



**UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**ESTUDIO DE PARÁMETROS CINÉTICOS COMO
PREDICTORES DE LA CAPACIDAD LÍTICA DE
BACTERIÓFAGOS DEL GÉNERO *FELIXOUNAVIRUS*
POR ROCÍO NICOLE BARRÓN MONTENEGRO**

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción para optar al título profesional de Magíster en ciencias mención Microbiología.

Profesor Guía

Dr. Andrés Opazo Capurro
Laboratorio de Investigación en
Agentes
Antimicrobianos (LIAA).
Facultad de Ciencias Biológicas.
Universidad de Concepción.

Profesora Co-guía

Dra. Andrea Moreno Switt
Laboratorio de Microbiología y
Parasitología.
Escuela de Medicina Veterinaria.

Pontificia Universidad Católica de
Chile.

Enero, 2021
Concepción, Chile

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento.



©2020, Rocío Barrón Montenegro

AGRADECIMIENTOS

Agradecer a los proyectos que hicieron posible el desarrollo de este trabajo y lo financiaron, adjudicados por la Dra. Andrea Moreno, FONDEF Idea ID18|10235 “FageCapsuleS, bacteriófagos de *Salmonella* microencapsulados con tecnología de liberación en intestino grueso y delgado” y Fondecyt 1181167 “Coevolución de *Salmonella*-bacteriofagos, sus modificaciones genéticas durante los ciclos de vida de *Salmonella* en agua, suelo y su ambiente”.



1. ÍNDICE

1. ÍNDICE.....	1
2. ÍNDICE DE ILUSTRACIONES	3
3. ÍNDICE DE TABLAS.....	4
4. ANEXOS.....	5
5. RESUMEN.....	6
6. ABSTRACT.....	8
7. INTRODUCCIÓN.....	10
Género <i>Salmonella</i> spp.....	10
Bacteriófagos	18
Bacteriófagos del género <i>Felixounavirus</i>.....	21
Ciclo de replicación bacteriófagos virulentos.....	24
Parámetros cinéticos asociados a bacteriófagos.....	28
Constante de adsorción (δ)	29
Periodo de latencia (L) y tasa de eclosión (β)	29
Multiplicidad de infección (MOI).....	31
Modelamiento matemático.....	33
8. Pregunta de investigación	35
9. Hipótesis.....	35
10. Objetivos.....	36
Objetivo general	36
Objetivos específicos	36
11. Materiales.....	38
Cepa bacteriana.....	38
Bacteriófagos	38
Medios de cultivo	39
Soluciones:	40

12. METODOLOGÍA.....	41
Determinación de parámetros cinéticos bacterianos.....	41
Obtención del stock de trabajo de bacteriófagos vB_Si_SF20-2 y vB_Si_35FD.	43
Determinación de la capacidad lítica bacteriófagos.....	45
13. Resultados.....	60
Determinación de los parámetros cinéticos bacterianos de cepa SI DR006.....	60
Determinación de la capacidad lítica de bacteriófago vB_Si_35FD.....	62
Determinación de los parámetros cinéticos de bacteriófagos vB_Si_35FD y vB_Si_SF20-2.....	66
14. Discusión.....	80
15. Conclusiones	92
16. Referencias.....	93
17. Anexos.....	104



2. ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

<i>Figura 1.</i>	12
<i>Figura 2.</i>	20
<i>Figura 3.</i>	27
<i>Figura 4.</i>	62
<i>Figura 5.</i>	65
<i>Figura 6.</i>	61
<i>Figura 7.</i>	69
<i>Figura 8.</i>	55
<i>Figura 9.</i>	59
<i>Figura 10.</i>	73
<i>Figura 11.</i>	77



3. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. 71



4. ANEXOS

<i>Figura suplementaria 1</i>	104
<i>Tabla suplementaria 1</i>	104
<i>Tabla suplementaria 2</i>	105



5. RESUMEN

Salmonella spp. es el principal agente causante a nivel mundial de enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs), responsable de un estimado de 155 mil muertes por año. En Chile, entre 2014 - 2018, se destaca como serovar emergente a *Salmonella* Infantis (SI). Debido a esto, es que el desarrollo de herramientas de biocontrol de este patógeno es imprescindible. Dentro de este contexto, los bacteriófagos nacen como opción, ya que son virus que infectan bacterias causando su lisis, han sido utilizados para control o para la erradicación de patógenos bacterianos, sin embargo, presentan grandes desafíos al momento de su selección. En este trabajo, se abordó la problemática de selección para su potencial uso en el biocontrol en SI. Para esto, se realizó la predicción de la capacidad lítica de los fagos vB_Si_SF20-2 y vB_Si_35FD mediante la construcción de un modelo matemático, entrenado con los parámetros cinéticos: constante de adsorción, periodo de latencia y tasa de eclosión. Los resultados demostraron que el modelo diseñado fue consistente en la predicción de la capacidad lítica de acuerdo a los datos experimentales obtenidos en esta

tesis, donde vB_Si_35FD presentó una mayor capacidad lítica, reduciendo en promedio 4,87 log(ufc/mL) los recuentos de SI en condiciones de laboratorio. Estos resultados indicarían que el fago vB_Si_35FD representaría un buen candidato para el biocontrol de SI. Si bien este modelo es un primer acercamiento, el modelo desarrollado podría reducir considerablemente los tiempos de selección de fagos.



6. ABSTRACT

Salmonella spp. is the main cause of foodborne illness worldwide, responsible for a global burden of 155 thousand deaths per year. In this sense, the serovar *Salmonella* Infantis (SI) emerged in Chile during the 2014 - 2018 period. Due to the above, the development of biocontrol interventions for this pathogen is essential. In this context, bacteriophages or phages, are viruses that infect bacteria, causing their lysis, therefore they have been used to control or to eradicate bacterial pathogens. However, there are several significant challenges in order to select them. In this work, this problem was addressed for its potential use for SI biocontrol. Specifically, we determined the prediction of the lytic capacity of two phages, vB_Si_SF20-2 and vB_Si_35FD, through a mathematical model trained with the kinetic parameters: adsorption rate, latency period and burst size. The results showed that the designed model was consistent in predicting the lytic capacity according to experimental data. These data showed that the phage vB_Si_35FD presented a higher lytic capacity, reducing in average 4.87 log(cfu/mL) the SI counts in laboratory conditions. Therefore, it would be a

good candidate for SI control. Although this is a first approach, the developed model could potentially considerably reduce the phage selection times.



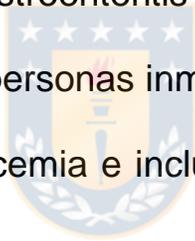
7. INTRODUCCIÓN

Género *Salmonella* spp.



El género *Salmonella* spp. corresponde al agente etiológico causante de salmonelosis, patología desarrollada en humanos y animales, la cual es transmitida principalmente por los alimentos y por contacto directo con animales contaminados, encontrándose ampliamente distribuida en el mundo. La salmonelosis es una de las principales enfermedades transmitidas por los alimentos (ETAs) y esta documentada como una de las principales causas de muerte a nivel mundial en materia de ETAs (CDC, 2019).

Los alimentos mayormente asociados a salmonelosis son de origen animal, tales como la leche, carne de pollo y huevos que se encuentran contaminados, y al no ser bien cocidos pueden causar la patología al consumirse, tal como se grafica en la Figura 1 (Eng *et al.* 2015). Además, se ha descrito la transmisión de este patógeno por comer hortalizas y frutas mal lavadas, o que han sido regadas con aguas contaminadas por heces de animales portadores del patógeno (Antunes *et al.* 2016). La salmonelosis se presenta como un cuadro de gastroenteritis autolimitado, asociado a diarrea, vómitos y dolor abdominal. En personas inmunodeprimidas y niños menores de 5 años, puede causar septicemia e incluso la muerte, además de tener



consecuencias a largo plazo, tal como producir artritis reactiva principalmente en adultos (D'Aoust *et al.* 1991; Quirós *et al.* 2007).

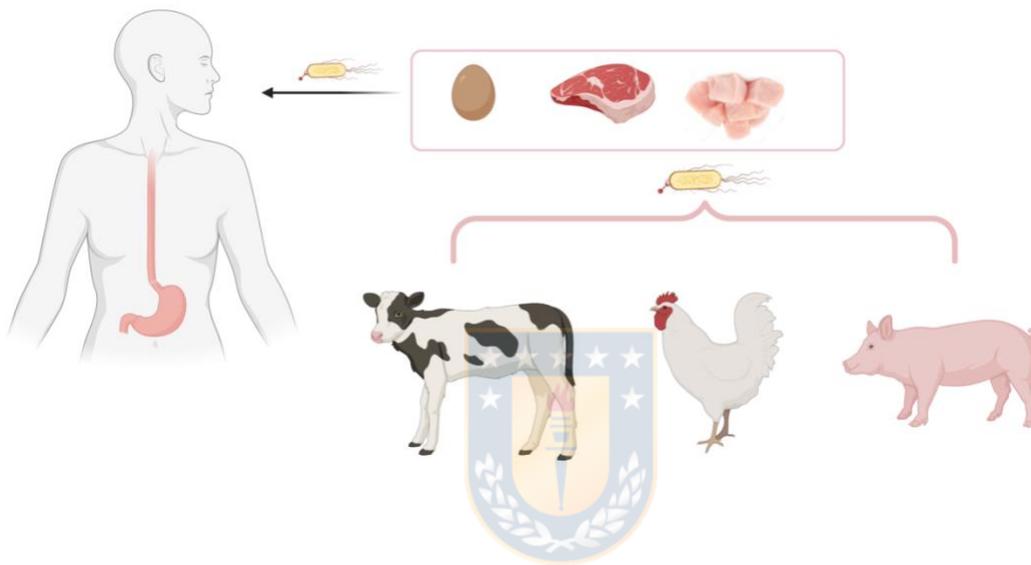


Figura 1. Transmisión de *Salmonella* spp. desde alimentos de origen animal. (Creada con BioRender.com)

Taxonómicamente, *Salmonella* spp. es un género bacteriano perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*. Hasta el momento se han descrito 2 especies: *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori*. A su vez, se definen 6 subespecies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *indica* y

houtenae. De estas subespecies, *Salmonella enterica* subespecie *enterica* es comúnmente asociada a infecciones en humanos y animales de sangre caliente (Eng *et al.* 2015). Según el esquema de White-Kauffman-Le Minor, se describen más de 2.600 serovares para las dos especies descritas, basándose en la detección de los antígenos de superficie flagelares (H), capsulares (Vi) y somáticos (O) que son determinados mediante reacciones de aglutinación (Grimmont *et al.* 2007).



A nivel mundial, *Salmonella* spp. es causante de 155 mil muertes asociadas a cuadros de diarrea por este patógeno (Besser 2018). En Chile, la epidemiología de *Salmonella* spp. es monitoreada por el Instituto de Salud Pública (ISP), siendo la salmonelosis una infección de notificación obligatoria. El último reporte corresponde al período 2014-2018, donde se aislaron 10.104 cepas de *Salmonella* spp. obtenidas de pacientes (ISP, 2019). Un dato relevante es que en el año 2018, *Salmonella* Infantis (SI) superó al número de cepas confirmadas de *Salmonella* Typhimurium, el cual se describe como uno de los principales serovares presentes en Chile.

Además, durante el período evaluado, *S. Infantis* ocupó el tercer lugar en frecuencia con un 4,1%, es decir, 419 cepas de un total de 10.104. En cuanto a los estudios de susceptibilidad a antimicrobianos reportados por el Instituto de Salud Pública (ISP) en 2019, estos se realizaron a 3.024 cepas, de las cuales 125 presentaron resistencia a los antimicrobianos testeados, destacando 108/419 cepas de *S. Infantis* productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE). Esto aporta datos importantes sobre la presencia de *Salmonella* spp. en Chile, evidenciando el aumento de *S. Infantis* (ISP, 2019).



Por otro lado, el segundo factor asociado a la salmonelosis es económico, ya que el costo de hospitalizaciones en humanos, se suma a las pérdidas económicas en la industria alimentaria y productiva asociadas a brotes de *Salmonella* spp., debido a las pérdidas en animales de producción y alimentos (Hussain *et al.* 2013). En este sentido, se estima que en Estados Unidos los costos anuales asociados a casos de salmonelosis son de US\$2.8 billones, lo que corresponde a aproximadamente \$2.472 dólares por caso

(Adhikari *et al.* 2004). En Chile, el factor económico es de gran importancia ya que la carne de ave ocupa el primer lugar en producción nacional, tanto para consumo nacional y como para exportación, industria regulada por el Servicio Agrícola Ganadero (SAG), quien estipula estrictos protocolos acorde a las regulaciones de cada país de destino (Para *et al.* 2012). Para consumo humano en Chile, los alimentos se rigen por el Reglamento Sanitario de los Alimentos, donde se indican las concentraciones bacterianas permitidas que no revisten ningún riesgo para la población (Chile, & MINSAL. 1996). Por otro lado, la Secretaría Regional Ministerial (SEREMI) de Salud de cada región, se encarga del monitoreo de patógenos transmitidos por los alimentos en las distintas matrices alimentarias y en distintas fases de su proceso de elaboración.

Los brotes de *Salmonella* spp. son estudiados con el objetivo de determinar su origen y los costos a nivel económico y de salud humana. Recientemente, desde el año 2016, la incidencia de SI ha aumentado en un 165,8% en Estados Unidos respecto a años anteriores, lo que lo convierte

en un serovar emergente (CDC, 2016). Este aumento en la incidencia de brotes de SI no está del todo clarificado, pero existen diversos estudios que reportan la presencia de un mega plásmido en los aislados de este patógeno identificado como pESI (*plasmid for emerging Salmonella Infantis*), el cual confiere un fenotipo de multidrogo-resistencia (MDR), el cual fue reportado por primera vez en Israel (Aviv *et al.* 2014), donde los autores identificaron este plásmido asociado principalmente a genes de resistencia a antimicrobianos y factores de virulencia. Posteriormente, se reportó en aislados de diferentes países, como Perú en 2017 (Silva *et al.* 2017), en Estados Unidos asociado a un brote en carne de pollo (Tate *et al.* 2017), en Hungría (Szmolka *et al.* 2018) y en Japón, el cual se asoció también a carne de pollo (Yokoyama *et al.* 2015). En Chile, la situación epidemiológica de SI ha sido poco estudiada, pero en 2020 se publicó un estudio de aislados de SI desde carne de pollo a la venta en supermercados chilenos, en el que se tomaron 361 muestras, obteniendo 87 aislados de SI, representando un 24% de positividad de las muestras, donde además se aislaron de igual modo 3 cepas de *S. Enteritidis* (Lapierre *et al.* 2020). Además, los investigadores encontraron que el 94% de los aislados presentaron el fenotipo MDR, acorde

al criterio de resistencia a 3 familias distintas de antibióticos, siendo el fenotipo más comúnmente encontrado el de resistencia a quinolonas, tetraciclinas y anfenicoles. Esto es de suma importancia, ya que es una primera evidencia del aumento de prevalencia de SI por sobre *S. Enteritidis* en carne de pollo de consumo diario en la población chilena, lo que además se asoció a un fenotipo de MDR (Lapierre *et al.* 2020). Es de acuerdo con esto, que se plantea a SI como un patógeno emergente a nivel mundial, con presencia en Chile, donde además los últimos estudios reportan aislados de SI asociados a altos niveles de resistencia a antimicrobianos, por lo que es crucial el desarrollo de herramientas de control tanto en la cadena de producción de alimentos, distribución y venta, donde los bacteriófagos surgen como una oportunidad de biocontrol (Mahony *et al.* 2011).

Bacteriófagos

El término bacteriófago fue propuesto por Félix D'Herelle y Twort, quienes los describieron por primera vez en 1917 y lo definieron como '*anti microbe*' con actividad sobre *Shigella* spp. causante de disentería (Terms *et al.* 2011). Además, D'Herelle utilizó por primera vez a los bacteriófagos como tratamiento en el Hospital *des Enfants-Malades*. (Carfora *et al.* 2018).



Los bacteriófagos (o fagos), se definen como virus que infectan bacterias, los cuales son parásitos intracelulares obligados, lo que significa que necesitan de la maquinaria de replicación bacteriana para completar su ciclo de vida (Fernandez *et al.* 2018). Los bacteriófagos corresponden a los microorganismos más abundantes de la biósfera, estimándose más de 10^{31} partículas de fagos en el planeta, donde la dinámica de infecciones fago-bacteria, a nivel global, equivale a 10^{23} infecciones por segundo, manteniendo un equilibrio dinámico entre ambas poblaciones (Suttle *et al.*

2007). Estos virus están compuestos por proteínas y material genético, donde la mayoría de los fagos presentan una cápside proteica de diversa morfología que contiene al material genético, pudiendo ser ADN simple o doble hebra o ARN (Clark, *et al.* 2006).

