

Escuela Superior Politécnica del Litoral

Facultad de Ciencias de la Vida

“Evaluación de cambios fenotípicos en cepas de *Salmonella* Infantis tras la adquisición de resistencia al bacteriófago 35fd”

[VIDA-381]

Previo la obtención del Título de:

Licenciada en Biología

Presentado por:

Angie Nicole Pozo Cedeño

Guayaquil - Ecuador

Año: 2024

Dedicatoria

El presente proyecto lo dedico con todo mi cariño y gratitud a mi abuela, quien ha sido un faro de sabiduría, fortaleza y amor incondicional a lo largo de mi vida. Ella ha sido mi ejemplo y la inspiración constante para seguir adelante, sin importar los obstáculos. A mi familia, por su apoyo constante y confianza, sin la cual este logro no habría sido posible. A la profesora Marynes quien me motivó para continuar en el proceso de la beca, en donde se realizó el presente proyecto. A mis queridas amigas Steffany, Romina, Gisella y Melissa por haberme brindado su apoyo y compañía durante momentos difíciles, por demostrarme lo valiosa que es la amistad verdadera lo que me ayudó a seguir adelante y a mantener la motivación para culminar mi proyecto.

Agradecimientos

Mi más sincero agradecimiento a la profesora Marynes Montiel, porque su apoyo incondicional, el aprendizaje y la paciencia fueron fundamentales para el éxito de este proyecto. A mis compañeros de laboratorio, quienes, con su cariño, paciencia y generosidad, resolvieron mis dudas y me motivaron a seguir adelante en los momentos de incertidumbre. A la Beca Manuela Sáenz, por brindarme la oportunidad de ser parte de este proyecto y por otorgarme los recursos para culminar este trabajo con éxito. Finalmente, mi más profundo agradecimiento a la Pontificia Universidad Católica de Chile y al laboratorio de Medicina Veterinaria por ofrecerme un espacio de aprendizaje y por brindarme las herramientas necesarias para llevar a cabo esta investigación, lo que ha sido clave en mi desarrollo como profesional y en mi formación académica.

Declaración Expresa

Yo Angie Nicole Pozo Cedeño acuerdo y reconozco que:

La titularidad de los derechos patrimoniales de autor (derechos de autor) del proyecto de graduación corresponderá al autor, sin perjuicio de lo cual la ESPOL recibe en este acto una licencia gratuita de plazo indefinido para el uso no comercial y comercial de la obra con facultad de sublicenciar, incluyendo la autorización para su divulgación, así como para la creación y uso de obras derivadas. En el caso de usos comerciales se respetará el porcentaje de participación en beneficios que corresponda a favor del autor.

La titularidad total y exclusiva sobre los derechos patrimoniales de patente de invención, modelo de utilidad, diseño industrial, secreto industrial, software o información no divulgada que corresponda o pueda corresponder respecto de cualquier investigación, desarrollo tecnológico o invención realizada por mí durante el desarrollo del proyecto de graduación, pertenecerán de forma total, exclusiva e indivisible a la ESPOL, sin perjuicio del porcentaje que me/nos corresponda de los beneficios económicos que la ESPOL reciba por la explotación de mi/nuestra innovación, de ser el caso.

En los casos donde la Oficina de Transferencia de Resultados de Investigación (OTRI) de la ESPOL comunique al autor que existe una innovación potencialmente patentable sobre los resultados del proyecto de graduación, no se realizará publicación o divulgación alguna, sin la autorización expresa y previa de la ESPOL.

Guayaquil, 1 de febrero del 2025.

Angie Pozo Cedeño

Evaluadores

Diego Gallardo Polit

Coordinador de carrera

Marynes Montiel Romero

Tutor de proyecto

Resumen

Salmonella enterica serotipo Infantis (SI) es un patógeno zoonótico de relevancia global, asociado principalmente a productos avícolas. Este microorganismo presenta una notable resistencia a antibióticos de tercera generación, fármacos clave en el tratamiento de infecciones bacterianas. Su capacidad para desarrollar resistencia ha propiciado su expansión y sustitución de otros serotipos más prevalentes a nivel mundial, un fenómeno facilitado por la presencia de un megaplásmido. Aunque se han explorado alternativas contra este patógeno, como el uso de bacteriófagos, la alta tasa de mutación de las bacterias puede inducirles resistencia frente a la lisis mediada por estos fagos lo que complica su desinfección. El investigar la interacción con los fagos y su evolución es crucial para el desarrollo de protocolos de desinfección contra SI. En el presente proyecto se evaluaron los cambios fenotípicos (curvas de crecimiento, presencia del megaplásmido y resistencia a distintos antibióticos) en tres cepas diferentes de SI expuestas al bacteriófago *Felix35fd*. Se obtuvieron 2 cepas mutantes: GC2 y PO2, donde se destaca el aumento de la resistencia hacia antibióticos hasta 8 veces su concentración inicial y la importancia del megaplásmido para su supervivencia.

Palabras Clave: *Salmonella* Infantis, bacteriófago 35fd, resistencia, megaplásmido, antibióticos.

Abstract

Salmonella enterica serotype Infantis (SI) is a zoonotic pathogen of global relevance, mainly associated with poultry products. This microorganism presents a remarkable resistance to third generation antibiotics, key drugs in the treatment of bacterial infections. Its ability to develop resistance has led to its expansion and replacement of other more prevalent serotypes worldwide, a phenomenon facilitated by the presence of a megaplasmid. Although alternatives have been explored against this pathogen, such as the use of bacteriophages, the high mutation rate of the bacteria can induce resistance to lysis mediated by these phages, which complicates their disinfection. Investigating the interaction with phages and their evolution is crucial for the development of disinfection protocols against SI. In the present project, phenotypic changes (growth curves, presence of the megaplasmid and resistance to different antibiotics) were evaluated in three different strains of SI exposed to the bacteriophage *Felix35fd*. Two mutant strains were obtained: GC2 and PO2, where the increase of resistance towards antibiotics up to 8 times their initial concentration and the importance of the megaplasmid for their survival stand out.

Keywords: *Salmonella* Infantis, bacteriophage 35fd, resistance, megaplasmid, antibiotics.

Índice General

Resumen.....	6
Abstract.....	7
Índice de tablas.....	9
Índice de imágenes.....	10
Capítulo 1.....	11
1.2 Descripción del problema.....	12
1.3 Justificación del problema.....	13
1.4.1 Objetivo general.....	14
1.4.2 Objetivos específicos.....	14
1.5 Marco teórico.....	14
Capítulo 2.....	18
2.1 Metodología.....	19
Capítulo 3.....	23
3.1 Resultados.....	24
Capítulo 4.....	31
4. Conclusión y Recomendaciones.....	32
5. Referencias.....	33
6. Anexos.....	37

Índice de tablas

<i>Tabla 1 Secuencia de nucleótidos de los primers FP25 y FP 40. Fuente: Miranda-Riveros et al., 2024.....</i>	<i>20</i>
<i>Tabla 2 Abreviaturas de las cepas obtenidas según su morfología y tamaño.....</i>	<i>24</i>
<i>Tabla 3 Antibióticos de diferentes generaciones utilizados para evaluar la CMI en las cepas mutantes. Las cepas diferenciadas de la cepa original están destacadas en negrita.....</i>	<i>29</i>

Índice de imágenes

Imagen 1 Cepas obtenidas de las 3 fuentes tras la exposición al bacteriófago 35fd.	25
Imagen 2 Resultados del PCR para las verdaderas cepas mutantes GC2 y PO2.....	26
Imagen 3 Curvas de crecimiento de SI en medio TSB realizadas en Excel.	27
Imagen 4 Curvas de crecimiento de SI en medio que simula al hospedero, medio a base de pollo realizadas en Excel.....	28

Capítulo 1

1.2 Descripción del problema

Salmonella Infantis (SI) es un patógeno emergente que afecta principalmente a productos avícolas, aunque también puede encontrarse en vegetales. Desde el año 2000, *S. Infantis* ha experimentado una expansión global, desplazando a serotipos de *Salmonella* más comunes, como Typhimurium y Enteritidis (Lee et al., 2021; Piña-Iturbe et al., 2024). Este serotipo se ha convertido en el más prevalente en las granjas de engorde, representando una amenaza significativa, especialmente en países en vías de desarrollo como Ecuador. La falta de regulación en las comidas callejeras agrava la situación, ya que los alimentos mal preparados e infectados con SI constituyen un peligro considerable para la salud pública. Además, *S. Infantis* es notablemente resistente a los protocolos de desinfección convencionales, siendo uno de los serovares más difíciles de erradicar (Sevilla-Navarro et al., 2024).

