los resultados obtenidos de los bacteriófagos en el presente estudio tienen semejanza con los resultados realizados por Sada & Tessema (2024), donde los bacteriófagos fueron estables entre pH 5 a pH 9, siendo uno de ellos muy estable a pH 3. Nazir et al (2024) indicaron en sus respectivos trabajos que los bacteriófagos estudiados fueron estables entre pH 4 a pH 10, inactivándose completamente a pH 3, pH 11 y pH 14. Además, Ullah et al (2021) mostraron que la actividad óptima de su bacteriófago oscila entre pH 5 a pH 11, indicando que valores superiores o inferiores a estos inactivan al bacteriófago. También Fikadu et al (2024) pusieron de manifiesto que los bacteriófagos que estudiaron desarrollaron estabilidad a pH 7 con una ligera disminución del título a pH 10, disminuyendo de forma drástica a pH 4 y siendo inactivados a pH 2 y pH 12. Abdelrahman et al (2022) indicaron que sus bacteriófagos son viables entre pH 4 a pH11, de los cuales 2 disminuyeron su título en 1 logaritmo, siendo todos inactivados a pH 2, pH 3 y pH 12. Por otro lado en el estudio efectuado por Lee et al (2020) el bacteriófago perdió actividad a pH 1, pH 2 y pH 12, manteniéndose

estable con reducciones significativas en el título entre pH 3 a pH 11. Por ultimo Punil (2017) indicó que el bacteriófago estudiado es estable entre pH 5 a pH 8, donde valores mayores o menores a estos pH alteran la viabilidad del bacteriófago. El bacteriófago HEc5I se mantuvo viable a pH 12 coincidiendo con los resultados obtenidos por Litt & Jaroni (2017).

3.7.3 Sensibilidad al Cloroformo de los bacteriófagos HEc4I, HEc5I, HEc2II y HEc7II

Los resultados de la prueba de sensibilidad al cloroformo de los bacteriófagos líticos HEc4I, HEc5I, HEc2II y HEc7II, se evidencia en la Tabla 22 y Tabla 23 y el porcentaje de reducción se observa en la Figura 44. Se usó como control los bacteriófagos contenidos en solución salina en proporción 1:1.

Tabla 22

Sensibilidad al cloroformo de los bacteriófagos líticos HEc4I y HEc5I usando como hospedero a Escherichia coli NCTC 13476

	BACTERIOFAGOS	CONTROL UFP/mL	CLOROFORMO UFP/mL	PORCENTAJE DE REDUCCION (%)
Hospedero <i>Escherichia coli</i> NCTC 13476	HEc4I	4.50 x10 ⁸	4.17 x10 ⁸	7.3
	HEc5I	7.00 x10 ⁸	6.83 x10 ⁸	2.4

Tabla 23

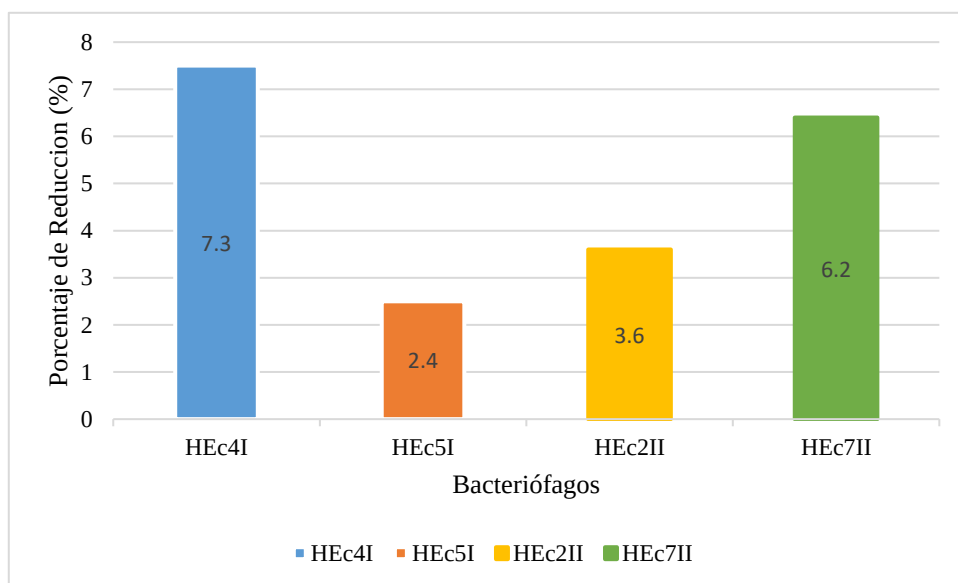
Sensibilidad al cloroformo de los bacteriófagos líticos HEc2II y HEc7II usando como hospedero a Escherichia coli ATCC 35218

	BACTERIOFAGOS	CONTROL UFP/mL	CLOROFORMO UFP/mL	PORCENTAJE DE REDUCCION (%)
Hospedero <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	HEc2II	1.40 x10 ⁶	1.35 x10 ⁶	3.6
	HEc7II	2.90 x10 ⁶	2.72 x10 ⁶	6.2

Figura 44

Porcentaje de reducción de sensibilidad al cloroformo de los bacteriófagos líticos

HEc4I y HEc5I usando como hospedero Escherichia coli NCTC 13476 y HEc2II y HEc7II usando como hospedero Escherichia coli ATCC 35218



Los bacteriófagos HEc4I, HEc5I, HEc2II y HEc7II fueron sometidos a cloroformo (99% de pureza) durante una hora. El bacteriófago HEc4I tuvo un título inicial de 4.50×10^8 UFP/mL después de la exposición al cloroformo disminuyendo su título a 4.17×10^8 UFP/mL, teniendo un porcentaje de reducción de 7,3, así mismo, el bacteriófago HEc5I empezó con un título inicial de 7.00×10^8 UFP/mL reduciendo después de la exposición al cloroformo a 6.83×10^8 UFP/mL, con un porcentaje de reducción de 2,4, como se ve en la Tabla 22. También el bacteriófago HEc2II tuvo un título inicial de 1.40×10^6 UFP/mL reduciendo después de la exposición al cloroformo a 1.35×10^6 UFP, con un porcentaje de reducción de 3,6, por último el bacteriófago HEc7II inició con un título inicial de 2.90×10^6 UFP/mL reduciendo después de la exposición al cloroformo a 2.72×10^6 UFP/mL, teniendo un porcentaje de reducción de 6,2, como se muestra en la Tabla 23.

Los 4 bacteriófagos estudiados presentan resistencia al cloroformo con un promedio de 95,13%, debido a que la estructura de la cápside no presenta envoltura lipídica, lo cual evita que el cloroformo no actúe sobre ellos (Fikadu et al., 2024); además, esta resistencia permite que los bacteriófagos sean utilizados en conjunto con biocidas (cloroformo) para control de bacterias en la industria alimentaria (Lee et al., 2020). Los porcentajes de reducción del título de los

bacteriófagos durante la exposición al cloroformo varían entre cada uno de ellos, debido a que cada bacteriófago funciona como una unidad independiente pese a tener hospederos de la misma especie, además cada bacteriófago puede presentar diferentes características estructurales de su cápside permitiendo la resistencia al cloroformo.

Según los resultados obtenidos se demuestra que los 4 bacteriófagos del presente estudio son resistentes al cloroformo, coincidiendo con los trabajos realizados por Punil (2017) y Lee et al (2020) quienes demostraron que sus bacteriófagos también fueron resistentes al cloroformo químicamente puro. Por otro lado (Nazir et al., 2024) y Fikadu et al. (2024) reportaron que sus bacteriófagos son ligeramente sensibles al cloroformo, difiriendo con el presente trabajo.

3.8 Identificación por biología molecular de los bacteriófagos líticos

Los bacteriófagos líticos para *Escherichia coli* NCTC 13476 resistente a carbapenemasas que presentaron características biológicas y fisicoquímicas estables fueron HEc4I y HEc5I, los mismos que se enviaron a secuenciar por Illumina NGS, obteniendo en código FASTA 137,691 nucleótidos para HEc4I y 137,919 nucleótidos para HEc5I, como muestra el Anexo 9 y Anexo 10 respectivamente.

De acuerdo a la comparación de las secuencias obtenidas de los resultados del GenBank, se descargaron un total de 36 secuencias con mayor similaridad y se elaboró una tabla de comparación de doble entrada para cada bacteriófago, como se muestra en la Figura 45 y Figura 46. Se evidenció que las secuencias de los bacteriófagos HEc4I y HEc5I tuvieron una similaridad de 95.2 con la secuencia MZ501048:Vequintavirus, infiriendo que pueden pertenecer al género *Vequintavirus*.

Figura 45
 Tabla de comparación del bacteriófago HEc4I

	Bacteriófago HEc4I																																							
OX460980:Vequentavirus	100.0	90.0	89.7	86.6	86.4	88.2	88.0	88.2	88.2	89.0	87.7	89.2	89.2	88.8	89.0	89.5	88.7	87.3	89.3	89.6	89.6	89.5	89.1	90.4	88.8	89.0	88.3	88.5	90.0	88.6	87.5	88.2	88.3	87.8	87.2	88.3	88.6	88.9		
MK883717:Vequentavirus		100.0																																						
MK883718:Vequentavirus			100.0																																					
MT740314:Vequentavirus				100.0																																				
OQ376695:Vequentavirus					100.0																																			
JO031132:Vequentavirus						100.0																																		
MW883061:Vequentavirus							100.0																																	
KY683736:Vequentavirus								100.0																																
MZ501061:Vequentavirus									100.0																															
KP869112:Vequentavirus										99.7																														
KC690136:Vequentavirus											100.0																													
DQ832317:Vequentavirus												100.0																												
MG963916:Vequentavirus													100.0																											
LC739538:Vequentavirus														100.0																										
MZ501048:Vequentavirus															100.0																									
MN850642:Vequentavirus																100.0																								
MW748998:Vequentavirus																	100.0																							
MK373780:Vequentavirus																		100.0																						
LN881727:Vequentavirus																			100.0																					
MZ501111:Vequentavirus																				100.0																				
LC739540:Vequentavirus																					100.0																			
MZ501093:Vequentavirus																						100.0																		
KT001917:Vequentavirus																							100.0																	
MK962749:Vequentavirus																								100.0																
ON286973:Vequentavirus																									100.0															
MN850646:Vequentavirus																										100.0														
MZ501060:Vequentavirus																											100.0													
MT682716:Vequentavirus																												100.0												
MZ501062:Vequentavirus																													100.0											
KR698074:Vequentavirus																														100.0										
KJ190158:Vequentavirus																															100.0									
MN850627:Vequentavirus																																100.0								
MN850649:Vequentavirus																																	100.0							
LR699804:Vequentavirus																																		100.0						
LC739541:Vequentavirus																																			100.0					
MH491969:Vequentavirus																																				100.0				
Bacteriófago HEc4I																																							100.0	

En Figura 45 se observa que la secuencia del bacteriófago HEc4I es similar con la secuencia del bacteriófago MZ501048:Vequentavirus, con un valor de 95.2 de similitud, infiriendo que probablemente el bacteriófago HEc4I pertenece al género *Vequentavirus*.