La taxonomía de los fagos no está definida completamente, principalmente debido a la gran diversidad genética que estos presentan, ya que poseen una alta variabilidad a nivel de secuencia, pero las proteínas estructurales son bastante conservadas en su función (Tolstoy *et al.* 2018). Actualmente, el *International Committee of Taxonomy of Viruses* (ICTV) es el organismo encargado de autorizar y organizar la clasificación taxonómica de los virus, con el objetivo de regularizar su nomenclatura y ordenamiento. Este comité clasifica a los fagos en base a su morfología y material genético. La mayoría de los fagos descritos con ADN doble hebra y cola están clasificados en el orden *Caudovirales* (Dion *et al.* 2020). Dentro de este orden se describen 5 familias: *Ackermannviridae*, *Herelleviridae*, *Siphoviridae*, *Podoviridae* y *Myoviridae*, donde los miembros de esta última familia presentan una

morfología de cápside icosaédrica y cola larga retráctil, tal como se muestra en la Figura 2 (Dion *et al.* 2020; Bertozzi *et al.* 2016). Dentro de esta familia viral, se describen diversos géneros virales, resaltando el género *Felixounavirus*.

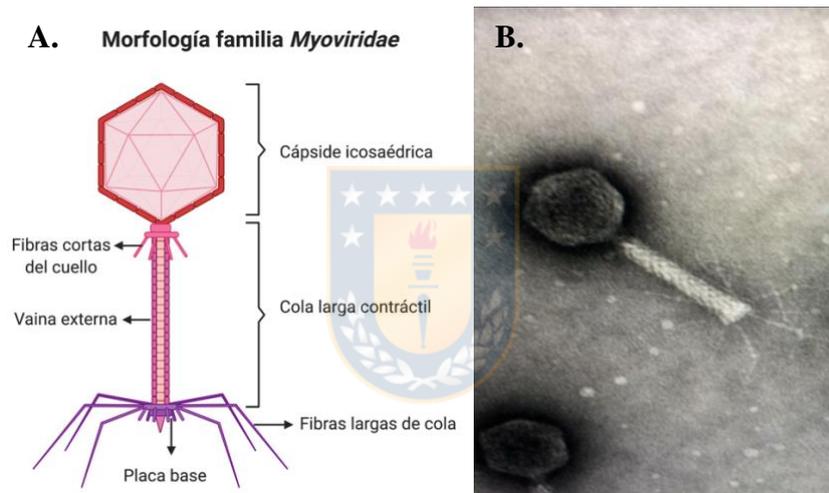


Figura 2. Morfología de fagos de la familia *Myoviridae*. En el panel **A** se muestra un esquema del fago T4, donde se observa la cápside icosaédrica, las fibras cortas del cuello, la cola que termina en la placa base y de donde emergen las fibras largas de la cola (*Creada en BioRender.com*). En el panel **B** se muestra una imagen obtenida mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) del fago vB_Si_DR094 aislado por el laboratorio de Inocuidad Alimentaria en la Universidad Andres Bello, desde heces de ganado en Isla de Pascua, Chile.

Bacteriófagos del género *Felixounavirus*

El fago *Felix O1* (también conocido como *Felix 01* o 0-1), corresponde a la “especie tipo” de los virus del género *Felixounavirus* (<https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>). *Felix O1* fue reportado por primera vez en 1943 por Félix y Callow, el cual fue utilizado para la identificación y tipificación de *Salmonella enterica* serovar Typhi (Callow *et al.* 1943). Este género, tal como se mencionó previamente, pertenece a la familia *Myoviridae*, los que se describen como estrictamente virulentos (Whichard *et al.* 2010).

Para que un bacteriófago se considere dentro de este género, acorde a la regulación del *ICTV*, la secuencia nucleotídica debe tener una identidad >60% respecto al fago *FelixO1* (Whichard *et al.* 2010). Hasta la fecha se han descrito 17 especies dentro del género *Felixounavirus* de acuerdo a la base

de datos de la ICTV (<https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>). Por otro lado, en el *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/>) se han depositado 77 genomas de fagos correspondientes a este género, de los cuales 25 son específicos del género *Salmonella*, los cuales fueron aislados de distintos países, y muestras (revisado en Enero de 2021).

En relación al proceso de infección, se ha descrito que el receptor bacteriano de los fagos del género *Felixounavirus* corresponde al lipopolisacárido (LPS) bacteriano, y recientemente se describió a la porina OmpC como otro receptor, describiendo una co-dependencia de ambos receptores para el reconocimiento del fago e infección (Dunne *et al.* 2018). Específicamente, la interacción de las fibras de la cola con el receptor de LPS ha sido por años ampliamente estudiada con el objetivo de comprender de mejor manera cómo ocurre el proceso de reconocimiento (McConnell, *et al.* 1983; Lindberg 1969; Hudson *et al.* 1978). En base a estos estudios, se logró determinar que los fagos del género *Felixounavirus*

infectan exclusivamente a bacterias Gram negativo, principalmente *Salmonella* spp. y algunas otras especies, tal como *Escherichia coli* (Welkos *et al.* 1954). El fago *Felix O1* se caracteriza por poseer un un amplio rango de hospedero, lisando el 98% de las cepas de *Salmonella* estudiadas, siendo esta característica una gran ventaja biotecnológica, ya que es capaz de infectar a un gran número de serovares de *Salmonella* spp. (Welkos *et al.* 1954). A lo largo de la historia, se ha propuesto el uso de fagos en diversas áreas de la biotecnología, donde se ha utilizado principalmente como biodetector de contaminación de *Salmonella* spp. (Kuhn *et al.* 2002; Guenther *et al.* 2012; Kuhn *et al.* 2002; Hirsh *et al.* 1983; Crane *et al.* 1984; Kuhn *et al.* 2007; Welkos *et al.* 1954). Dentro de este contexto, los fagos han sido utilizados como herramientas de biocontrol en la industria alimentaria, aplicándose directamente en los alimentos o animales de producción, ya sea individual o a modo de cóctel junto con otros fagos (Hooton *et al.* 2011; Borie, *et al.* 2011; Whichard, *et al.* 2003; Yeh, *et al.* 2017).

Ciclo de replicación bacteriófagos virulentos.

Los fagos pueden cursar 3 tipos de ciclos de replicación: el ciclo lisogénico, pseudo-lisogénico y lítico. Los fagos temperados cursan un ciclo lisogénico, en el que el material genético viral se integra al cromosoma bacteriano y los virus se replican en conjunto con la bacteria hospedera por ciclos indeterminados, hasta que bajo ciertos estímulos éstos se escinden del cromosoma, y se replican de manera independiente, causando la lisis bacteriana (Sullivan *et al.* 2017). Se describe también el ciclo o estado de pseudo-lisogenia, donde el fago detiene su replicación, independientemente de la bacteria, pudiendo retomar su ciclo y generar progenie viral. En general, este ciclo se favorece en ambientes con baja disponibilidad de nutrientes (Los *et al.* 2012; Aertsen *et al.* 2013). Por último, se encuentra el ciclo lítico que cursan los fagos virulentos, en el que el fago utiliza la maquinaria de replicación bacteriana para replicarse y causar la lisis bacteriana. En general, los 3 ciclos tienen los mismos pasos de adsorción, replicación, ensamblaje de partículas virales, empaquetamiento y liberación,

pero se diferencian en los tiempos en los que esto ocurre, ya que como se mencionó anteriormente, los fagos temperados pueden replicarse junto a la bacteria por ciclos indeterminados (Shatten *et al.* 2014).

Las principales características del ciclo lítico se muestran en la Figura 3, el cual consta de la primera fase de adsorción, en la que se identifican 3 etapas. En primero lugar, existe un contacto inicial que consta de colisiones al azar entre las fibras de la cola, que presentan una orientación aleatoria, y la bacteria hospedera, cuya movilización se encuentra principalmente determinada por el movimiento browniano, dispersión o difusión (Bertozzi *et al.* 2016; Rakhuba *et al.* 2010). Luego se produce la unión reversible, donde las fibras de la cola del virus cambian su conformación y se unen de forma reversible al receptor bacteriano, para dar finalmente paso a la unión irreversible. Se describe en ciertos fagos, que el paso de unión irreversible está determinado por la interacción de los *receptor binding protein* (RBP) del fago con estructuras presentes en la superficie bacteriana, tales como porinas o el LPS, lo que desencadena una serie de cambios

conformacionales en la estructura de la cola del fago, como la contracción de la vaina de la cola, permitiendo la inyección del material genético viral en el citoplasma bacteriano (Taylor *et al.* 2016). Por ejemplo ha sido comprado en el fago T4 (perteneciente a la familia *Myoviridae*), que una vez finalizada la etapa de adsorción, se inicia la replicación del material genético viral, utilizando la maquinaria de replicación bacteriana, se genera una alteración de la subunidad σ de la ARN polimerasa bacteriana, lo que modifica la especificidad de este complejo, reconociendo los promotores presentes en el genoma del fago (Benkovic *et al.* 2017). En seguida, comienza la transcripción y posterior traducción de las proteínas virales, las que se ordenan en i) proteínas de etapa temprana, involucradas en la replicación viral, ii) las proteínas de etapa media, involucradas en la maduración y ensamblaje de las partículas virales y iii) las proteínas de etapa tardía, donde se encuentran las endolisinas y holinas, responsables de la lisis bacteriana (Wong *et al.* 2017). El mecanismo de lisis bacteriana ocurre por una oligomerización de las holinas, que forman un poro en la membrana interna, el cual permite el paso de la endolisina acumulada en el citoplasma bacteriano, que presenta actividad muramidasa, por lo que cataliza la

hidrólisis de las uniones β -1,4 entre los residuos de ácido N-acetilmurámico y N-acetil-D-glucosamina del peptidoglicano, causando un desequilibrio osmótico que se traduce en la lisis de la bacteria y posterior liberación de la progenie viral (Young *et al.* 1995).

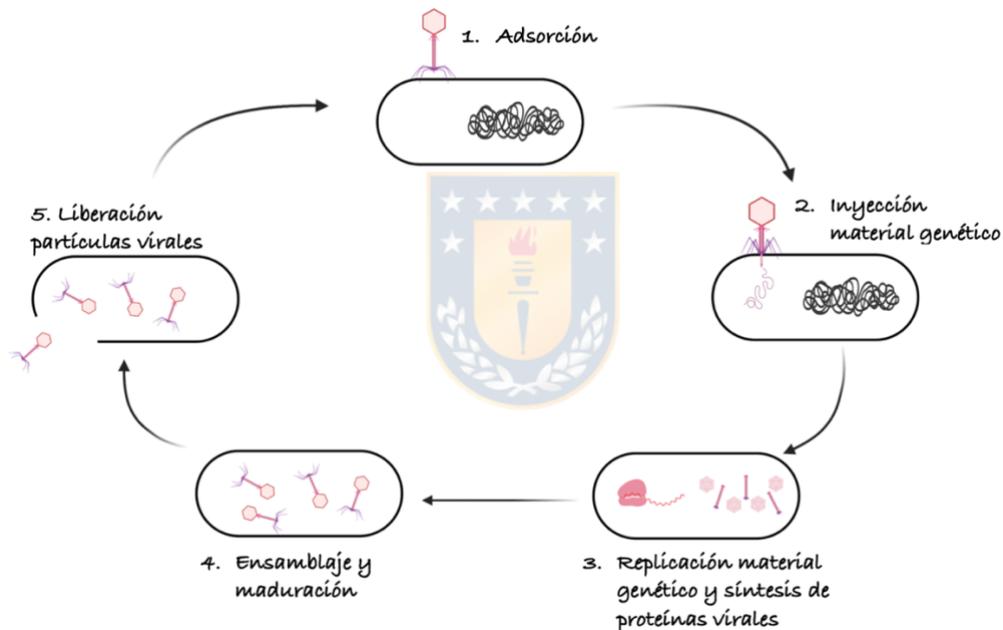


Figura 3.

Representación del ciclo lítico de bacteriófagos. Se esquematizan la fase de adsorción (1), luego la inyección del material genético viral en el interior de la bacteria (2), la replicación y síntesis de proteínas (3), el ensamblaje y maduración de las partículas virales (4) y finalmente la liberación de las partículas virales mediante la lisis bacteriana (5) (Figura creada en *BioRender.com*).

Parámetros cinéticos asociados a bacteriófagos

Como se explicó la sección anterior, el ciclo de vida de los fagos consta de principalmente 3 pasos: adsorción, replicación y síntesis de proteínas y finalmente la liberación de partículas virales (Figura 3). Experimentalmente, se pueden cuantificar ciertos parámetros asociados a este ciclo, tales como la constante de adsorción, período de latencia y tasa de eclosión. Diversos autores han descrito la determinación de estos parámetros; sin embargo, al momento de asignarles una nomenclatura se observa una variedad en la simbología asociada a cada uno de ellos, como por ejemplo Bereta *et al* 1998, quienes denominan la constante de adsorción por “K”. Sin embargo, para efectos de este trabajo de tesis, la nomenclatura se guiará por lo propuesto por García *et al* 2019, donde se propone el uso de letras griegas, en el que la constante de adsorción se identifica con δ , la tasa de eclosión con β y el periodo de latencia como **L**.

Constante de adsorción (δ)

Mediante la constante de adsorción (δ), es posible cuantificar el proceso de adsorción irreversible del fago a la bacteria en un medio de cultivo en función al tiempo, por lo que se expresa en (cel·mL/min). Específicamente, se cuantifica el fago libre en el medio contrarestándolo al inóculo inicial adicionado (Clokier *et al.* 2009). Este parámetro es específico para cada especie bacteriana, es decir, influyen el tamaño bacteriano y los receptores expresados al momento de la interacción con el fago (Costa *et al.* 2019).

Periodo de latencia (L) y tasa de eclosión (β)

Durante el ciclo de replicación se reconocen distintos parámetros que se analizan para entender este proceso en una bacteria hospedadora durante la infección (Shao *et al.* 2008). Usualmente los parámetros

cuantificables corresponden a la ya descrita constante de adsorción (δ), además del tiempo de latencia (L) y tasa de eclosión (β). “ L ” es el tiempo que transcurre desde la inyección del material genético, hasta la lisis de la bacteria que conlleva la liberación de la progenie viral (Figura 3). Finalmente, β determina cuántas partículas virales son liberadas por ciclo de infección, la cual es expresada por el número de partículas virales (Kropinski *et al.* 2009).



Estos parámetros cinéticos son de gran importancia ya que podrían, junto a otras características como la determinación de multiplicidad de infección (MOI) y el rango de hospedero, clasificar a los fagos para su potencial aplicación (Abedon 2009). Para el estudio de las interacciones fago-bacteria, los parámetros cinéticos aportan al diseño de protocolos más eficientes, a través de la optimización en producción de fagos y de la determinación de dosis óptimas para tratamientos (Sinha *et al.* 2018).

Multiplicidad de infección (MOI)

La multiplicidad de infección (en inglés, *multiplicity of infection*, MOI) corresponde a la relación de infección entre el fago y la bacteria. Específicamente, representa el número de partículas virales que infectan a una bacteria en un cultivo líquido. Este evento puede ser representado estadísticamente mediante la distribución de Poisson, lo que quiere decir, que una MOI igual a 1 corresponde a la probabilidad de un 36,79% de que 1 bacteria sea infectada por 1 solo fago; donde la probabilidad de que 2 fagos infecten a una misma bacteria sería de 18,39% (Sinha *et al.* 2018). Para el estudio de los parámetros cinéticos de los fagos, la MOI es de suma importancia, ya que se debe asegurar que la infección de una bacteria esté determinada sólo por un fago, ya que al utilizar una MOI menor de 1, aumenta la probabilidad de ocurrencia de este evento a un 95%. Mediante la MOI, se puede determinar la relación fago/bacteria, con lo que se asegura una mayor adsorción del fago a la bacteria (Clokier *et al.* 2009). Este parámetro se calcula según la siguiente fórmula:

$$MOI = \frac{\text{unidades formadoras de placas de lisis (pfu)}}{\text{unidades formadoras de colonias (cfu)}}$$

Tanto la MOI, L y β pueden variar dependiendo de las condiciones de cultivo y del hospedero, lo que según recientes publicaciones, la capacidad lítica es una representación cuantitativa, que indica la capacidad de un fago sobre una población bacteriana determinada, es decir, cuanto el fago es capaz de disminuir el recuento bacteriano de una población en una concentración y tiempo establecido (Costa *et al.* 2019). Experimentalmente, esto se puede establecer mediante una curva de lisis bacteriana, la cual se realiza en un tiempo de entre 7 a 12 h para estudiar la capacidad lítica de un solo fago (Costa *et al.* 2019). Con los datos expuestos anteriormente y recalcando la importancia de estudiar distintas herramientas de biocontrol como los fagos contra *Salmonella* spp., es que es necesario establecer y optimizar criterios de selección para fagos líticos, los que son útiles para el desarrollo de fagoterapia o su aplicación como biocontrol.