Otro aspecto preocupante de *S. Infantis* es su alta resistencia a antimicrobianos, especialmente a los antibióticos de tercera generación, que son de gran importancia en el tratamiento de infecciones bacterianas graves. La resistencia antibiótica en SI se debe en gran parte a la presencia de genes localizados en un megaplásmido denominado *pESI* (plásmido de *Salmonella enterica* Infantis emergente) (Lee et al., 2021).

Además, SI presenta una tasa elevada de mutación, lo que le permite desarrollar resistencia incluso frente a agentes de biocontrol como los bacteriófagos, que son altamente específicos. Esta capacidad de mutación incluye la alteración de regiones específicas del megaplásmido, lo que le permite modificar los receptores de la superficie bacteriana que interactúan con el fago (Gvaladze et al., 2024). Este proceso puede ocurrir en cuestión de horas, permitiendo a la bacteria mantener su resistencia sin perder el megaplásmido.

1.3 Justificación del problema

A pesar de la importancia económica y alimentaria de la industria avícola, esta se encuentra seriamente amenazada por *Salmonella* Infantis debido a su alta resistencia a los antimicrobianos, su persistencia a pesar de los protocolos de desinfección y su capacidad para resistir la lisis mediada por bacteriófagos. Aunque la terapia con fagos ha emergido como una opción prometedora para el control de estos patógenos, algunas cepas bacterianas presentan resistencia a la lisis fagocítica, lo que limita la efectividad de este tratamiento. Esta resistencia se debe a mecanismos complejos, como la alteración de la membrana bacteriana o la producción de sustancias que neutralizan la acción de los fagos. Así, a pesar de los esfuerzos para utilizar los fagos como alternativa terapéutica, las bacterias pueden continuar sobreviviendo y multiplicándose.

Dado este desafío, estudiar cómo las bacterias alteran su fitness, su resistencia a los antibióticos y su curva de crecimiento tras la exposición a los fagos es crucial para comprender los mecanismos de compensación que permiten a las bacterias superar los efectos de los fagos y los antibióticos. Este conocimiento es clave para desarrollar enfoques más efectivos para controlar las infecciones y evitar que las bacterias evolucionen hasta generar resistencia. Además, el problema se agrava en países en desarrollo como Ecuador, donde la alta demanda de comida callejera y la regulación sanitaria limitada aumentan la exposición a patógenos resistentes. Los grupos más vulnerables, como las personas inmunocomprometidas, los niños y los ancianos, corren un mayor riesgo, ya que el tratamiento de infecciones por estas bacterias se ve aún más complicado debido a su resistencia tanto a los antibióticos como a los fagos (Bianchi et al., 2023).

1.4.1 Objetivo general

Evaluar cepas mutantes de *Salmonella* Infantis resistentes al bacteriófago lítico 35fd, procedentes de tres fuentes diferentes (ambiental, de carne de pollo y clínica), obtenidas mediante exposiciones sucesivas y pasajes continuos con el bacteriófago.

1.4.2 Objetivos específicos

- Analizar el fitness bacteriano de las cepas mutantes utilizando curvas de crecimiento en medios de cultivo basados en carne de pollo y TSA.
- Determinar la presencia del megaplásmido y el cambio en la resistencia a antibióticos de las cepas mutantes resistentes al fago, comparando las cepas mutantes y las cepas originales.

1.5 Marco teórico

Salmonella enterica serotipo Infantis (SI) es uno de los patógenos zoonóticos más importantes que puede infectar a diversos animales, siendo los productos avícolas su principal fuente de transmisión, aunque también se encuentra en alimentos vegetales (Gvaladze et al., 2024; Mejia et al., 2020). En la última década, su incidencia ha aumentado notablemente a nivel mundial, alcanzando un incremento del 60%. Este aumento ha llegado a desplazar a serotipos más comunes que causan brotes de enfermedades alimentarias, como *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis* (Brown et al., 2018).

El éxito evolutivo de *Salmonella* Infantis se atribuye a las mutaciones adaptativas en los genes que codifican las girasas de ADN (*gyrA*) y nitroreductasas (*nfsA*), así como a la presencia de un megaplásmido emergente similar al pESI. Este megaplásmido mosaico, de aproximadamente 280 kb, contiene genes que confieren resistencia a antibióticos, como *blaCTX-*

M-65, que le otorga resistencia a cefalosporinas y quinolonas de tercera generación (Brown et al., 2018), así como factores de virulencia como el operón *mer*, fimbrias, y el sistema de captación de hierro yersiniabactina (*ybt*). Estos factores no solo favorecen su adaptación a diversos antimicrobianos, incluyendo antibióticos y metales pesados, sino que también contribuyen a la producción de biopelículas y a su capacidad de invasión (Alvarez et al., 2023; Aviv et al., 2014; Kürekci et al., 2021). La formación de biopelículas es particularmente relevante, ya que protege a la bacteria frente a factores estresantes y facilita la infección cruzada. Además, *Salmonella* *Infantis* es capaz de transferir genes de resistencia a otras bacterias, afectando tanto a la microbiota intestinal como a otros patógenos (Aviv et al., 2016; Davalas et al., 2024).

En el cuerpo humano, *Salmonella* *Infantis* se adhiere a la membrana celular de la célula hospedadora e invade activamente el interior de la célula, donde sobrevive. De esta manera, logra llegar al tracto intestinal, donde se establece (Grzymajlo, 2022). Además, presenta mecanismos para evadir el sistema inmunológico, como la producción de L-asparaginasa II, que potencia su virulencia mientras inhibe la acción de las células T (McLaughlin et al., 2017). Estos mecanismos son clave para su supervivencia y capacidad de causar infecciones persistentes, lo que refuerza su propagación y éxito dentro del huésped.

La presencia de SI y su multirresistencia en este sector está estrechamente relacionada con prácticas de cría en granjas de engorde y el uso incontrolado de antibióticos, utilizados no solo para tratar infecciones, sino también para promover un crecimiento rápido y realizar profilaxis en los animales. La producción avícola es considerada el proveedor de alimentos más importante del mundo, pues representa cerca del 40% de la producción de carnes a nivel mundial, y sigue en expansión debido a la creciente demanda poblacional (Bist et al., 2024;

FAO, 2023). Debido a que, SI infecta principalmente productos avícolas, este fenómeno representa un grave problema para los países en desarrollo y una amenaza considerable para la industria alimentaria global (Calero-Cáceres et al., 2020). Según las cifras a escala global, el mayor número de aislamientos de SI se reporta en el continente americano, donde representa aproximadamente el 43% seguido por Europa con cerca del 30% (Alvarez et al., 2023). En Ecuador, este serotipo es el más común entre las aves de corral. Las cepas de *Salmonella* Infantis ya han sido documentadas en Ecuador, donde han provocado pequeños brotes, como el reportado por Cartelle et al. (2016).