Figura 46

Tabla de comparación del bacteriófago Hec5I

Bacteriófago HEC5I

OX460980:Vequentavirus	100.0	90.0	89.7	86.6	86.4	88.2	88.0	90.0	88.6	87.5	88.2	88.3	87.8	87.2	88.3	88.6	89.3	89.6	89.6	89.5	89.1	90.4	88.8	89.0	88.3	88.5	88.2	89.0	87.7	89.2	89.2	88.8	89.0	89.5	88.7	87.3	89.0	
MK883717:Vequentavirus		100.0	94.7	88.5	88.5	90.3	91.8	92.1	91.0	89.4	89.9	90.7	90.6	89.0	88.3	90.4	89.9	90.0	89.9	89.9	89.3	90.2	89.0	89.0	88.5	89.0	88.4	89.6	88.2	89.8	89.2	89.3	89.4	89.8	88.8	86.8	89.4	
MK883718:Vequentavirus			100.0	88.6	90.0	91.2	90.4	89.8	89.8	87.5	88.9	89.2	89.0	87.3	89.0	89.4	89.5	90.5	89.4	89.8	89.6	90.7	89.2	89.4	89.3	88.7	89.0	91.4	88.3	89.1	89.5	89.5	90.8	91.0	89.0	88.2	90.7	
MT740314:Vequentavirus				100.0	87.9	88.7	88.2	88.7	89.2	86.9	88.7	87.4	88.7	86.8	87.5	87.1	88.2	90.2	89.2	89.7	89.7	89.0	88.4	88.9	89.2	88.2	88.1	87.5	87.4	88.6	88.7	90.3	89.2	88.9	89.2	88.2	89.2	
OQ376695:Vequentavirus					100.0	91.3	92.0	87.0	87.5	85.3	86.6	86.8	86.4	85.4	87.6	87.6	88.0	88.5	87.2	89.7	87.3	88.1	87.5	87.6	86.8	86.6	87.2	88.8	86.0	87.5	88.0	88.2	88.4	89.2	89.3	88.2	88.8	
JQ031132:Vequentavirus						100.0	93.3	88.6	89.6	88.0	89.4	88.3	88.2	87.7	88.0	87.4	88.8	90.7	89.4	89.3	89.5	89.0	88.8	89.3	89.4	88.2	88.8	88.5	87.4	88.9	88.8	89.6	89.2	89.8	87.3	87.4	89.2	
MW883061:Vequentavirus							100.0	89.8	90.1	88.0	88.9	89.4	88.6	88.3	86.7	88.7	88.4	89.8	88.2	88.8	88.3	88.5	88.3	87.7	87.8	87.7	88.3	87.6	86.6	89.1	89.0	88.3	88.8	88.8	87.9	86.2	89.1	
MT682716:Vequentavirus								100.0	93.8	92.8	92.5	94.2	93.2	92.9	90.3	92.4	93.4	93.3	92.8	93.2	92.3	93.6	91.7	92.0	91.4	91.3	91.5	91.3	91.3	91.3	92.4	92.1	92.1	91.9	92.3	91.8	89.5	91.5
MZ501062:Vequentavirus									100.0	92.7	93.6	94.3	93.6	92.9	91.0	92.3	93.0	93.9	93.3	92.6	93.0	93.2	93.0	92.0	91.9	91.4	91.3	91.3	90.8	91.2	91.9	91.7	92.8	93.2	90.8	90.3	93.0	
KR698074:Vequentavirus										100.0	93.7	94.2	93.6	92.0	91.5	92.1	92.6	92.3	92.7	91.9	91.8	91.9	92.3	93.7	92.0	92.7	89.9	89.1	92.4	90.7	91.0	90.8	90.9	91.4	89.0	90.1	90.2	
KJ190158:Vequentavirus											100.0	93.9	94.7	92.2	91.9	93.1	92.2	92.8	93.3	92.5	93.0	93.5	93.0	93.2	93.6	92.2	90.8	89.7	91.5	93.2	91.8	92.7	92.6	93.5	91.0	92.2	92.1	
MN850627:Vequentavirus												100.0	95.5	93.8	91.7	94.1	95.8	93.5	92.9	92.5	91.9	95.0	93.4	94.1	92.5	92.9	91.1	90.8	90.8	92.0	92.1	91.4	91.7	92.6	90.3	90.4	91.4	
MN850649:Vequentavirus													100.0	92.1	91.8	93.2	92.9	93.5	93.9	92.0	92.2	93.5	93.5	94.3	93.7	92.2	91.0	90.1	91.1	92.3	91.8	92.2	92.2	93.1	91.7	90.9	92.1	
LR699804:Vequentavirus														100.0	90.5	91.4	91.8	91.7	91.5	90.6	90.8	92.8	92.0	90.9	90.0	90.2	89.3	88.6	89.0	90.4	89.6	89.0	89.9	90.7	88.9	88.9	89.9	
LC739541:Vequentavirus															100.0	93.7	92.4	91.3	92.8	91.0	91.0	93.0	93.4	92.5	90.6	92.9	89.2	90.3	89.9	91.4	92.1	90.7	91.9	93.0	90.6	92.8	92.1	
MH491969:Vequentavirus																100.0	92.0	91.3	91.7	91.6	90.3	94.3	91.9	92.6	90.3	91.8	89.6	90.2	89.5	91.4	91.9	90.5	91.8	93.0	90.8	90.8	92.2	
MK373780:Vequentavirus																	100.0	94.2	94.7	93.0	93.3	93.7	92.6	93.4	92.5	93.4	91.0	91.1	91.9	92.8	93.6	92.6	92.4	93.2	92.0	90.9	91.7	
LN881727:Vequentavirus																		100.0	94.7	93.9	94.4	94.0	93.5	93.4	93.6	92.4	92.6	91.9	91.9	92.8	93.1	92.7	93.7	93.8	92.5	91.2	93.2	
MZ501111:Vequentavirus																			100.0	93.1	93.9	93.3	94.0	93.7	93.9	93.3	91.0	90.9	91.4	92.5	92.8	91.9	93.4	93.5	92.4	91.3	92.9	
LC739540:Vequentavirus																				100.0	93.8	94.2	92.8	93.7	92.9	92.6	91.1	91.7	92.0	92.0	92.7	93.7	93.7	93.6	94.0	92.8	92.1	
MZ501093:Vequentavirus																					100.0	92.8	92.4	92.9	93.6	93.6	91.4	92.2	92.3	92.8	93.0	93.5	93.1	93.6	91.9	91.8	92.1	
KT001917:Vequentavirus																						100.0	94.6	94.6	93.5	92.7	92.3	92.3	91.7	93.6	92.6	92.5	93.4	94.3	92.1	92.2	93.2	
MK962749:Vequentavirus																							100.0	94.6	93.7	93.4	91.7	91.0	90.8	92.3	91.6	91.3	93.2	93.7	91.7	93.4	93.4	
ON286973:Vequentavirus																								100.0	94.1	94.1	91.3	91.7	91.6	91.9	92.0	92.6	92.9	93.1	91.4	91.9	92.9	
MN850646:Vequentavirus																									100.0	93.2	91.9	90.1	91.7	92.5	91.7	92.8	93.3	93.7	91.2	92.8	92.3	
MZ501060:Vequentavirus																										100.0	90.5	90.1	91.1	92.5	93.2	92.0	91.8	92.1	90.3	92.2	91.0	
KY683736:Vequentavirus																											100.0	90.7	90.1	92.3	91.1	90.9	91.5	91.6	90.3	89.6	91.3	
MZ501061:Vequentavirus																												100.0	89.8	90.1	90.4	90.8	91.9	92.7	90.2	89.7	91.6	
KP869112:Vequentavirus																													100.0	91.9	92.6	91.7	91.9	92.0	90.5	90.7	91.1	
KC690136:Vequentavirus																														100.0	93.1	92.6	92.5	92.5	92.9	91.4	92.1	
DQ832317:Vequentavirus																															100.0	93.6	93.1	93.1	91.8	91.3	92.3	
MG963916:Vequentavirus																																100.0	93.7	93.5	92.0	91.7	91.7	
LC739538:Vequentavirus																																	100.0	95.5	93.6	93.0	94.4	
MZ501048:Vequentavirus																																		100.0	93.5	93.6	95.2	

Así mismo, en la Figura 46 se observa que la secuencia del bacteriófago Hec5I es similar con la secuencia del bacteriófago MZ501048:Vequentavirus, con un valor de 95.2 de similitud, infiriendo que probablemente el bacteriófago Hec5I pertenece al género *Vequentavirus*.

Se realizó una nueva búsqueda de la secuencia MZ501048:Vequintavirus en la base de datos del GenBank, resultando en la especie *Escherichia phage AlexBoehm* del género *Vequintavirus*.

Se corroboró la información de la taxonomía proporcionada por la base de datos del GenBank con la plataforma del Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV), obteniendo que los bacteriófagos HEc4I y la HEc5I posiblemente pertenezcan al género *Vequintavirus*, cuya posición taxonómica es la siguiente:

Dominio: *Duplodnavyria*

Reino: *Heunggongvirae*

Filo: *Uroviricota*

Clase: *Caudoviricetes*

Orden: No definido

Familia: No definida

Subfamilia: *Vequintavirinae*

Género: *Vequintavirus*

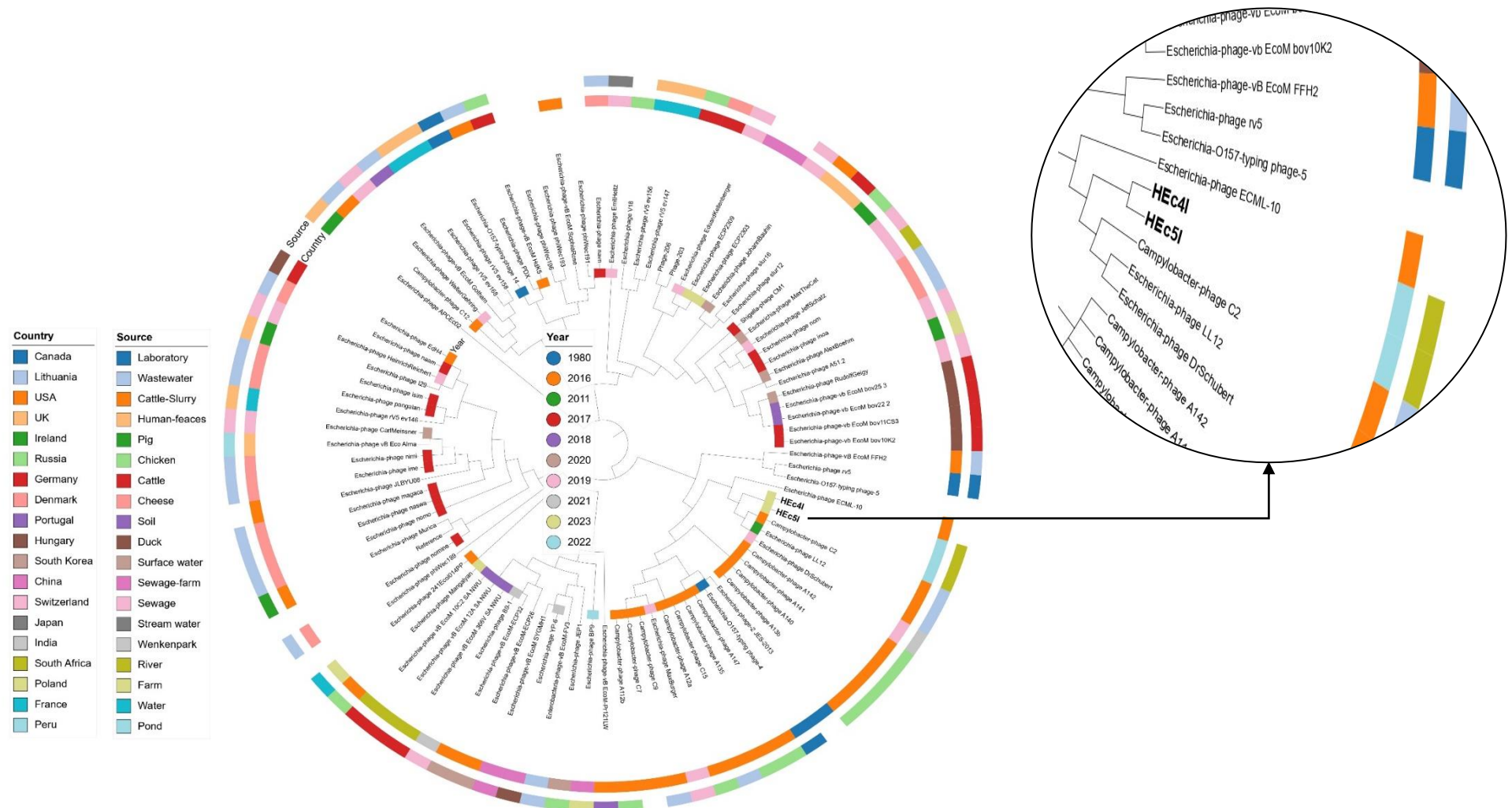
Fuente:https://ictv.global/taxonomy/taxondetails?taxnode_id=202319480&taxon_name=Vequintavirus%20alexboehm

El género *Vequintavirus* está dentro de un orden y una familia no definida en la plataforma del ICTV.

A partir de las secuencias descargadas de todos los bacteriófagos del género *Vequintavirus* de la base de datos del GenBank, se realizó el dendrograma circular como se observa en la Figura 47.

Figura 47

Dendrograma circular donde se observa a los bacteriófagos HEC4I y HEC5I



El dendrograma circular permite observar el país, el año y el recurso a partir del cual fue aislado cada bacteriófago, se observó que los bacteriófagos HEc4I y HEc5I son genéticamente similares entre sí por presentar ramas muy cortas que se unen en un mismo nodo, lo que podría significar que compartieron un ancestro en común, además de tener una historia evolutiva muy cercana. También se visualiza que los bacteriófagos *Escherichia*-phageDrSchubert y *Escherichia*-phage LL12 comparten características genéticas similares con el bacteriófago *Campylobacter*-phageC2, a su vez estos bacteriófagos comparten características genéticas similares con los bacteriófagos HEc4I y HEc5I, por último, los bacteriófagos antes mencionados comparten características genéticas similares con *Escherichia*-phage ECML-10; todos los bacteriófagos utilizados para generar el dendrograma circular, pertenecen al género *Vequintavirus*.

Con estos resultados obtenidos inferimos que los bacteriófagos HEc4I y HEc5I poseen similitud genética debido a que fueron obtenidos de puntos de muestreo cercanos de la cuenca del río Huatanay, correspondientes a la época de lluvias (mes de marzo 2024), además, se utilizó un mismo hospedero que fue *Escherichia coli* NCTC 13476 (resistente a carbapenemasas) para su aislamiento. También, los bacteriófagos más cercanos en el dendrograma circular fueron aislados en Estados Unidos, no presentando una distancia geográfica muy lejana con los bacteriófagos en estudio. Así mismo, se tomó en consideración estos bacteriófagos debido a que su hospedero presenta resistencia a carbapenemasas, los cuales según la OMS pertenecen al Grupo de microorganismos de peligro crítico en cuanto a resistencia bacteriana.

Los bacteriófagos presentes en la subfamilia *Vequintavirinae* tienen afinidad por bacterias del orden Enterobacterales que están asociados a mamíferos; específicamente los bacteriófagos *Vequintavirus* utilizan un receptor primario para adherirse a su célula hospedadora, este receptor específico es un carbohidrato ubicado en la membrana externa de las Enterobacterias. El género *Vequintavirus* posee un amplio espectro lítico de hospedero frente a cepas de *Escherichia coli* (Cortés-Martín et al., 2024).