Modelamiento matemático

El modelamiento matemático es una herramienta que en biología puede aportar a la predicción de diversos procesos gobernados por organismos o lo que les rodea (Jungck, 2011). Entre los distintos modelos, en microbiología de poblaciones, la metodología de modelamiento consiste en el uso de un sistema de ecuaciones diferenciales para describir el comportamiento de distintas poblaciones relacionadas entre sí (García *et al.* 2019), con especial interés en la interacción fago-bacteria. Para su construcción, es importante definir estas poblaciones y determinar los parámetros cinéticos que influirán individualmente y entre ellas. En el caso de bacteria-fago, estas poblaciones se describen usualmente como bacterias no infectadas, fago y bacterias infectadas (Krysiak-Baltyn *et al.* 2016). Ciertos autores con el objetivo de generar un modelo lo más aproximado a las condiciones de laboratorio, se agrega una población de bacterias resistentes, también es relevante la existencia de una población bacteriana de refugio, que son bacterias que se mantienen susceptibles al

fago (Chaundry *et al.* 2018). Esto es de gran relevancia, ya que al utilizar fagos como herramienta de biocontrol es importante predecir y comprender las interacciones a largo plazo de estas poblaciones, su coevolución e impacto a nivel fenotípico y genómico (Bruce *et al.* 2004).

En resumen, es importante destacar la presencia de SI en Chile, donde sus niveles de resistencia a antibióticos alertan sobre las limitantes de la terapia antimicrobiana tradicional, por lo que, la búsqueda de herramientas alternativas para su biocontrol es indispensable. En este contexto, es que, sin bien los fagos se han utilizado antes, aún existen grandes desafíos en su uso, sobre todo al momento de seleccionar los mejores candidatos para poder ser aplicados como herramientas de control.

8. Pregunta de investigación

¿Son los parámetros cinéticos de constante de adsorción (δ), tasa de eclosión (L) y periodo de latencia (β) predictivos para estimar la capacidad lítica entre bacteriófagos del género *Felixounavirus*?

9. Hipótesis

Es posible predecir la capacidad lítica mediante los parámetros cinéticos: constante de adsorción (δ), tasa de eclosión (L) y periodo de latencia (β), utilizando un modelo matemático en fagos del género *Felixounavirus* y *Salmonella* Infantis.

10. Objetivos

Objetivo general

Predecir la capacidad lítica a través de los parámetros cinéticos: constante de adsorción (δ), tasa de eclosión (L) y periodo de latencia (β), utilizando un modelo matemático en fagos del género *Felixounavirus* y *Salmonella* Infantis.



Objetivos específicos

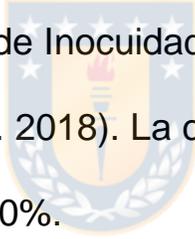
1. Evaluar los parámetros cinéticos bacterianos y la capacidad lítica de los fagos vB_Si_35FD y vB_Si_SF20-2.
2. Determinar los parámetros cinéticos de constante de adsorción (δ), tasa de eclosión (β) y periodo de latencia (L) para los fagos: vB_Si_35FD y vB_Si_SF20-2.

3. Generar y comprobar un modelo matemático que prediga en base a parametros cinéticos, la capacidad lítica de los bacteriófagos vB_Si_35FD y vB_Si_SF20-2



11. Materiales

Cepa bacteriana

- **Salmonella enterica serovar Infantis DR006:** Cepa utilizada como hospedera para ambos bacteriófagos utilizados. Esta cepa fue aislada desde heces de pollo de traspatio, y pertenece a la colección de cepas del Laboratorio de Inocuidad Alimentaria de la Universidad Andrés Bello (Rivera et al. 2018). La cepa esta conservada en caldo tripticasa-glicerol 70% a 80%.

Bacteriófagos

- **vB_Si_SF20-2:** en este trabajo se utilizó para la curva de un ciclo y ensayos de adsorción. Este virus fue aislado desde heces de pollo de traspatio en San Felipe, región de Valparaíso (Rivera *et al.* 2019).

- **vB_Si_35FD:** en este trabajo se empleó para la realización de la curva de un ciclo, ensayos de adsorción y curvas de lisis. Fue aislado en 2015 desde heces de bovino en Valdivia, región de Los Ríos.

Medios de cultivo

Caldo tripticasa (CT): Medio de cultivo empleado para el crecimiento de microorganismos no exigentes (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). Se utilizó para el crecimiento y almacenamiento de cepa bacteriana.

Agar tripticasa (AT): Medio de cultivo empleado para crecimiento de microorganismos aerobios o anaerobios facultativos (BD, Franklin Lakes, NJ). Se utilizó para obtención de colonias aisladas y crecimiento bacteriano.

Agar semisólido: Es una preparación en base a 0,7% de agar tripticasa suplementado con caldo tripticasa, el cual se añade sobre una capa de agar tripticasa sólida y es usada para el estudio de infección de bacteria-bacteriófago. Se emplea para los ensayos de propagación de bacteriófagos,

recuento y determinación de título, ya que permite el desarrollo de placas de lisis visibles (Abedon and Yin, 2009).

Soluciones:

- NaCl 0.9% (p/v) para diluciones bacterianas.
- Solución tampón SM (NaCl 0.1 mM; MgSO₄ 8 mM; Tris-HCl 1M; pH 7,5) para conservación de bacteriófagos y diluciones de los mismos.
- Cloroformo para mantención de *stock* de bacteriófagos puros.



12. METODOLOGÍA

Objetivo 1

Determinación de parámetros cinéticos bacterianos

Se determinó el parámetro de tasa de crecimiento (μ) bacteriana mediante el ensayo de curva de crecimiento, además de obtener la relación de la densidad óptica (DO) en proporción a un recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) (Liu, 2017). Para esto se utilizó un cultivo de la cepa DR006 en caldo tripticasa (CT) de 16 h a 37°C en condiciones de aerobiosis. Luego se tomó una alícuota del cultivo y se diluyó en 60 mL de CT a temperatura ambiente, el cual se incubó en un matraz blafeado a 37°C por 8 h con agitación de 150 rpm y condiciones de aerobiosis. A continuación, se tomaron muestras del cultivo cada 30 min por las primeras 2 h y luego cada 1 h. Se utilizó como control negativo un matraz con CT incubado en las

mismas condiciones sin bacterias. A cada muestra se le midió la DO a 600 nm mediante el espectrofotómetro NanoPhorometer C40 (Implen–ALE, Munich, Germany). En ciertas determinaciones fue necesario diluir la muestra 1:2 con CT estéril para poder obtener la medida de DO. Además, se realizó un recuento de células viables mediante el método de recuento en placa, para lo que se diluyeron las muestras con NaCl 0,9% a una razón de 1:10. A partir de estas diluciones, se sembraron 100 μ L en placas de AT por triplicado, las cuales se incubaron por 16 h a 37°C en condiciones de aerobiosis, para luego realizar el recuento de colonias en cada una de ellas (Liu, 2017).



Una vez cuantificadas las colonias por dilución, se realizó la conversión a ufc/mL, para lo cual el número de colonias contadas se multiplicó por 1000 (para calcular la concentración por mL) y se dividió por 100 (ya que el volumen de siembra fue de 100 μ L). Luego, se graficaron los datos en GraphPad Prism 8 versión 8.0.2 y se seleccionaron los puntos de la zona de la curva que corresponden a la fase de crecimiento exponencial, donde se

calculó el logaritmo de los puntos seleccionados para realizar una regresión lineal (Figura suplementaria 1), obteniendo la ecuación (Ec.) 1. En esta ecuación, la pendiente corresponde a la constante de crecimiento bacteriana (μ) en las condiciones de crecimiento aplicadas (Liu, 2017).

$$y = mx + c \quad \text{Ec 1.}$$

Además, en la Ec. 1, “**x**” e “**y**” corresponden a los puntos de tiempo (h) y UFC/mL respectivamente, “**m**” corresponde a la pendiente de la recta y “**c**” al punto de intercepción con el eje y.



Obtención del *stock* de trabajo de bacteriófagos vB_Si_SF20-2 y vB_Si_35FD.

Para la obtención del *stock* de trabajo, se propagaron ambos fagos a partir del *stock* original para obtener un lisado puro de cada uno de ellos, lo cual se realizó mediante el protocolo descrito por Moreno-Switt *et al.* (2013). Brevemente, a partir del *stock* original se realizaron diluciones seriadas con tampón SM hasta 10^{-6} . Paralelamente, se diluyó un cultivo de 16 h de la cepa

bacteriana de SI DR006 en CT 1:10, y se realizó una infección con cada una de las diluciones del *stock* original. Los cultivos de bacteria-fago se incubaron por 10 min a temperatura ambiente, luego se agregaron 4 mL de agar semisólido a 50°C, el cual se homogenizó y se vertió sobre una placa de AT. Posteriormente, estas placas se incubaron en condiciones de aerobiosis a 37°C por 16 h.

Una vez finalizada la incubación, se observaron las placas de lisis de cada una de las diluciones y se seleccionó la placa de AT con placas de lisis confluentes. Luego, se seleccionó una de ellas con un asa recta, la cual fue resuspendida en 1 mL de tampón SM. Luego, se realizó una infección con DR006 la cual se incubó por 10 min a temperatura ambiente siguiendo las mismas condiciones descritas anteriormente. Posteriormente, se agregaron 10 mL de tampón SM sobre las placas de AT incubadas y se incubó a temperatura ambiente por 12 h. A continuación, se recolectó el tampón SM y se centrifugó a 3,000 rpm por 30 min. Posteriormente se filtró el

sobrenadante utilizando un papel filtro con un poro de 0,22 μm , almacenando el filtrado con un 1% de cloroformo a 4°C.

Una vez preparado el lisado de trabajo, se procedió a determinar el título de éste. Para esto, se preparó una doble capa con agar semisólido y un cultivo de DR006, el cual se secó a temperatura ambiente. Luego se prepararon diluciones seriadas del lisado de trabajo en tampón SM y se realizó el recuento de placas de lisis por el método de microgota, para lo que se depositaron 10 μL de cada una de las diluciones realizadas del lisado de trabajo en agar tripticasa. Luego, estas placas se incubaron en condiciones de aerobiosis a 37°C por 16 h. Todas las diluciones se realizaron en triplicado (Switt *et al.* 2013).

Determinación de la capacidad lítica bacteriófagos

Para determinar la capacidad lítica viral, se emplearon dos metodologías a diferentes MOIs. Para esto, se utilizó un espectrofotómetro

lector de microplacas Infinite M200 NanoQuant (TECAN). Utilizando placas de 96 pocillos, se realizó la curva de lisis, empleando un control de CT y de crecimiento de SI DR006. Para esto, se inició a partir de un cultivo de 16 h de SI, tomándose 20 μ L y 180 μ L de CT. En el caso de las distintas MOIs (0,1, 1 y 10), se agregó el volumen de fagos utilizando las concentraciones calculadas, el cual se mantuvo en el equipo por 12 h a una temperatura de 37°C y agitación orbital por 15 s previo a medición cada 30 min a una longitud de onda de 600nm.



La otra metodología utilizada para determinar la capacidad lítica viral fue mediante la curva de lisis, realizada en un matraz baffleado, para lo cual se empleó una MOI de 10. Brevemente, se inició desde un cultivo de SI de 16 h en CT, el cual se diluyó 1:10, luego se tomó una alícuota de 60 μ L la cual se traspasó a un matraz de agitación con 60 mL de CT a 37°C. Este cultivo se usó como control de SI, mientras que, para la MOI de 10, se adicionó el volumen de fago previamente calculado. Ambos matraces se incubaron por 7 h a 37°C en condiciones de aerobiosis tomando muestras

cada 1 h, a las que se midió la DO a 600 nm con un espectrofotómetro modelo UVmini-1240 N° serie A109348, para finalmente realizar el recuento de células viables mediante el método de recuento en placa (Costa *et al.* 2019). Los análisis estadísticos correspondientes al t-test, se realizaron mediante Excel v16.44.

Objetivo 2



Determinación de los parámetros cinéticos de constante de adsorción (δ), tasa de eclosión (β) y periodo de latencia (L) para los fagos vB_Si_35FD y vB_Si_SF20-2.

Los parámetros cinéticos de interés determinados para los fagos fueron la constante de adsorción (δ), la que se determinó mediante una curva de adsorción, y el período de latencia (L) y la tasa de eclosión (β), los cuales se determinaron mediante la confección de una curva de un ciclo.

La curva de adsorción se determinó a partir de un cultivo bacteriano en CT de 16 h, el cual se diluyó 1:10, con el objetivo de tener un cultivo en fase exponencial. Luego, se empleó una MOI de 0,01 en un volumen total de 10 mL, el cultivo se incubó a 4°C y se tomaron muestras de 0,5 mL cada 5 min por 30 min totales. A cada muestra se le agregó 0,2% de cloroformo, se emulsionó y se realizó un recuento de unidades formadoras de placas (UFP) sobre una doble capa de agar. Todos los recuentos se realizaron por triplicado. Además, con el objetivo de verificar la MOI, se realizó un recuento de colonias mediante dilución en placa al inicio y al final del ensayo (Kokkari *et al.* 2018).



Con los datos del recuento de las placas de lisis, se realizó el cálculo para obtener las ufp/mL utilizando el software GraphPad Prism 8 versión 8.0.2. Específicamente, se calculó el promedio de los triplicados y su desviación estándar correspondiente, luego se graficaron los datos según la ecuación 2 (Ec. 2), donde **P** corresponde a la población de fago, **N** a la población de bacterias, **t** al tiempo y δ a la constante de adsorción. Si esto

se integra, se obtiene la ecuación 3 (Ec. 3), a la que se le realizó una regresión exponencial, obteniéndose la ecuación 4 (Ec. 4), donde se despejó la constante de adsorción (δ).

$$\frac{dP}{dt} = \delta - N \quad \text{Ec 2.}$$

$$\frac{P_t}{P_0} = e^{(-\delta \cdot N \cdot t)} \quad \text{Ec 3.}$$

$$\delta = \frac{-\text{Ln}\left(\frac{P_t}{P_0}\right)}{N \cdot t} \quad \text{Ec 4.}$$



Para la determinación de L y β , se empleó la metodología de curva de un ciclo. Para esto, se trabajó a partir de un cultivo en CT de 16 h, luego se ajustó a un cultivo en fase exponencial y se realizó un recuento de células viables previo a la infección por triplicado. Luego se inició la infección con cada fago a una MOI de 0,01 en un volumen de 1 mL que se incubó en agitación a 37°C por 10 min. Posteriormente, se adicionaron 200 μL de cloroformo, se homogenizó y se tomaron 10 μL del cultivo de infección los

que se transfirieron a 10 mL de CT, lo que se incubó en agitación por 60 min a 37°C. Luego, se tomaron muestras 100 µL cada 10 min y se realizó un recuento de placas de lisis a diluciones predeterminadas en tampón SM, lo cual se realizó por triplicado (Abedon *et al.* 2009).

A continuación, se realizó el recuento de placas de lisis, se calcularon las ufp/mL y se graficaron los datos en GraphPad Prism 8 versión 8.0.2 A partir de este gráfico, se obtuvo el L y se calculó la β , para lo que se determinó el promedio de /mL pre- y post-eclosión y luego se obtuvo el cociente que correspondió a la β .



Objetivo 3

Generar un modelo matemático que prediga en base a parámetros cinéticos, la capacidad lítica de los bacteriófagos vB_Si_35FD y vB_Si_SF20-2.