La resistencia de SI a múltiples antibióticos de tercera generación plantea una grave preocupación para la salud pública, dificultando el tratamiento de infecciones en humanos y animales (Kürekci et al., 2021). Este problema es especialmente alarmante para personas inmunocomprometidas, ancianos y niños, quienes podrían requerir tratamiento en casos graves (World Health Organization, 2018). Abordar estos brotes es esencial para un país como Ecuador, que enfrenta bajas tasas de regulación en calidad sanitaria en la industria alimentaria y una significativa venta de alimentos callejeros sin las debidas condiciones de salubridad (Cartelle et al., 2016; Cárdenas et al., 2024; Zurita et al., 2020). Para combatir esta amenaza, se han explorado medidas como el uso de bacteriófagos que provocan la lisis de *Salmonella* Infantis. Sin embargo, esta bacteria tiene la capacidad de mutar en períodos cortos, desarrollando resistencia a los fagos y dando lugar a cepas que son consideradas mutantes (Adler et al., 2021). Aunque el uso de bacteriófagos no está descartado, en lugar de emplear un solo tipo, se crean cócteles de diferentes bacteriófagos que se integran en distintas regiones del genoma de la bacteria, lo que dificulta su mutación. Además del uso de bacteriófagos, los aceites esenciales pueden emplearse como complemento para reducir la carga bacteriana de *S. Infantis*. Estas

opciones son importantes porque actúan como biocontrol y reducen el riesgo de infección por alimentos (Gvaladze et al., 2024; Moon et al., 2020; Sevilla-Navarro et al., 2024). Esto resalta la necesidad de enfoques innovadores y sostenibles para el control de *Salmonella* Infantis en el contexto de la salud pública y la seguridad alimentaria.

Capítulo 2

2.1 Metodología

2.1.1 Obtención de cepas mutantes

Se prepararon placas con agar Tripticasa Soya Agar (TSA) al 1.5% para evaluar tres aislados de *Salmonella* (provenientes de agua, pollo y muestras clínicas) en contra de un fago lítico. Para ello, se prepararon tubos de ensayo con 4 mL de TSA al 0.7%, a los cuales se les agregó 150 μ L de cultivo bacteriano crecido durante la noche y 100 μ L de stock de fago a una concentración de 10^9 ufp/mL. Los tubos fueron homogéneamente mezclados en un vortex y posteriormente se vertieron sobre las placas de agar TSA al 1.5%. Este proceso se repitió para la dilución de fago 10^8 y los diferentes aislados. Después de verter la mezcla, se permitió que la capa de agar se solidificara durante 10-15 minutos. Las placas se incubaron a 37°C durante 18-24 horas. Los procedimientos de inoculación y siembra se repitieron por triplicado para confirmar la resistencia de las colonias a la lisis por el fago, considerando la morfología de las colonias como característica de selección. Tras la incubación, se seleccionaron colonias con morfología diferente y eran rotuladas con una abreviatura descriptiva según su morfología para su distinción. Las colonias aisladas mutantes fueron subcultivadas al menos tres veces en TSA para obtener cultivos puros libres de bacteriófagos. Los cultivos puros se almacenaron a -80°C en Caldo Soja Tripticaseína (TSB) + glicerol al 20% y se conservaron para futuros ensayos.

2.1.2 Extracción y purificación de ADN y PCR

Para la extracción y purificación de ADN se usó el kit de sangre y tejidos DNeasy® de QIAGEN siguiendo el protocolo otorgado por el mismo kit que serviría para realizar la PCR. Para la PCR se usaron primers creados en el laboratorio de Veterinaria de la Pontificia Universidad Católica de Chile por Miranda-Riveros et al., 2024. Los primers identificaban las

regiones altamente conservadas del megaplásmido pESI: FP25 (fimbrial protein 25) y FP40 (fimbrial protein 40) y sus secuencias se muestran en la *Tabla 1*. Para el control negativo se usó la cepa DR006 que no contiene el megaplásmido y para el control positivo de cada cepa se usó la cepa original que también contiene el megaplásmido.

Tabla 1 Secuencia de nucleótidos de los primers FP25 y FP 40. Fuente: Miranda-Riveros et al., 2024.

Primer	Secuencia 5-3
FP25-F	GCTGTCCCTTGCGTTTTTCAG
FP25-R	AAATCTGTCGTGGCGTTTGG
FP40-F	TTATCTCAGGGGGCAGGCTA
FP40-R	TAATCGACGCCCCCATTCTC

2.1.3 Curvas de crecimiento

Se inocularon 180 μL de medio TSB en cada pocillo de una placa de cultivo. El control negativo consistió únicamente en TSB, mientras que el control positivo se preparó añadiendo TSB con la cada una de las cepas mutantes obtenidas. A continuación, se añadieron 20 μL de la cepa bacteriana de SI a una densidad óptica (OD600) aproximada de 0.01, equivalente a 3.3×10^6 UFC/mL. Las placas fueron incubadas a 37°C durante 18-24 horas, monitoreando el crecimiento bacteriano a intervalos de 0.5 horas. Durante este período, se midió la densidad óptica (OD600) en cada punto de tiempo para seguir la cinética de crecimiento de las cepas bacterianas. Se realizaron triplicados para cada cepa y control y se calculó el promedio de las mediciones obtenidas. Al finalizar el experimento, se generaron curvas de crecimiento para cada tratamiento, las cuales se compararon entre la cepa salvaje y la cepa mutante mediante el análisis del área bajo la curva.

2.1.4 Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de antibióticos

Para la concentración mínima inhibitoria se utilizaron 2 medios de cultivo: TSA y medio con carne de pollo. Para ello, se emplearon las cepas mutantes obtenidas previamente. Se establecieron controles experimentales: el control positivo, que consiste en el crecimiento bacteriano sin la adición de fármacos, y el control negativo, que contiene solo el medio sin bacterias. Se tomó un volumen de 400 μL del medio TSA y se diluyó el stock concentrado del antibiótico hasta alcanzar una concentración de 2x, que representa el máximo dentro del rango de diluciones. Se añadieron 100 μL de cada antibiótico diluido en los pocillos de la columna 1. Posteriormente, se añadieron 50 μL de TSA a los pocillos de las columnas 2 a 12 para reducir la concentración de los antibióticos. A partir de la columna 1, se pipetearon 50 μL y se transfirieron a la siguiente columna, repitiendo este proceso hasta llegar a la columna 10, de la cual se descartan 50 μL . Luego, se inocularon 50 μL de la cepa *Salmonella enterica* serotipo Infantis (SI) con una concentración de 10^6 CFU/mL en todos los pocillos, excepto en el control negativo. La placa se incubó durante 18-24 horas a 37°C y, posteriormente, se leyeron los resultados siguiendo los estándares CLSI. Se observaron las concentraciones de antibióticos en donde ya no había formación de colonias y dependiendo del resultado se clasificaron como: Resistentes (R), Sensible (S), Intermedio (I) o No hay Interpretación (NI). Los antibióticos utilizados para esta investigación fueron: Amikacina (AMK), Amoxicilina + Ac. clavulánico (AMC), Ampicilina (AMP), Ampicilina / Sulbactam (SAM), Astreonam (AZT), Cefepima (FEP), Cefotaxima (CTX), Cefotaxima/ Ac. Clavulánico (CTX/DCI), Cefoxitina, Ceftaxidima (CAZ), Ceftaxidima /Ac. Clavulánico (CAZ/DCI), Cefuroxima (CXM), Cefalotina (KF), Cloranfenicol (CLO), Ciprofloxacino (CIP), Colistina (CL), Doripenem, Ertapenem (ETP), Fosfomicina + Glucosa-6-Fosfato (FOS/ G6P), Gentamicina (GE), Imipenem (IPM), Levofloxacino (LFX), Meropenem

(MEM), Minociclina (MIN), Ac. Nalidíxico (NA), Nitrofurantoina (NIT), Piperacilina /Tazobactam (PIP/TZB), Rifampicina (RIF), Tigeciclina y Trimetoprima/Sulfametoxazol (SXT).

