

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS**

FACULTAD DE FARMACIA

**“Obtención y evaluación de
microesferas de alginato
conteniendo al Bacteriófago S1”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN FARMACIA**

PRESENTA

M en F. Janeth Gómez García

CO DIRECTORES DE TESIS

Dra. Nallelyt Segundo Arizmendi

Dr. Efrén Hernández Baltazar

Cuernavaca, Morelos, junio 2024.

El presente trabajo de tesis fue realizado en el Laboratorio 9 de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia, perteneciente a la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

La autora del presente recibió apoyo por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), con el financiamiento otorgado para la realización de este Posgrado mediante la beca No. 745928

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por todas las bendiciones que me ha otorgado, por guiarme hacia personas que me motivan a ser mejor y por darme la dicha de llegar hasta este momento.

A mi mamá, Eusebia García, por tu apoyo incondicional, tus palabras y consejos. Me has dado todas las herramientas necesarias para ser una mujer que no se rinde y que lucha por alcanzar sus metas. Te amo infinitamente y agradezco todo el esfuerzo que has hecho para que yo vea mis sueños cumplidos. Estoy orgullosa de ser tu hija y agradecida con Dios por tenerte como mamá. ♥

A mi papá, Elías Gómez; pese a las dificultades y diferencias jamás me han negado tu apoyo incondicional y agradezco infinitamente el esfuerzo que haces para apoyarme en este camino de la ciencia y por motivarme, muy a tu manera, a ser mejor profesionalista y persona. Espero que te encuentres orgulloso de mí. ♥


A la Dra. Nallelyt Segundo Arizmendi, para quien tengo un agradecimiento infinito. Gracias por el tiempo y por la motivación para llevar a cabo este proyecto y por supuesto gracias por compartirme ese amor que tienes por los Bacteriófagos; más allá de ser mi directora de tesis, eres una amiga y una gran consejera, siempre creyendo en mí.

Al Dr. Efrén Hernández Baltazar por todo el apoyo que me brindo desde el inicio del proyecto, por todos los consejos, y por enseñarme que la dedicación y el esfuerzo rinden fruto. Gracias por confiar en mí y por no abandonarme al final del proyecto.

A la Dra. Jazmín Flores Monroy por su amabilidad y disponibilidad para formar parte del comité tutorial. Gracias por todas las observaciones realizadas para enriquecer este trabajo.

A mis tíos Israel Gómez y Alejandra Sotelo, quienes me han tratado como una hija apoyándome a seguir preparándome académicamente y aconsejándome para tomar siempre buenas decisiones,

A mis hermanas: Rosario, por apoyarme y aconsejarme durante toda la vida y Ximena, por ser como eres, y por darme lo más valioso de mi vida, mis sobrinos Santiago, Mateo, Alfonso, y Esperanza quienes iluminan mi vida con solo mirarme.

A Max Alberto Damián Escobar y su familia, por el apoyo y el cariño. Alberto, gracias por apoyarme durante este tiempo, sé que no fue fácil, pero gracias por tus palabras para impulsarme a seguir adelante cada día, por tu paciencia, tu cariño y tu inigualable manera de ser. TE AMO ♥!! 

A mi amiga: Miri Barón, gracias por alegrar mis días con tus conversaciones, por tu apoyo incondicional, por ser mi amiga, mi cómplice, mi confidente y ante todo una Hermana. Te quiero mucho 😊

INDICE GENERAL

INDICE GENERAL.....	1
INDICE DE FIGURAS.....	4
INDICE DE TABLAS.....	5
INDICE DE ECUACIONES.....	5
ABREVIATURAS.....	6
1 RESUMEN.....	7
2 ABSTRACT.....	8
3 INTRODUCCIÓN.....	9
3.1 Sector avícola en México.....	9
3.2 <i>Salmonella</i> en el sector avícola.....	9
3.2.1 Pulososis y Tifosis aviar.....	9
3.3 <i>Salmonella</i> Enteritidis en el sector avícola.....	10
3.3.1 Transmisión de <i>Salmonella</i> Enteritidis en aves de corral.....	10
3.3.2 Transmisión de <i>Salmonella</i> Enteritidis en huevos.....	11
3.4 Tratamiento de salmonelosis en el sector avícola.....	12
3.4.1 Antibióticos.....	12
3.4.2 Ácidos orgánicos.....	14
3.5 Fagoterapia en el sector avícola.....	14
3.6 Alginato y gelificación iónica.....	15
3.7 Microesferas de alginato como sistemas de administración de Bacteriófagos.....	17
3.7.1 Liberación a partir de microesferas de alginato.....	18
4 ANTECEDENTES.....	20
5 JUSTIFICACIÓN.....	21
6 HIPÓTESIS.....	22
7 OBJETIVOS.....	22
7.1 General.....	22

7.2	Particulares	22
8	ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	23
9	MATERIALES.....	24
9.1	Biológicos.....	24
9.2	Soluciones.....	24
10	MÉTODOS.....	25
10.1	Identificación y mantenimiento de las cepas bacterias	25
10.2	Propagación del Bacteriófago S1	25
10.3	Determinación del título fágico.....	26
10.4	Determinación de la actividad lítica del Bacteriófago S1 en cepas de interés avícola.....	27
10.4.1	Determinación de la eficiencia de plaqueo (EOP)	27
10.5	Determinación de las condiciones de formulación	28
10.5.1	Evaluación de diámetros de agujas para la obtención de microesferas	28
10.5.2	Evaluación de la concentración de CaCl ₂ para el proceso de encapsulación.....	28
10.6	Obtención de microesferas de alginato-CaCl ₂ conteniendo al Bacteriófago S1	29
10.6.1	Determinación de la infectividad del Bacteriófago S1 encapsulado en microesferas de alginato-CaCl ₂	29
10.7	Determinación de la eficiencia de encapsulación.....	29
10.8	Liberación del Bacteriófago S1 encapsulado en un modelo <i>in vitro</i> de fluido gástrico e intestinal simulado.....	30
10.9	Eliminación de <i>Salmonella enterica</i> serovar Enteritidis en el modelo <i>In vivo</i> (<i>Gallus gallus domesticus</i>).....	30
10.9.1	Recepción y acondicionamiento del modelo biológico	30
10.9.2	Infección y tratamiento de los grupos.....	31
11	RESULTADOS.....	32
11.1	Determinación de la actividad lítica del Bacteriófago S1 en cepas de interés avícola.....	32
11.2	Evaluación de diámetros de agujas para la obtención de microesferas	32
11.3	Evaluación de la concentración de CaCl ₂ en el proceso de encapsulación.....	33

11.4	Determinación de la infectividad del Bacteriófago S1 encapsulado	34
11.5	Establecimiento de las condiciones de formulación	36
11.6	Determinación de la eficacia de encapsulación del Bacteriófago S1.....	36
11.7	Liberación del Bacteriófago S1 encapsulado en un modelo <i>in vitro</i> de fluido gástrico e intestinal simulado.....	38
11.8	Eliminación de <i>Salmonella enterica</i> serovar Enteritidis en el modelo <i>in vivo</i>	39
11.8.1	Determinación de bacterias presentes en heces de <i>Gallus gallus domesticus</i> tras su llegada al animalario.....	39
11.8.2	Determinación de la infección por <i>Salmonella</i> Enteritidis en <i>Gallus gallus domesticus</i>	40
11.8.3	Reducción de <i>Salmonella</i> Enteritidis en <i>Gallus gallus domesticus</i>	41
12	. DISCUSIÓN	44
13	CONCLUSIONES.....	51
14	PERSPECTIVAS.....	52
15	REFERENCIAS.....	53
16	ANEXOS	61