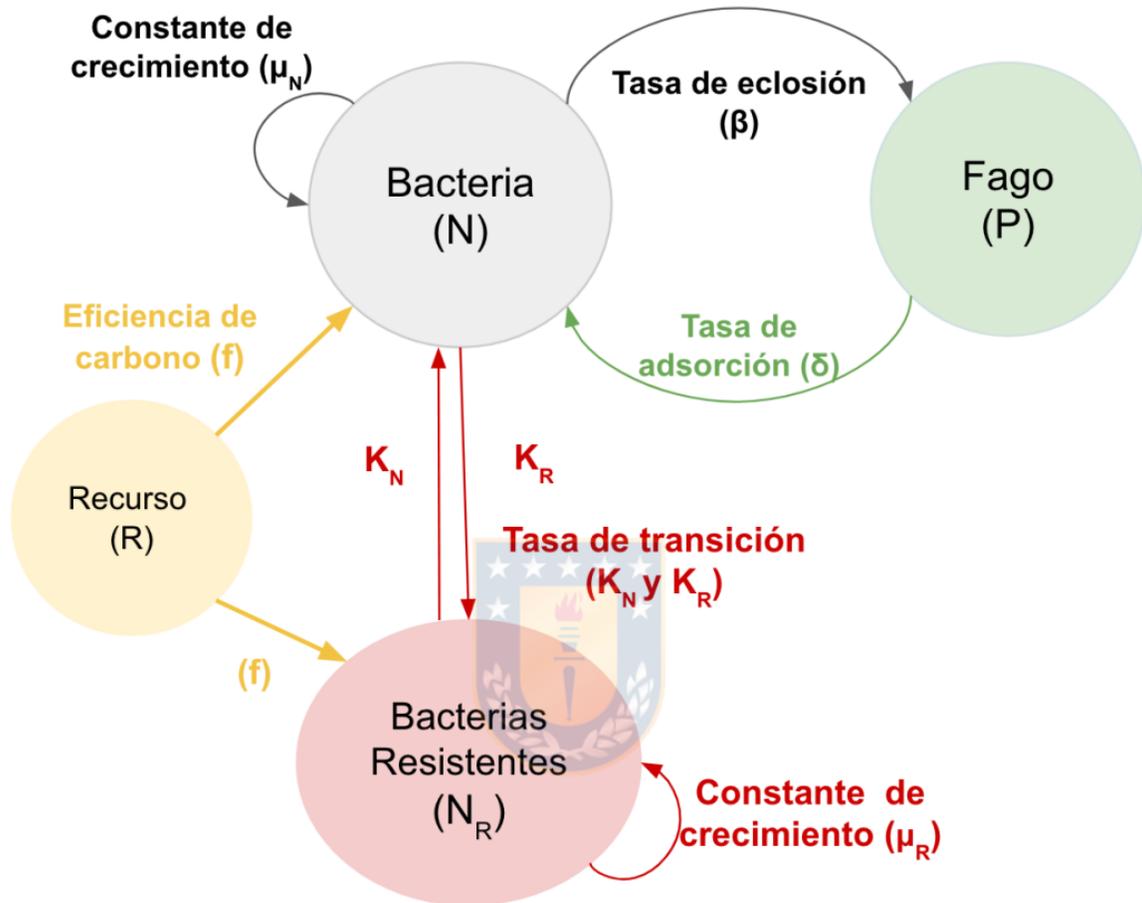
Para relacionar los parámetros cinéticos asociados a la bacteria y al fago, se diseñó un modelo de acción de masas que permitiera determinar *in silico* la capacidad lítica de los fagos. Basado en el modelo presentado por Bruce *et al.* (1977) se diseñó un modelo de acción de masa basado en tres sub-poblaciones de bacteriófagos (**F**), bacterias susceptibles (**N**) y bacterias resistentes (**N_R**), determinando bajo qué parámetros estas están correlacionadas y se afectan entre sí, para lo que se utilizaron los parámetros cinéticos expuestos en la Figura 4. En base a este modelo de acción de masas, se procedió a diseñar ecuaciones diferenciales que modelaran el comportamiento de cada sub-población basado en los parámetros cinéticos. Posteriormente, las ecuaciones diferenciales se programaron en el software

Berkeley Madonna versión 10.1.2 (University of California, Estados Unidos), el cual resolvió las ecuaciones acorde al método Euler (<https://berkeley-madonna.myshopify.com/pages/features>). Se realizaron simulaciones con los parámetros cinéticos obtenidos experimentalmente bajo condiciones ideales para predecir si estos son buenos indicadores de la capacidad lítica.

Con los parámetros cinéticos ya determinados para los fagos vB_Si_35FD y vB_Si_SF20-2 utilizando *S. Infantis* como hospedero, se procedió a diseñar un modelo de acción de masa que permitiera generar ecuaciones diferenciales acertadas para la simulación *in silico* de la cinética de infección.

En primer lugar, se definieron tres poblaciones como se muestra en la Figura 4. La población bacteriana **N** (cél/mL) donde el fago es capaz de infectar y replicarse, los bacteriófagos **P** (partículas virales/mL) y la población de bacterias resistentes **N_R** (cél/mL), donde el fago no se adsorbe, por lo tanto, no hay infección (Chaundry *et al.* 2018). Entre las poblaciones **N** y **N_R**

se observan flechas en ambos sentidos, lo que quiere decir que son poblaciones dinámicas, donde las bacterias susceptibles pasan a ser resistentes y viceversa a una tasa K_N y K_R , respectivamente (Chaundry *et al.* 2018). La relación entre la población de bacterias susceptibles N y el fago P esta dada por la infección, que a su vez esta mediada por los parámetros δ y β . La δ disminuye la población de fagos, ya que se adsorben a la bacteria y mediante β aumentan su población. Sin embargo, esto causa una disminución de la población bacteriana, ya que la bacteria debe ser lisada para que el fago libere su progenie viral. Se considera que la población bacteriana además disminuye por δ del fago, ya que se asume que cuando el fago infecta a la bacteria, esta será eventualmente lisada (Levin y Bull, 1996).



Parámetros cinéticos	Abreviatura
Eficiencia de carbono	f
Constante de crecimiento	μ
Tasa de transición resistentes a susceptibles	K_N
Tasa de transición susceptibles a resistentes	K_R
Tasa de eclosión	β
Tasa de adsorción	\square

Figura 4.

Modelo de acción de masas diseñado para simular infección fago-hospedero. Tres poblaciones descritas, bacterias (**N**), fagos (**P**), bacterias resistentes (**N_R**) y el recurso (R) y parámetros cinéticos empleados con su abreviación.

Por otro lado, el recurso se denominó como **R** ($\mu\text{g/mL}$), donde se asumió que las poblaciones bacterianas **N** y **N_R** consumían el recurso a su constante de crecimiento máxima (μ y μ_R), y se definió que la eficiencia del sustrato **f** ($\mu\text{g/cél}$), que corresponde a cuánto sustrato en μg consume una

célula (Levin *et al.* 1977). Para limitar el recurso y así el crecimiento de las poblaciones se utilizó la Ecuación de Monod representada en la Ec. 5, donde **R** corresponde a la concentración de sustrato ($\mu\text{g/mL}$), **C** a la constante de Monod y ψ (*psi*) a la relación de Monod, los cuales modelan el crecimiento bacteriano (Monod, 1950).

Con los antecedentes expuestos, la ecuación del recurso (**R**) en el tiempo se diseñó como muestra la ecuación 6 (Ec. 6), donde se aprecia que el recurso disminuye por la eficiencia de sustrato (**f**) y el crecimiento de **N** y N_R , multiplicadas por sus constantes de crecimiento (μ) correspondientes.

$$\psi(R) = \frac{R}{(C+R)} \quad \text{Ec 5.}$$

$$\frac{d(R)}{dt} = -f \cdot \psi (N \cdot \mu_N + N_R \cdot \mu_R) \quad \text{Ec 6.}$$

Por otro lado, la población bacteriana **N**, se rigió por la ecuación 7 (Ec. 7), donde primero se describe el crecimiento bacteriano a una tasa μ_N ,

dependiente de la población inicial N y limitada por la relación de Monod (ψ). Luego, su población se ve afectada de forma negativa por la transición a bacterias resistentes dependiente de la población inicial N_R y su tasa de transición K_R , además, de la infección por el fago que esta dada por la $\square\square$

Ec 7.

$$\frac{d(N)}{dt} = N \cdot \mu_N \cdot \psi + (N_R \cdot K_R - N \cdot K_N) \cdot \psi - P \cdot \delta \cdot N$$



La población bacteriana resistente N_R se describe en la ecuación 8 (Ec. 8), donde esta crece a su propia constante de crecimiento estimada (μ_R), limitada por la relación de Monod (ψ). Su población disminuye en base a la tasa de transición K_N , donde de resistentes, las bacterias transicionan a susceptibles y a su vez la población se ve aumentada por la tasa de transición K_R , donde las bacterias susceptibles pasan a resistentes. Esta población no se ve afectada por el fago, ya que son resistentes.

$$\frac{d(N_R)}{dt} = N_R \cdot \mu_R \cdot \psi + (N \cdot K_N - N_R \cdot K_R) \cdot \psi$$

Ec 8.

En el caso de la población de bacteriófagos (**P**), ésta se ve influenciada principalmente por la interacción con la población bacteriana (**N**). Cuando un fago infecta a una bacteria, el primer paso es la adsorción, lo que se describe en la ecuación 9 (Ec. 9) como la δ , la cual es dependiente a su vez de la población inicial de **N** y **P**, disminuyendo la población del fago. Por otro lado, una vez ocurrida la infección, la bacteria es lisada y se libera la progenie viral a una β determinada experimentalmente, la que aumenta la población del fago.



Ec 9.

$$\frac{d(P)}{dt} = P \cdot \beta \cdot N - P \cdot \delta \cdot N$$

Finalmente, el modelo final de acción de masas, se compone del conjunto de ecuaciones expuestas anteriormente, relacionadas entre sí (Figura 5).

$$\frac{d(R)}{dt} = \underbrace{-f \cdot \psi (N \cdot \mu_N + N_R \cdot \mu_R)}_{\text{Agotamiento de recurso por crecimiento bacteriano}}$$

Ec 6.

$$\frac{d(N)}{dt} = \underbrace{N \cdot \mu_N \cdot \psi}_{\text{Crecimiento bacteriano}} + \underbrace{(N_R \cdot K_R - N \cdot K_N) \cdot \psi}_{\text{Transición de resistencia y susceptibilidad}} - \underbrace{P \cdot d \cdot N}_{\text{Pérdida por adsorción}}$$

Ec 7.

$$\frac{d(N_R)}{dt} = \underbrace{N_R \cdot \mu_R \cdot \psi}_{\text{Crecimiento}} + \underbrace{(N \cdot K_N - N_R \cdot K_R) \cdot \psi}_{\text{Transición de resistencia y susceptibilidad}}$$

Ec 8.

$$\frac{d(P)}{dt} = \underbrace{P \cdot e \cdot N}_{\text{Eclósión}} - \underbrace{P \cdot d \cdot N}_{\text{Adsorción}}$$

Ec 9.



Figura 5.

Modelo compuesto por ecuaciones diferenciales que modelan el comportamiento de infección entre población bacteriana (N) y de fago (P). También se describe el recurso (R), y la emergencia de bacterias resistentes (N_R).

13. Resultados

Objetivo 1

Determinación de los parámetros cinéticos bacterianos de cepa SI DR006.

Para determinar la tasa de crecimiento (μ) y generar una relación entre la densidad óptica (DO) y el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC), se realizó una curva de crecimiento bacteriana. Como se detalló en la sección de metodología, se midió la DO y se realizó el recuento de células viables cada media hora por las primeras 2 h y luego cada 1 h. En la Figura 6 se muestran los datos obtenidos, graficados como DO y el recuento bacteriano (UFC/mL). En esta Figura se observan las tres etapas descritas para el crecimiento bacteriano. En las primeras 2 h, se observó la fase de adaptación de la bacteria al medio de cultivo, luego se puede observar la

fase exponencial, la cual se estableció entre la 3 h hasta las 5 h; para finalmente dar paso a la fase estacionaria entre las 6 h y 7 h, donde el crecimiento bacteriano se estabiliza.

A partir de los resultados de la curva de crecimiento, se seleccionaron los puntos correspondientes a la fase exponencial del crecimiento bacteriano, los que correspondieron a las 3 h, 4 h y 5 h y de acuerdo con los resultados de DO, se realizó una regresión lineal. De estos datos, se obtuvo la ecuación de la recta $y = 0.423x - 1.564$ con un coeficiente $R^2 = 0,972$. A partir de esta ecuación, se determinó que μ correspondió a 0,4 células/hora, la cual corresponde a la pendiente de la ecuación obtenida.

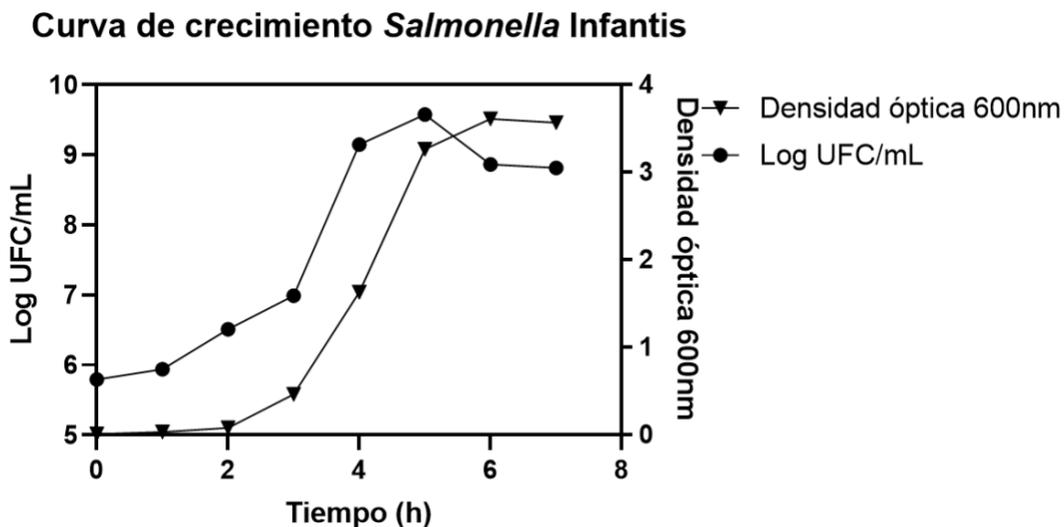


Figura 6.

Curva de crecimiento de SI DR006. Para el diseño de esta curva, se midió la DO a 600nm y el recuento de células viables cada 1 h por un total de 7 h. El símbolo (▼) corresponde a los valores de DO, mientras que (●) corresponde al recuento de células viables, expresado como log (UFC/mL). *No fue posible realizar las tres experiencias debido al cierre de laboratorios por la pandemia.*

Determinación de la capacidad lítica de bacteriófago vB_Si_35FD.

Con el objetivo de evaluar la capacidad lítica del fago vB_Si_35FD, se realizaron tres curvas de infección a diferentes MOIs mediante dos metodologías, mediante espectrofotómetro, medición de densidad óptica y por matraz y recuento bacteriano. En primer lugar, se realizaron curvas de

control de crecimiento de SI con valores de MOIs de 0,1, 1 y 10. A partir de estas determinaciones, se observó que el control de SI creció hasta alcanzar una DO de 0,68, mientras que al crecer la bacteria junto con el fago a una MOI de 0,1, se observó una disminución de DO a las 5 h de 0,0085 en contraste a lo medido para el control de SI a la misma hora, que resultó en un DO de 0,41 para una MOI de 0,1. En el caso de las MOIs 1 y 10, la reducción máxima de la DO se registró a las 7 h, donde la MOI 1 alcanzó una DO de 0,0199 y la MOI 10 de 0,028 en comparación al control que a la hora 7 tuvo una DO de 0,491. Esta reducción en la medición de la DO en la población de SI para la MOI 0,1 ocurrió por las primeras 7 h, luego aumentó alcanzando una DO de 0,530 a la hora 12. Por otro lado, la disminución en la DO de MOI 1 y 10 se observó en las primeras 9 h en ambos casos y se midió una DO de 0,418 y 0,296 respectivamente a la hora 12, donde el control alcanzó una DO de 0,68 (Figura 7 A).

Por otro lado, a una MOI de 10 en matraz se observó que el crecimiento de SI control alcanzó una DO de aproximadamente 4, observándose un crecimiento exponencial entre las 3 h y 5 h, donde además no se observó

crecimiento por sobre $DO = 0,5$, manteniéndose aproximadamente en valor 0 (Figura 7 B). En los ensayos en matraz, se calculó el recuento de UFC, donde se observó que en la primera hora de infección ocurrió una disminución en el recuento bacteriano por bajo las 10^4 UFC/mL, lo cual se mantuvo hasta las 6 h, desde donde se evidenció un incremento en el recuento bacteriano por sobre las 10^4 UFC/mL, la disminución en el recuento bacteriano fue significativa acorde a los análisis estadísticos mediante t-test (Figura 7 C).



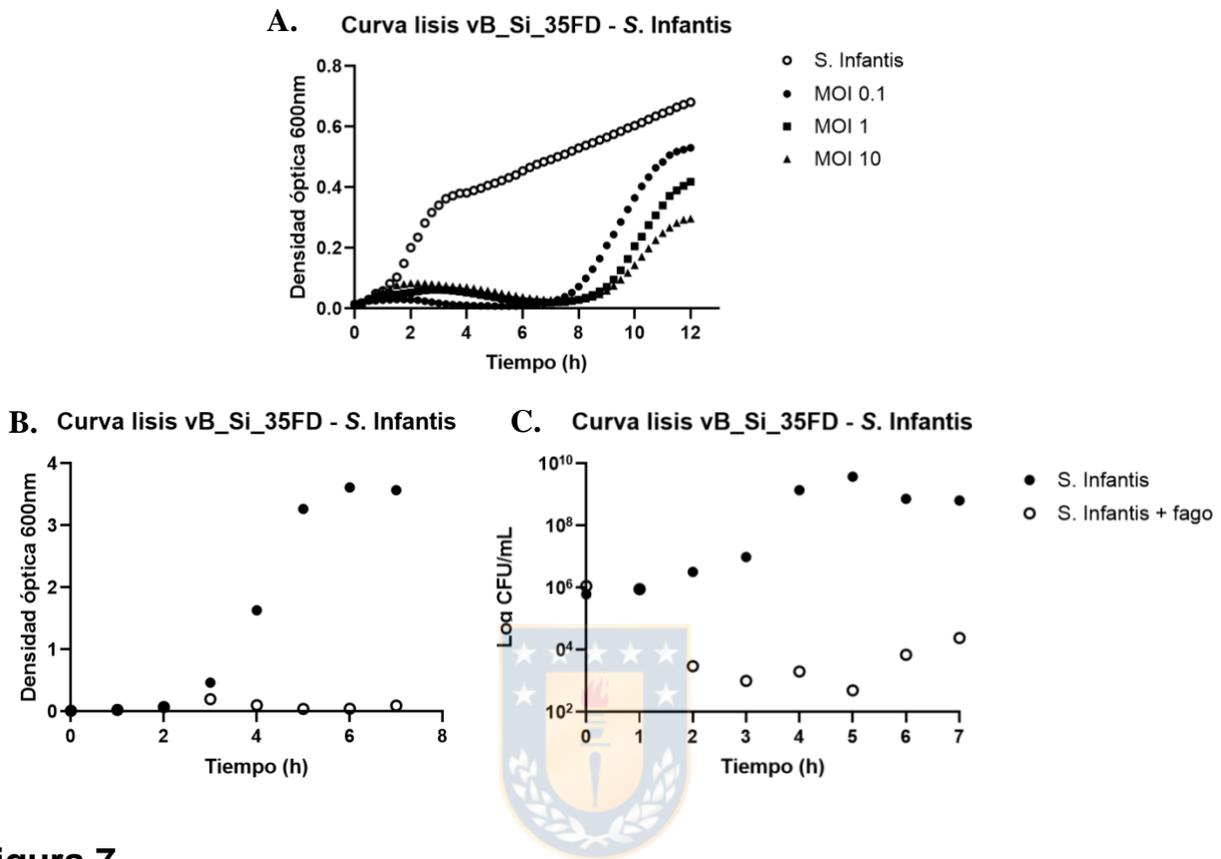


Figura 7.