2.1.5 Preparación del medio a base de pollo

Se adquirieron pedazos de pechuga de un centro comercial y se cortó en pequeños cuadrados. Posteriormente, el pollo fue homogeneizado con agua destilada en una proporción de 1:10 a 12,000 rpm durante 10 minutos utilizando un ablandador y luego se filtró a través de papel filtro No. 4 para obtener el extracto. Para esterilizar el extracto, se sometió a un proceso de filtración con cámara al vacío seguido y después se realiza alícuotas con jeringa a 0,22 μm , seguido de una pasteurización a 65°C durante 25 minutos.

Para verificar la efectividad del proceso de esterilización, se cultivó el medio TSA y se incubó a 37°C durante 24 horas. Finalmente, se realizó un recuento bacteriano para confirmar la presencia o ausencia de microorganismos en el medio.

2.1.6 Cálculos estadísticos

Se empleó el análisis de varianza (ANOVA) y Kruskal-Wallis para evaluar las diferencias en el área bajo la curva. Para la comparación de medias, se aplicaron pruebas de rango múltiple Dunn test, utilizando un nivel de significancia de $p < 0,05$. El análisis estadístico se llevó a cabo con el software Rstudio 4.4.2 y para el cálculo del área bajo la curva se utilizó el programa Python 3.13.1.

Capítulo 3

3.1 Resultados

3.1.1 Cepas resistentes a la lisis de fagos

Durante los pasajes realizados, se obtuvieron cepas consideradas mutantes debido a su capacidad de crecer en las placas de TSA a pesar de la alta concentración del bacteriófago lítico 35fd. A partir de las 3 cepas originales se obtuvieron 8 cepas que exhibieron diversas morfologías y fueron clasificadas en función del tamaño y la forma de las colonias, como se detalla en la *Tabla 2* y como se observa en la *Imagen 1*.

Tabla 2 Abreviaturas de las cepas obtenidas según su morfología y tamaño.

Nomenclatura	Morfología
PO2	Pequeña Ovalada 2 Pasaje
NA2	No Aislable del 2 Pasaje
GI2	Grande Irregular 2 Pasaje
GC2	Grande circular 2 Pasaje
PI2	Pequeña irregular 2 Pasaje

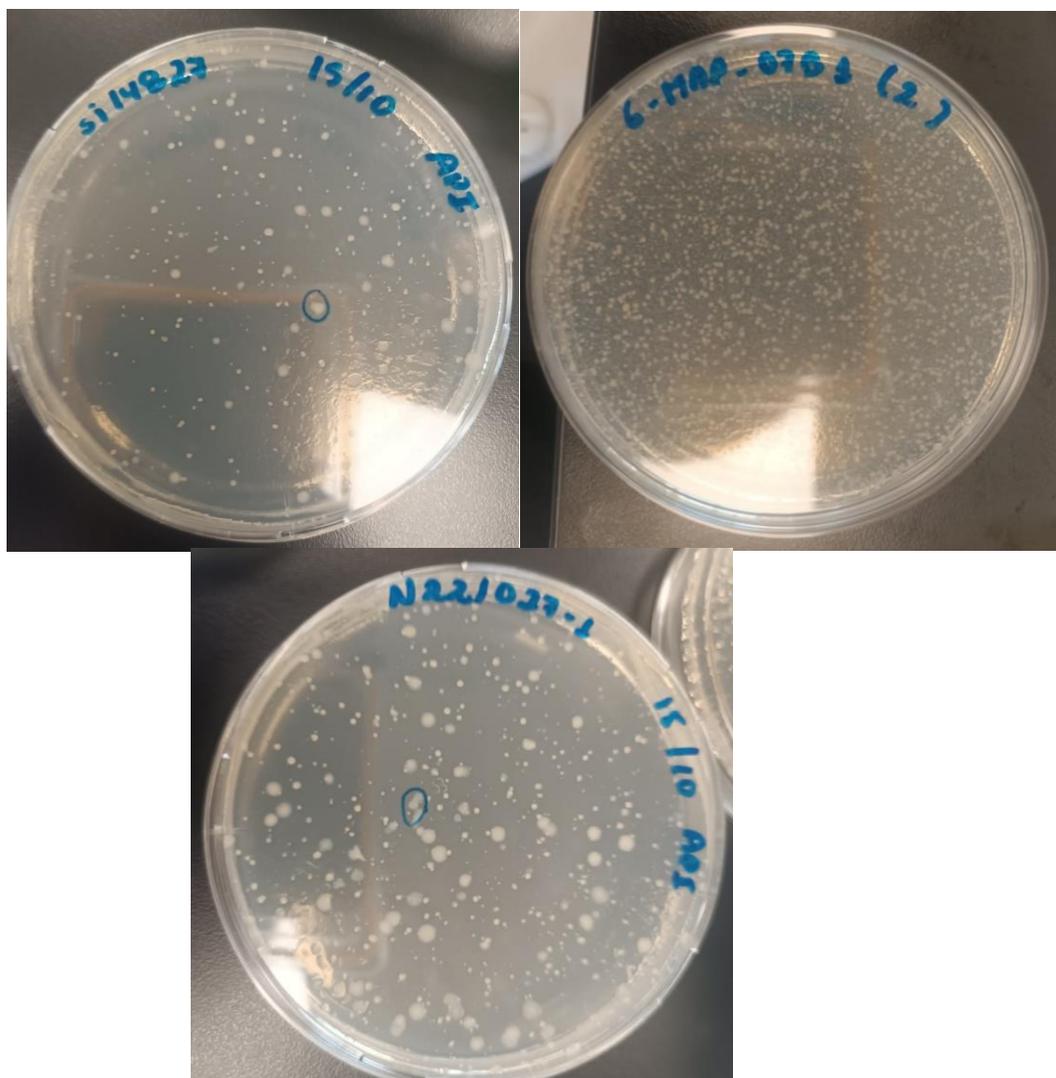


Imagen 1 Cepas obtenidas de las 3 fuentes tras la exposición al bacteriófago 35fd.

Sin embargo, al hacer crecer las cepas aisladas e incubar con una gota que contenía bacteriófagos a una concentración de 10^9 , se observó lisis en 6 de las 8 cepas, excepto en 6-MAP-PO2 y 6-MAP-GC2. Posteriormente, se realizó un spot test utilizando una concentración menor, dado que la anterior era demasiado alta y podría haber provocado lisis inespecífica. Los resultados obtenidos fueron similares, lo que llevó a la conclusión de que las cepas 6-MAP-PO2 y 6-MAP-GC2 son resistentes a la lisis del fago 35fd, mientras que las demás fueron clasificadas como pseudomutantes.

3.1.2 Presencia del megaplásmido

A partir de los primers utilizados, FP25 y FP40, se determinó que todas las cepas evaluadas contenían el megaplásmido, dado que el marcador molecular mostró una señal notable para FP25. Sin embargo, para FP40, las señales fueron muy sutiles y no son visibles en la *Imagen 3*. El control negativo resultó negativo, mientras que el control positivo, compuesto por las cepas originales, también mostró resultados positivos tanto para FP25 como para FP40. Esto podría indicar que no se utilizó la cantidad adecuada del primer FP40 o que hubo algún fallo durante el proceso.