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Transmisión transóvarica y transcáscara de <i>Salmonella</i> Enteritidis en huevos.	12
Figura 2: Estructura del alginato.	16
Figura 3: Modelo de caja de huevo propuesto por Grant.....	17
Figura 4. Representación gráfica del proceso de liberación de principios activos contenidos en sistemas de alginato.	19
Figura 5: Estrategia experimental	23
Figura 6: Método de propagación del Bacteriófago S1.....	26
Figura 7: Método de sembrado en doble placa	27
Figura 8: Zonas líticas correspondientes a la capacidad infectiva del Bacteriófago S1 contra cepas de interés avícola.....	32
Figura 9: Influencia de la concentración de CaCl ₂ y el tiempo de contacto en el tamaño de las microesferas de alginato.	33
Figura 10: Microscopia óptica (40x) de microesferas de alginato expuestas durante 10 min a diferentes concentraciones de CaCl ₂ y almacenadas a temperatura ambiente.....	34
Figura 11: Determinación de la presencia del Bacteriófago S1 en microesferas obtenidas con aguja 0.3 mm de diámetro interno..	35
Figura 12: Determinación de la presencia del Bacteriófago S1 en microesferas obtenidas con aguja 0.5 mm de diámetro interno..	36
Figura 13: Fotografías de microesferas de alginato durante el proceso de desintegración en SBM... ..	37
Figura 14: Liberación <i>in vitro</i> del Bacteriófago S1 encapsulado en microesferas de alginato.....	39
Figura 15: Crecimiento bacteriano de hisopados cloacales de pollos en Agar S-S	40
Figura 16: Crecimiento bacteriano correspondiente a hisopados cloacales obtenidos 72 h post-infección con <i>Salmonella</i> Enteritidis.....	41
Figura 17: Eliminación de <i>Salmonella</i> Enteritidis en el modelo <i>Gallus gallus domesticus</i>	42
Figura 18: Evaluación <i>in vivo</i> de la actividad profiláctica del Bacteriófago S1 encapsulado en microesferas de alginato contra <i>Salmonella</i> Enteritidis	43

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Límites Máximos Residuales de antibióticos presentes en carne de pollo o gallina establecidos por la Comisión del Codex Alimentarius. Modificado de: Comisión del <i>Codex Alimentarius</i> , 2015	13
Tabla 2: Composición de mezclas para la determinación de la protección y liberación <i>In vitro</i> del Bacteriófago S1 en FGS y FIS.	30
Tabla 3: Registro de infección y tratamiento en cada grupo experimental del ensayo <i>In vivo</i>	31
Tabla 4: Tamaño de esferas obtenidas de la evaluación con tres diferentes diámetros de aguja.....	32
Tabla 5: Formulaciones de microesferas de alginato conteniendo al Bacteriófago S1	36
Tabla 6: Eficiencia de encapsulación del Bacteriófago S1	38
Tabla 7: Consumo de microesferas de alginato y agua en cada grupo experimental	41

INDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1: Fórmula para determinar el título fágico	26
Ecuación 2: Fórmula para determinar la eficiencia de plaqueo en Bacteriófagos	28
Ecuación 3: Fórmula para determinar la eficacia de encapsulación	29

ABREVIATURAS

°C	Grados Centígrados	mL	Mililitro
AB	Agar Blando	MOI	Multiplicidad de Infección
ALG	Alginato	NaCl	Cloruro de Sodio
ASS	Agar Salmonella-Shigella	OIE	Organización Mundial de Sanidad Animal
A-XLD	Agar Xilosa Lisina Desoxicolato	OMS	Organización Mundial de la Salud
Ca²⁺	Ion Calcio	pH	Potencial de hidrógeno
CaCl₂	Cloruro de Calcio	p/v	Peso/Volumen
EOP	Eficiencia de Plaqueo	rpm	Revoluciones por minuto
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación	SADER	Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural
FDA	Administración de Drogas y Alimentos	SBM	Solución Broken Microsphere
FGS	Fluido Gástrico Simulado	S.E.	<i>Salmonella</i> Enteritidis
FIS	Fluido Intestinal Simulado	SENASICA	Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria
g	Gramos	TGI	Tracto Gastrointestinal
G	Gravedades	TSA	Agar Soya Trypticaseína
GRAS	Material Generalmente Reconocido como Seguro	TSB	Caldo Soya Trypticasa
H	Horas	µg/kg	Microgramos/Kilogramo
HCl	Ácido Clorhídrico	µL	Microlitros
LMR	Limites Máximo Residuales	µm	Micrómetros
M	Molaridad	UFC	Unidades Formadoras de Colonias
mm	Milímetros	UFP	Unidades Formadoras de Placas
mbar	Milibares	UNA	Unión Nacional de Avicultores
min	Minutos	UV	Ultravioleta

1 RESUMEN

Salmonella es uno de los principales patógenos causantes de Enfermedades Transmitidas por Alimentos (**ETA**), siendo el consumo de huevo, carne de aves de corral y agua contaminada las principales fuentes de infección de salmonelosis para el humano (Afshari y cols., 2018; Organización Mundial de la Salud, 2015; Méndez y cols., 2011). En México, se estima que 6 de cada 10 personas incluyen en su dieta alimentos de origen avícola, principalmente pollo y huevo (Unión Nacional de Avicultores, 2019). Por lo anterior, es importante que la industria avícola mexicana garantice la bioseguridad en la crianza, producción y comercialización de la carne de pollo y huevo para evitar la contaminación con microorganismos patógenos en aves de corral y seres humanos.

Actualmente, una amplia variedad de estudios ha demostrado que las soluciones y cócteles a base de bacteriófagos aplicados en el sector avícola son una alternativa eficaz para reducir las cargas bacterianas de *Salmonella* que colonizan el tracto digestivo de las aves de corral (Wernicki y cols., 2017; Liu y cols., 2018). Sin embargo, una de las principales desventajas es su limitada estabilidad, produciendo pérdidas de hasta el 99% del título fágico durante el procesamiento y almacenamiento. Por ello, las investigaciones recientes se han enfocado en desarrollar formulaciones farmacéuticas sólidas como nanosomas, liposomas y microesferas para la encapsulación de bacteriófagos (Loh y cols., 2021). Por lo anterior, el objetivo del presente proyecto fue obtener microesferas de alginato y evaluar su capacidad en la entrega de Fagoterapia en el modelo de *Gallus gallus domesticus* como posible tratamiento de salmonelosis en el sector avícola.