Curva de lisis población de SI infectada con el fago vB_Si_35FD. En **A** se observa el crecimiento de la cepa DR006 infectada con las MOIs 0,1, 1 y 10 por 12 h. En **B** se observan la medición de la OD de las curvas de lisis obtenidas con una MOI de 10 por 7 h. En **C** se observan la medición de UFC/mL de las curvas de lisis obtenidas con una MOI de 10 por 7 h, estos datos se analizaron mediante t-test obteniendo una significancia $<0,05$. Para los gráficos B y C. *No fue posible realizar las 3 experiencias debido a la pandemia actual.*

Objetivo 2

Determinación de los parámetros cinéticos de bacteriófagos vB_Si_35FD y vB_Si_SF20-2.

Para determinar los parámetros cinéticos de los fagos vB_Si_35FD y vB_Si_SF20-2, se realizó una curva de adsorción desde la cual se determinó la constante de adsorción (δ), donde a partir de la curva de un ciclo fue posible determinar el periodo de latencia (**L**) y tasa de eclosión (β), lo que se utilizó luego para resolver el modelo matemático.

Para construir la curva de adsorción, se realizó la infección de la cepa SI DR006 con una MOI de 0,001 y se cuantificaron placas de lisis cada 10 min. Las curvas para ambos fagos se realizaron por triplicado. Los resultados se exponen en la Figura 8, junto con la desviación estándar correspondiente de los datos. A partir de los resultados obtenidos, se observó que el fago vB_Si_SF20-2 generó una disminución de su título $1,67 \times 10^4$ UFP/mL a 1×10^4 UFP/mL, durante los primeros 10 min de infección (Figura 8 A). En el caso

del fago vB_Si_35FD, se evidenció que la mayor disminución fue desde un recuento a tiempo 0 de 2×10^5 UFP/mL que bajó a $1,03 \times 10^5$ UFP/mL a los 10 min de iniciada la infección con SI DR006 (Figura 8 B).

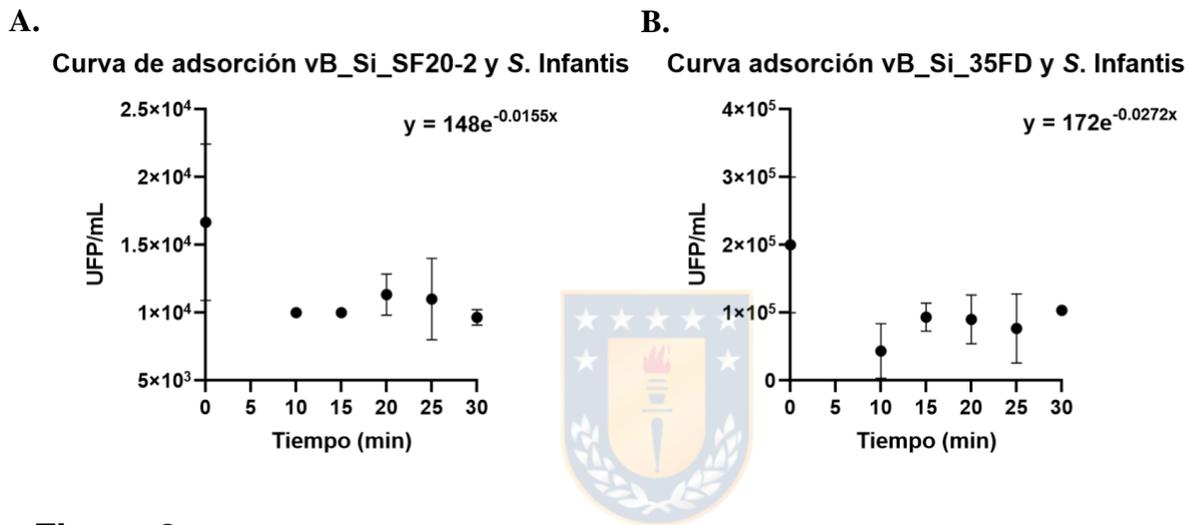


Figura 8.

Curvas de adsorción del fago vB_Si_SF20-2 (A) y fago vB_Si_35FD (B). Las barras representan la desviación estándar entre las réplicas.

Por otro lado, las constantes de adsorción (δ) para cada fago se calcularon acorde a la Ec. 4 expuesta anteriormente, la cual es derivada de la regresión exponencial. La ecuación asociada a esta regresión se muestra en la figura 10 para cada una de las curvas, donde la variable que se despeja es la pendiente ubicada en el exponencial. Es así que se pudo determinar

que la δ del fago vB_Si_SF20-2 corresponde a $1,12 \times 10^{-9}$ 1/(cél/mL) ·min, mientras que el valor de δ para el fago vB_Si_35FD fue igual a $6,8 \times 10^{-10}$ 1/(cél/mL) min, lo que evidencia una variación de un orden de magnitud entre ambos virus.

Por otro lado, los parámetros cinéticos L y β se determinaron mediante la curva de un ciclo, cuantificándose las unidades formadoras de placas de lisis (UFP). Los resultados de las curvas demuestran que para el fago vB_Si_SF20-2, los parámetros cinéticos fueron previamente determinados y reportados por Rivera *et al.* (2019), observándose un aumento en el título viral a los 30 min pasada la fase de adsorción, por lo que su L se estimó en 40 min aproximadamente. Además, β se determinó como igual a 30 partículas virales/cél (Figura 9 A).

En el caso del fago vB_Si_35FD, se pudo observar una estabilización del título de fagos por los primeros 20 min luego de ocurrida la adsorción.

Luego, se observó un aumento en el título viral entre los 20 min y 30 min, lo que correspondería a la liberación de la progenie viral, estableciéndose el **L** igual a 20 min. El título viral posteriormente se estabilizó entre los 40 min y 60 min (Figura 9 B). Finalmente, la β se calculó de la misma manera descrita anteriormente, donde se determinó que este parámetro correspondió a 90 partículas virales/cél.

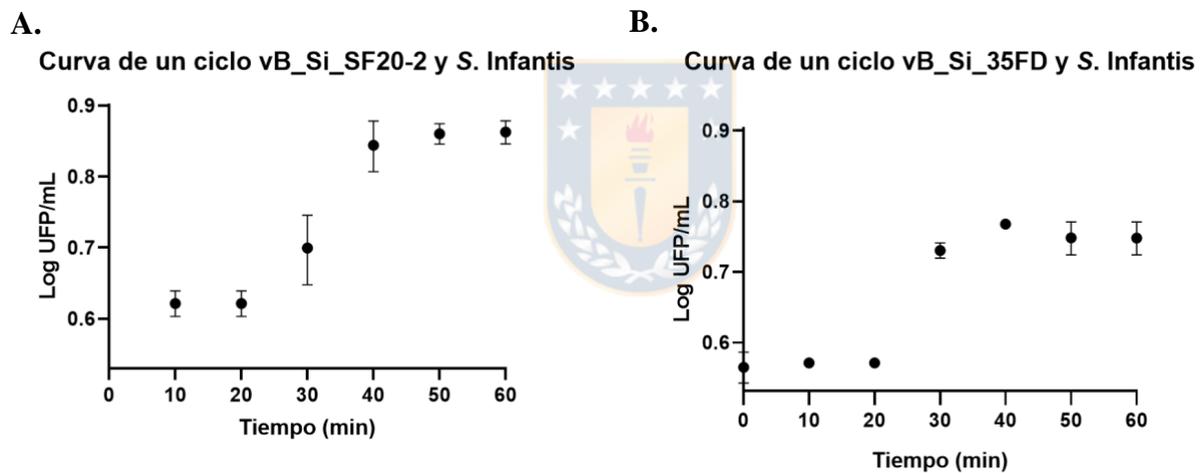


Figura 9.

Representación gráfica de los datos de las curvas de un ciclo. **A** fago vB_Si_SF20-2 y **B** fago vB_Si_35FD. Las barras representan la desviación estándar de los puntos, calculada mediante el software GraphPad Prisma v8.

Objetivo 3

Comprobar que el modelo matemático diseñado, prediga en base a parametros cinéticos, la capacidad lítica de los bacteriófagos vB_Si_35FD y vB_Si_SF20-2.

De acuerdo con el modelo descrito en la sección de materiales y métodos, se procedió a programar el código en el software Berkeley Madonna versión 10.1.2 con algunos ajustes. Específicamente, se incorporaron condicionales con el objetivo de mantener un nivel de refugio de 1.000 bacterias susceptibles al fago, para evitar que la población (**N**) se extinguiera. Por otro lado, se adicionó el **L**, el que modificó la población bacteriana previa β con el objetivo de ajustar de mejor manera el modelo a la realidad de la infección fago–bacteria.

El modelo se entrenó con los parámetros obtenidos experimentalmente para la cepa DR006 y los fagos incluidos en este estudio, sin embargo, también se utilizaron datos de bibliografía, tales como la tasa

de crecimiento de bacterias resistentes (μ_R) y las constantes de transición entre población de bacterias susceptibles y resistentes (K_N y K_R). Todos los parámetros utilizados se detallan en la Tabla 1.

Tabla 1. Parámetros cinéticos determinados experimentalmente, los que se utilizaron para entrenar el modelo programado en Berkeley Madonna, para SI DR006 y los fagos vB_Si_SF20-2 y vB_Si_35FD.

Parámetro	vB_Si_SF20-2	vB_Si_35FD	S. Infantis DR006
Constante de crecimiento (μ)	-	-	0.4 cél/h
Constante de crecimiento resistentes (μ_R) ^a	-	-	0.2 cél/h
Tasa de transición (K_N) ^a	-	-	1×10^{-6}
Tasa de transición (K_R) ^a	-	-	1×10^{-7}
Constante de adsorción (δ)	$1,12 \times 10^{-9}$ 1/(cél/mL)·min	$6,8 \times 10^{-10}$ 1/(cél/mL)·min	-

Parámetro	vB_Si_SF20-2	vB_Si_35FD	S. Infantis DR006
Periodo de latencia (L)	40 min ^b	20 min	-
Tasa de eclosión (β)	30 partículas/mL ^b	90 partículas/mL	-

^a Datos obtenidos de Chaundry *et al.* 2018.

^b Datos obtenidos de Rivera *et al.* 2019.



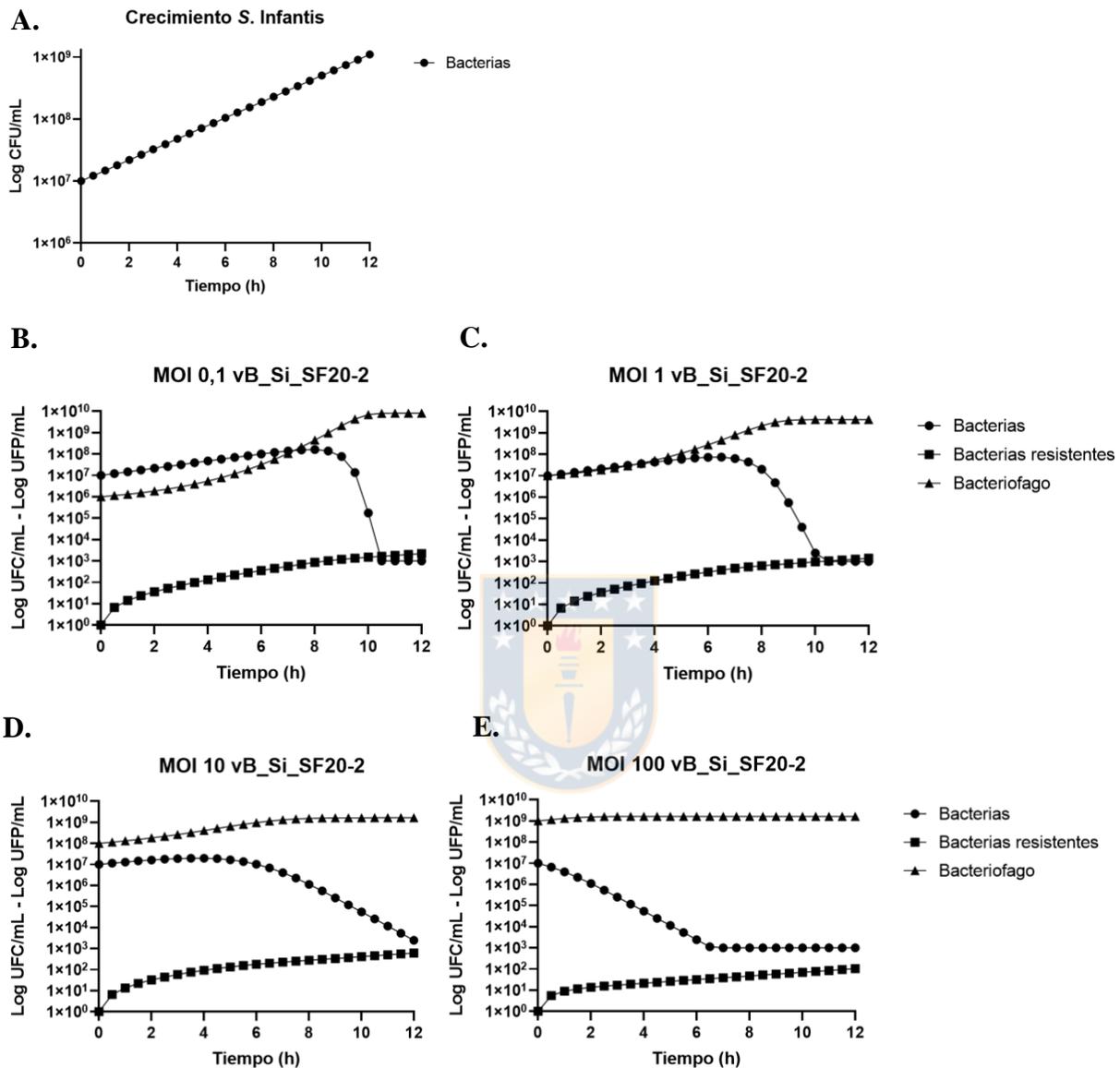


Figura 10.

Simulaciones realizadas en software Berkeley Madonna acorde al modelo de acción de masas presentado con los datos obtenidos experimentalmente del fago vB_Si_SF20-2. Se muestran los puntos cada 30 min. En **A** se observa la curva de *SI* DR006 sin fago, mientras que en **B - E** se observan las curvas de infección obtenidas con diferentes MOIs (0,1; 1; 10 y 100).

Para el modelamiento de infección de fago vB_Si_SF20-2 se utilizaron los datos expuestos en la Tabla 1. En primer lugar, se realizó una simulación del crecimiento de SI sin el fago, con una MOI de 0,1. Se apreció que el inóculo inicial de N fue de 1×10^7 UFC/mL, aumentando aproximadamente hasta un título de 1×10^8 UFC/mL. A partir de 9 h, este valor comenzó a disminuir llegando al nivel de refugio de 1000 bacterias a las 11 h aproximadamente, lo que significa que esta población **N** fue lisada por el fago (**P**), ya que ésta última aumentó su título inicial de 1×10^6 UFP/mL hasta llegar a 1×10^{10} UFP/mL. También se observa que, desde el inicio de la infección, la población de bacterias resistentes (**N_R**) aumenta su población de forma logarítmica, sobrepasando la población refugio de 1000 bacterias susceptibles a las 10 h aproximadamente (Figura 10 B). Utilizando una MOI de 1 para el fago vB_Si_SF20-2, se inició con un mismo título de bacterias (**N**) y fago (**P**) de 1×10^7 UFC/mL y 1×10^7 UFP/mL, respectivamente. Se evidenció que los fagos aumentaron su población, estabilizándose a una concentración de 1×10^{10} UFP/mL a las 10 h. Por otro lado, se observó que la población bacteriana aumentó hasta las 8 h aproximadamente, donde comenzó a disminuir, llegando al nivel de refugio a las 10 h. En cuanto a la

población de bacterias resistentes, éstas aumentaron de forma constante hasta un título de 1×10^3 UFP/mL (Figura 10 C).