Cabe resaltar que los resultados de aislamiento, caracterización e identificación de los bacteriófagos HEc4I y HEc5I obtenidos en el presente trabajo son los primeros reportes del género *Vequintavirus* como bacteriófagos de *Escherichia coli* en el Perú.

Los resultados de secuenciamiento de los bacteriófagos HEc4I y HEc5I pertenecientes al género *Vequintavirus* difieren con los resultados obtenidos por Lee et al. (2020) indicaron que su bacteriófago perteneció al género *Rb49virus* de la subfamilia *Tevenrinae* de la familia *Myoviridae*, a su vez Abdelrahman et al. (2022) clasificaron a sus bacteriófagos dentro del orden *Caudovirales*, en la familia *Siphoviridae*; por otro lado, Nazir et al. (2024), indicaron que sus bacteriófagos pertenecen al género *Kayfunavirus* y *Suceptinavirus* de la familia *Autographiviridae* y subfamilia *Gordonclarkvirinae*. Por ultimo Sada & Tessema (2024) identificaron a los bacteriófagos clasificándolos dentro del orden *Caudovirales* en las familias *Myoviridae*, *Siphoviridae* y *Podoviridae*.

CONCLUSIONES

- Se aisló un total de 34 bacteriófagos líticos contra *Escherichia coli* provenientes de muestras de aguas de la cuenca del río Huatanay, 16 bacteriófagos líticos fueron aislados usando como hospedero *Escherichia coli* NCTC 13476 y 18 bacteriófagos líticos fueron aislados utilizando como hospedero *Escherichia coli* ATCC 35218 multidrogo resistentes (MDR).
- Se determinó las características biológicas de los bacteriófagos líticos aislados, donde en el rango de hospedero intraespecie de los 34 bacteriófagos, presentaron actividad lítica contra cepas clínicas de *Escherichia coli* MDR, de los cuales 4 bacteriófagos fueron seleccionados tomando en cuenta la intensidad de la zona de aclaramiento y la cantidad de cepas lisadas, donde el bacteriófago HEc4I tuvo actividad lítica contra 5 cepas (10%), HEc5I presentó actividad lítica contra 15 cepas (31%), HEc2II manifestó actividad lítica contra 7 cepas (15%) y HEc7II mostro actividad lítica contra 9 cepas (19%); para el rango de hospedero interespecie ninguno de los 4 bacteriófagos presento actividad lítica. La MOI óptima para los bacteriófagos HEc4I, HEc5I, HEc2II y HEc7II fue de 0.01. La constante de adsorción para los bacteriófagos HEc4I y HEc5I fue de 15 minutos, de HEc2II fue de 10 minutos y de HEc7II fue de 20 minutos. En la curva de un paso el periodo de latencia de los bacteriófagos HEc4I, HEc5I y HEc7II fue de 5 minutos y de HEc2II fue de 10 minutos, con un tamaño de explosión de 376 para HEc4I, para HEc5I de 111, para HEc2II de 3256 y para HEc7II de 9 UFP por célula infectada.
- Se determinó las características fisicoquímicas de los bacteriófagos líticos usando como hospedero a cepas de *Escherichia coli* NCTC 13476 y *Escherichia coli* ATCC 35218 multidrogo resistentes (MDR). En la termo estabilidad los bacteriófagos HEc4I, HEc5I, HEc2II y HEc7II presentaron estabilidad de 30°C a 50°C incluida la T°amb, sufriendo un descenso a los 60°C e inactivándose a 70°C y 80°C. Los bacteriófagos HEc4I, HEc5I, HEc2II y HEc7II tuvieron un rango de estabilidad entre pH 3 a pH 11 y el bacteriófago HEc5I presentó actividad lítica a pH 12. Los bacteriófagos HEc4I, HEc5I, HEc2II y HEc7II no presentaron sensibilidad al cloroformo.

- Los bacteriófagos HEc4I y HEc5I se identificaron por secuenciamiento Illumina NGS y probablemente pertenezcan al género *Vequintavirus*.

RECOMENDACIONES

1. Se recomienda la toma de microfotografías mediante microscopía electrónica de transmisión para conocer la morfología de los bacteriófagos.
2. Se aconseja estudiar las temperaturas de almacenamiento de los bacteriófagos a -80°C, -20°C y -4°C en diferentes medios de conservación.
3. Se sugiere realizar estudios para determinar su actividad *in vivo* y evaluar su rendimiento de los bacteriófagos.

BIBLIOGRAFIA

- Abd-El Wahab, A., Basiouni, S., El-Seedi, H. R., Ahmed, M. F. E., Bielke, L. R., Hargis, B., Tellez-Isaias, G., Eisenreich, W., Lehnherr, H., Kittler, S., Shehata, A. A., & Visscher, C. (2023). An overview of the use of bacteriophages in the poultry industry: Successes, challenges, and possibilities for overcoming breakdowns. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1136638.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1136638>
- Abdelrahman, F., Rezk, N., Fayed, M. S., Abdelmoteleb, M., Atteya, R., Elhadidy, M., & El-Shibiny, A. (2022). Isolation, Characterization, and Genomic Analysis of Three Novel E. coli Bacteriophages That Effectively Infect E. coli O18. *Microorganisms*, 10(3), 589. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10030589>
- Abedon, S. T. (2023). Bacteriophage Adsorption: Likelihood of Virion Encounter with Bacteria and Other Factors Affecting Rates. *Antibiotics*, 12(4), 723.
<https://doi.org/10.3390/antibiotics12040723>
- Adams, M. H. (1959). *Bacteriophages*. New York, Interscience Publishers.
<http://archive.org/details/bacteriophages00adam>
- Adriaenssens, E. M., & Brister, J. R. (2017). How to Name and Classify Your Phage: An Informal Guide. *Viruses*, 9(4), 70. <https://doi.org/10.3390/v9040070>
- Akova, M. (2016). Epidemiology of antimicrobial resistance in bloodstream infections. *Virulence*, 7(3), Article 3. <https://doi.org/10.1080/21505594.2016.1159366>
- Allocati, N., Masulli, M., Alexeyev, M. F., & Di Ilio, C. (2013). Escherichia coli in Europe: An Overview. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10(12), Article 12. <https://doi.org/10.3390/ijerph10126235>

- Alomari, M. M. M., Dec, M., & Urban-Chmiel, R. (2021). Bacteriophages as an Alternative Method for Control of Zoonotic and Foodborne Pathogens. *Viruses*, 13(12), 2348. <https://doi.org/10.3390/v13122348>
- Alzamora, M. C., Echevarría, A. C., Ferraro, V. M., Riveros, M. D., Zambruni, M., & Ochoa, T. J. (2019). Resistencia antimicrobiana de cepas comensales de *Escherichia coli* en niños de dos comunidades rurales peruanas. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 36, 459-463. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2019.363.4366>
- ANA. (2016). *Protocolo nacional para el monitoreo de la calidad de los recursos hídricos superficiales*. Autoridad Nacional del Agua. <https://www.ana.gob.pe/publicaciones/protocolo-nacional-para-el-monitoreo-de-la-calidad-de-los-recursos-hidricos-0>
- Antimicrobial Resistance Collaborators. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: A systematic analysis. *Lancet (London, England)*, 399(10325), 629-655. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)
- Arbab, S., Ullah, H., Wang, W., & Zhang, J. (2022). Antimicrobial drug resistance against *Escherichia coli* and its harmful effect on animal health. *Veterinary Medicine and Science*, 8(4), 1780-1786. <https://doi.org/10.1002/vms3.825>
- Azeredo, J., & Sutherland, I. (2008). The Use of Phages for the Removal of Infectious Biofilms. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 9(4), Article 4. <https://doi.org/10.2174/138920108785161604>
- Batinovic, S., Wassef, F., Knowler, S. A., Rice, D. T. F., Stanton, C. R., Rose, J., Tucci, J., Nittami, T., Vinh, A., Drummond, G. R., Sobey, C. G., Chan, H. T., Seviour, R. J., Petrovski, S., & Franks, A. E. (2019). Bacteriophages in Natural and

- Artificial Environments. *Pathogens*, 8(3), Article 3.
<https://doi.org/10.3390/pathogens8030100>
- Bengtsson-Palme, J., Kristiansson, E., & Larsson, J. (2018). Environmental factors influencing the development and spread of antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, 42(1), Article 1. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux053>
- Benmarhnia, T., & Fuller, D. (2020). *Métodos cuasi-experimentales*. 249-275.
- Bisso, A. (2018). *Fundamentos básicos de la terapia antimicrobiana* (1). 31(1), Article 1.
- Blanco Picazo, P. (2022). Bacteriófagos y movilización de genes de resistencia a antibióticos desde una perspectiva One-Health [Ph.D. Thesis, Universitat de Barcelona]. En *TDX (Tesis Doctorals en Xarxa)*.
<https://www.tdx.cat/handle/10803/687493>
- Brady, A., Felipe-Ruiz, A., Gallego del Sol, F., Marina, A., Quiles-Puchalt, N., & Penadés, J. R. (2021). Molecular Basis of Lysis–Lysogeny Decisions in Gram-Positive Phages. *Annual Review of Microbiology*, 75(1), Article 1.
<https://doi.org/10.1146/annurev-micro-033121-020757>
- Campo, L. (2024). *Identificación fenotípica y molecular (PCR) de β -Lactamasas tipo BLEE y carbapenemasas en cepas de Klebsiella pneumoniae aislados de pacientes intrahospitalarios en la ciudad de Cusco* [Biologo, Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco].
<https://repositorio.unsaac.edu.pe/handle/20.500.12918/8635>
- Clokie, M. R. J., & Kropinski, A. M. (Eds.). (2009a). *Bacteriophages* (Vol. 501). Humana Press. <http://link.springer.com/10.1007/978-1-60327-164-6>
- Clokie, M. R. J., & Kropinski, A. M. (Eds.). (2009b). *Bacteriophages* (Vol. 501). Humana Press. <http://link.springer.com/10.1007/978-1-60327-164-6>

- Córdoba, M. A. V. (2022). *Virología médica* (2.^a ed.). Editorial El Manual Moderno.
https://books.google.com.pe/books?id=alyCEAAQBAJ&pg=PA1&hl=es&source=gbbs_toc_r&cad=2#v=onepage&q&f=false
- Cortés-Martín, A., Buttimer, C., Pozhydaieva, N., Hille, F., Shareefdeen, H., Bolocan, A. S., Draper, L. A., Shkoporov, A. N., Franz, C. M., Höfer, K., Ross, R. P., & Hill. (2024). Isolation and characterization of Septuagintavirus; a novel clade of Escherichia coli phages within the subfamily Vequintavirinae. *Microbiology Spectrum*, 12(9), e00592-24. <https://doi.org/10.1128/spectrum.00592-24>
- Croxen, M. A., Law, R. J., Scholz, R., Keeney, K. M., Wlodarska, M., & Finlay, B. B. (2013). Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic Escherichia coli. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(4), Article 4.
<https://doi.org/10.1128/CMR.00022-13>
- Cuyutupa, A. (2022). *Aislamiento y caracterización de bacteriófagos líticos aislados de intestino de pollos y específicos de Salmonella Infantis multidrogo-resistente* [Universidad Nacional Mayor de San Marcos].
<https://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/20.500.12672/18550>
- De Angelis, G., Del Giacomo, P., Posteraro, B., Sanguinetti, M., & Tumbarello, M. (2020). Molecular Mechanisms, Epidemiology, and Clinical Importance of β -Lactam Resistance in Enterobacteriaceae. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(14), 5090. <https://doi.org/10.3390/ijms21145090>
- Dini, C. (2011). *Aislamiento y caracterización molecular de bacteriófagos de bacterias enteropatógenas para biocontrol de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA)* [Doctor en Ciencias Exactas, área Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de La Plata]. <https://doi.org/10.35537/10915/2686>

- Domingo-Calap, P., & Delgado-Martínez, J. (2018). Bacteriophages: Protagonists of a Post-Antibiotic Era. *Antibiotics*, 7(3), Article 3.
<https://doi.org/10.3390/antibiotics7030066>
- FDA. (2024, septiembre 8). *Antimicrobial Resistance Information from FDA* [Gubernamental]. U.S. Food & Drug Administration; FDA.
<https://www.fda.gov/emergency-preparedness-and-response/mcm-issues/antimicrobial-resistance-information-fda>
- Fernández, L., Leal, A., Agún, S., Jurado, A., Rodríguez, A., & García, P. (2023). *Los enemigos de las bacterias: Los bacteriófagos*. 26(1), 51-74.
- Fikadu, A., Amankwah, S., Alemu, B., Alemu, Y., Naga, A., Tekle, E., & Kassa, T. (2024). Isolation and Phenotypic Characterization of Virulent Bacteriophages Against Multidrug-Resistant *Escherichia coli* and Its Phage-Resistant Variant from Sewage Sources. *Infection and Drug Resistance*, 17, 293-303.
<https://doi.org/10.2147/IDR.S441085>
- Flores, G. I. (2017). Caracterización de bacteriófagos líticos de *Salmonella enterica* aislados de muestras de pollos. *Universidad Nacional Mayor de San Marcos*.
<https://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/20.500.12672/7317>
- Frieri, M., Kumar, K., & Boutin, A. (2017). Antibiotic resistance. *Journal of Infection and Public Health*, 10(4), Article 4. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2016.08.007>
- Garriss, G., & Henriques-Normark, B. (2020). Lysogeny in *Streptococcus pneumoniae*. *Microorganisms*, 8(10), Article 10.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms8101546>
- Garrity, G. M., Brenner, D. J., Krieg, N. R., & Staley, J. T. (2005). *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology: Second Edition, Volume two The Proteobacteria Part B: The Gammaproteobacteria* (2.^a ed., Vol. 2). Springer.