Las microesferas de alginato conteniendo Bacteriófago S1 se formularon a partir de la evaluación de diferentes diámetros de aguja, concentraciones de la solución gelificante de CaCl_2 y tiempos de exposición en la solución gelificante, seleccionando las condiciones donde las microesferas presentaron menor tamaño y menor deformación en la periferia. Se obtuvieron tres formulaciones denominadas MCa-5, MCa-10 y MCa-15 con eficiencias de encapsulación del 74.8%, 53.5% y 49.2% respectivamente. El ensayo de liberación *in vitro* en fluido gástrico e intestinal simulado estableció que la formulación MCa-5 protege al Bacteriófago S1 durante su paso por buche, proventrículo y molleja, y favorece la liberación en yeyuno e íleon, cavidades colonizadas por *Salmonella* Enteritidis. Para evaluar la funcionalidad de la formulación MCa-5 en el tratamiento de salmonelosis en el sector avícola se realizó un ensayo *in vivo* utilizando un modelo de pollo (*Gallus gallus domesticus*), el cual se demostró que una dosis de 3.2 g de microesferas de alginato conteniendo Bacteriófago S1 (Formulación MCa-5) reduce una unidad logarítmica de *Salmonella* Enteritidis a las 24 h post tratamiento. Por otro lado, se comprobó que la administración profiláctica de 3.5 g microesferas de alginato conteniendo Bacteriófago S1 no evitó la infección por *Salmonella* Enteritidis en el modelo *in vivo* de *Gallus gallus domesticus*.

2 ABSTRACT

Salmonella is one of the main pathogens causing foodborne diseases, with the consumption of eggs, poultry meat and contaminated water being the main sources of salmonellosis infection for humans (Afshari et al, 2018; World Health Organization, 2015; Mendez et al, 2011). In Mexico, it is estimated that six out of 10 people include in their diet poultry foods, mainly chicken and egg (National Union of Poultry Farmers, 2019). Therefore, it is important that the Mexican poultry industry guarantees biosecurity in the breeding, production and marketing of chicken and egg meat to avoid contamination with pathogenic microorganisms in poultry and humans.

Currently, a wide variety of studies has shown that bacteriophage-based solutions and cocktails applied in the poultry sector are an effective alternative to reduce the bacterial loads of *Salmonella* that colonize the digestive tract of poultry (Wernicki et al, 2017; Liu et al, 2018). However, one of the main disadvantages is its limited stability, producing losses of up to 99% of the phage titer during processing and storage. Therefore, recent research has focused on developing solid pharmaceutical formulations such as nanosomes, liposomes and microspheres for encapsulation of bacteriophages (Loh et al, 2021). Therefore, the objective of the present project was to obtain alginate microspheres and to evaluate their capacity in the delivery of phage therapy in the model of *Gallus gallus domesticus* as a possible treatment of salmonellosis in the poultry sector.

Alginate microspheres containing Bacteriophage S1 were formulated from the evaluation of different needle diameters, CaCl₂ crosslinking solution concentrations and exposure times in the crosslinking solution, selecting the conditions where the microspheres presented smaller size and less deformation of the periphery. Three formulations called MCa-5, MCa-10 and MCa-15 were obtained with encapsulation efficiencies of 74.8%, 53.5% and 49.2% respectively. The *in vitro* release assay in simulated gastric and intestinal fluid established that the formulation MCa-5 protects Bacteriophage S1 during its passage through crop, proventriculus and gizzard, and allows the release of the phage in jejunum and ileum, cavities colonized by *Salmonella* Enteritidis. To evaluate the functionality of the MCa-5 formulation in the treatment of salmonellosis in poultry, an *in vivo* trial using a chicken model (*Gallus gallus domesticus*) was performed, which showed that a dose of 3.2 g of alginate microspheres containing Bacteriophage S1 (MCa-5 formulation) reduces a logarithmic unit of *Salmonella* Enteritidis at 24 h post treatment. On the other hand, it was found that prophylactic administration of 3.5 g microspheres of alginate containing Bacteriophage S1 did not prevent infection by *Salmonella* Enteritidis in the *in vivo* model of *Gallus gallus domesticus*.

3 INTRODUCCIÓN

3.1 Sector avícola en México

La industria avícola es la actividad del sector pecuario con mayor producción en México. En el año 2021, México destacó a nivel mundial como el sexto país productor de carne y el quinto país productor de huevo con una producción de 3.66 y 3.0 millones de toneladas respectivamente. Por otro lado, la Unión Nacional de Avicultores (**UNA**) estima que 6 de cada 10 mexicanos incluyen en su dieta alimentos avícolas, principalmente pollo y huevo (Unión Nacional de Avicultores, 2019). Por lo anterior, es de suma importancia garantizar la bioseguridad en la crianza, producción y comercialización de la carne de pollo y huevo para evitar la contaminación con microorganismos patógenos en aves de corral y seres humanos

3.2 *Salmonella* en el sector avícola

El género bacteriano *Salmonella* es uno de los principales patógenos a nivel mundial que afecta el sector avícola, las serovariedades de *Salmonella enterica* frecuentemente aislados de aves de corral o huevo son: *Salmonella enterica* serovar Pullorum (***Salmonella Pullorum***), *Salmonella enterica* serovar Gallinarum (***Salmonella Gallinarum***) y *Salmonella enterica* serovar Enteritidis (***Salmonella Enteritidis***) (Organización Mundial de la Salud **OMS** y Red Internacional de Autoridades de Inocuidad de los Alimentos INFOSAN, 2018).

3.2.1 Pulorosis y Tifosis aviar

Las bacterias *Salmonella Pullorum* y *Salmonella Gallinarum* son agentes causales de la pulorosis y tifosis aviar respectivamente, ambas enfermedades presentan una distribución cosmopolita y afectan a pollos, pavos y faisanes (Vaid y cols., 2021; Barrow y Freitas-Neto, 2011). La pulorosis se ha asociado principalmente a la infección de pollos recién nacidos y hasta tres semanas de edad, mientras que, la tifosis aviar se presenta principalmente en aves jóvenes (entre cinco y ocho semanas de edad) y adultas (de edades superiores a las ocho semanas). Los signos clínicos de ambas enfermedades son: alas caídas, deshidratación, diarrea, plumas erizas, debilidad y adherencia de las heces a la cloaca (Barrow y Freitas-Neto, 2011; Terzolo y Chacana, 2003). La morbi-mortalidad asociada a estas enfermedades depende de la edad y el estado nutricional de las aves de corral, sin embargo, se conoce que la mayor tasa de mortalidad se da en pollos desde un día de nacidos hasta dos semanas de vida. Ambas enfermedades representan importancia en el sector avícola debido a la pérdida económica originada por la muerte de los animales y el saneamiento de las instalaciones afectadas (Huberman y Terzolo, 2014; Terzolo y Chacana, 2003). Actualmente, la Organización Mundial de Sanidad Animal (**OIE**, por sus siglas en inglés) informó que la pulorosis y tifosis aviar se encuentran incluidas en la lista de enfermedades infecciosas avícolas de declaración obligatoria a nivel mundial. En México, la Secretaría

de Agricultura y Desarrollo Rural (**SADER**) y el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (**SENASICA**) son las dependencias encargadas de vigilar, monitorear, notificar y erradicar las enfermedades infecciosas avícolas. Desde el año 2012 y hasta noviembre del 2022 ambas dependencias han declarado a México como un país libre de salmonelosis aviar; debido al nulo aislamiento, identificación y tipificación de las serovariedades Pullorum y Gallinarum en el sector avícola mexicano (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria, 2022)

Es importante destacar que las serovariedades Pullorum y Gallinarum infectan específicamente a las aves de corral, por lo que no representan riesgo para la seguridad alimentaria del hombre. Sin embargo, a nivel mundial los productos de origen avícola son una de las principales fuentes de transmisión de *Salmonella* Enteritidis, la cual posee la capacidad causar brotes de salmonelosis en humanos (Organización Mundial de la Salud, 2019; Organización Mundial de Salud Animal, 2018; Borie y cols., 2008; Ruiz y cols., 2008).