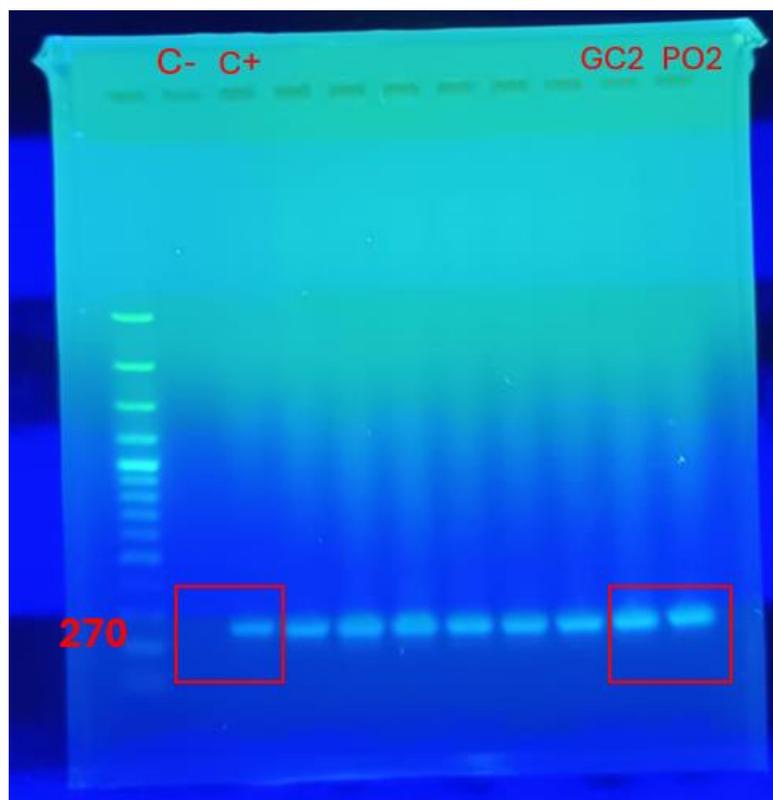


Imagen 2 Resultados del PCR para las verdaderas cepas mutantes GC2 y PO2. En el pocillo 1 se encuentra el marcador negativo con la bacteria DR006, en el 2 pocillo el control positivo la cepa original 6-MAP, en los últimos pocillos las cepas mutantes GC2 y PO2.

3.1.3 Curvas de crecimiento

En el medio de TSB, el crecimiento bacteriano entre las cepas mutantes y la cepa silvestre fue similar, como se observa en la *Imagen 3*. Sin embargo, en el medio a base de pollo se notaron diferencias significativas entre la cepa mutante 6-MAP-GC2 y las cepas 6-MAP-PO2 y la original. En comparación, la carga bacteriana final de las cepas 6-MAP-PO2 y la original fue similar, aunque durante la fase exponencial, 6-MAP-PO2 presentó una mayor carga bacteriana en un menor tiempo. En contraste, la carga bacteriana de 6-MAP-GC2 fue inferior.

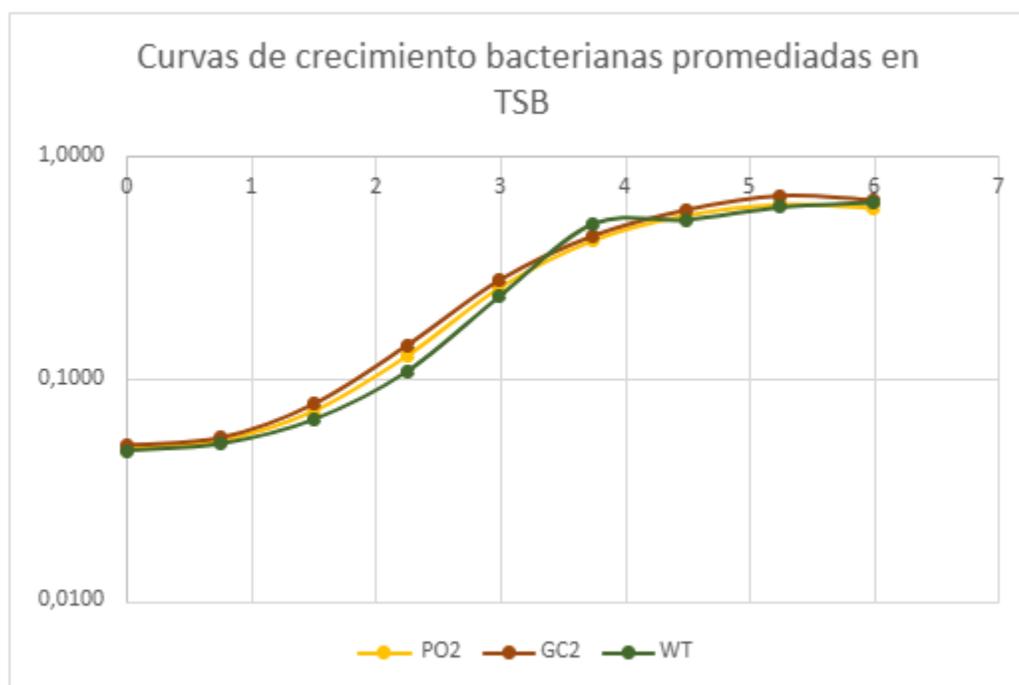


Imagen 3 Curvas de crecimiento de SI en medio TSB realizadas en Excel.

Además, en el medio a base de pollo se evidenció un mayor costo energético para el crecimiento de las cepas; para alcanzar la fase de latencia, se requirieron aproximadamente 12 horas como se observa en la *Imagen 4*, a diferencia de las 6 horas necesarias en el medio de TSB.

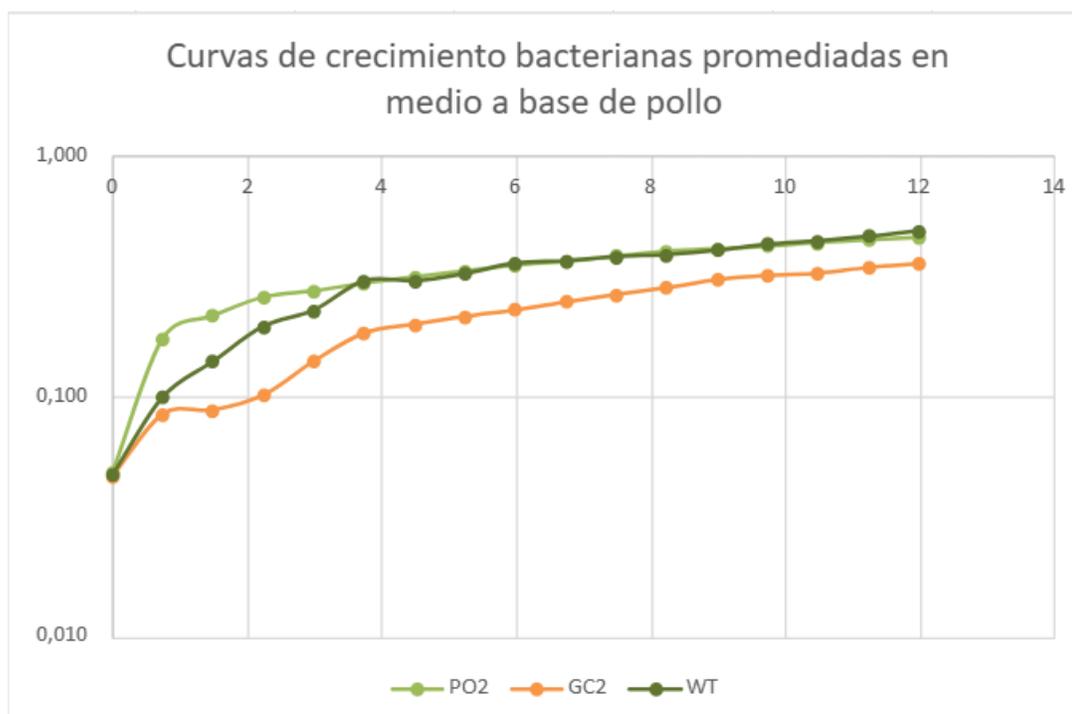


Imagen 4 Curvas de crecimiento de SI en medio que simula al hospedero, medio a base de pollo realizadas en Excel.