- Gibb, B., & Hadjiargyrou, M. (2021). Bacteriophage therapy for bone and joint infections. *The Bone & Joint Journal*, 103-B(2), Article 2.
<https://doi.org/10.1302/0301-620X.103B2.BJJ-2020-0452.R2>
- Gulyaeva, A., Garmaeva, S., Kurilshikov, A., Vich Vila, A., Riksen, N. P., Netea, M. G., Weersma, R. K., Fu, J., & Zhernakova, A. (2022). Diversity and Ecology of Caudoviricetes Phages with Genome Terminal Repeats in Fecal Metagenomes from Four Dutch Cohorts. *Viruses*, 14(10), 2305.
<https://doi.org/10.3390/v14102305>
- Guttman, B., Raya, R. R., & Kutter, E. (2005). Basic phage biology. En *Bacteriophages: Biology and applications*. Crc Press-taylor & Francis Group.
<https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/127758>
- Guzzi, L. (2023). Fagoterapia: Una alternativa emergente en la era de la multirresistencia antibiótica. *Actualizaciones en Sida e Infectología*.
<https://doi.org/10.52226/revista.v31i112.123>
- Habibinava, F., Zolfaghari, M. R., Sabouri Shahrbabak, S., Zargar, M., & Soleimani, M. (2021). Isolation of Lytic Bacteriophages against MDR-Klebsiella pneumoniae and MDR-Enterobacter aerogenes from Sewage Samples: A Potential Tool for Medical Purposes. *Iranian Journal of Medical Microbiology*, 15(1), 46-66.
<https://doi.org/10.30699/ijmm.15.1.46>
- Harada, L. K., Silva, E. C., Campos, W. F., Del Fiol, F. S., Vila, M., Dąbrowska, K., Krylov, V. N., & Balcão, V. M. (2018). Biotechnological applications of bacteriophages: State of the art. *Microbiological Research*, 212-213, 38-58.
<https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.04.007>
- Hemm, M., Weaver, J., & Storz, G. (2020). Escherichia coli small proteome. *EcoSal Plus*, 9(1), Article 1. <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.ESP-0031-2019>

- Huang, Y., Wang, W., Zhang, Z., Gu, Y., Huang, A., Wang, J., & Hao, H. (2022). Phage Products for Fighting Antimicrobial Resistance. *Microorganisms*, 10(7), 1324. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10071324>
- Hyman, P. (2019). Phages for Phage Therapy: Isolation, Characterization, and Host Range Breadth. *Pharmaceuticals*, 12(1), 35. <https://doi.org/10.3390/ph12010035>
- ICTV. (2023). *Current ICTV Taxonomy Release* | ICTV [Base de datos de virus]. International Committee on Taxonomy of Viruses: ICTV. <https://ictv.global/taxonomy>
- Jamal, M., Hussain, T., Das, C. R., & Andleeb, S. (2015). Characterization of Siphoviridae phage Z and studying its efficacy against multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* planktonic cells and biofilm. *Journal of Medical Microbiology*, 64(4), 454-462. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000040>
- Jamalludeen, N., Johnson, R. P., Friendship, R., Kropinski, A. M., Lingohr, E. J., & Gyles, C. L. (2007). Isolation and characterization of nine bacteriophages that lyse O149 enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Veterinary Microbiology*, 124(1-2), Article 1-2. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.03.028>
- Jang, J., Hur, H.-G., Sadowsky, M. j., Byappanahalli, M. n., Yan, T., & Ishii, S. (2017). Environmental *Escherichia coli*: Ecology and public health implications—a review. *Journal of Applied Microbiology*, 123(3), Article 3. <https://doi.org/10.1111/jam.13468>
- Jiménez, M. A., Galas, M., Corso, A., Hormazábal, J. C., Duarte Valderrama, C., Salgado, N., Ramón-Pardo, P., & Melano, R. (2019). Consenso latinoamericano para definir, categorizar y notificar patógenos multirresistentes, con resistencia extendida o panresistentes. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 1-8. <https://doi.org/10.26633/RPSP.2019.65>

- Jończyk, E., Kłak, M., Międzybrodzki, R., & Górski, A. (2011). The influence of external factors on bacteriophages review. *Folia Microbiologica*, 56(3), 191-200. <https://doi.org/10.1007/s12223-011-0039-8>
- Kaushik, M., Sarkar, N., Singh, A., & Kumar, P. (2022). Nanomaterials to address the genesis of antibiotic resistance in *Escherichia coli*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.946184>
- Keen, E. C. (2015). A century of phage research: Bacteriophages and the shaping of modern biology. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 37(1), Article 1. <https://doi.org/10.1002/bies.201400152>
- Koonin, E. V., Krupovic, M., & Agol, V. I. (2021). The Baltimore Classification of Viruses 50 Years Later: How Does It Stand in the Light of Virus Evolution? *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 85(3), e00053-21. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00053-21>
- LaPlante, K. L., Dhand, A., Wright, K., & Lauterio, M. (2022). Re-establishing the utility of tetracycline-class antibiotics for current challenges with antibiotic resistance. *Annals of Medicine*, 54(1), 1686-1700. <https://doi.org/10.1080/07853890.2022.2085881>
- Larsson, D. G. J., & Flach, C.-F. (2022). Antibiotic resistance in the environment. *Nature Reviews. Microbiology*, 20(5), 257-269. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00649-x>
- Lee, C., Choi, I. Y., Park, D. H., & Park, M.-K. (2020). Isolation and characterization of a novel *Escherichia coli* O157:H7-specific phage as a biocontrol agent. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, 18(1), 189-199. <https://doi.org/10.1007/s40201-020-00452-5>

- Leprince, A., & Mahillon, J. (2023). Phage Adsorption to Gram-Positive Bacteria. *Viruses*, 15(1). <https://doi.org/10.3390/v15010196>
- Letellier, L., Boulanger, P., Plançon, L., Jacquot, P., & Santamaria, M. (2004). Main features on tailed phage, host recognition and DNA uptake. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library*, 9, 1228-1339. <https://doi.org/10.2741/1333>
- Litt, P. K., & Jaroni, D. (2017). Isolation and Physiomorphological Characterization of Escherichia coli O157:H7-Infecting Bacteriophages Recovered from Beef Cattle Operations. *International Journal of Microbiology*, 2017, 7013236. <https://doi.org/10.1155/2017/7013236>
- Liu, D., Van Belleghem, J. D., de Vries, C. R., Burgener, E., Chen, Q., Manasherob, R., Aronson, J. R., Amanatullah, D. F., Tamma, P. D., & Suh, G. A. (2021). The Safety and Toxicity of Phage Therapy: A Review of Animal and Clinical Studies. *Viruses*, 13(7), 1268. <https://doi.org/10.3390/v13071268>
- Liu, Y., Zhu, M., Fu, X., Cai, J., Chen, S., Lin, Y., Jiang, N., Chen, S., & Lin, Z. (2021). Escherichia coli Causing Neonatal Meningitis During 2001–2020: A Study in Eastern China. *International Journal of General Medicine*, 14, 3007-3016. <https://doi.org/10.2147/IJGM.S317299>
- López, J. V. (2020). Epistemological and ontological reflections on viruses: Towards a new definition of viral processes. *SCIO: Revista de Filosofía*, 19, Article 19. https://doi.org/10.46583/scio_2020.19.609
- Macdonald, K. E., Stacey, H. J., Harkin, G., Hall, L. M. L., Young, M. J., & Jones, J. D. (2020). Patient perceptions of phage therapy for diabetic foot infection. *PLoS ONE*, 15(12), e0243947. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243947>

- Magiorakos, A.-P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., Harbarth, S., Hindler, J. F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D. L., Rice, L. B., Stelling, J., Struelens, M. J., Vatopoulos, A., Weber, J. T., & Monnet, D. L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 18(3), Article 3. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>
- Malik, D., Sokolov, I., Vinner, G., Mancuso, F., Cinquerrui, S., Vladislavljevic, G. T., Clokie, M. R. J., Garton, N. J., Stapley, A. G. F., & Kirpichnikova, A. (2017). Formulation, stabilisation and encapsulation of bacteriophage for phage therapy. *Advances in Colloid and Interface Science*, 249, 100-133. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.05.014>
- Marcó, M. B., Suárez, V. B., Quiberoni, A., & Pujato, S. A. (2019). Inactivation of Dairy Bacteriophages by Thermal and Chemical Treatments. *Viruses*, 11(5), Article 5. <https://doi.org/10.3390/v11050480>
- Marcos-Carbajal, P., Salvatierra, G., Yareta, J., Pino, J., Vásquez, N., Diaz, P., Martínez, I., Asmat, P., Peralta, C., Huamani, C., Briones, A., Ruiz, M., Laura, N., Luque, Á., Arapa, L., & Tsukayama, P. (2021). Caracterización microbiológica y molecular de la resistencia antimicrobiana de Escherichia coli uropatógenas de hospitales públicos peruanos. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 38, 119-123. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2021.381.6182>

- Mayer, G. (2015a). *Bacteriófago*. BACTERIOLOGIA - CAPITULO SIETE
VIROLOGIA - CAPITULO VEINTICUATRO BACTERIOFAGO.
<http://www.microbiologybook.org/mayer/phage.htm>
- Mayer, G. (2015b). *Bacteriófago*. Bacteriologia-Capitulo Siete Virologia- Capitulo
Venticuatro Bacteriofagos. <http://www.microbiologybook.org/mayer/phage.htm>
- Mestrovic, T., Aguilar, G. R., Swetschinski, L. R., Ikuta, K. S., Gray, A. P., Weaver, N.
D., Han, C., Wool, E. E., Hayoon, A. G., Hay, S. I., Dolecek, C., Sartorius, B.,
Murray, C. J. L., Addo, I. Y., Ahinkorah, B. O., Ahmed, A., Aldeyab, M. A.,
Allel, K., Ancuceanu, R., ... Naghavi, M. (2022). The burden of bacterial
antimicrobial resistance in the WHO European region in 2019: A cross-country
systematic analysis. *The Lancet Public Health*, 7(11), Article 11.
[https://doi.org/10.1016/S2468-2667\(22\)00225-0](https://doi.org/10.1016/S2468-2667(22)00225-0)
- Montso, P. K., Mlambo, V., & Ateba, C. N. (2019). Characterization of Lytic
Bacteriophages Infecting Multidrug-Resistant Shiga Toxigenic Atypical
Escherichia coli O177 Strains Isolated From Cattle Feces. *Frontiers in Public
Health*, 7, 355. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2019.00355>
- Municipalidad Provincial del Cusco. (2013). *Plan de Desarrollo Urbano Cusco al
2023*. [https://www.studocu.com/es-ar/document/universidad-de-
palermo/planificacion-de-la-produccion-organizacion-industrial/2-3-3-sub-
componente-agua-y-cambio-climatico/17259503](https://www.studocu.com/es-ar/document/universidad-de-palermo/planificacion-de-la-produccion-organizacion-industrial/2-3-3-sub-componente-agua-y-cambio-climatico/17259503)
- Munita, J. M., & Arias, C. A. (2016). Mechanisms of Antibiotic Resistance.
Microbiology spectrum, 4(2), Article 2.
<https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015>
- Murray, C. J., Ikuta, K. S., Sharara, F., Swetschinski, L., Aguilar, G. R., Gray, A., Han,
C., Bisignano, C., Rao, P., Wool, E., Johnson, S. C., Browne, A. J., Chipeta, M.

- G., Fell, F., Hackett, S., Haines-Woodhouse, G., Hamadani, B. H. K., Kumaran, E. A. P., McManigal, B., ... Naghavi, M. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: A systematic analysis. *The Lancet*, 399(10325), Article 10325. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)
- Nataro, J. P., & Kaper, J. B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 11(1), Article 1.
- Nazir, A., Li, L., Li, F., Tong, Y., Liu, Y., & Chen, Y. (2024). Characterization, taxonomic classification, and genomic analysis of two newly isolated bacteriophages with potential to infect *Escherichia coli*. *Microbiology Spectrum*, 0(0), e02230-23. <https://doi.org/10.1128/spectrum.02230-23>
- Necel, A., Bloch, S., Nejman-Faleńczyk, B., Dydecka, A., Topka-Bielecka, G., Węgrzyn, A., & Węgrzyn, G. (2021). A Validation System for Selection of Bacteriophages against Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Contamination. *Toxins*, 13(9), Article 9. <https://doi.org/10.3390/toxins13090644>
- Newell, D. G., & La Ragione, R. M. (2018). Enterohaemorrhagic and other Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC): Where are we now regarding diagnostics and control strategies? *Transboundary and Emerging Diseases*, 65 Suppl 1, 49-71. <https://doi.org/10.1111/tbed.12789>
- Nobrega, F. L., Vlot, M., de Jonge, P. A., Dreesens, L. L., Beaumont, H. J. E., Lavigne, R., Dutilh, B. E., & Brouns, S. J. J. (2018). Targeting mechanisms of tailed bacteriophages. *Nature Reviews Microbiology*, 16(12), 760-773. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0070-8>
- OMS. (2024a, mayo 17). *WHO bacterial priority pathogens list, 2024: Bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance* [Gubernamental].