En el caso de la MOI de 10, ésta presentó variaciones respecto a las demás, donde se inició con un título de bacterias susceptibles de 1×10^7 UFP/mL, y luego su crecimiento no aumentó por sobre este valor, donde tampoco la población fue lisada completamente por los fagos. Esto se evidencia en que no se alcanza el nivel refugio en las 12 h de simulación. Por otro lado, el fago se estabilizó en 1×10^{10} UFP/mL. El número de bacterias resistentes aumentó de forma constante hasta un título de 1×10^3 UFC/mL (Figura 10 D).

Finalmente, la simulación de infección utilizando una MOI de 100 del fago vB_Si_SF20-2, se inicia con un inóculo del fago igual a 1×10^9 UFP/mL, el cual se estabiliza en 1×10^{10} UFP/mL. Por otro lado, la población de bacterias susceptibles no aumenta, ya que disminuye de forma exponencial

durante 6 h, alcanzando el nivel de refugio de 1.000 bacterias, lo que quiere decir que su población se extinguió. Finalmente, el valor de N_R aumentó, alcanzando un valor de 1×10^2 UFC/mL (Figura 10 E).



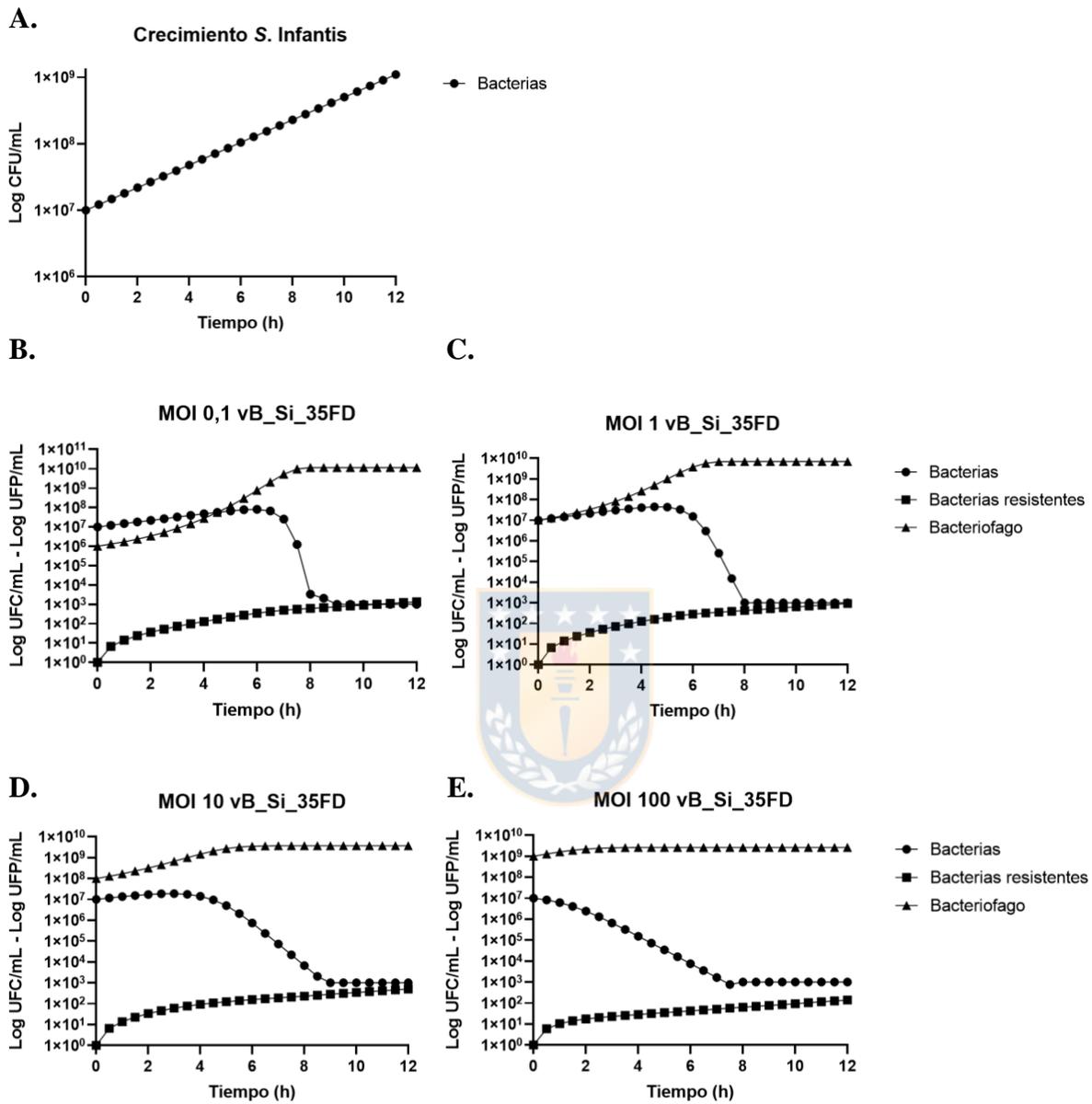


Figura 11.

Simulaciones realizadas con el software Berkeley Madonna versión 10.1.2 para *S. Infantis* por 12 h (A). Además, se muestran los resultados de las simulaciones con el fago vB_Si_35FD a distintas MOIs: 0,1 (B), 1 (C), 10 (D) y 100 (E).

En el caso del fago vB_Si_35FD, se realizó el modelamiento con los datos expuestos en la Tabla 1. En primer lugar, se simuló crecimiento de la bacteria sin el fago, donde se observó un aumento exponencial de título desde 1×10^7 hasta 1×10^9 UFC/mL (Figura 11 A). Utilizando una MOI de 0,1, se observó que el crecimiento de DR006 alcanzó un título cercano a 1×10^8 UFC/mL, para luego disminuir significativamente su población en la 7 h, estabilizándose en el nivel de refugio a las 9 h. Por otro lado, la población del fago a su vez aumentó y se estabilizó en 1×10^{10} UFP/mL a la 8h aproximadamente, donde a su vez, el valor de N_R aumentó de manera constante desde la hora 0 hasta un título cercano a 1×10^3 UFC/mL (Figura 11 B). Con una MOI de 1, se observó que el fago se estabilizó en 1×10^{10} UFP/mL, y la población bacteriana aumentó hasta la 6 h, y luego su decauyó hasta estabilizarse en el nivel de refugio desde 8 h. El aumento de bacterias resistentes se evidenció desde la 1 h, alcanzando una concentración de 1×10^3 UFC/mL en la 12 h (Figura 11 C). En el caso de la MOI de 10, se determinó que el crecimiento de la población del fago se estabilizó en 1×10^{10} UFP/mL aproximadamente a la 6 h. En el caso de la población de bacterias susceptibles (N_s), se observó un aumento hasta la 4 h, y luego su valor

disminuyó alcanzando el nivel de refugio a las 9 h, estabilizándose hasta la 12 h en 1×10^3 UFC/mL. Por su parte, el valor de N_R aumentó desde los primeros 30 min de iniciada la infección, hasta alcanzar un valor de 1×10^3 ufc/mL en la 12 h (Figura 11 D). Finalmente, con una MOI 100, la población del fago se estabilizó en 1×10^{10} UFP/mL, mientras que el valor de N_S no aumentó por sobre el inóculo inicial de 1×10^7 UFC/mL, disminuyendo desde la hora 1 hasta la hora 7, donde se alcanzó el nivel de refugio (Figura 11 E).



14. Discusión

Salmonella spp. es el principal causante a nivel mundial de ETAs, el cual es el responsable de 155 mil muertes anuales (Besser, *et al* 2018). En Chile, entre 2014 a 2018 se reporta a *Salmonella* Infantis en el tercer lugar de prevalencia dentro de las especies de éste género. Además, se ha determinado que el 92% de las cepas aisladas durante este periodo presentó resistencia a antibióticos asociada a la producción BLEE (ISP, 2019). A nivel mundial, desde 2016 se destaca la prevalencia de SI en diversos países como Iraq, Estados Unidos y Chile (Aviv *et al.* 2016; Tate *et al.* 2017; Lapierre *et al.* 2020). Esto representa una problemática de inocuidad alimentaria asociada al control de este patógeno, y dentro de este contexto, es que la utilización de bacteriófagos que lisen a SI cobra especial relevancia. En este

sentido, los fagos pertenecientes al género *Felixounavirus* son capaces de infectar a un alto número de serovares de *Salmonella* spp., y además son reducen la carga viral de este patógeno en cultivo, en matrices alimentarias y aplicados sobre piel de pollos (Zhang *et al.* 2010; Duc *et al.* 2018).

El uso de fagos como herramienta de biocontrol aún presenta grandes desafíos, los que van desde la apropiada selección de virus, su dosificación hasta el modo de aplicación (Abedon, 2017). Además, si bien hay criterios importantes establecidos para fagos utilizados en biocontrol, tales como el ciclo de reproducción lítico estricto, rango de hospedero reducido al patógeno(s) de interés, y que el fago sea estable a diferentes rangos de pH o temperatura a los que será expuesto; no hay un término o concepto unificado de selección de fagos.

Es así como esta tesis abordó la problemática de la definición de parámetros involucrados en la elección de fagos para su potencial uso como

biocontrol. En este contexto, se utilizó *Salmonella* Infantis (SI) como hospedero, y dos fagos, vB_Si_SF20-2 y vB_Si_35FD, ambos pertenecientes al género *Felixounavirus*, como infectantes.

En primer lugar, al evaluar la capacidad lítica, se determinó que el fago vB_Si_35FD fue capaz de reducir, en promedio, la población de SI en 4,86 log(UFC/mL) (Tabla anexa 1) respecto al control, acorde a los estudios estadísticos realizados, esta disminución fue significativa ($p < 0,05$) (Figura 6 C). En el trabajo de Costa *et al.* 2019, ellos reportaron la reducción de recuento de *Salmonella* Typhimurium un máximo de 2,6 log(UFC/mL) con el uso de un solo fago utilizando una MOI de 100. Por otro lado, Park *et al.* 2011 reportaron que la población de *S. Typhimurium* fue reducida por el fago SFP10 hasta en 1,77 log (UFC/mL) con una MOI de 100. En ambos estudios mencionados se logró reducir, como máximo 2,6 log(UFC/mL), a una MOI de 100, lo que contrasta con lo encontrado en este trabajo, donde con una MOI de 10 el fago vB_Si_35FD fue posible reducir, en promedio 4,86 log(UFC/mL) la población de SI.

En cuanto al crecimiento de SI y la cuantificación de la DO, ésta alcanzó un valor máximo de 3,26. Este alto valor se puede deber a las condiciones en el que el experimento fue desarrollado. Por ejemplo, Takasaki *et al.* 2020 realizaron una comparación de distintos cultivos con iguales condiciones de temperatura, inóculo bacteriano y agitación, donde se observó que al cambiar el matraz de cultivo, variaban los parámetros de pH, O₂ y CO₂ disuelto en el medio, además de la DO medida, la que en matraz bafleado alcanzó un valor de 4,8 con *E. coli*. Estos resultados son concordantes con nuestros resultados, ya que el tipo de matraz utilizado para la curva de crecimiento bacteriana y la curva de lisis fue un matraz bafleado. En cuanto a la disminución de la DO observada en la curva de lisis (Figura 5B), el crecimiento de SI en presencia del fago vB_SI_35FD en promedio disminuyó 1,511 (Tabla anexa 2). En distintas condiciones (fago, matraz y MOI), Rivera *et al.* 2019 determinó que el fago vB_SI_SF20-2 logró una disminución de absorbancia de 0,6 unidades en un cultivo de SI de 12 h, por lo que el fago vB_SI_35FD fue capaz de reducir en mayor proporción la población de SI. Comparando estos dos estudios, el fago vB_Si_35FD fue capaz de disminuir en mayor proporción la población, sin embargo, la MOI

utilizada en esta tesis fue de 10, en comparación a la empleada en el estudio de Rivera *et al.* 2019, donde se utilizó una MOI de 0,01 para evaluar la capacidad lítica del fago.

A partir de los resultados de esta tesis, es posible afirmar que el fago vB_Si_35FD es capaz de reducir en condiciones de laboratorio a SI, por lo que, preliminarmente, podría ser un real candidato para el control de SI en animales o alimentos, el cual es un emergente problema de salud en Chile como lo expone el Minsal en su reporte de 2014-2018, apoyado por lo reportado por Lapierre *et al.* 2020.

En relación a la determinación de la capacidad lítica, esta se determinó mediante el equipo TECAN (Figura 7 C), el que presenta limitantes experimentales, como el volumen empleado, de 200 μ L. Además, con este equipo no es posible realizar agitación constante de la placa, lo que no permite una correcta homogenización. La disponibilidad de oxígeno está

limitada de igual forma, ya que las placas de 96 pocillos se depositan cerradas dentro del equipo, el conjunto de estos factores podría explicar la baja DO alcanzada por SI en su fase exponencial (0,590). Se describe a *Salmonella* spp. como un género anaerobio facultativa, por lo que su crecimiento es posible ante disponibilidad limitada de oxígeno (Liu. 2017). Sin embargo, al utilizar un bajo volumen de medio de cultivo, la disponibilidad de nutrientes podría haber limitado el crecimiento de la bacteria, tal como se demostró en el trabajo realizado por Airoidi *et al.* 1988, donde se demostró que la incubación de *S. Typhimurium* bajo distintas concentraciones de nutrientes produjo una disminución en su crecimiento a medida que disminuía la disponibilidad de su fuente de carbono.

Finalmente, con las dos metodologías empleadas para la determinación de la capacidad lítica, se observó en ambos casos un aumento en la población de SI en las últimas horas de infección con el fago vB_Si_35FD. En el caso del recuento de células viables (Figura 7 C), el aumento se produjo entre la hora 6 y 7, mientras que en el caso de la

medición de DO a 600 nm, este aumento comenzó desde la hora 8 (Figura 7 A). En este sentido, se podría sugerir que este fenómeno podría deberse al surgimiento de una sub-población de SI que presente resistencia al fago vB_Si_35FD, pero es necesario realizar experimentos específicos para su comprobación. Al respecto, Rivera *et al.* 2019 fueron capaces de aislar colonias de SI que crecieron en una curva de lisis de 12 h y fueron desafiadas con el fago vB_SI_SF20-2, para así determinar si habían desarrollado resistencia. Los mecanismos de resistencia, acorde a lo presentado por Bickard *et al.* 2012, se pueden clasificar como una inmunidad innata y/o adaptativa que desarrollan las bacterias para evitar la infección por fagos. En este trabajo no se realizaron estudios de desarrollo de resistencia en la cepa utilizada, pero sin duda es un punto de gran relevancia, ya que es uno de los grandes desafíos al momento de utilizar fagos como biocontrol. Los mecanismos de resistencia por parte de la bacteria son descritos por Labrie *et al.* 2010, donde se clasifican acorde a la etapa del ciclo de reproducción que afecta. Ejemplos de esto son la fase de adsorción, afectada por modificación de receptores, producción de matriz extracelular y/o inhibidores competitivos, o por otro lado la inyección del material genético, la cual se

puede degradar por el mecanismo CRISPR-Cas o sistemas de modificación o restricción, entre otros mecanismos descritos. Experimentalmente, dependiendo del tipo de resistencia, se puede realizar un *screening* a grandes rasgos mediante estudios genómicos, en búsqueda de modificaciones en los dos sistemas CRISPR-Cas descritos en *Salmonella* spp. (Shariat *et al.* 2015) y búsqueda de SNP en genes estructurales de la bacteria que hayan sido descritos como posibles receptores bacterianos (Botka *et al.* 2019, Bertozzi *et al.* 2016). Costa *et al.* 2019 reporta la tasa de emergencia de resistentes comparando entre el uso de un solo fago y la combinación de dos fagos en modelo de *S. Typhimurium* obteniendo una menor tasa de emergencia de resistencia al utilizar los fagos de forma individual. Por otro lado en Chan *et al.* 2013, reporta que es necesario actualizar dos veces al año las formulaciones de fagos como terapia, para mantener su efectividad. Un ejemplo de esto es el producto comercializado “Intestiphage”, el que debe reformular su contenido de fagos dependiendo de los patógenos circulantes y la resistencia desarrollada en las bacterias de interés, lo que da un indicio de la necesidad de desarrollar una terapia o control local y acorde a las necesidades actuales de los productores de

animales (Pirnay *et al.* 2011). Este último punto refuerza la necesidad de generar herramientas que permitan una selección de fagos de forma eficiente.