3.1.4 CMI de antibióticos

Se observaron cambios significativos en la CMI de varias familias de antibióticos entre la cepa original y las cepas mutantes, como se muestra en la *Tabla 3*. En algunas concentraciones, la CMI se duplicó, como en el caso de Ceftazidima/Ac. Clavulánico y Levofloxacin. En otros antibióticos, el aumento fue de hasta ocho veces la CMI original, como se evidenció en Cefepima y Ceftazidima. Estos aumentos en la CMI sugieren que la adquisición de resistencia a la lisis del bacteriófago podría estar asociada con modificaciones en la estructura de la membrana bacteriana, como la pérdida de porinas o el incremento de glicoproteínas, lo que afectaría la penetración de los antibióticos. Así mismo, podría influir en la resistencia a los antibióticos, ya sea de manera negativa, como se ha observado en otros estudios, o de forma positiva como se muestra en el presente proyecto.

Tabla 3 Antibióticos de diferentes generaciones utilizados para evaluar la CMI en las cepas mutantes. Las cepas diferenciadas de la cepa original están destacadas en negrita.

Antibiótico	WT	PO2	GC2
Amikacina	<=8	<=8	<=8
Amoxicilina/Ac. clavulánico	<=8	<=8	<=8
Ampicilina	>16	>16	>16
Ampicilina/ Sulbactam	16	>16	16
Aztreonam	>16	>16	>16
Cefepime	<= 2	8	16
Cefotaxima	32	>32	>32
Cefotaxima/ Ac. clavulánico	<= 0.25	<= 0.25	<= 0.25
Cefoxitina	<=8	<=8	<=8
Ceftazidima	<= 2	8	16
Ceftazidima/ Ac. clavulánico	0.5	1	1
Cefuroxima (oral)	>16	>16	>16
Cefuroxima (parenteral)	>16	>16	>16
Cefuroxima (sodio)	>16	>16	>16
Cefalotin	>32	>32	>32
Cloranfenicol	>16	>16	>16
Ciprofloxacina	0.25	0.5	0.5
Colistin	<=1	<=1	<=1
Doripenem	<=4	<=4	<=4
Ertapenem	<=4	<=1	<=1
Fosfomicina + G6P	<=32	<=32	<=32
Imipenem	>8	>8	>8
Levofloxacina	0.25	0.5	0.5
Meropenem	<=1	<=1	<=1
Minociclina	<=1	>8	>8
Ac. Nalidixic	>16	>16	>16
Nitrofurantoina	>64	>64	>64
Piperacilina/Tazobactam	<=8	<=8	<=8
Rifampina	>64	>8	>8
Tigeciclina	1	1	1
Trimetoprim/ Sulfamethox	<=2	<=2	<=2

3.1.5 Análisis estadísticos

3.1.5.1 Medio TSB

Se utilizaron diversos parámetros para realizar la suavización de los datos y llevar a cabo los análisis estadísticos del Área Bajo la Curva (ABC). Los resultados mostraron que los datos seguían una distribución normal y que no existía diferencia significativa en la varianza entre los grupos. En consecuencia, se concluyó que no había diferencias significativas en las ABC, ya que el valor p fue superior a 0.05, lo que indica que las áreas bajo la curva y los patrones de crecimiento fueron similares en todas las cepas cultivadas en medio TSB.

3.1.5.2. Medio a base de pollo

En los resultados del medio a base de pollo los resultados del área bajo la curva no seguían una distribución normal, pero sí poseían varianzas homogéneas por lo que se usó Kruskal-Wallis. El p-value fue de 0.05091, aunque está muy cerca del límite no existen diferencias significativas entre los grupos, es decir las áreas son similares.

Capítulo 4

4. Conclusión y Recomendaciones

4.1 Conclusión

La evaluación de las cepas mutantes de *Salmonella* Infantis resistentes al bacteriófago lítico 35fd, obtenidas de diferentes fuentes (ambiental, carne de pollo y clínica), ha revelado importantes hallazgos sobre su adaptación y resistencia. Las cepas mutantes: 6-MAP-GC2 y 6-MAP-PO2, mostraron un rendimiento similar al de la cepa original en medios de cultivo TSB, indicando que no hay una pérdida significativa de fitness bajo esas condiciones. Sin embargo, en el medio a base de carne de pollo, se observaron diferencias entre las cepas mutantes, lo que sugiere que la resistencia al fago podría afectar el comportamiento bacteriano en entornos más específicos. Además, las cepas mutantes presentaron un aumento en la CMI frente a cefalosporinas como ceftazidima y cefepima hasta 8 veces su concentración inicial, lo que indica un cambio en su resistencia a antibióticos tras la adaptación al bacteriófago. Estos resultados sugieren que la resistencia a fagos no solo impacta la interacción bacteriana con los fagos, sino que también puede estar relacionada con la adquisición de resistencia a antibióticos, lo que plantea implicaciones en el tratamiento y control de infecciones.

4.2 Recomendaciones

Para obtener análisis estadísticos más confiables al realizar las curvas de crecimiento mínimo, se recomienda realizar al menos tres mediciones por cada medio, utilizando siempre los respectivos blancos. También es importante realizar las mediciones por triplicado. Además, es fundamental incluir controles negativos de los medios utilizados en cada proceso, con el fin de evitar contaminaciones y resultados erróneos. Finalmente, tras la obtención de las cepas mutantes, se sugiere secuenciar las cepas obtenidas para evaluar los cambios específicos en su

genética, lo que permitirá comprender mejor los procesos de interacción con los bacteriófagos y la evolución de SI.

5. Referencias

- Adler, B. A., Kazakov, A. E., Zhong, C., Liu, H., Kutter, E., Lui, L. M., Nielsen, T. N., Carion, H., Deutschbauer, A. M., Mutalik, V. K., & Arkin, A. P. (2021). The genetic basis of phage susceptibility, cross-resistance and host-range in *Salmonella*. *Microbiology (Reading, England)*, 167(12), 001126. <https://doi.org/10.1099/mic.0.001126>
- Alvarez, D. M., Barrón-Montenegro, R., Conejeros, J., Rivera, D., Undurraga, E. A., & Moreno-Switt, A. I. (2023). A review of the global emergence of multidrug-resistant *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Serovar *Infantis*. *International Journal Of Food Microbiology*, 403, 110297. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2023.110297>
- Aviv, G., Rahav, G., & Gal-Mor, O. (2016). Horizontal Transfer of the *Salmonella enterica* Serovar *Infantis* Resistance and Virulence Plasmid pESI to the Gut Microbiota of Warm-Blooded Hosts. *mBio*, 7(5). <https://doi.org/10.1128/mbio.01395-16>
- Aviv, G., Tsyba, K., Steck, N., Salmon-Divon, M., Cornelius, A., Rahav, G., Grassl, G. A., & Gal-Mor, O. (2013). 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>
- Bist, R. B., Bist, K., Poudel, S., Subedi, D., Yang, X., Paneru, B., Mani, S., Wang, D., & Chai, L. (2024). Sustainable poultry farming practices: a critical review of current strategies and future prospects. *Poultry Science*, 104295. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2024.104295>
- Bianchi, D. M., Barzanti, P., Adriano, D., Martucci, F., Pitti, M., Ferraris, C., Floris, I., La Brasca, R., Ligotti, C., Morello, S., Scardino, G., Musolino, N., Tramuta, C., Maurella,