World Health Organization.

<https://www.who.int/publications/i/item/9789240093461>

OMS. (2024b, junio 14). *La OMS publica un informe sobre el estado de desarrollo de antibacterianos* [Gubernamental]. Organizacion Mundial de la Salud.

<https://www.who.int/es/news/item/14-06-2024-who-releases-report-on-state-of-development-of-antibacterials>

Ortiz, Y., García-Heredia, A., Merino-Mascorro, A., García, S., Solís-Soto, L., & Heredia, N. (2021). Natural and synthetic antimicrobials reduce adherence of enteroaggregative and enterohemorrhagic *Escherichia coli* to epithelial cells.

PLoS ONE, 16(5), Article 5. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0251096>

Pakbin, B., Brück, W. M., & Rossen, J. W. A. (2021). Virulence Factors of Enteric Pathogenic *Escherichia coli*: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(18), Article 18. <https://doi.org/10.3390/ijms22189922>

Sciences, 22(18), Article 18. <https://doi.org/10.3390/ijms22189922>

Park, H., Kim, J., Kim, M., Park, Y., & Ryu, S. (2021). Development of new strategy combining heat treatment and phage cocktail for post-contamination prevention.

Food Research International, 145, 110415.

<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110415>

Pérez, H. J. S. (2020). Los virus, ni vivos ni muertos. *Ecofronteras*, 18-20.

Peréz, M. T. P. (2021). *La pandemia silenciosa: Resistencia bacteriana a los antibióticos*. Fundacion Universitaria San Pablo CEU, 2021.

https://repositorioinstitucional.ceu.es/bitstream/10637/13083/1/Pandemia_Perez_2021.pdf

Prada, C., Holguín, A., González, A., & Vives, M. (2015). Fagoterapia, alternativa para el control de las infecciones bacterianas. Perspectivas en Colombia. *Universitas Scientiarum*, 20(1), Article 1. <https://doi.org/10.11144/Javeriana.SC20-1.faci>

- Prieto, A. B. (2024). *Frecuencia de filogrupos de Escherichia coli según fenotipo de resistencia a partir de aislamientos clínicos en pacientes pediátricos de un hospital de Lima, Perú, 2023-2024* [Licenciado en Tecnología Médica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos].
<https://cybertesis.unmsm.edu.pe/item/6abd673e-dc10-4fb7-a53c-82114d54b8fe>
- Pulingam, T., Parumasivam, T., Gazzali, A. M., Sulaiman, A. M., Chee, J. Y., Lakshmanan, M., Chin, C. F., & Sudesh, K. (2022). Antimicrobial resistance: Prevalence, economic burden, mechanisms of resistance and strategies to overcome. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 170, 106103.
<https://doi.org/10.1016/j.ejps.2021.106103>
- Punil, R. J. (2017). *Caracterización de un bacteriófago específico de Escherichia coli aislado de aguas residuales de “La Taboada”* [Universidad Nacional Mayor de San Marcos]. <https://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/20.500.12672/7363>
- Reina, J., & Reina, N. (2018). Phagotherapy, an alternative to antibiotic therapy? *Revista Española de Quimioterapia*, 31(2), Article 2.
- Riley, L. W. (2020). Distinguishing Pathovars from Nonpathovars: Escherichia coli. *Microbiology Spectrum*, 8(4), Article 4.
<https://doi.org/10.1128/microbiolspec.AME-0014-2020>
- Rosano, G. L., Morales, E. S., & Ceccarelli, E. A. (2019). New tools for recombinant protein production in Escherichia coli: A 5-year update. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, 28(8), Article 8.
<https://doi.org/10.1002/pro.3668>
- Sada, T. S., & Tessema, T. S. (2024). Isolation and characterization of lytic bacteriophages from various sources in Addis Ababa against antimicrobial-resistant diarrheagenic Escherichia coli strains and evaluation of their

- therapeutic potential. *BMC Infectious Diseases*, 24, 310.
<https://doi.org/10.1186/s12879-024-09152-z>
- Salim, A., Madhavan, A., Subhash, S., Prasad, M., Nair, B. G., & Pal, S. (2022). Escherichia coli ST155 as a production-host of three different polyvalent phages and their characterisation with a prospect for wastewater disinfection. *Scientific Reports*, 12, 19406. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-24134-4>
- Sattar, S., Bailie, M., Yaqoob, A., Khanum, S., Fatima, K., Altaf, A. U. R. B., Ahmed, I., Shah, S. T. A., Munawar, J., Zehra, Q. A., Daud, S., Arshad, A., Imdad, K., Javed, S., Tariq, A., Bostan, N., & Altermann, E. (2023). Characterization of two novel lytic bacteriophages having lysis potential against MDR avian pathogenic Escherichia coli strains of zoonotic potential. *Scientific Reports*, 13, 10043. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-37176-z>
- SEDACUSCO. (2017). *A.plan Maestro Optimizado 2012-2016 Sedacusco | PDF | Deuda | Amortización (Negocio)*. Scribd.
<https://es.scribd.com/document/359527425/A-plan-Maestro-Optimizado-2012-2016-Sedacusco>
- Segundo, A., Hernández, B., López, V., & Torres, A. (2010). *Los bacteriófagos como una alternativa en el tratamiento de enfermedades infecciosas Bacterianas (Fagoterapia)* (3). 41(3), Article 3.
- Sjahriani, T., Wasito, E. B., & Tyasningsih, W. (2021). Isolation and Identification of Escherichia coli O157:H7 Lytic Bacteriophage from Environment Sewage. *International Journal of Food Science*, 2021, 7383121.
<https://doi.org/10.1155/2021/7383121>
- Sulayyim, H. J. A., Ismail, R., Hamid, A. A., & Ghafar, N. A. (2022). Antibiotic Resistance during COVID-19: A Systematic Review. *International Journal of*

- Environmental Research and Public Health*, 19(19), 11931.
<https://doi.org/10.3390/ijerph191911931>
- Talavera-González, J. M., & Talavera-Rojas, M. (2021). Bacteriófagos, los virus come-bacterias: Historia de dos mentes científicas. *Revista Digital Universitaria*, 22(5). <https://doi.org/10.22201/cuaieed.16076079e.2021.22.5.9>
- Tang, K. W. K., Millar, B. C., & Moore, J. E. (2023). Antimicrobial Resistance (AMR). *British Journal of Biomedical Science*, 80, 11387.
<https://doi.org/10.3389/bjbs.2023.11387>
- Tenaillon, O., Skurnik, D., Picard, B., & Denamur, E. (2010). The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 8(3), Article 3.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro2298>
- Tito, R. (2021). *Factores positivos y negativos en la gestión del proyecto “Servicio de protección y gestión del riesgo contra inundaciones del cauce del río Huatanay en distritos de la provincia de Cusco y Quispicanchi, periodo 2013 – 2018”* [Pontificia Universidad Católica del Perú].
<https://tesis.pucp.edu.pe/repositorio/handle/20.500.12404/19835>
- Turner, D., Kropinski, A. M., & Adriaenssens, E. M. (2021a). A Roadmap for Genome-Based Phage Taxonomy. *Viruses*, 13(3), 506. <https://doi.org/10.3390/v13030506>
- Turner, D., Kropinski, A. M., & Adriaenssens, E. M. (2021b). A Roadmap for Genome-Based Phage Taxonomy. *Viruses*, 13(3), Article 3.
<https://doi.org/10.3390/v13030506>
- Turner, D., Shkoporov, A. N., Lood, C., Millard, A. D., Dutilh, B. E., Alfenas-Zerbini, P., Zyl, L. J. van, Aziz, R. K., Oksanen, H. M., Poranen, M. M., Kropinski, A. M., Barylski, J., Brister, J. R., Chanisvili, N., Edwards, R. A., Enault, F., Gillis, A., Knezevic, P., Krupovic, M., ... Adriaenssens, E. M. (2023). Abolishment of

- morphology-based taxa and change to binomial species names: 2022 taxonomy update of the ICTV bacterial viruses subcommittee. *Archives of Virology*, 168(2). <https://doi.org/10.1007/s00705-022-05694-2>
- Ullah, A., Qamash, T., Khan, F. A., Sultan, A., Ahmad, S., Abbas, M., Khattak, M. a. K., Begum, N., Din, S. U., Jamil, J., & Kalsoom. (2021). Characterization of a Coliphage AS1 isolated from sewage effluent in Pakistan. *Brazilian Journal of Biology*, 82, e240943. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.240943>
- Walker, P. J., Siddell, S. G., Lefkowitz, E. J., Mushegian, A. R., Adriaenssens, E. M., Alfenas-Zerbini, P., Dempsey, D. M., Dutilh, B. E., García, M. L., Hendrickson, R. C., Junglen, S., Krupovic, M., Kuhn, J. H., Lambert, A. J., Łobocka, M., Oksanen, H. M., Orton, R. J., Robertson, D. L., Rubino, L., ... Zerbini, F. M. (2022). Recent changes to virus taxonomy ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2022). *Archives of virology*, 167(11), 2429-2440. <https://doi.org/10.1007/s00705-022-05516-5>
- Wang, J., Ma, W., & Wang, X. (2021). Insights into the structure of Escherichia coli outer membrane as the target for engineering microbial cell factories. *Microbial Cell Factories*, 20, 73. <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01565-8>
- Węgrzyn, G. (2022). Should Bacteriophages Be Classified As Parasites Or Predators? *Polish Journal of Microbiology*, 71(1), Article 1. <https://doi.org/10.33073/pjm-2022-005>
- Young, R. (2013). Phage lysis: Do we have the hole story yet? *Current opinion in microbiology*, 16(6), Article 6. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2013.08.008>
- Żaczek, M., Górski, A., Weber-Dąbrowska, B., Letkiewicz, S., Fortuna, W., Rogóż, P., Pasternak, E., & Międzybrodzki, R. (2022). A Thorough Synthesis of Phage

Therapy Unit Activity in Poland—Its History, Milestones and International Recognition. *Viruses*, 14(6), 1170. <https://doi.org/10.3390/v14061170>

Zhuang, M., Achmon, Y., Cao, Y., Liang, X., Chen, L., Wang, H., Siame, B. A., & Leung, K. Y. (2021). Distribution of antibiotic resistance genes in the environment. *Environmental Pollution*, 285, 117402. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117402>

ANEXOS

Anexo 1

Ficha técnica de información de Escherichia coli NCTC 13476



MATERIAL SAFETY DATA SHEET

Material Safety Data Sheet for:

National Collection of Type Cultures (NCTC) bacterial culture products in freeze-dried format

Review date: 14.04.2023

Issued to: Users of UKHSA NCTC freeze-dried bacterial culture products

Access: Document to be downloaded from Culture Collections website
www.culturecollections.org.uk

Culture Collections
UK Health Security Agency
Porton Down
Salisbury
SP4 0JG
UK
Telephone: +44 (0) 1980 612512
www.culturecollections.org.uk/contactus

1. Identification of the substance/mixture and of the company/undertaking

Product name: Flame-sealed glass ampoule containing 0.15g of freeze-dried bacterial culture under vacuum.

Refer to the relevant cell line data entry on the Culture Collections website:

www.culturecollections.org.uk

Contact: Culture Collections
UK Health Security Agency
Porton Down
Salisbury
SP4 0JG, UK
Telephone (working hours): +44 (0)1980 612512
Telephone (out of hours): +44 (0)1980 612100
www.culturecollections.org.uk/contactus

2. Hazards Identification

Physico-chemical hazard: Not applicable

Health hazard: Minimal risk of infection provided good laboratory practice is observed and appropriate containment facilities are used for organisms of Hazard Group 3.

Environmental hazard: Not applicable

3. Composition/information on ingredients

Flame-sealed glass ampoule containing a freeze-dried pure culture of a bacterium, of either Hazard Group 2 or 3 (Hazard Groups 2 and 3 as defined by the Advisory Committee on Dangerous Pathogens 2004 Approved List of Biological Agents <https://www.hse.gov.uk/pubns/misc208.pdf>). A Hazard Group 2 organism may cause human disease and may be a hazard to laboratory workers, but is unlikely to spread to the community, whereas a Hazard Group 3 organism may cause human disease and be a hazard to laboratory workers as well as being likely to spread to the community. The organism is held within a cryoprotectant to prevent damage to the microbial cells during the freeze-drying process; the cryoprotectant is not classified as dangerous material.

4. First aid measures

If accidental contact with material occurs, laboratory staff must follow local first aid procedures that are normally applied following exposure to such material. In the case of an organism of Hazard Group 3, appropriate medical advice should be sought and suitable prophylaxis considered.

5. Fire-fighting measures

Not applicable

6. Accidental release measures

Local risk assessments should be in place prior to purchasing and handling NCTC glass ampoules. As a guide: wear suitable gloves, pick up the ampoule with absorbent material moistened with a suitable disinfectant and discard in appropriate receptacle. Wipe area with a similarly moistened pad of absorbent material and subsequently sterilise all paper and the ampoule. In the case of a Hazard Group 3 organism, sterilisation of the safety cabinet may be appropriate.