Las diferencias observadas entre el fago vB_Si_35FD con los trabajos citados previamente, puede tener diversas explicaciones, este trabajo de tesis se centró en los parámetros cinéticos de los fagos que pudieran explicar esta diferencia de comportamiento entre dos virus distintos con un mismo hospedero. Es así como se determinó la constante de crecimiento (μ) de SI, la cual fue de 0,4 cel/tiempo (Figura suplementaria 1), lo que concuerda con lo informado por Liu (2017). El total de los parámetros asociados a los fagos de este estudio vB_Si_SF20-2 y vB_Si_35FD, fueron expuestos en la Tabla 1. La constante de adsorción (δ) obtenida en ambos fagos fue de $1,12 \times 10^{-9}$ y $6,8 \times 10^{-10}$ 1/(cél/mL·min), cuyos valores son concordantes con lo reportado anteriormente. Tal como lo reporta Abedon (2009), donde realiza un análisis en base al modelo publicado por Wang *et al.* 1996, determinando que las constantes de adsorción varían entre 10^{-8} hasta 10^{-10} mL/min. Acorde

a Hyman *et al.* 2009, se describen los parámetros que influyen esta constante, tales como la bacteria hospedera, su tamaño, la estabilidad de su membrana en el medio utilizado y su estado fisiológico, además, de la estabilidad del fago.

El periodo de latencia (**L**) y tasa de eclosión (β) para los fagos de este estudio vB_Si_SF20-2 y vB_Si_35FD, fueron de 40 min con una liberación de 30 partículas y 20 min con una tasa de eclosión de 90 partículas, respectivamente. El fago vB_Si_35FD presentó un menor **L** y β respecto al fago vB_Si_SF20-2, donde la bibliografía no se describen rangos establecidos de estos parámetros. Carey Smith *et al.* 2006, reportaron un **L** de 50 min y un β de 139 partículas virales para un fago infectante de *Salmonella* spp. Kropinsky (2017), expone los desafíos experimentales que presenta la curva de un ciclo, ya que se asume que entre el 90-95% de los fagos del medio son adsorbidos por las bacterias. También se menciona la importancia de trabajar rápido, pero de forma precisa, debido a los cortos tiempos de medición, con el objetivo de obtener parámetros certeros, donde

las replicas son de importancia para tener datos de calidad que sean consistentes entre ellos (Kropinsky, 2017). Ésto es de suma relevancia para tener una simulación acorde al diseño del modelo matemático lo más cercana a las condiciones reales.

En el caso del diseño del modelo de acción de masas conformado por las ecuaciones diferenciales, éste se basó en el modelo descrito por Levin *et al.* 1977. Si bien en esta tesis se explicaron las asunciones realizadas, es importante recalcar que el modelo intenta asemejarse a las condiciones experimentales, pero sus resultados son una estimación.

En cuanto a los resultados obtenidos mediante el software Berkeley Madonna para los fagos vB_Si_SF20-2 y vB_Si_35FD (Figuras 10 y 11, respectivamente), al comparar estos resultados, se determino que el fago vB_Si_35FD fue capaz de alcanzar el nivel de refugio en menor tiempo que el fago vB_Si_SF20-2, bajo los mismos valores de MOI, por lo que tendría

una mayor capacidad lítica, tomando en consideración los parámetros cinéticos de ambos fagos, además de los relacionados a la bacteria hospedera, lo que concuerda con lo obtenido de forma experimental previamente.

Para concluir, de acuerdo con los resultados de simulación, estos fueron concordantes con la data experimental, donde el fago vB_Si_35FD fue capaz de reducir significativamente la población de bacterias susceptibles en mayor proporción que el fago vB_Si_SF20-2 en iguales condiciones, por lo que presenta una mayor capacidad lítica. Este modelo diseñado especialmente para este trabajo tiene el potencial de ser una herramienta de predicción basada en los parámetros cinéticos de δ , L y β , el cual presenta una alta utilidad para una pre-selección de posibles candidatos para su uso como biocontrol. Si bien, esto se debe sustentar con el trabajo experimental, una vez calibrada la herramienta, se acortarían los tiempos de selección de fagos.

15. Conclusiones

Como conclusión principal, se obtuvo que la hipótesis de este proyecto fue comprobada. Utilizando los parámetros cinéticos de constante de adsorción, periodo de latencia y tasa de eclosión como variables del modelo matemático, fue posible predecir la capacidad lítica de un fago. En particular, a través de la simulación se pudo determinar que el fago vB_Si_35FD fue capaz de reducir en menor tiempo la población de bacterias susceptibles que vB_Si_SF20-2, es decir que presentó una mayor capacidad lítica, lo que se comprobó de forma experimental.

16. Referencias

- Abedon, S. T. (2009). Kinetics of phage-mediated biocontrol of bacteria. *Foodborne Pathogens and Disease*, 6(7), 807–815. <https://doi.org/10.1089/fpd.2008.0242>
- Abedon, S. T. (2017). Information phage therapy research should report. *Pharmaceuticals*, 10(2), 1–17. <https://doi.org/10.3390/ph10020043>
- Abedon, S. T., & Yin, J. (2009). Chapter 17 Bacteriophage Plaques: Theory and Analysis. *Bacteriophages: Methods and Protocols, Volume 1*, 501, 161–175. <https://doi.org/10.1007/978-1-60327-164-6>
- Adhikari, B., Angulo, F., & Meltzer, M. (2004). Economic Burden of *Salmonella* Infections in the United States. *American Agricultural Economics Association Annual Meeting, May*, 1–21.
- Airoldi, A. A., & Zottola, E. A. (1988). Growth and Survival of *Salmonella* Typhimurium at Low Temperature in Nutrient Deficient Media. *Journal of Food Science*, 53(5), 1511–1513. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1988.tb09311.x>
- Alegria-Moran, R., Rivera, D., Toledo, V., Moreno-Switt, A. I., & Hamilton-West, C. (2017). First detection and characterization of *Salmonella* spp. In poultry and swine raised in backyard production systems in central Chile. *Epidemiology and Infection*, 145(15), 3180–3190. <https://doi.org/10.1017/S0950268817002175>
- Antunes, P., Mourão, J., Campos, J., & Peixe, L. (2016). Salmonellosis: The role of poultry meat. *Clinical Microbiology and Infection*, 22(2), 110–121. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.12.004>
- Aviv, G., Tsyba, K., Steck, N., Salmon-Divon, M., Cornelius, A., Rahav, G., Grassl, G. A., & Gal-Mor, O. (2014). A unique megaplasmid contributes to stress tolerance and pathogenicity of an emergent *Salmonella enterica* serovar Infantis strain. *Environmental Microbiology*, 16(4), 977–994. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12351>

- Benkovic, S. J., & Spiering, M. M. (2017). Understanding DNA replication by the bacteriophage T4 replisome. *Journal of Biological Chemistry*, 292(45), 18434–18442. <https://doi.org/10.1074/jbc.R117.811208>
- Beretta, E., and Kuang, Y. (1998). Modeling and analysis of a marine bacteriophage infection. *Math. Biosci.* 149, 57–76. doi: 10.1016/S0025-5564(97)10015-3
- Bertozzi Silva, J., Storms, Z., & Sauvageau, D. (2016). Host receptors for bacteriophage adsorption. *FEMS Microbiology Letters*, 363(4), 1–11. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw002>
- Besser, J. M. (2018). *Salmonella* epidemiology: A whirlwind of change. *Food Microbiology*, 71, 55–59. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.08.018>
- Bikard, D., & Marraffini, L. A. (2012). Innate and adaptive immunity in bacteria: Mechanisms of programmed genetic variation to fight bacteriophages. *Current Opinion in Immunology*, 24(1), 15–20. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2011.10.005>
- Botka, T., Pantůček, R., Mašlaňová, I., Benešík, M., Petráš, P., Růžičková, V., Havlíčková, P., Varga, M., Žemličková, H., Koláčková, I., Florianová, M., Jakubů, V., Karpíšková, R., & Doškař, J. (2019). Lytic and genomic properties of spontaneous host-range Kayvirus mutants prove their suitability for upgrading phage therapeutics against staphylococci. *Scientific Reports*, 9(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41868-w>
- Borie, C., Hauva, C., Quiroga, J., Bravo, V., Sánchez, M. L., Morales, M. A., Retamal, P., Retamales, J., & Robeson, J. (2011). Uso de bacteriófagos en gallinas de postura infectadas con *Salmonella enterica* serotipo Enteritidis: Prevención de la colonización intestinal y reproductiva. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 43(1), 85–89. <https://doi.org/10.4067/S0301-732X2011000100012>
- Bruce R. Levin, Frank M. Stewart, and L. C. (1977). Resource-limited growth, competition, and predation: A model and experimental studies with bacteria and bacteriophage 1. *The American Naturalist*. 111(977), 3–24.
- Callow, B. R. (1943). *Felix A, Callow BR. Typing of paratyphoid B bacilli by Vi bacteriophage. Br Med J 1943;2(4308):127– 130.*
- Campbell, A. (1961). Conditions for the existence of bacteriophage. *Evolution* 15, 153–165. doi:10.2307/2406076

- Carey-Smith, G. V., Billington, C., Cornelius, A. J., Hudson, J. A., & Heinemann, J. A. (2006). Isolation and characterization of bacteriophages infecting *Salmonella* spp. *FEMS Microbiology Letters*, 258(2), 182–186. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00217.x>
- Carfora, V., Alba, P., Leekitcharoenphon, P., Ballarò, D., Cordaro, G., Matteo, P. Di, Donati, V., Ianzano, A., Iurescia, M., Stravino, F., Tagliaferri, T., Battisti, A., & Franco, A. (2018). Colistin resistance mediated by mcr-1 in ESBL-producing, multidrug resistant *Salmonella* Infantis in broiler chicken industry, Italy (2016-2017). *Frontiers in Microbiology*, 9(AUG). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01880>
- Center for Disease Control (CDC) and Prevention. National Enteric Disease Surveillance: *Salmonella* Annual Summary. Available online: <https://www.cdc.gov/nationalsurveillance/pdfs/2016-Salmonella-report-508.pdf> (2016)
- Chaudhry, W. N., Pleška, M., Shah, N. N., Weiss, H., McCall, I. C., Meyer, J. R., Gupta, A., Guet, C. C., & Levin, B. R. (2018). Leaky resistance and the conditions for the existence of lytic bacteriophage. *PLoS Biology*, 16(8), 1–23. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2005971>
- Chan, B. K., Abedon, S. T., & Loc-Carrillo, C. (2013). Phage cocktails and the future of phage therapy. *Future Microbiology*, 8(6), 769–783. <https://doi.org/10.2217/fmb.13.47>
- Chile, & MINSAL. (1996). *Reglamento Sanitario de los Alimentos - Decreto 977/1996*. 13, 182. [http://web.minsal.cl/sites/default/files/files/DECRETO_977_96 actualizado a Enero 2015\(1\).pdf](http://web.minsal.cl/sites/default/files/files/DECRETO_977_96_actualizado_a_Enero_2015(1).pdf)
- Clark, J. R., & March, J. B. (2006). Bacteriophages and biotechnology: vaccines, gene therapy and antibacterials. *Trends in Biotechnology*, 24(5), 212–218. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2006.03.003>
- Clokier, M. R. J., & Kropinski, A. M. (2009). Bacteriophages: methods and protocols. *Methods in Molecular Biology*, 501, xxii, 307 p. <https://doi.org/10.1007/978-1-60327-164-6>
- Costa, P., Pereira, C., Gomes, A. T. P. C., & Almeida, A. (2019). Efficiency of single phage suspensions and phage cocktail in the inactivation of *Escherichia coli* and

- Salmonella typhimurium*: An in vitro preliminary study. *Microorganisms*, 7(4).
<https://doi.org/10.3390/microorganisms7040094>
- Crane, D. D., Martin, L. D., & Hirsh, D. C. (1984). Detection of *Salmonella* in feces by using Felix-01 bacteriophage and high-performance liquid chromatography. *Journal of Microbiological Methods*, 2(5), 251–256. [https://doi.org/10.1016/0167-7012\(84\)90020-4](https://doi.org/10.1016/0167-7012(84)90020-4)
- D'Aoust, J. Y. (1991). Pathogenicity of foodborne *Salmonella*. *International Journal of Food Microbiology*, 12(1), 17–40. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(91\)90045-Q](https://doi.org/10.1016/0168-1605(91)90045-Q)
- Dion, M. B., Oechslin, F., & Moineau, S. (2020). Phage diversity, genomics and phylogeny. *Nature Reviews Microbiology*, 18(3), 125–138.
<https://doi.org/10.1038/s41579-019-0311-5>
- Dunne, M., Denyes, J. M., Arndt, H., Loessner, M. J., Leiman, P. G., & Klumpp, J. (2018). *Salmonella* Phage S16 Tail Fiber Adhesin Features a Rare Polyglycine Rich Domain for Host Recognition. *Structure*, 26(12), 1573-1582.e4.
<https://doi.org/10.1016/j.str.2018.07.017>
- Eng, S. K., Pusparajah, P., Ab Mutalib, N. S., Ser, H. L., Chan, K. G., & Lee, L. H. (2015). *Salmonella*: A review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. *Frontiers in Life Science*, 8(3), 284–293.
<https://doi.org/10.1080/21553769.2015.1051243>
- Fernández, L., Rodríguez, A., & García, P. (2018). Phage or foe: An insight into the impact of viral predation on microbial communities. *ISME Journal*, 12(5), 1171–1179. <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0049-5>
- Formulae, A., & The, O. F. (2007). *Antigenic formulae of the Salmonella serovars*.
<https://www.pasteur.fr/ip/portal/action/WebdriveActionEvent/oid/01s-000036-089>
- Game, A. N., Densities, R., & Growth, B. (2017). *crossm*. 8(1), 1–13.
- García, R., Latz, S., Romero, J., Higuera, G., García, K., & Bastías, R. (2019). Bacteriophage production models: An overview. *Frontiers in Microbiology*, 10(JUN), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01187>
- Guenther, S., Herzig, O., Fieseler, L., Klumpp, J., & Loessner, M. J. (2012). Biocontrol of *Salmonella Typhimurium* in RTE foods with the virulent bacteriophage FO1-E2.

International Journal of Food Microbiology, 154(1–2), 66–72.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.12.023>

Hirsh, D. C., & Martin, L. D. (1983). Detection of *Salmonella* spp. in milk by using Felix-O1 bacteriophage and high-pressure liquid chromatography. *Applied and Environmental Microbiology*, 46(5), 1243–1245.
<https://doi.org/10.1128/aem.46.5.1243-1245.1983>

Hooton, S. P. T., Atterbury, R. J., & Connerton, I. F. (2011). Application of a bacteriophage cocktail to reduce *Salmonella* Typhimurium U288 contamination on pig skin. *International Journal of Food Microbiology*, 151(2), 157–163.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.015>

Hudson P. Helen, Lindberg A. A. and B. A. D. Stocker. (1978). Lipopolysaccharide Core Defects In *Salmonella* typhimurium mutants wich are resistant to Felix O phage but retain smooth character. *Journal of General Microbiology*, 109. 97–112.

Hussain, M. A., & Dawson, C. O. (2013). Economic Impact of Food Safety Outbreaks on Food Businesses. *Foods (Basel, Switzerland)*, 2(4), 585–589.
<https://doi.org/10.3390/foods2040585>

Informativo de Observatorio en Inocuidad y Calidad Alimentaria (2018). INFOBIC, ACHIPIA, Ministerio de Agricultura, Chile. 1-5.