- C., & Decastelli, L. (2023). Food Safety Monitoring of Salmonella spp. in Northern Italy 2019–2021. *Pathogens*, *12*(7), 963. <https://doi.org/10.3390/pathogens12070963>
- Brown, A. C., Chen, J. C., Watkins, L. K. F., Campbell, D., Folster, J. P., Tate, H., Wasilenko, J., Van Tubbergen, C., & Friedman, C. R. (2018). CTX-M-65 Extended-Spectrum β -Lactamase–Producing Salmonella enterica Serotype Infantis, United States. *Emerging Infectious Diseases*, *24*(12), 2284–2291. <https://doi.org/10.3201/eid2412.180500>
- Cartelle, M., Zurita, J., Mino, A. P. Y., Ortega-Paredes, D., & Alcocer, I. (2016). Characterization of a small outbreak of Salmonella enterica serovar Infantis that harbour CTX-M-65 in Ecuador. *The Brazilian Journal Of Infectious Diseases*, *20*(4), 406–407. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2016.03.007>
- Calero-Cáceres, W., Villacís, J., Ishida, M., Burnett, E., & Vinueza-Burgos, C. (2020). Whole-Genome Sequencing of Salmonella enterica Serovar Infantis and Kentucky Isolates Obtained from Layer Poultry Farms in Ecuador. *Microbiology Resource Announcements*, *9*(13). <https://doi.org/10.1128/mra.00091-20>
- Díaz, B., Salazar, E., Gu, G., Nou, X., Ortiz, J., Maldonado, P., & Cevallos-Cevallos, J. M. (2024). Microbial Composition and Diversity of High-demand Street-vended Foods in Ecuador. *Journal Of Food Protection*, *87*(4), 100247. <https://doi.org/10.1016/j.jfp.2024.100247>
- Davalos, S., Santa-Cruz, M., Condori, R., Rodriguez, J., & Lucas, J. (2024). Multiple antibiotic resistance of Salmonella Infantis in the Peruvian poultry production chain: detection in birds, the farming environment, and chicken carcasses. *Preventive Veterinary Medicine*, 106364. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2024.106364>

- FAO. 2023a. Production | Gateway to poultry production and products | Food and Agriculture Organization of the United Nations. Accessed Sept. 2023. <https://www.fao.org/poultry-production-products/production/en/>.
- Gvaladze, T., Lehnerr, H., & Hertwig, S. (2024). A bacteriophage cocktail can efficiently reduce five important Salmonella serotypes both on chicken skin and stainless steel. *Frontiers In Microbiology*, 15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1354696>
- Kürekci, C., Sahin, S., Iwan, E., Kwit, R., Bomba, A., & Wasyl, D. (2020). Whole-genome sequence analysis of Salmonella Infantis isolated from raw chicken meat samples and insights into pESI-like megaplasmid. *International Journal Of Food Microbiology*, 337, 108956. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108956>
- Lee, W. W. Y., Mattock, J., Greig, D. R., Langridge, G. C., Baker, D., Bloomfield, S., Mather, A. E., Wain, J. R., Edwards, A. M., Hartman, H., Dallman, T. J., Chattaway, M. A., & Nair, S. (2021). Characterization of a pESI-like plasmid and analysis of multidrug-resistant Salmonella enterica Infantis isolates in England and Wales. *Microbial Genomics*, 7(10). <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000658>
- Mejía, L., Medina, J. L., Bayas, R., Salazar, C. S., Villavicencio, F., Zapata, S., Matheu, J., Wagenaar, J. A., González-Candelas, F., & Vinuesa-Burgos, C. (2020). Genomic Epidemiology of Salmonella Infantis in Ecuador: From Poultry Farms to Human Infections. *Frontiers In Veterinary Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.547891>
- Miranda-Riveros, J., Díaz-Gavidia, C., Piña-Iturbe, A. & Moreno-Switt, A. (2024). Prevalence and molecular characterization of *Salmonella enterica* serotype Infantis in meat. Poster presented at the Chilean Congress of Microbiology 2024, Coquimbo, Chile.

- Moon, S. H., Waite-Cusic, J., & Huang, E. (2019). Control of Salmonella in chicken meat using a combination of a commercial bacteriophage and plant-based essential oils. *Food Control*, *110*, 106984. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106984>
- Piña-Iturbe, A., Díaz-Gavidia, C., Álvarez, F. P., Barron-Montenegro, R., Álvarez-Espejo, D. M., García, P., Solís, D., Constenla-Albornoz, R., Toro, M., Olivares-Pacheco, J., Reyes-Jara, A., Meng, J., Bell, R. L., & Moreno-Switt, A. I. (2024). Genomic characterisation of the population structure and antibiotic resistance of Salmonella enterica serovar Infantis in Chile, 2009–2022. *The Lancet Regional Health - Americas*, *32*, 100711. <https://doi.org/10.1016/j.lana.2024.100711>
- Ruíz, B. (2023, 1 diciembre). *Ecuador is exporting chicken to the Bahamas*. WATTPoultry. <https://www.wattagnet.com/blogs/latin-america-poultry-at-a-glance/blog/15659439/ecuador-is-exporting-chicken-to-the-bahamas>
- Sevilla-Navarro, S., Torres-Boncompte, J., Garcia-Llorens, J., Bernabéu-Gimeno, M., Domingo-Calap, P., & Catalá-Gregori, P. (2024). Fighting Salmonella Infantis: bacteriophage-driven cleaning and disinfection strategies for broiler farms. *Frontiers In Microbiology*, *15*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1401479>
- World Health Organization: WHO. (2018, 20 febrero). *Salmonella (non-typhoidal)*. [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-\(non-typhoidal\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-(non-typhoidal))
- Zurita, J., Yáñez, F., Sevillano, G., Ortega-Paredes, D., & Miño, A. P. Y. (2019). Ready-to-eat street food: a potential source for dissemination of multidrug-resistant Escherichia coli epidemic clones in Quito, Ecuador. *Letters In Applied Microbiology*, *70*(3), 203-209. <https://doi.org/10.1111/lam.13263>


```

# Verificar las columnas necesarias

def verificar(df):

    if 'Tiempo' not in df.columns:

        raise ValueError("El archivo CSV no contiene la variable Tiempo.")

    bacterias = [col for col in df.columns if col != 'Tiempo']

    if not bacterias:

        raise ValueError("El archivo CSV no contiene ninguna columna para las mediciones de
OD600.")

    tiempo = df['Tiempo'].values

    OD600 = df[bacterias]

    return tiempo, OD600, bacterias

tiempo, OD600, bacterias = verificar(df)

# Modelo logístico

def modelo_logistico(t, a, b, c, d):

    return a / (1 + np.exp(-b * (t - c))) + d

# Suavizar datos

def suavizar(ydata, window_length=5, polyorder=2):

    return savgol_filter(ydata, window_length=window_length, polyorder=polyorder)

# Ajustar y graficar curvas

def graficarCurvasAjustadas(tiempo, OD600):

```

```

curvas_ajustadas = {}

for columna in OD600.columns:

    y_suavizada = suavizar(np.log1p(OD600[columna].values), window_length=7,
polyorder=2) # Aplicar transformación logarítmica

    popt, pcov = curve_fit(modelo_logistico, tiempo, y_suavizada,
                            p0=[0.7, 0.1, 0.35, 0.04],
                            bounds=([0, 0, 0, 0], [10, 1, 10, 1]), # Limitar parámetros
                            maxfev=5000)

    curvas_ajustadas[columna] = modelo_logistico(tiempo, *popt)

df_ajustadas = pd.DataFrame(curvas_ajustadas)

df_ajustadas['Tiempo'] = tiempo

df_melted = df_ajustadas.melt(id_vars=['Tiempo'], var_name='Curva', value_name='OD600')

fig = px.line(df_melted, x='Tiempo', y='OD600', color='Curva',
              title='Curvas de crecimiento de Salmonella Infantis ajustadas',
              labels={'Tiempo': 'Tiempo (h)', 'OD600': 'Densidad Óptica a 600 nm'})

fig.update_traces(mode='lines+markers', hovertemplate="Tiempo: % {x}<br>OD600:
% {y}<extra></extra>")

fig.update_layout(hovermode='closest', dragmode='zoom')

fig.show()

# Calcular el área bajo la curva

def ABJ(tiempo, OD600):

    def Area(tiempo, OD600):