7. Handling and storage

Store at 4 - 10°C prior to opening. Ampoule cultures must be processed in a laboratory environment which, as defined by national regulations or guidelines, is suitable for the handling of microorganisms of ACDP Hazard Group 2 or 3, as appropriate. Staff handling the material should have been trained in the handling of infectious biological material. The material should be treated with the same degree of care as would be exercised with routine samples. Hand-to-mouth contact should be avoided whilst working with the samples and normal hand-washing procedures relating to the handling of routine samples must be observed also with ampoule cultures.

8. Exposure controls / personal protection

Use good laboratory practice and wear appropriate laboratory coats, protective eye wear and gloves. Reconstitution procedures should be handled in a microbiology safety cabinet conforming to EN12469:2000 *Biotechnology – Performance criteria for microbiological safety cabinets*.

9. Physical and chemical properties

Inert odourless dry material.

10. Stability and reactivity

Long term storage will not increase the risks of infection associated with handling the material.

11. Toxicological information

Not applicable

12. Ecological information

Not applicable

13. Disposal considerations

The used material must be disposed of using an autoclave as for routine samples containing infectious microorganisms and in accordance with all local and national regulations.

14. Transport information



Refer to the IATA and ADR Dangerous Goods Regulations for the transport of Infectious substances – Division 6.2. Bacteria will either be Category A (UN2814 – Infectious substance, affecting humans or UN2900 – Infectious substance, affecting animals) or Category B (UN3373 – Biological substance Category B) as appropriate.

15. Regulatory information

EC	Biological agent hazard group 2
EC	Biological agent hazard group 3

Note that this safety data sheet does not constitute the user's own assessments of workplace risk as required by Health and Safety legislation.

16. Other information

For further safety information concerning this product, customers are advised to read the instruction sheet accompanying the ampoule cultures.

In the event of an accident involving exposure of staff to the products contact the Culture Collections (+44 (0) 1980 612512) during normal UK working hours. the UKHSA Porton Duty Officer (+44 (0) 1980 612100) should be contacted out of hours.

For further safety information concerning this product, users are advised to read the instruction sheets available from the website: www.culturecollections.org.uk

Anexo 2

Ficha técnica de información de *Escherichia coli* ATCC 35218



Escherichia coli (Migula) Castellani and Chalmers

35218™

Product Sheet

Description

Escherichia coli strain 1532 was isolated from a canine in Tennessee. This whole-genome sequenced strain can be used in susceptibility disc testing or as a quality control strain.

Strain designation: 1532

Deposited As: *Escherichia coli* (Migula) Castellani and Chalmers

Type strain: No

Toxin genes: *stx1* (Shiga toxin 1) negative; *stx2* (Shiga toxin 2) negative

Storage Conditions

Product format: Freeze-dried

Storage conditions: 2°C to 8°C

Intended Use

This product is intended for laboratory research use only. It is not intended for any animal or human therapeutic use, any human or animal consumption, or any diagnostic use.

BSL 1

ATCC determines the biosafety level of a material based on our risk assessment as guided by the current edition of *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL)*, U.S. Department of Health and Human Services. It is your responsibility to understand the hazards associated with the material per your organization's policies



ATCC® | Credible leads to Incredible®

www.atcc.org

Page 1 of 5

***Escherichia coli* (Migula) Castellani and Chalmers**
35218

Product Sheet

and procedures as well as any other applicable regulations as enforced by your local or national agencies.

ATCC highly recommends that appropriate personal protective equipment is always used when handling vials. For cultures that require storage in liquid nitrogen, it is important to note that some vials may leak when submersed in liquid nitrogen and will slowly fill with liquid nitrogen. Upon thawing, the conversion of the liquid nitrogen back to its gas phase may result in the vial exploding or blowing off its cap with dangerous force creating flying debris. Unless necessary, ATCC recommends that these cultures be stored in the vapor phase of liquid nitrogen rather than submersed in liquid nitrogen.

Certificate of Analysis

For batch-specific test results, refer to the applicable certificate of analysis that can be found at www.atcc.org.

Growth Conditions

Medium:

ATCC Medium 2853: Nutrient Agar/Broth with 100 mcg/ml Ampicillin

Temperature: 37°C

Atmosphere: Aerobic

Handling Procedures

1. Open vial.
2. Rehydrate the entire pellet with approximately 0.5 mL of # 2853 broth.

***Escherichia coli* (Migula) Castellani and Chalmers**

35218

Product Sheet

Aseptically transfer the entire contents to a 5-6 mL tube of # 2853 broth.

Additional test tubes can be inoculated by transferring 0.5 mL of the primary broth tube to these secondary tubes.

3. Use several drops of the primary broth tube to inoculate a # 2853 plate and/or #2853 agar slant.

4. Incubate at 37°C for 24 hours.

Notes

Additional information on this culture is available on the ATCC® web site at www.atcc.org.

Material Citation

If use of this material results in a scientific publication, please cite the material in the following manner: *Escherichia coli* (Migula) Castellani and Chalmers (ATCC 35218)

References

References and other information relating to this material are available at www.atcc.org.

Warranty

The product is provided 'AS IS' and the viability of ATCC® products is warranted for 30 days from the date of shipment, provided that the customer has stored and handled the product according to the information included on the product information sheet, website, and Certificate of Analysis. For living cultures, ATCC lists the media formulation and reagents that have been found to be effective for the product. While other unspecified media and reagents may also produce satisfactory results, a change in the ATCC and/or depositor-recommended protocols may affect the

***Escherichia coli* (Migula) Castellani and Chalmers**

35218

Product Sheet

recovery, growth, and/or function of the product. If an alternative medium formulation or reagent is used, the ATCC warranty for viability is no longer valid. Except as expressly set forth herein, no other warranties of any kind are provided, express or implied, including, but not limited to, any implied warranties of merchantability, fitness for a particular purpose, manufacture according to cGMP standards, typicality, safety, accuracy, and/or noninfringement.

Disclaimers

This product is intended for laboratory research use only. It is not intended for any animal or human therapeutic use, any human or animal consumption, or any diagnostic use. Any proposed commercial use is prohibited without a license from ATCC.

While ATCC uses reasonable efforts to include accurate and up-to-date information on this product sheet, ATCC makes no warranties or representations as to its accuracy. Citations from scientific literature and patents are provided for informational purposes only. ATCC does not warrant that such information has been confirmed to be accurate or complete and the customer bears the sole responsibility of confirming the accuracy and completeness of any such information.

This product is sent on the condition that the customer is responsible for and assumes all risk and responsibility in connection with the receipt, handling, storage, disposal, and use of the ATCC product including without limitation taking all appropriate safety and handling precautions to minimize health or environmental risk. As a condition of receiving the material, the customer agrees that any activity undertaken with the ATCC product and any progeny or modifications will be conducted in compliance with all applicable laws, regulations, and guidelines. This product is provided 'AS IS' with no representations or warranties whatsoever except as expressly set forth herein and in no event shall ATCC, its parents, subsidiaries, directors, officers, agents, employees, assigns, successors, and affiliates be liable for indirect, special, incidental, or consequential damages of any kind in connection with or arising out of the customer's use of the product. While reasonable effort is made to ensure authenticity and reliability of materials on deposit, ATCC is not liable for damages arising from the misidentification or misrepresentation of such materials.

***Escherichia coli* (Migula) Castellani and Chalmers**
35218

Product Sheet

Please see the material transfer agreement (MTA) for further details regarding the use of this product. The MTA is available at www.atcc.org.

Copyright and Trademark Information

© ATCC 2023. All rights reserved.

ATCC is a registered trademark of the American Type Culture Collection.

Revision

This information on this document was last updated on 2023-07-15

Contact Information

ATCC

10801 University Boulevard

Manassas, VA 20110-2209

USA

US telephone: 800-638-6597

Worldwide telephone: +1-703-365-2700

Email: tech@atcc.org or contact your local distributor

Anexo 3

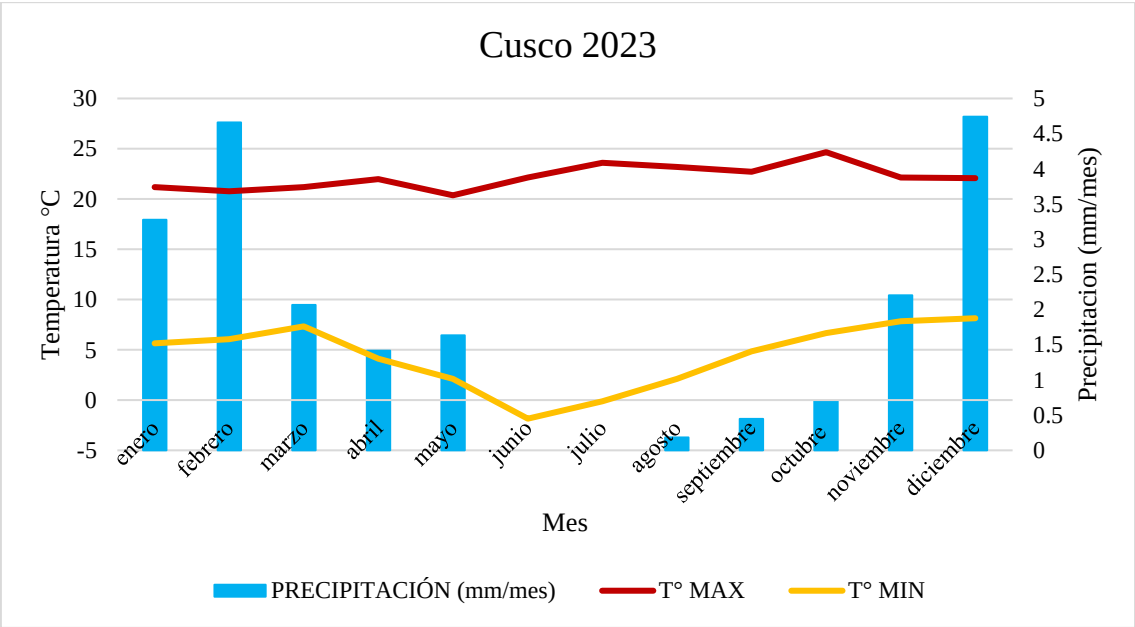
Datos meteorológicos del año 2023

AÑO / MES / DÍA	TEMPERATURA (°C)		HUMEDAD RELATIVA (%)	PRECIPITACIÓN (mm/mes)
	T° MAX	T° MIN		TOTAL
Enero	21.1785714	5.645161	72.6333333	3.275
Febrero	20.7785714	6.064286	76.1821429	4.6571429
Marzo	21.1733333	7.322581	77.3866667	2.0666667
Abril	21.975	4.126667	74.5444444	1.4142857
Mayo	20.3678571	2.116129	74.5821429	1.6357143
Junio	22.1258065	-1.848387	71.9322581	0
Julio	23.6	-0.125806	68.1548387	0
Agosto	23.1774194	2.122581	70.7645161	0.183871
Septiembre	22.7258065	4.86129	69.8612903	0.4466667
Octubre	24.659375	6.671875	71.221875	0.7032258
Noviembre	22.1259259	7.835484	73.6851852	2.2038462
Diciembre	22.0677419	8.141935	76.7266667	4.7419355

Fuente: Extraído de <https://www.senamhi.gob.pe/main.php?dp=cusco&p=estaciones>

Figura 48

Climatodiagrama del año 2023



Fuente: Extraído de <https://www.senamhi.gob.pe/main.php?dp=cusco&p=estaciones>

Anexo 4

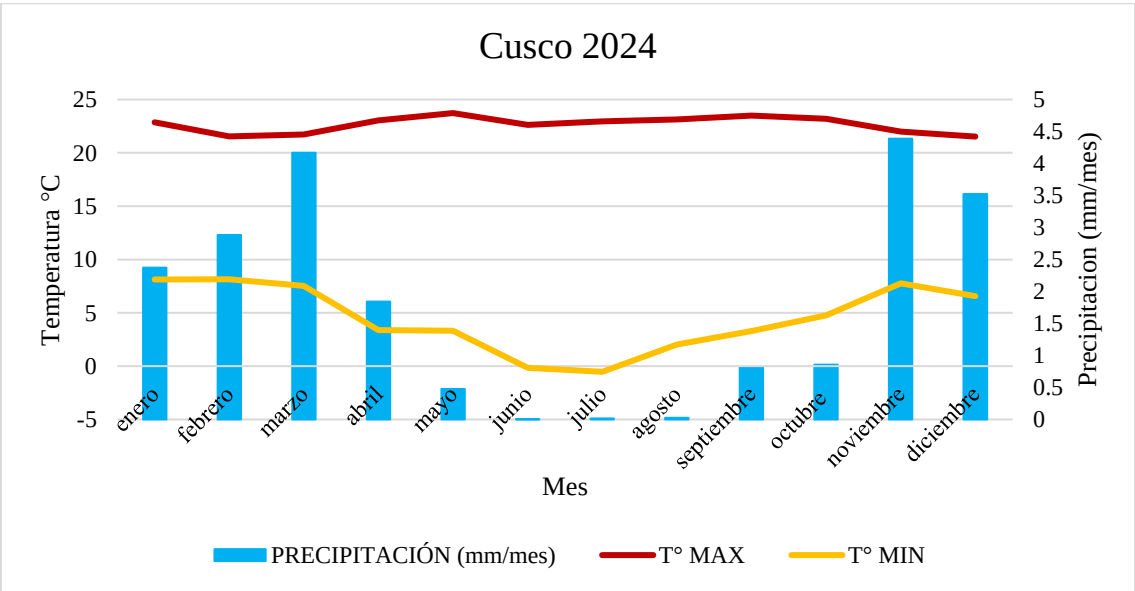
Datos meteorológicos del año 2024

AÑO / MES / DÍA	TEMPERATURA (°C)		HUMEDAD RELATIVA (%)	PRECIPITACIÓN (mm/mes)
	T° MAX	T° MIN		TOTAL
Enero	22.8612903	8.132258	75.9419355	2.3741935
Febrero	21.5482759	8.144828	78.9931035	2.8827586
Marzo	21.7258065	7.512903	77.7225807	4.1709677
Abril	23.0483871	3.393548	75.6741936	1.84
Mayo	23.7290323	3.332258	73.2193548	0.4774194
Junio	22.6333333	-0.148387	68.94	0.0034483
Julio	22.9612903	-0.529032	65.2516129	0.016129
Agosto	23.1225807	2.045161	63.6870968	0.0258065
Septiembre	23.5033333	3.283333	63.6033333	0.8133333
Octubre	23.2064516	4.777419	60.9258065	0.8580645
Noviembre	22	7.75	69.8366667	4.3866667
Diciembre	21.5258065	6.564516	70.6096774	3.5225806

Fuente: Extraído de <https://www.senamhi.gob.pe/main.php?dp=cusco&p=estaciones>

Figura 49

Climatodiagrama del año 2024



Fuente: Extraído de <https://www.senamhi.gob.pe/main.php?dp=cusco&p=estaciones>

Anexo 5

Pruebas estadísticas para la comparación de los bacteriófagos aislados en época de lluvias (mes de marzo 2024) y época de secas (mes de agosto 2023)

Considerando la prueba de normalidad de Shapiro Wilk ($n < 30$) donde $\text{sig} < 0.05$ se considera que no existe normalidad en los datos analizados, por consiguiente, se usa la prueba no paramétrica de Rangos de Wilcoxon para comparar el total de bacteriófagos en época de seca y de lluvia.