3.3 *Salmonella* Enteritidis en el sector avícola

La Organización Mundial de la Salud (**OMS**) en conjunto con la Organización Mundial de Salud Animal (**OIE**, por sus siglas en inglés) estiman que el 28% de los casos de salmonelosis causada por *Salmonella* Enteritidis en humanos se asocia al consumo de productos de origen avícola, principalmente, el huevo y la carne de pollo. Por lo anterior, la bacteria *Salmonella* Enteritidis se ha incluido como uno de los principales patógenos transmitidos por alimentos, representando un problema tanto en salud pública como en la industria avícola. Así mismo, la salmonelosis en el sector avícola se ha declarado una enfermedad de notificación obligatoria mundial (Organización Mundial de la Salud, 2019; Organización Mundial de Salud Animal, 2018; Antunes y cols., 2016; Borie y cols., 2008; Ruiz y cols., 2008). Por lo anterior, la industria avícola mexicana debe monitorear constantemente los brotes de bacterias patógenas, como *Salmonella* Enteritidis. Sin embargo, es importante destacar que México no cuenta con cifras estadísticas asociadas a los brotes de salmonelosis en aves de corral ocasionados a esta serovariedad. El estudio más reciente fue realizado en 2006 por Zaidi y colaboradores, quienes recolectaron un total de 295 muestras de carne de pollo en Yucatán, determinando que el 39.7% (117 muestras) se encontraban contaminadas con *Salmonella* spp, los serotipos mayormente aislados fueron *Salmonella* Albany (18.2%) *Salmonella* Enteritidis (16.8%), *Salmonella* Agona (14%) y *Salmonella* Meleagridis (14%).

3.3.1 Transmisión de *Salmonella* Enteritidis en aves de corral

Las aves de corral adquieren a *Salmonella* Enteritidis del ambiente donde se encuentran, principalmente por vía oral, debido al consumo de agua y alimento contaminado (Suzuki, 1994). Una vez realizada la ingesta, *Salmonella* es capaz de resistir el pH ácido del buche, estómago glandular y muscular (comúnmente conocidos como proventrículo y molleja) de las aves esto debido a un sistema

adaptativo llamado respuesta de tolerancia ácida. Después de ingreso, *Salmonella* inicia su ciclo de infección invadiendo el tejido linfoide presente en la porción cecal y cloacal, los procesos generados durante la invasión del tejido linfoide de las aves de corral aún no se han descrito completamente, sin embargo, se conoce que la isla de patogenicidad SPI-1 de *Salmonella* está directamente relacionada con la colonización de la porción cecal, ya que promueve la invasión de células epiteliales intestinales; algunos de los signos y síntomas que pueden presentarse durante la infección por *Salmonella* Enteritidis son retraso del crecimiento, baja producción de huevos, fiebre y diarrea. La bacteria puede permanecer durante varios meses en el tracto gastrointestinal de las gallinas infectadas sin que estas manifiesten signos clínicos de enfermedad, continuando con su postura y alimentación normal facilitando así la diseminación a otras aves sanas a partir de las heces. Por otro lado, *Salmonella* Enteritidis se aloja en los tejidos reproductivos promoviendo la transmisión transovarica que da como resultado la producción de huevos infectados (Herrera y Jabib, 2015; Borie y cols., 2008; Ruiz y cols., 2008).

3.3.2 Transmisión de *Salmonella* Enteritidis en huevos

El contenido interno de los huevos recién puestos es generalmente estéril; sin embargo, pueden encontrarse contaminados por diversos microorganismos (Herrera y Jabib, 2015; Yang y cols., 2017). *Salmonella* Enteritidis es el serotipo bacteriano mayormente asociado con la infección de huevos de gallina. El mecanismo de infección se debe a dos factores principales: su capacidad única para colonizar el ovario y el oviducto de las gallinas ponedoras a largo plazo, y su propagación y persistencia en la población de parvadas de reproductoras en la mayor parte del mundo (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria EFSA, 2010) En la actualidad, se conocen dos vías de transmisión por las cuales *Salmonella* Enteritidis es capaz de contaminar el interior de los huevos, representadas en la Figura 1. (Herrera y Jabib, 2015; Yang y cols., 2017; Gantois y cols., 2009)

- **Transmisión transóvarica o vertical:** Esta vía de transmisión es común en las serovariedades de Gallinarum, Pullorum y Enteritidis (Martelli,2012; Gantois y cols., 2009). La contaminación con *Salmonella* ocurre durante la formación del huevo, antes de que esté se cubra con la cáscara, principalmente en el ovario, donde se forma la yema, o durante el paso de la yema por el oviducto contaminado, posteriormente la membrana vitelina y la albumina rodean la yema contaminada, el huevo pasa hacia el útero donde se forma el cascarón y posteriormente es expulsado por la vagina o cloaca, en donde puede ser contaminado en su superficie (Martelli,2012; Rincón y cols., 2011; Gantois y cols., 2009).
- **Transmisión transcáscara u horizontal:** En esta vía, se lleva a cabo la contaminación fecal de la superficie externa de la cáscara durante el tránsito a través de la cloaca o después de la oviposición; *Salmonella* penetran en la albumina a través de los poros mediante un proceso de

succión debido a la diferencia térmica entre el huevo recién puesto y el ambiente. (Rincón y cols., 2011; Gantois y cols., 2009).