```

```

    return np.trapezoid(OD600, tiempo)

curvas_ajustadas = {}

areas_bc = {}

for i in OD600.columns:

    y_suavizada = suavizar(np.log1p(OD600[i].values), window_length=7, polyorder=2)

# Aplicar transformación logarítmica

    popt, pcov = curve_fit(modelo_logistico, tiempo, y_suavizada,

                            p0=[0.7, 0.1, 0.35, 0.04],

                            bounds=([0, 0, 0, 0], [10, 1, 10, 1]), # Limitar parámetros

                            maxfev=5000)

    curvas_ajustadas[i] = modelo_logistico(tiempo, *popt)

    area = Area(tiempo, curvas_ajustadas[i])

    areas_bc[i] = area

return areas_bc

# Imprimir los parámetros y el área bajo la curva

for i in range(len(bacterias)):

    y_suavizada = suavizar(np.log1p(OD600[bacterias[i]].values), window_length=7,

polyorder=2)

    popt, pcov = curve_fit(modelo_logistico, tiempo, y_suavizada,

                            p0=[0.7, 0.1, 0.35, 0.04],

                            bounds=([0, 0, 0, 0], [10, 1, 10, 1]), # Limitar parámetros

                            maxfev=5000)

    print(f"Parámetros optimizados para la curva {bacterias[i]}: {popt}")

```

```

print(f"Tasa de crecimiento para la curva {bacterias[i]}: {popt[0]} \n")
areas_bc = ABJ(tiempo, OD600)
for i in range(len(bacterias)):
    print(f"El área bajo la curva es: {bacterias[i]} = {areas_bc[bacterias[i]]}")
# Graficar las curvas ajustadas
graficarCurvasAjustadas(tiempo, OD600)

```

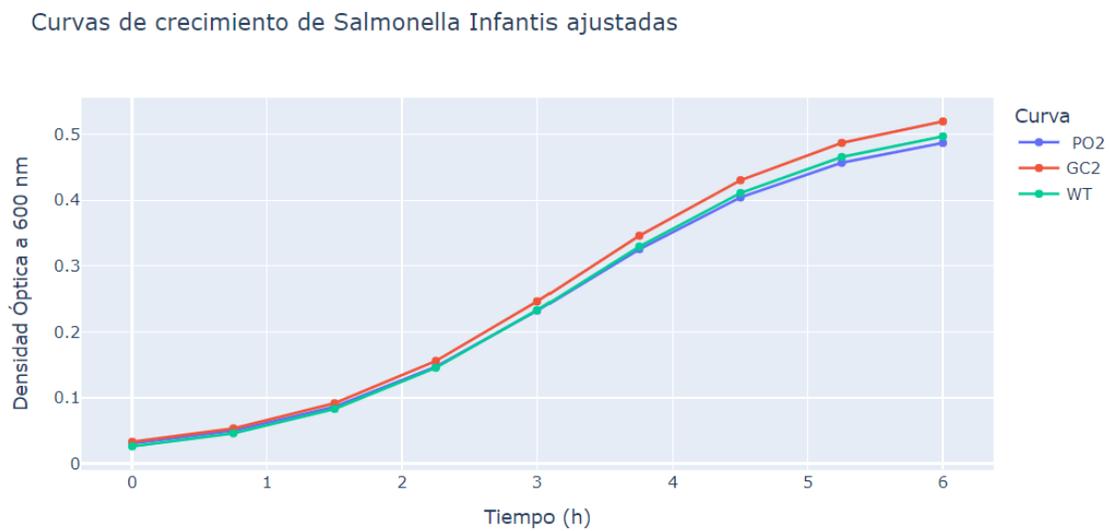


Ilustración 1 Curvas de crecimiento interactivas de SI en medio TSB elaboradas con datos ajustados.

Curvas de crecimiento de Salmonella Infantis ajustadas

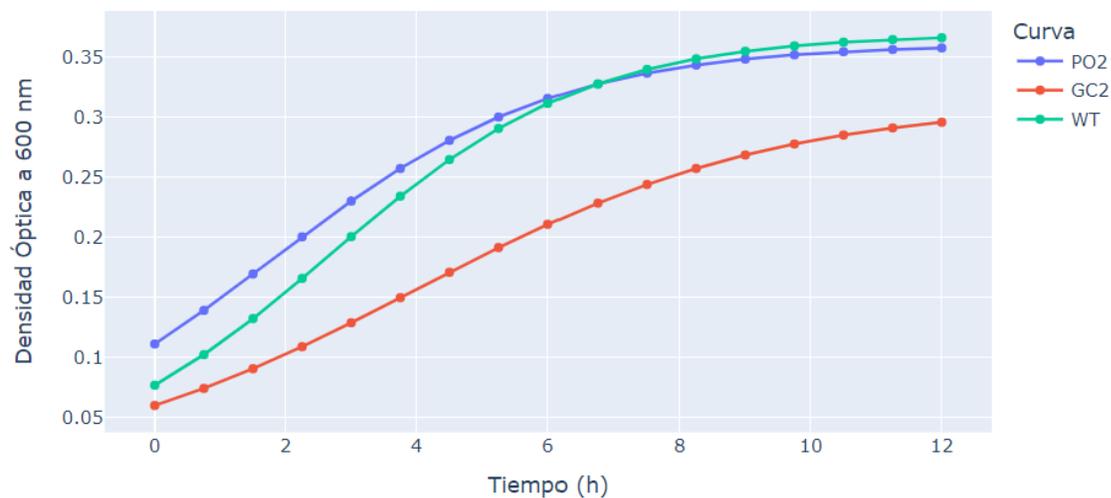


Ilustración 2 Curvas de crecimiento interactivas de SI en medio a base de pollo elaboradas con datos ajustados.

6.3 Código de Rstudio para el cálculo de diferencias estadísticas

```
# Datos proporcionados para cada grupo
```

```
PO2 <- c(1.471144270368357, 1.7836904202509773, 1.47142604448349010)
```

```
GC2 <- c(1.5652932672938957, 1.9200353358376798, 1.5654771557172111)
```

```
WT <- c(1.481649442778437, 1.8058959379176946, 1.4819957122485332)
```

```
# Crear un data.frame
```

```
data <- data.frame(
```

```
  valor = c(PO2, GC2, WT),
```

```
  grupo = rep(c("PO2", "GC2", "WT"), each = 3))
```

```
# 1. Test de Shapiro-Wilk para normalidad por grupo
```

```
shapiro_test_PO2 <- shapiro.test(PO2)
```

```
shapiro_test_GC2 <- shapiro.test(GC2)
```

```
shapiro_test_WT <- shapiro.test(WT)
```

```
print(shapiro_test_PO2)
```

```
print(shapiro_test_GC2)
```

```
print(shapiro_test_WT)
```

```
# 2. Test de Bartlett para homogeneidad de varianzas
```

```
bartlett_test <- bartlett.test(valor ~ grupo, data = data)
```

```
print(bartlett_test)
```

```
# 3. Test de ANOVA (si se cumple normalidad y homogeneidad de varianzas)
```

```
anova_result <- aov(valor ~ grupo, data = data)
```

```
summary(anova_result)
```

```
# Si ANOVA no es válido, hacemos Kruskal-Wallis
```

```
kruskal_test <- kruskal.test(valor ~ grupo, data = data)
```

```
print(kruskal_test)
```

```
# Diferencias entre grupos
```

```
dunn.test(data$valor, g=data$grupo, kw=TRUE)
```