Tabla 24

Prueba de Normalidad de Shapiro-Wilk

	Estadístico	gl	Sig.
NCTC 13476	,580	12	,000
ATCC 35218 Lluvia	,327	12	,000
Total	,552	12	,000
ATCC 35218 Secas	,592	12	,000

Tabla 25

Prueba no paramétrica de Rangos de Wilcoxon

<i>Escherichia coli</i>			
	ATCC35218 (Secas)	ATCC35218 (Secas)	
	NCTC13476	NCTC13476	ATCC35218 (Secas)
	(Lluvia)	(Lluvia)	Total (Lluvia)
Z	-,482 ^b	-2,801 ^b	-,482 ^b
Sig. asintótica(bilateral)	,630	,005	,630

a. Prueba de rangos con signo de Wilcoxon

b. Se basa en rangos negativos.

De la tabla se observa que la presencia de bacteriófagos (virus) de *Escherichia coli* ATCC 35218 en época de secas no presenta diferencias significativas respecto a NCTC 13476 en época de lluvias ($\text{sig} = 0.630 > 0.05$), al 95% de confiabilidad.

La presencia de bacteriófagos (virus) *Escherichia coli* ATCC 35218 en época de secas si presenta diferencias significativas respecto a NCTC 35218 en época de lluvias ($\text{sig} = 0.005 < 0.05$), al 95% de confiabilidad.

La presencia de bacteriófagos (virus) *Escherichia coli* ATCC 35218 en época de secas no presenta diferencias significativas respecto al Total en época de lluvias ($\text{sig} = 0.630 > 0.05$), al 95% de confiabilidad.

Anexo 6

Tabla 26

Rango de hospedero de los 34 bacteriófagos líticos frente a cepas de Escherichia coli multidrogo resistentes (MDR)

	BACTERIOFAGOS LITICOS																																	
Cepas de <i>E.coli</i> (MDR)	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12	F13	F14	F15	F16	F17	F18	F19	F20	F21	F22	F23	F24	F25	F26	F27	F28	F29	F30	F31	F32	F33	F34
ES 004	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ES 007	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ES 009	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ES 015	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ES 024	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ES 026	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ES 028	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ES 029	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ES 032	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
ES 049	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ES 088	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ES 089	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ES 098	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ES 106	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ES 110	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
ES 162	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ES 199	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ES 203	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ES 217	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ES 220	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
ES 236	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ES 244	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
ES 246	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-

	BACTERIOFAGOS LITICOS																																	
Cepas de <i>E.coli</i> (MDR)	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12	F13	F14	F15	F16	F17	F18	F19	F20	F21	F22	F23	F24	F25	F26	F27	F28	F29	F30	F31	F32	F33	F34
ES 253	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ES 255	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ES 256	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
ES 259	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ES 264	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ES 267	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+
ES 277	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HR 219	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HR 223	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HR 228	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HR 230	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
HR 248	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HR 251	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
HR 258	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HR 259	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HR 275	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HR 278	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HR 281	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HR 286	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HR 287	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HR 296	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
E. coli NCTC 13476	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E. coli ATCC 35218	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
E. coli ATCC 13353	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
E. coli CITBM	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Nota: F (bacteriófago), 1-34 (número de bacteriófago), *E.coli* (*Escherichia coli*), ES (ESSALUD Hospital Adolfo Guevara Velasco), HR (Hospital Regional), + (Lisis positiva) y - (Lisis negativa)

Anexo 7

Pruebas estadísticas para la comparación de la actividad lítica de los 34 bacteriófagos frente a los hospederos *Escherichia coli* NCTC 13476 y *Escherichia coli* ATCC 35218

Tabla 27

Tabla cruzada de los hospederos *Escherichia coli* NCTC 13476 y *Escherichia coli* ATCC 35218 mediante la actividad lítica de los 34 bacteriófagos.

		Actividad Lítica		
		Negativa	Positiva	Total
Hospedero	<i>Escherichia coli</i> NCTC	N	18	34
	13476	%	90,0%	50,0%
	<i>Escherichia coli</i> ATCC	N	2	34
	35218	%	10,0%	50,0%
Total		N	20	68
		%	100,0%	100,0%

Ho: No hay diferencias significativas entre la actividad lítica de los 34 bacteriófagos (virus) contra *Escherichia coli* NCTC 13476 o *Escherichia coli* ATCC 35218.

H1: Hay diferencias significativas entre la actividad lítica de los 34 bacteriófagos (virus) contra *Escherichia coli* NCTC 13476 o *Escherichia coli* ATCC 35218.

Tabla 28

Pruebas estadística de chi-cuadrado

	Valor	df	Significación asintótica (bilateral)	Significación exacta (bilateral)	Significación exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	18,133 ^a	1	,000		
Corrección de continuidad ^b	15,938	1	,000		
Razón de verosimilitud	20,159	1	,000		
Prueba exacta de Fisher				,000	,000
Asociación lineal por lineal	17,867	1	,000		
N de casos válidos	68				

a. 0 casillas (0,0%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es 10,00.

b. Sólo se ha calculado para una tabla 2x2

De acuerdo a la prueba Chi cuadrado se puede afirmar que hay diferencias significativas entre la actividad lítica de los 34 bacteriófagos (virus) contra *Escherichia coli* NCTC 13476 o *Escherichia coli* ATCC 35218 (sig = 0.000 < 0.05).

Anexo 8

Fotografías de muestreo y procesamiento

Figura 50

Fotografías de muestreo de aguas de la cuenca del rio Huatanay



Nota: (a) muestreo realizado en el Puente Condebambilla, (b) muestreo realizado en Oropesa y (c) muestreo realizado en Coviduc.

Figura 51

Fotografías de filtrado de aguas obtenidas de la cuenca del rio Huatanay



Nota: (a) y (b) filtrado de las muestras de agua de la cuenca del Rio Huatanay por medio de la bomba al vacío

Figura 52

Fotografía del enriquecimiento de aguas de la cuenca del rio Huatanay



Figura 53

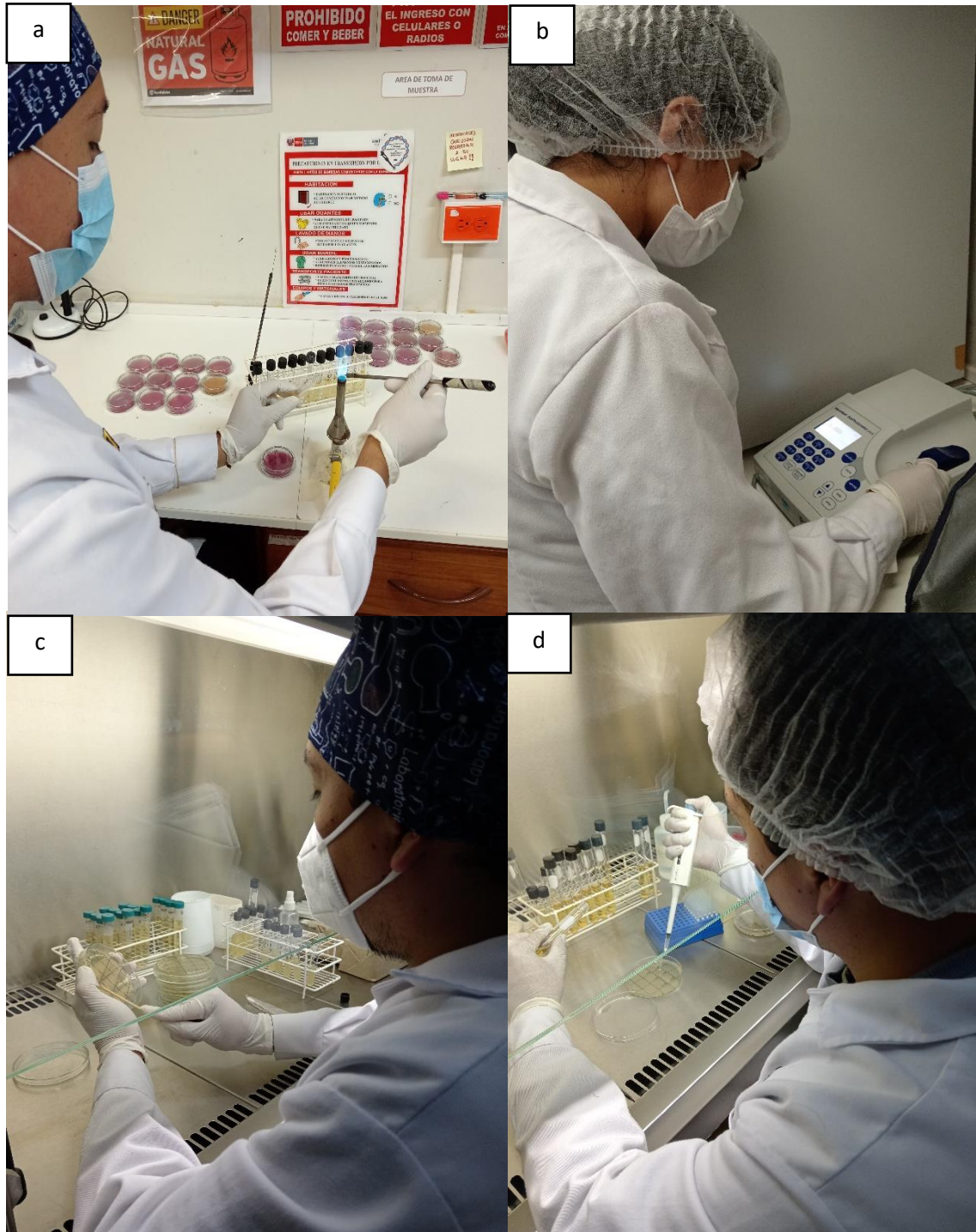
Fotografías del procesamiento por el método de bicapa de agar para el aislamiento de bacteriófagos



Nota: (a) realización de diluciones seriadas, (b) incorporación de agar TSA al 50% en tubos que contiene bacteriófagos más bacterias, (c) plaqueo de las muestras por la técnica de la bicapa de agar y (d) incubación de las placas (bicapas de agar) en horno Pasteur