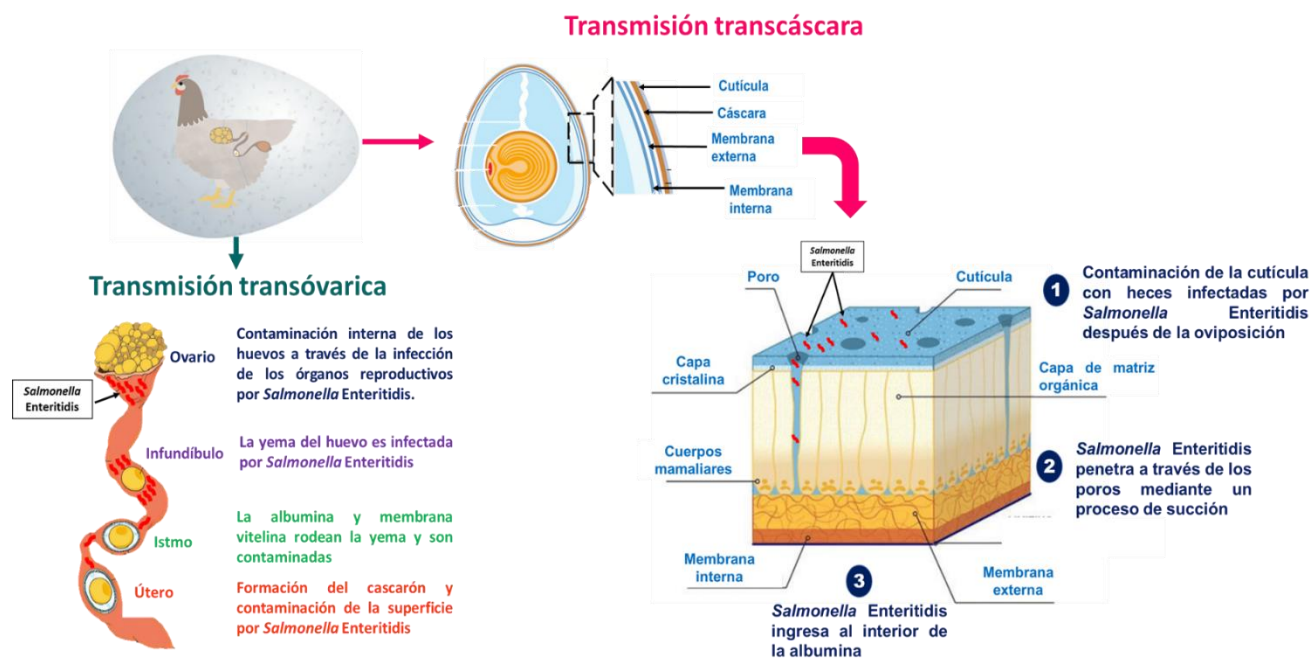


Figura 1: Transmisión transovárica y transcáscara de *Salmonella* Enteritidis en huevos. Imagen modificada de Gantois y cols., 2009.

3.4 Tratamiento de salmonelosis en el sector avícola

3.4.1 Antibióticos

Durante varias décadas antibióticos como la kanamicina, gentamicina, cloranfenicol y furazolidona fueron utilizados en la profilaxis y tratamiento de salmonelosis en las aves de corral, incluso, a principios de 1940 se descubrió que los antibióticos favorecían la ganancia de peso en aves de corral, por lo que se implementaron como promotores del crecimiento (Gonzales y cols., 2013; Lozano y Arias, 2008; Reig y Toldra, 2008; Castanon, 2007). Sin embargo, a lo largo de los años se ha demostrado que los residuos de antibióticos presentes en la carne de aves de corral y otros alimentos de origen animal al ser ingeridos por el humano producen desórdenes en el desarrollo corporal, reacciones alérgicas y propagación de microorganismos resistentes a los antibióticos en el hombre, representando un riesgo para la salud de los consumidores (Organización Mundial de la Salud, 2017; Lozano y Arias, 2008).

Por lo anterior, los principales países productores de aves de corral, como México y Estados Unidos, han eliminado el uso de antibióticos como promotores de crecimiento y restringido su empleo en el tratamiento de enfermedades bacterianas en el sector avícola (Roth y cols., 2019). Además, la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación (**FAO**, por sus siglas en inglés) en conjunto con la Organización Mundial de la Salud (**OMS**) han integrado la Comisión del Codex

Alimentarius con el objetivo de establecer los límites máximos residuales (**LMR**) de un antibiótico en los tejidos comestibles de cada especie animal, que al ser ingeridos por el humano no constituyan ningún riesgo, evitando así la diseminación de cepas bacterianas resistentes a antibióticos entre animales y humanos. La Tabla 1 resume los LMR de algunos antibióticos utilizados en el sector avícola (Comisión del Codex Alimentarius, 2015).

Antibiótico	Año de implementación	Límites Máximos Residuales de antibiótico en cada tejido (µg/kg)				
		Grasa/Piel	Hígado	Músculo	Riñón	Huevos
Avilamicina	2009	200	300	200	200	N.E.
Bencilpenicilina procaínica	1999	N.E.	50	50	50	N.E.
Colistin	2008	150	150	150	200	300
Danofloxacina	2001	100	400	200	400	N.E.
Estreptomycin	2001	600	600	600	1000	N.E.
Eritromicina	2008	100	100	100	100	50
Espectinomycin	1999	2000	2000	500	5000	2000
Flumequina	2005	1000	500	500	3000	N.E.
Lincomicina	2003	200	500	200	500	N.E.
Monensina	2009	100	10	10	10	N.E.
Neomicina	1999	500	500	500	1000	500
Sarafloxin	2001	20	80	10	80	N.E.
Tilosina	2009	100	100	100	100	300
Tilmicosin	2011	250	2400	150	600	N.E.

N.E. No especificado

Tabla 1: Límites Máximos Residuales de antibióticos presentes en carne de pollo o gallina establecidos por la Comisión del Codex Alimentarius. Modificado de: Comisión del *Codex Alimentarius*, 2015

3.4.1.1 *Salmonella* resistente a los antibióticos

La resistencia bacteriana se define como la capacidad que poseen las bacterias para evadir la acción de un antibiótico, mediante la expresión de diferentes mecanismos de resistencia. La creciente aparición y propagación de cepas de *Salmonella* resistentes a fluoroquinolonas y cefalosporinas de tercera generación, ha generado grandes limitaciones en los tratamientos para infecciones humanas. Por lo anterior, la OMS incluyó al género bacteriano *Salmonella* en el listado de bacterias patógenas prioritarias para las que se necesitan los antibióticos (Organización Mundial de la Salud, 2017).

El listado de la OMS se divide en tres categorías:

- **Prioridad crítica:** incluye bacterias que han adquirido resistencia a un elevado número de antibióticos, como los carbapenémicos y las cefalosporinas de tercera generación y que son especialmente peligrosas en hospitales, residencias de ancianos y pacientes que necesitan ser atendidos con dispositivos como ventiladores y catéteres intravenosos.
- **Prioridad elevada:** Incluye bacterias que presentan farmacorresistencia creciente y provocan enfermedades comunes e intoxicaciones alimentarias, en este grupo se incluye a *Salmonella*.
- **Prioridad media:** Incluye bacterias que presentan resistencia a un bajo número de antibióticos, pero que han presentado un aumento en la farmacorresistencia.

3.4.2 Ácidos orgánicos

El incremento de cepas de *Salmonella* multiresistentes a antibióticos, como las fluoroquinolonas, ha obligado a que la industria avícola busque nuevas alternativas en la profilaxis y tratamiento de salmonelosis (Ditoe y cols., 2018; Organización Mundial de la Salud, 2017; Castanon, 2007). Actualmente, una de las alternativas ejecutadas por el sector avícola es el empleo de ácidos orgánicos adicionados en el alimento de las aves de corral, entre los mayormente empleados se encuentran el ácido fórmico, ácido acético y ácido propiónico (Ditoe y cols., 2018). El efecto acidificante de los ácidos orgánicos a nivel intestinal promueve un efecto bactericida y/o bacteriostático y mejoras en la sanidad intestinal de las aves lo que conlleva a un mejor aprovechamiento de los nutrientes del alimento (Lopez, 2010). Los principales mecanismos de acción de los ácidos orgánicos son: actividad antimicrobiana, estimulación de la secreción pancreática y efecto trófico sobre los enterocitos (Ditoe y cols., 2018; Gonzales y cols., 2013). Sin embargo, la principal desventaja del uso de ácidos orgánicos es que estos disminuyen de igual manera los microorganismos pertenecientes al microbiota intestinal de las aves de corral (Gonzales y cols., 2013).

Por otro lado, desde el año 2013 la OMS ha enfatizado la prioridad de buscar nuevas alternativas en el tratamiento de infecciones ocasionadas por el género bacteriano *Salmonella*; por ello, diversos investigadores se han enfocado en buscar nuevas alternativas eficaces y seguras para el tratamiento de salmonelosis aviar entre las iniciativas más destacadas se encuentra la Fagoterapia (Wessels y cols., 2021)

3.5 Fagoterapia en el sector avícola

La Fagoterapia se define como el uso de Bacteriófagos para el tratamiento y control de afecciones generadas por bacterias patógenas; los Bacteriófagos son virus que infectan y lisan bacterias de manera especie-específica (Monk, 2010; Prada Peñaranda y cols., 2015).