Instituto de Salud Publica. Ministerio De Salud. Gobierno de Chile. (2019). *Salmonella* spp. 2014-2018. *Boletín de Vigilancia de Laboratorio*, 9(13), 1–56.
<http://www.ispch.cl/sites/default/files/BoletínSalmonella-12052020A.pdf>

Johnson, P. J. T., & Levin, B. R. (2013). Pharmacodynamics, Population Dynamics, and the Evolution of Persistence in *Staphylococcus aureus*. *PLoS Genetics*, 9(1).
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003123>

Jungck, J. R. (2011). Mathematical biology education: Modeling makes meaning. *Mathematical Modelling of Natural Phenomena*, 6(6), 1–21.
<https://doi.org/10.1051/mmnp/20116601>

Kasman, L. M., Kasman, A., Westwater, C., Dolan, J., Schmidt, M. G., & Norris, J. S. (2002). Overcoming the Phage Replication Threshold: a Mathematical Model with Implications for Phage Therapy. *Journal of Virology*, 76(11), 5557–5564.
<https://doi.org/10.1128/jvi.76.11.5557-5564.2002>

- Kokkari, C., Sarropoulou, E., Bastias, R., Mandalakis, M., & Katharios, P. (2018). Isolation and characterization of a novel bacteriophage infecting *Vibrio alginolyticus*. *Archives of Microbiology*, 200(5), 707–718. <https://doi.org/10.1007/s00203-018-1480-8>
- Kuhn, J. C. (2007). Detection of *Salmonella* by bacteriophage Felix 01. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 394, 21–37. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-512-1_2
- Kuhn, J., Suissa, M., Chiswell, D., Azriel, A., Berman, B., Shahar, D., Reznick, S., Sharf, R., Wyse, J., Bar-On, T., Cohen, I., Giles, R., Weiser, I., Lubinsky-Mink, S., & Ulitzur, S. (2002). A bacteriophage reagent for *Salmonella*: Molecular studies on Felix 01. *International Journal of Food Microbiology*, 74(3), 217–227. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00682-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00682-1)
- Kuhn, J., Suissa, M., Wyse, J., Cohen, I., Weiser, I., Reznick, S., Lubinsky-Mink, S., Stewart, G., & Ulitzur, S. (2002). Detection of bacteria using foreign DNA: The development of a bacteriophage reagent for *Salmonella*. *International Journal of Food Microbiology*, 74(3), 229–238. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00683-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00683-3)
- Krysiak-Baltyn, K., Martin, G. J. O., Stickland, A. D., Scales, P. J., and Gras, S. L. (2016). Computational models of populations of bacteria and lytic phage. *Crit. Rev. Microbiol.* 42, 942–968. doi: 10.3109/1040841X.2015.1114466
- Lapierre, L., Cornejo, J., Zavala, S., Galarce, N., Sánchez, F., Benavides, M. B., Guzmán, M., & Sáenz, L. (2020). Phenotypic and genotypic characterization of virulence factors and susceptibility to antibiotics in *Salmonella* Infantis strains isolated from chicken meat: First findings in Chile. *Animals*, 10(6), 1–15. <https://doi.org/10.3390/ani10061049>
- Levin, B. R., & Bull, J. J. (2004). Population and evolutionary dynamics of phage therapy. *Nature Reviews Microbiology*, 2(2), 166–173. <https://doi.org/10.1038/nrmicro822>
- Levin, B. R., Bull, J. J., & Url, S. (1996). *The University of Chicago Phage Therapy Revisited : The Population Biology of a Bacterial Infection and Its Treatment with Bacteriophage and Antibiotics Reviewed work (s)*: Phage therapy revisited : the population biology of a bacterial infection and its.

- Lindberg, A. A., & Holme, T. (1969). Influence of O side chains on the attachment of the Felix O-1 bacteriophage to *Salmonella* bacteria. *Journal of Bacteriology*, 99(2), 513–519. <https://doi.org/10.1128/jb.99.2.513-519.1969>
- Liu, S. (2017). How Cells Grow. In *Bioprocess Engineering*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-63783-3.00011-3>
- Loc-Carrillo, C., & Abedon, S. T. (2011). Pros and cons of phage therapy. *Bacteriophage*, 1(2), 111–114. <https://doi.org/10.4161/bact.1.2.14590>
- Mahony, J., McAuliffe, O., Ross, R. P., & van Sinderen, D. (2011). Bacteriophages as biocontrol agents of food pathogens. *Current Opinion in Biotechnology*, 22(2), 157–163. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.10.008>
- Majowicz, S. E., Musto, J., Scallan, E., Angulo, F. J., Kirk, M., O'Brien, S. J., Jones, T. F., Fazil, A., & Hoekstra, R. M. (2010). The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. *Clinical Infectious Diseases*, 50(6), 882–889. <https://doi.org/10.1086/650733>
- McConnell, M. R., & Schoelz, J. E. (1983). Evidence for shorter average O-polysaccharide chainlength in the lipopolysaccharide of a bacteriophage felix 01-sensitive variant of *Salmonella anatum* A1. *Journal of General Microbiology*, 129(10), 3177–3184. <https://doi.org/10.1099/00221287-129-10-3177>
- Monod, J. (1950). A Certain Number. *Annual Reviews in M*, 3(XI), 371–394.
- Moreno Switt, A. I., Orsi, R. H., den Bakker, H. C., Vongkamjan, K., Altier, C., & Wiedmann, M. (2013). Genomic characterization provides new insight into *Salmonella* phage diversity. *BMC Genomics*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-481>
- Pallasch, T. J. (1996). Pharmacokinetic principles of antimicrobial therapy. *Periodontology* 2000, 10(1), 5–11. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.1996.tb00065.x>
- Para, S. P. P., & Carne, E. D. E. (2012). *Instructivo De Verificación Oficial De Salmonella I-Pp-It-iii*.
- Park, M., Lee, J. H., Shin, H., Kim, M., Choi, J., Kang, D. H., Heu, S., & Ryu, S. (2012). Characterization and comparative genomic analysis of a novel bacteriophage,

SFP10, simultaneously inhibiting both *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(1), 58–69.
<https://doi.org/10.1128/AEM.06231-11>

Payne, R. J. H., & Jansen, V. A. A. (2000). Phage therapy: The peculiar kinetics of self-replicating pharmaceuticals. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 68(3), 225–230. <https://doi.org/10.1067/mcp.2000.109520>

Pirnay, J. P., De Vos, D., Verbeken, G., Merabishvili, M., Chanishvili, N., Vaneechoutte, M., Zizi, M., Laire, G., Lavigne, R., Huys, I., Van Den Mooter, G., Buckling, A., Debarbieux, L., Pouillot, F., Azeredo, J., Kutter, E., Dublanchet, A., Górski, A., & Adamia, R. (2011). The phage therapy paradigm: Prêt-à-porter or sur-mesure? *Pharmaceutical Research*, 28(4), 934–937. <https://doi.org/10.1007/s11095-010-0313-5>

Quirós, F. J., Zarco, P., Carmona, L., Collantes, E., Simón, F., Rodero, I., Martín, C., Alonso, J. P., Pousa, A., Castilla, J., & Rivas, A. (2007). Artritis reactiva por *Salmonella* hadar en la epidemia de gastroenteritis asociada al consumo de pollo precocinado en España. *Reumatología Clínica*, 3(EXTRA.2), 36–38.
[https://doi.org/10.1016/s1699-258x\(07\)73639-2](https://doi.org/10.1016/s1699-258x(07)73639-2)

Rakhuba, D. V., Kolomiets, E. I., Szwajcer Dey, E., & Novik, G. I. (2010). Bacteriophage receptors, mechanisms of phage adsorption and penetration into host cell. *Polish Journal of Microbiology*, 59(3), 145–155. <https://doi.org/10.33073/pjm-2010-023>

Receptor for Felix 0-1 Phage in. (1967). 225–233.

Rivera, D., Hudson, L. K., Denes, T. G., Hamilton-West, C., Pezoa, D., & Moreno-Switt, A. I. (2019). Two phages of the genera *Felixunavirus* subjected to 12 hour challenge on *Salmonella* Infantis showed distinct genotypic and phenotypic changes. *Viruses*, 11(7), 1–21. <https://doi.org/10.3390/v11070586>

Rivera, D., Toledo, V., Pillo, F. D. I., Dueñas, F., Tardone, R., Hamilton-West, C., Vongkamjan, K., Wiedmann, M., & Moreno Switt, A. I. (2018). Backyard Farms Represent a Source of Wide Host Range *Salmonella* Phages That Lysed the Most Common *Salmonella* Serovars. *Journal of Food Protection*, 81(2), 272–278.
<https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-17-075>

- Santos, S. B., Carvalho, C., Azeredo, J., & Ferreira, E. C. (2014). Population dynamics of a *Salmonella* lytic phage and its host: Implications of the host bacterial growth rate in modelling. *PLoS ONE*, *9*(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102507>
- Shariat, N., Timme, R. E., Pettengill, J. B., Barrangou, R., & Dudley, E. G. (2015). Characterization and evolution of *Salmonella* CRISPR-Cas systems. *Microbiology (United Kingdom)*, *161*(2), 374–386. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000005>
- Scallan, E., Hoekstra, R. M., Angulo, F. J., Tauxe, R. V., Widdowson, M. A., Roy, S. L., Jones, J. L., & Griffin, P. M. (2011). Foodborne illness acquired in the United States—Major pathogens. *Emerging Infectious Diseases*, *17*(1), 7–15. <https://doi.org/10.3201/eid1701.P11101>
- Schatten, H., & Eisenstark, A. (2014). *Salmonella*: Methods and protocols: Second edition. In *Salmonella: Methods and Protocols: Second Edition* (Vol. 1225). <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1625-2>
- Shao, Y., & Wang, I. N. (2008). Bacteriophage adsorption rate and optimal lysis time. *Genetics*, *180*(1), 471–482. <https://doi.org/10.1534/genetics.108.090100>
- Sinha, S., Grewal, R. K., & Roy, S. (2018). Modeling Bacteria–Phage Interactions and Its Implications for Phage Therapy. In *Advances in Applied Microbiology* (1st ed., Vol. 103). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2018.01.005>
- Suttle, C. A. (2007). Marine viruses - Major players in the global ecosystem. *Nature Reviews Microbiology*, *5*(10), 801–812. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1750>
- Switt, A. I., den Bakker, H. C., Vongkamjan, K., Hoelzer, K., Warnick, L. D., Cummings, K. J., Wiedmann, M. (2013). *Salmonella* bacteriophage diversity reflects host diversity on dairy farms. *Food microbiology*, *36*(2), 275–285. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.06.014>
- Szmolka, A., Szabó, M., Kiss, J., Pászti, J., Adrián, E., Olasz, F., & Nagy, B. (2018). Molecular epidemiology of the endemic multiresistance plasmid pSI54/04 of *Salmonella* Infantis in broiler and human population in Hungary. *Food Microbiology*, *71*, 25–31. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.03.011>
- Takahashi, M., & Aoyagi, H. (2020). Analysis and effect of conventional flasks in shaking culture of *Escherichia coli*. *AMB Express*, *10*(1), 4–9. <https://doi.org/10.1186/s13568-020-01013-7>

- Tate, H., Folster, J. P., Hsu, C. H., Chen, J., Hoffmann, M., Li, C., Morales, C., Tyson, G. H., Mukherjee, S., Brown, A. C., Green, A., Wilson, W., Dessai, U., Abbott, J., Joseph, L., Haro, J., Ayers, S., McDermott, P. F., & Zhao, S. (2017). Comparative analysis of extended-spectrum- β -lactamase CTX-M-65-producing *Salmonella enterica* serovar Infantis isolates from humans, food animals, and retail chickens in the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(7), 1–11. <https://doi.org/10.1128/AAC.00488-17>
- Taylor, N. M. I., Prokhorov, N. S., Guerrero-Ferreira, R. C., Shneider, M. M., Browning, C., Goldie, K. N., Stahlberg, H., & Leiman, P. G. (2016). Structure of the T4 baseplate and its function in triggering sheath contraction. *Nature*, 533(7603), 346–352. <https://doi.org/10.1038/nature17971>
- Terms, F. (2011). On an invisible microbe antagonistic to dysentery bacilli. Note by M. F. d'Herelle, presented by M. Roux. *Comptes Rendus Academie des Sciences 1917*; 165:373–5. *Bacteriophage*, 1(1), 3–5. <https://doi.org/10.4161/bact.1.1.14941>
- Tolstoy Igor, Andrew M. Kropinski, and J. R. B. (2018). Bacteriophage Taxonomy: An Evolving Discipline. *Bacteriophage Therapy - From Lab to Clinical Practice*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1693(3), 649–659. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7395-8>
- Wang, I., Dykhuizen, D.E. & Slobodkin, L.B. (1996). The evolution of phage lysis timing. *Evol Ecol* 10, 545–558 <https://doi.org/10.1007/BF01237884>
- Welkos, S., Schreiber, M., & Baer, H. (1974). Identification of *Salmonella* with the O-1 Bacteriophage. *Applied Microbiology*, 28(4), 618–622. <https://doi.org/10.1128/aem.28.4.618-622.1974>
- Whichard, J. M., Sriranganathan, N., & Pierson, F. W. (2003). Suppression of *Salmonella* growth by wild-type and large-plaque variants of bacteriophage Felix O1 in liquid culture and on chicken frankfurters. *Journal of Food Protection*, 66(2), 220–225. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-66.2.220>
- Whichard, J. M., Weigt, L. A., Borris, D. J., Li, L. L., Zhang, Q., Kapur, V., William Pierson, F., Lingohr, E. J., She, Y. M., Kropinski, A. M., & Sriranganathan, N. (2010). Complete genomic sequence of Bacteriophage Felix O1. *Viruses*, 2(3), 710–730. <https://doi.org/10.3390/v2030710>

- Won, G., Hajam, I. A., & Lee, J. H. (2017). Improved lysis efficiency and immunogenicity of *Salmonella* ghosts mediated by co-expression of λ phage holin-endolysin and ψ x174 gene e. *Scientific Reports*, 7(February), 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep45139>
- Yeh, Y., Purushothaman, P., Gupta, N., Ragnone, M., Verma, S. C., & de Mello, A. S. (2017). Bacteriophage application on red meats and poultry: Effects on *Salmonella* population in final ground products. *Meat Science*, 127, 30–34. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2017.01.001>
- Yokoyama, E., Ando, N., Ohta, T., Kanada, A., Shiwa, Y., Ishige, T., Murakami, K., Kikuchi, T., & Murakami, S. (2015). A novel subpopulation of *Salmonella enterica* serovar Infantis strains isolated from broiler chicken organs other than the gastrointestinal tract. *Veterinary Microbiology*, 175(2–4), 312–318. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.11.024>
- Young, R., & Bläsi, U. (1995). Holins: form and function in bacteriophage lysis. *FEMS Microbiology Reviews*, 17(1–2), 191–205. [https://doi.org/10.1016/0168-6445\(94\)00079-4](https://doi.org/10.1016/0168-6445(94)00079-4)
- Zhang, J., Kraft, B. L., Pan, Y., Wall, S. K., Saez, A. C., & Ebner, P. D. (2010). Development of an anti-*Salmonella* phage cocktail with increased host range. *Foodborne Pathogens and Disease*, 7(11), 1415–1419. <https://doi.org/10.1089/fpd.2010.0621>

17. Anexos.

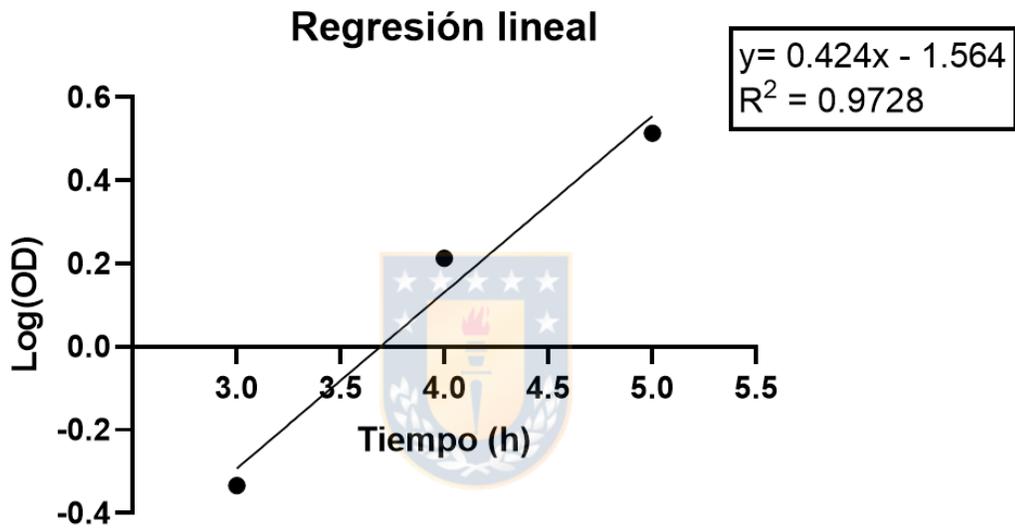


Figura suplementaria 1.

Regresión lineal de datos de DO medidos en la fase exponencial de la curva de crecimiento de *S. Infantis*. En base a la ecuación de la recta la μ es de 0,4 células/hora.

Tabla suplementaria 1.

Datos de reducción de población por hora de población de *S. Infantis* infectada con fago vB_Si_35FD a una MOI de 10.

Tiempo (horas)	Control SI Log(UFC/mL)	SI + vB_Si_35FD Log(UFC/mL)	Reducción de SI Log(UFC/mL)
0	5,79	6,05	-0,26
1	5,94	5,94	0
2	6,51	3,48	3,03
3	6,99	3,00	3,99
4	9,15	3,30	5,84
5	9,58	2,69	6,88
6	8,86	3,85	5,02
7	8,81	4,38	4,43
Promedio de reducción en Log(UFC/mL)			4,87

Tabla suplementaria 2.

Datos de reducción de medición de DO por hora para la población de *S. Infantis* infectada con fago vB_Si_35FD a una MOI de 10.

Tiempo (horas)	Control SI DO ^a	SI + vB_Si_35FD DO	Reducción de SI DO
0	0,012	0,010	0,002
1	0,034	0,025	0,009
2	0,080	0,070	0,010
3	0,464	0,197	0,267
4	1,633	0,100	1,533
5	3,266	0,041	3,225
6	3,610	0,044	3,566
7	3,570	0,094	3,476
Promedio de reducción en DO			1,511

^a Las mediciones de DO desde la hora 4, primero se diluyeron 1:2 con CT (caldo tripticasa) para realizar la medición, ya que la turbidez se encontraba sobre el límite de detección.