Figura 54

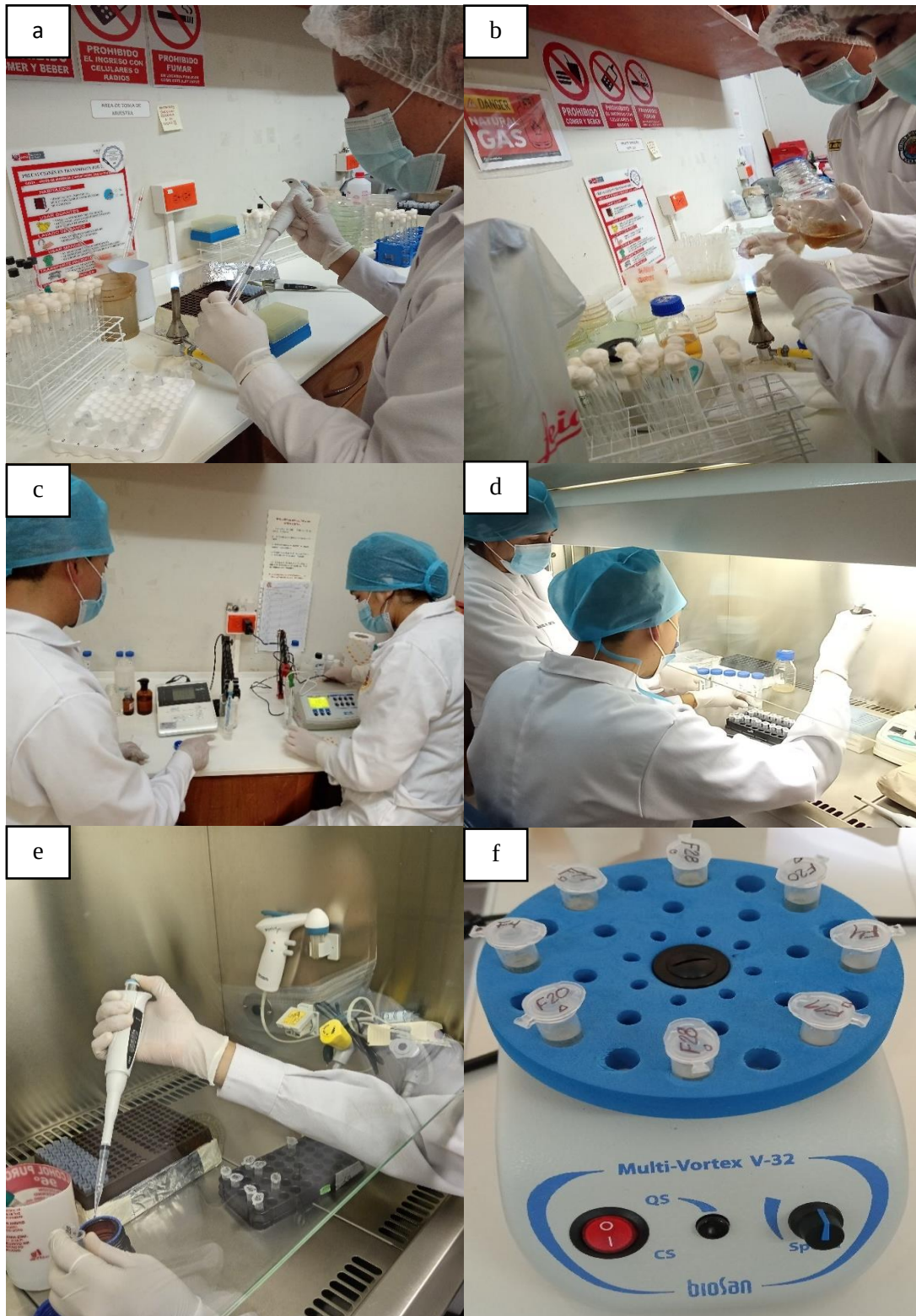
Fotografías de procesamiento de rango de hospedero de bacteriófagos



Nota: (a) sembrado de muestras de cepas de *Escherichia coli* para comprobar la pureza, (b) lectura en espectrofotómetro para medir la absorbancia (OD_{600}) de las cepas bacterianas para realizar la prueba en zona (spot test), (c) siembra en agar TSA y (d) técnica de la prueba en zona (spot test)

Figura 55

Fotografías de procedimientos de caracterización físico química de los bacteriófagos



Nota: (a) realización de diluciones seriadas, (b) incorporación de agar TSA al 50% en tubos que contiene bacteriófagos más bacterias, (c) medición del pH de PBS en potenciómetro, (d) alícuotas de bacteriófagos en tubos de microcentrifuga estériles, (e) adición de cloroformo a tubos de microcentrifuga que contienen al bacteriófago en estudio, (f) tubos de microcentrifuga que contienen cloroformo mas bacteriófago en vortex para ser homogenizados durante 1 hora

Anexo 9

Secuencia de nucleótidos del material genético del bacteriófago HEc4I

TGAATGGTACTCTTGCCAGCTCACAACTGAATGCATGGATAGCTGGTCATCAG
ATCCTTGCTGGCAAGAAGTATTTTAACGACAACAACGGCATGTGTGCGGTAG
GGATAACAGGTCTGGGTGAACAACTATAGACATTGTTATCGAGATTTACACA
CCGTGGTCAACGTCTAGCGTGACAGGTGTCACAATCTCCTGTCCCACTGTGA
TCGTTAGTCGTTCTAACTCAAGCTTCCAGGGACCTTGGAACGAGTCTCACAA
CTAACCTTTAAAGCCCCGCTTCGGCGGGGTTTATTTTTATGCTCAGATTGACTA
TTGTTACAAAATTTGGTAAAATACCTTGTAAGAGATTTTCATACCGGAGGAGTG
ACGTGGCTAAGTATGGATTGACAGAGGCTGGTTTCGTTATACCAACCCTAAAT
GACCTAATCGTTGAACTAAGCAAAGCCTGATCCGTGCTTTTGGCGAAAACCT
TCAACGTACAGAGTAACTCCGTTGCAGATAAGCTGACCACTATCTTCAACGA
GCGAGAGTATCAACTTATTCTTATGGCAGCATCTGTATACGCATCACAGACGC
TGTATGGGGCAGAAGGTATTTACCTAGATGAGCTTCTTGGAAGACAGGGTATT
TACCGAAGAGGCCGTTCTAAATCATCAGGTACCTGCCAGTTGACAATCAACA
CAACTGTGCCGTACAATATGATTTATGATTCCAAAACCTTATACGCTGGACAGT
GGCAACTTTGTTCTTAGCAACGATGTGCAAGTAGCAGGGAATCTTATTGCTCA
CAGAATAAATGCTCCAGACCTAAGGATTGGTAAATACAACCTTTCAAATTACCA
ACCAGACAGACGGAAGTATTAACAAAAGTCTGGTTTTAACAGATAAGTC
TCTGGACTCTTCTGATTTGCCAAGCTTTTACGGAGAGATTAAGCAATTCATTG
TCGATAATACAACCCTGTTGAACGACGATTTGATTCAGATCGATATGTTGACA
GGAACGTTGTGGATAGGGTACAATTCGAATCTTGATCAAGTTGGACTTAATAG
TAGAGTA.....AGATGCTGAATTCAAAAGACAGAACTTATAAAGAGC
TGATGAGCACTTTGGATTCCTCTATTGAAGAGGTTGAAAATCGTGTCACAGA
ACTTAACAGGTACATGGATGGTAGGGTAGATGAGGCATTCCAGCAACTTGGA
GACAGAATAGGTGCGGTAGTTACAGAGACAACCTCAGAAGTTTGAGGATGTC
AATGGCAATATCACAGCGCTGGATAGGAACTTGTTGCTGCACAGAACAAGT
TCACCAACGATCTGAACACTGAAAGTGGAAGATTGGCATCCCTGATTGAGAC
AACCAATAAAGCAACTACTGATCTTCTGAACAAAAGACAGAGGCTTTAGAT
GAGAAATTGGTTGCCGCCAAAGGTGAGCTGGTAGAGCAGATAGGGGGAGTT
GAGAGCGGGTATTTAGCCGGAGATAAACTCTGGATGGCAAGATCAATACTC
AGAGAACAGAGCTTGACGCAAGCATCTTGAGCACTAACCAGGCCACTGTGG
ATCTTTTGAACAGGACATCTGAACTCTGGATCAAAAGATTAGTCAGACAAA
CGCGACGGTATCTAAAACTATACCACCCTTGACGGCAAGATAACCGCCGCA
AAAACCTGACCTCAACACCTTGATTGCCAATACCAACAAGGCCACCACGGACT
TGTTGAATCAGAAAACATCTGCACTGTCAGAGCAGATAACTTCTGCACGTGG
GGAGATTTCTACCAACAAGCAAGCGATTGATGCTTTGGATGGAAAACCTGACT
TCCACAAAAACAGCGCTGGATGCTACAATTTCCGATACCAACAAGCCACTG
TGGACCTTATCAACGGCACAGCGTCAGCTATTCGTCAAGAACTTGCTGTCTGC
TAAGCAGGAGATCATTGATGATGTTGGGGATGTGTCCGAGATCAGGGCTGCA
GTAGCTACAACATCTAAGGCTGTAACCGACTTAGAGGGTAAAGTAAATGCTC
AGTGGGGCACAAAATAACAGGTAGACTCCGCAGGGAATAAATATGTTGCAGG
TATTCAGTTGGGGATGGAAGGGTCTGGAGGCCAAGTTCAATCCTACTTCATG
GTTAGCGCAACAATTTTGCGGTATACAACCCTGGCAATGGAACAGCAACCC
TTGCTTTCGCAATCAAGAACAACCAAGCGTTCTTGAAAG

Anexo 10

Secuencia de nucleótidos del material genético del bacteriófago HEc5I

GTGCTAAAAATTGATAAAAACTTAACTGATTGTTGAAAACCTCTTAATAGAG
GATCATACTCAACTGGATATACGGCTCTCTTCACGGGACACTCCTGTAAAC
CCTAATAAATAAAAAAGGGGAGGGGGTTCTCCCCTCCCCTTTTTATTTATTAG
GGTTTAACAGGAGTGTCCCGTGAAGAGAGCCGTATATCCAGTTGAGTATGA
TCCTCTATTAAGAGTTTTCAACAATCAGTTAAGTTTTTATCAATTTTTAGCAC
AATATAACCCAGAAATCAATGTTGGTTTATCAGCCCTGCTGCCACCAACAG
AGTTCGTTATTGGCAGTGTTCACTATCCATGCAGAACGATTGTAGACTTCTT
CGAGAAGATTGCAAAACATACAGGCCTGCCAATTGATACTGGTATTTCAAC
TATCCGTATGGGTGTTATTCTTCTGTTCTTCACAGAAAACCTTGATGAAAGC
ACTTTAACACTGCAAAGCGGGGATGTCAATATCACACTCACTCCGTCAGTGT
TTAAAGAGGTAGATGCTGCTTTCCAAGTTTCCGTGGCAGAGGGCCATTTATG
GGACCCTGTAGGGATGCCTAAAAAAGTGACCATAAACGATGAGCAATGCAA
CATTGTTTATGAAGAAGATACCCAAACTTTACCATTGAGTGGCCTAAGAA
ACGTTCTCAGGTTGTAAATCTTGGACTGGTCTCTACGATAGCTCCACCGCCT
GAACCAGAGCCGGAGCCGCCTGTAGGTCCTACTGAACCTGGTGGTGACGGT
GAAGTTACTGTAGCAGATCCGCAAGATGTGACTGTATCATCTTCCTCATTG
TAGCCATTGAGAATAAGGATGAAATCCTTAAACAGGCCGCAGCTCTTAACA
ACGAAGATGACAAAAGTGTTTCAAAAGATGCACTCCAAACCTTCGCTAAAG
AGTACGGTGTTACCT.....TGAAGAAATCATCAAGGCCAGGTTGA
AGTTGAAAAAGCTAAAATGCTGACTAAGGCTCAAGCTTTAAGCTTTGTTGGT
GAAGAAGATCATGCAACCCTGTTGACTTCATGCTAGAAAAAGCTAACGAA
CCTATCGTAGCTATGCTGGAGAAAGCTCAAGCCAAAATTGAAGAGCTGGAA
GCAGAGGTGCATAAACTAAAGAAGAGTTTGCCACCACTGAACATGGTAAT
GATGGCGAACCTGTTGTGGATGATATTGCAAAATCCGCAGAAGAAATTCTT
GCTGAAAACGTTGCAAAAGCACTTGCTCGTGCACGTGCAGAATCTGCCAAA
TAAGACATTAACGGGGGAAATAAATGATTACCGCTCAATATTCTGATATCG
TGCTCGGCAAAGTTGATTCTAGCGATGCTGGCTACAATTTTAAAGAGATGG
AAATTACACTGACAGAGCACCATCATGCTGGTACTGTTGTAACAAAACTG
GCACTATCGCTAACGATGATGGCTCAGACGTTTATGGTGTTCTCGTAGACCG
AGCTCTGGTAAAAGATGCAGGAAAAGTTCATCTCGCTGAGCCTCTGCAAAC
AGGTCAGAAATATAAACTGGTTGTTGCAGTTCACGGTGTTACCTTTGCAAAA
GATAAGCTGCTGGGGTCTAACGGTGAAGCAGCTAAGCAGGCTGTTCTTGAA
AAGCTGGAAGCTCTGGGTAAACAAAGTTCACGTCCAGACTCTTGGTGAAGAG
TAAGCCCTAAATTGTTCTGGGAAAATATTTAAGTTTTACTTTGGAGAAATAAA
TGATTACTCGTAAAGATGAATTTGGCATTGTCGATTTAGGTGCTACTCTGGA
CCTTGTTCCGCGTCAATTTTCGCCTGATTACCGGTATGGATCTGTTCGAACT
CGTCTCGGCACCTCAACAATTGCTCAGATTGAACGTGTTGATGAAGTTGTAA
CCGACATTCCGGCACGCCGTCGTGGTGGTGAACGTAACCTACGTGGGTAGTG
AACGTGCTCAGGTTAAAAACCTGAACATCCCGTTCTTCCCTCTGGACAAAGG
CATCACCGCAGCAGATGTTTCAAGAACTTCCGTCTGTTACTTCACCCCTGATGCT
CCGAAAACCTGTTTCAAGACGTAGTAACCCGCGTTGTTTCGCCGTATCCGTGTTT
CTCATGAAGCACTGCGTGAGAAAGCACTGTTCCAGGCTATTCTTGGTAAATC
CTATGCGCCTGGTGACACAACCTGTCAGTATGACTACTACAC