Actualmente, diversos investigadores han demostrado que el uso de Bacteriófagos en aves de corral es eficaz para reducir el número de patógenos que colonizan el tracto digestivo como *Salmonella*. Fiorentin y colaboradores (2010) demostraron la eficacia de la eliminación de *Salmonella enteritidis* en los ciegos de pollos de un día de nacidos tratados con un coctel de Bacteriófagos líticos, por otro lado, Ahmadi y colaboradores (2016) determinaron una eficacia del 100% en la eliminación de *Salmonella Enteritidis* en los ciegos de codornices de 33 días de nacidas tratadas con una suspensión de Bacteriófagos, además probaron que la suspensión tiene un efecto profiláctico tras reducir la tasa de infección en un 80% en codornices tratadas con Bacteriófagos y posteriormente expuestas a 100 μ L un cultivo de *Salmonella Enteritidis* con una dosis infectante de 1.2×10^9 UFC/mL. Finalmente, Wernicki y colaboradores (2017) resumen una amplia variedad de trabajos enfocados en el uso de la Fagoterapia en el sector avícola, demostrando que el uso de Bacteriófagos en aves de corral es eficaz para reducir el número de patógenos de *Salmonella* que colonizan el tracto digestivo. Por ejemplo: el trabajo de Andreatti Filho y colaboradores (2007) quienes demostraron que la administración vía oral de un coctel de Bacteriófagos seleccionados ayudó a prevenir la colonización de cepas de *Salmonella Enteritidis* en aves de corral.

Pese a los reportes de éxito de las soluciones y cócteles a base de Bacteriófagos, una de las principales inquietudes es la estabilidad y/o actividad de los fagos tras su paso por el tracto gastrointestinal de las aves de corral, debido principalmente a que las soluciones a base de Bacteriófagos presentan una estabilidad limitada y una pérdida significativa en el título durante el procesamiento y el almacenamiento (Malik y cols., 2017). Por lo anterior, las actuales investigaciones se han enfocado en obtener formulaciones sólidas a partir del uso de biopolímeros, como el alginato, que contenga Bacteriófagos como principio activo permitiendo la administración de Bacteriófagos por vía oral, manteniéndolos protegidos durante su paso a lo largo del tracto gastrointestinal y ser liberados principalmente en el intestino delgado (Colom y cols., 2015; Kutateladze y Adarnia, 2008).

3.6 Alginato y gelificación iónica

El alginato (**ALG**) es un biopolímero natural extraído de las algas marrones principalmente de las especies *Macrocystis pyrifera*, *Laminaria hyperborea* y *Ascophyllum nodosum* (Szekalska y cols., 2016; Lee y Mooney, 2012), se encuentra formado por dos tipos de unidades monoméricas: ácido β -D-manurónico (bloque M) y ácido α -L-glucorónico (bloque G), estos monosacáridos se agrupan formando homopolímeros denominados bloques G (-GGG-) y bloques M (-MMM-) o heteropolímeros en donde los bloques M y G se encuentran alternados, como se muestra en la Figura 2 (Lee y Mooney, 2012; Sachan y cols., 2009). Asimismo, posee la denominación de material "Generalmente Reconocido como Seguro" (**GRAS**) por la Administración de Alimentos y Medicamentos (**FDA**, por sus siglas en inglés), una designación que se aplica a sustancias aceptadas como seguras para uso alimentario. Por otro

lado, debido a la mucoadhesividad, hinchamiento y su capacidad de formar geles en presencia de cationes divalentes como el Mn^{2+} , Ba^{2+} , Cu^{2+} y Ca^{2+} el ALG es uno de los polímeros naturales empleados en la industria farmacéutica como agente espesante y estabilizador de suspensiones y emulsiones, en el diseño y desarrollo de micropartículas para la liberación controlada de fármacos por vía oral, bucal, ocular y vaginal, aplicaciones biomédicas entre las que destacan las matrices para cultivos de tejidos tridimensionales, la inmovilización de microorganismos probióticos, células y enzimas y recientemente la encapsulación de Bacteriófagos (Szekalska y cols., 2016; Rinaudo, 2014; Sosnik, 2014; Lee y Mooney, 2012; Lupo y cols., 2012; Sachan y cols., 2009).

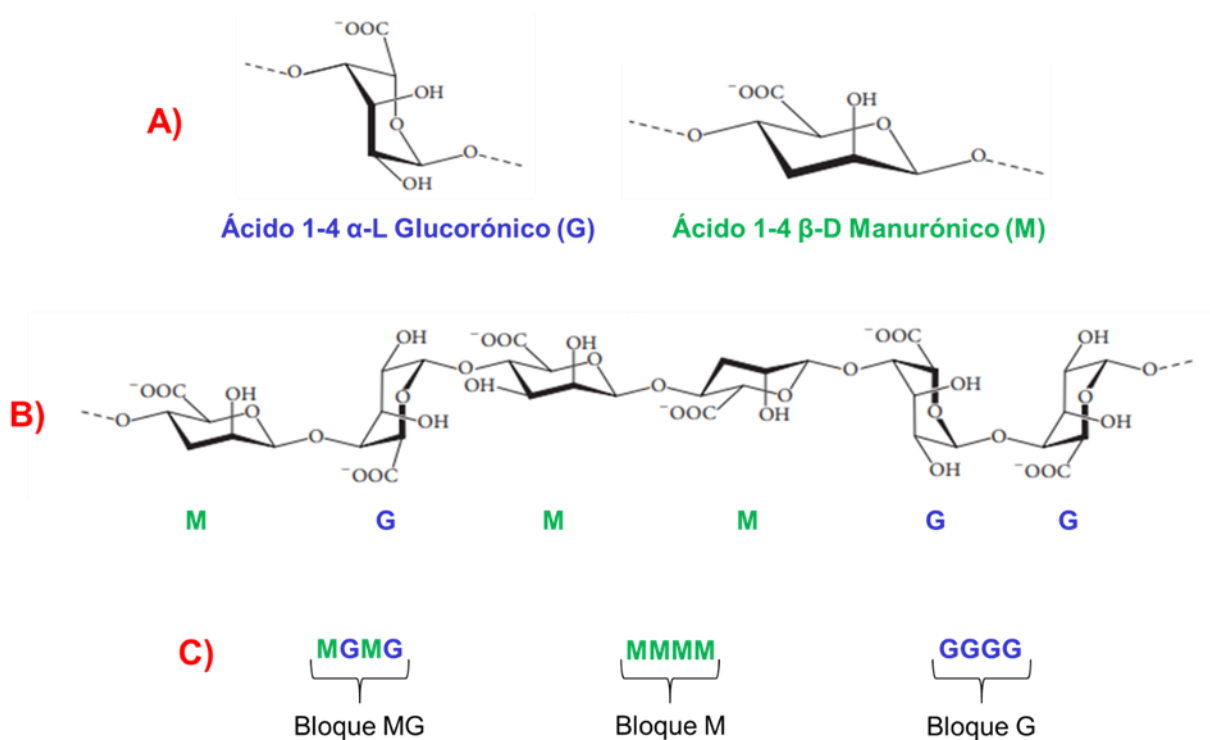


Figura 2: Estructura del alginato.

A) Monómeros base; B) Estructura lineal de la cadena de alginato; C) Distribución de bloques dentro de la cadena. Imagen obtenida y modificada de Szekalska y cols., 2016.

La encapsulación de Bacteriófagos con ALG se lleva a cabo a partir de la técnica de gelificación iónica la cual se fundamenta en la unión intramolecular entre los grupos del ácido carboxílico ubicados en el esqueleto del ALG y los iones de Ca^{2+} presentes; los monómeros de ácido glucorónico presentes se unen a una región similar en otra molécula por medio de calcio, el cual puede conectar una segunda cadena de ALG, dando como resultado es una cadena de filamentos de ALG unidos al calcio que forman un gel sólido de tipo químico, no reversibles al calentarlos, de gran tensión superficial y de

dureza variable, en una amplia variedad de formas que incluyen películas, perlas, micro y nano esferas, etc. Para dar explicación a las propiedades gelificante de los alginatos, Grant propuso en 1973 el “modelo de caja de huevo” (Figura 3), donde se observa el reordenamiento estructural del ALG (Avedaño y cols., 2013; Chandak y cols., 2016; Lupo y cols., 2012; Rinaudo, 2014; Szekalska y cols., 2016; Sosnik, 2014).

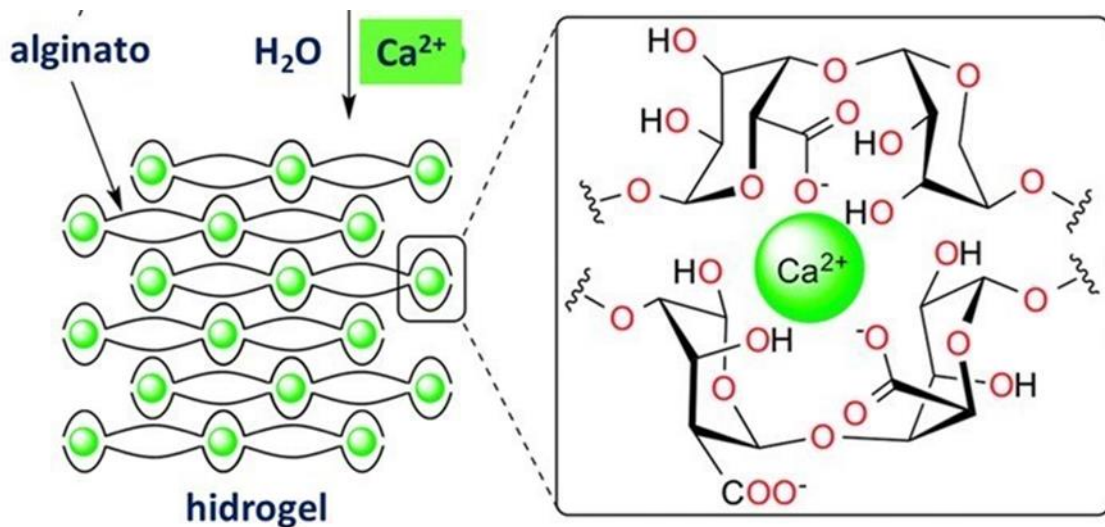


Figura 3: Modelo de caja de huevo propuesto por Grant
Obtenida de Kuhbeck y cols., 2015

La dureza de los geles de ALG depende del contenido de ácido glucorónico en la molécula, se conoce que a mayor contenido de bloques G se forman geles rígidos y quebradizos, mientras que, a mayor cantidad de bloques M los geles formados son suaves y elásticos. El grado de gelificación del gel depende de la hidratación del ALG, la concentración del ion calcio y la proporción de ácido glucorónico; sin embargo, es posible manipular la dureza del gel formado modificando algunas condiciones de elaboración, por ejemplo: pH, concentración de iones y concentración de ALG, esta técnica ha sido ampliamente utilizada debido a la sencillez de su preparación a nivel laboratorio (Sosnik, 2014; Rinaudo, 2014; Avedaño y cols., 2013; Lupo, y cols., 2012).

3.7 Microesferas de alginato como sistemas de administración de Bacteriófagos

Las microesferas se definen como pequeñas partículas esféricas con diámetros desde 1 μm hasta 1000 μm donde el principio activo se encuentra distribuido en el interior de la matriz protegido de condiciones como: pH, temperatura, disolventes orgánicos y contaminación (Chandak y cols., 2016)

Dentro de los estudios sobre la encapsulación de Bacteriófagos con ALG se encuentra el trabajo de Yongsheng y colaboradores (2008), quienes encapsularon al Bacteriófago Félix O1 específico para

Salmonella spp en microesferas de ALG-CaCl₂ recubiertas con quitosan y evaluaron en ensayos *In vitro* el efecto del Fluido Gástrico Simulado (**FGS**), sales biliares y Fluido Intestinal Simulado (**FIS**) sobre la infectividad del Bacteriófago demostrando que el fago no encapsulado no fue detectable después de una exposición de 5 minutos a pH inferiores de 3.7 mientras que el Bacteriófago encapsulado disminuyó solo 2.58 unidades logarítmicas tras exponer las microesferas a FGS durante 60 min. La exposición en sales biliares al 1 y 2% mostró que la infectividad del fago no encapsulado disminuía en 1.29 y 1.67 unidades logarítmicas, respectivamente; por su parte, el Bacteriófago contenido en las microesferas no mostró pérdida en los recuentos fágicos. Finalmente, la exposición en FIS (pH 6,8) durante 6 h permitió la liberación total del Bacteriófago Félix O1 encapsulado, por lo que se concluyó que la técnica de microencapsulación por gelificación iónica con ALG permite al Bacteriófago Félix O1 mantenerse infectivo en el medio ácido. Por su parte, Moghtader y colaboradores. (2017) encapsularon el Bacteriófago T4 en microesferas de ALG-CaCl₂ recubiertas con quitosano o polietilenimina con un tamaño de partícula de 900 a 950 µm. La evaluación *In vitro* demostró la capacidad infectiva del Bacteriófago no encapsulado disminuyo por debajo de 10³ unidades formadoras de placa por mililitro (**UFP/mL**) cuando se expuso a pH 2.5, sin embargo, las microesferas recubiertas con quitosan y polietilenimina redujeron significativamente la pérdida del Bacteriófago cuando se exponen a pH ácido. Además, el Bacteriófago encapsulado no mostró disminución significativa en los recuentos fágicos tras la exposición en sales biliares al 1% durante 2 h por su parte, el Bacteriófago no encapsulado disminuyó en aproximadamente 1.44 unidades logarítmicas después de incubación.

3.7.1 Liberación a partir de microesferas de alginato

La exhortación del uso de microesferas en el diseño de formulaciones sólidas de administración oral de Bacteriófagos que no son estables en fluidos gástricos se debe a que principalmente a que, durante la exposición a pH ácido por ejemplo del estómago, se forma una capa insoluble y porosa de ácido algínico evitando la hinchazón de la membrana de ALG entrecruzado con calcio por lo que no se permite la liberación del producto encapsulado (Sosnik,2014; Ghosal y Ray, 2011). Por otro lado, a valores de pH neutro y básico por ejemplo del intestino, las microesferas llevan a cabo un proceso "hinchazón-disolución-erosión" donde, el gradiente de presión que existe entre la microesfera y el medio aumenta, lo que provoca la hidratación, hinchamiento y disolución de la membrana polimérica permitiendo la liberación del principio activo hacia el exterior, como se muestra en la Figura 4 (Hjorth y Karlsen, 2002).

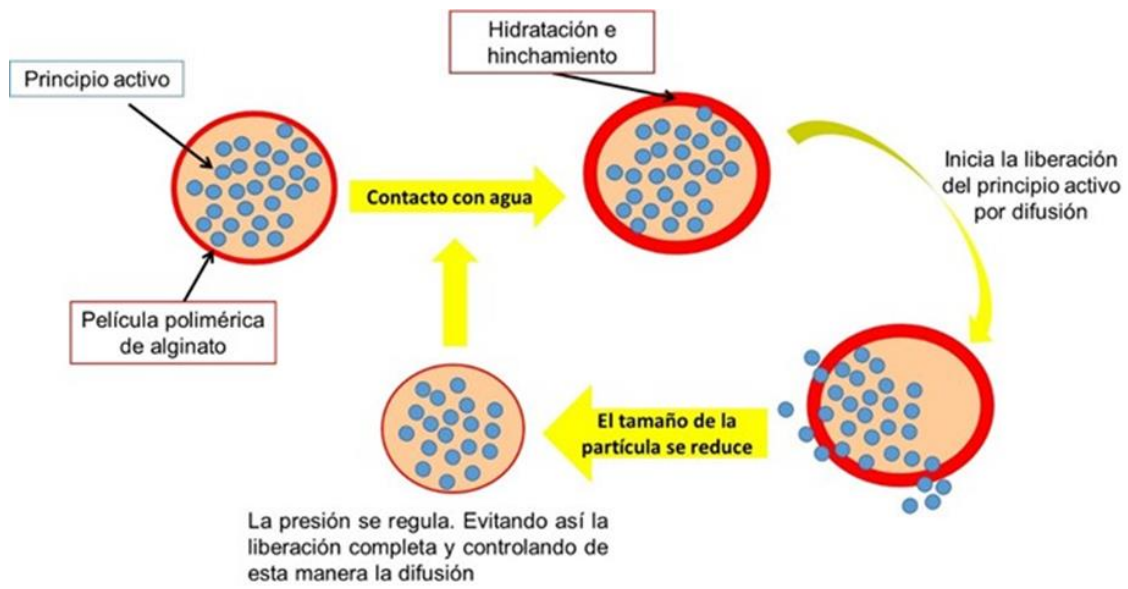


Figura 4. Representación gráfica del proceso de liberación de principios activos contenidos en sistemas de alginato. Imagen modificada de Rojas y cols., 2008

4 ANTECEDENTES

La restricción del uso de antibióticos en el sector avícola ha obligado a la comunidad científica a buscar tratamientos efectivos que eviten la infección de las aves de corral (Wessels y cols., 2021; Roth y cols., 2019; Organización Mundial de la Salud, 2017). Una alternativa en el tratamiento de enfermedades infecciosas bacterianas que ha demostrado ser efectiva en los últimos años, es el uso de Bacteriófagos (Fagoterapia) (Wessels y cols., 2021; Choińska y cols., 2015). Por lo anterior, en los últimos años se han desarrollado formas farmacéuticas sólidas a base de polímeros con la finalidad de obtener sistemas orales que garanticen la resistencia de los Bacteriófagos a las condiciones gástricas de aves, permitiendo la liberación en el intestino delgado infectado por *Salmonella* spp (Qadir y cols., 2018; Górski y cols., 2018; Choińska y cols., 2015; Malik y cols., 2017; Sillankorva, y cols., 2012).

El Bacteriófago S1 empleado en el presente proyecto fue aislado de aguas residuales de la ciudad de Cuernavaca Morelos, caracterizado parcialmente en el Laboratorio 9 de Microbiología y Parasitología de la UAEM. Se determinó que es un fago con morfología de placa característica de los fagos pertenecientes a la familia *Myoviridae*, posee una longitud de 200 nm y un diámetro de 50 nm, lleva a cabo el ciclo replicativo lítico y es específico para *Salmonella* Enteritidis, pierde significativamente su capacidad lítica cuando se expone a temperaturas mayores a 50°C, radiación ultravioleta (UV) por periodos superiores a los tres minutos y valores pH inferiores a 3.0 y mayores a 9.0 (Segundo-Arizmendi, 2017).

En estudios previos, el Bacteriófago S1 fue encapsulado en esferas de ALG-CaCl₂ con un tamaño promedio de 3.73 ± 0.04 mm y una eficacia de encapsulación del 70%. La evaluación *In vitro* mostró que la liberación del Bacteriófago S1 encapsulado ocurre a valores de pH superiores a 6.9 además, se determinó que las esferas de ALG conteniendo al Bacteriófago S1 disminuyen en 1.16 unidades logarítmicas (UFC/mL) un cultivo de *Salmonella* Enteritidis incubado a 37°C, 120 rpm durante 24 h. La evaluación *In vivo* en el modelo *Gallus gallus domesticus* confirmó que las esferas de ALG son desintegradas en el buche de los pollos; sin embargo, se logró identificar zonas líticas características del Bacteriófago S1 en duodeno y ciegos, cavidades colonizadas por el género bacteriano *Salmonella*, por lo que se concluyó que las esferas de ALG- CaCl₂ son un sistema eficaz para el empleo en fagoterapia. Por otro lado, es importante destacar que el tamaño de las esferas obtenidas representa una limitante en la administración por vía oral en el modelo empleado (Gómez-García, 2017).

Por lo anterior, el presente trabajo tiene como objetivo desarrollar una formulación de microesferas de ALG por el método de gelificación iónica y su posterior evaluación como sistema de entrega, vía oral, de Fagoterapia en el modelo de *Gallus gallus domesticus* como posible tratamiento de salmonelosis en el sector avícola.

5 JUSTIFICACIÓN

La bacteria *Salmonella* Enteritidis es uno de los principales patógenos transmitidos por alimentos de origen avícola y fue incluida en la categoría de “prioridad elevada” del listado de bacterias resistentes para las que se necesitan urgentemente nuevos tratamientos, publicado por la Organización Mundial de la Salud en el año 2017; además, el uso de Bacteriófagos encapsulados en sistemas sólidos de administración oral aplicada en el sector avícola han demostrado ser una opción efectiva como tratamiento de enfermedades infecciosas bacterianas.

En trabajos previos, el Bacteriófago S1 encapsulado en esferas de alginato demostró mantener su capacidad lítica tras su paso por el tracto gastrointestinal de *Gallus gallus domesticus* garantizando su llegada a duodeno y ciegos, sin embargo, el tamaño de partícula demostró ser una limitante para la administración oral en aves de corral. Por lo anterior, el presente trabajo propone encapsular el Bacteriófago S1 en microesferas de alginato para la administración oral en el alimento de aves de corral y evaluar su eficacia como sistema de entrega de Fagoterapia en el modelo de *Gallus gallus domesticus*.

6 HIPÓTESIS

Si las microesferas de alginato obtenidas por el método de gelificación iónica son capaces de proteger y liberar al Bacteriófago S1 entonces, la formulación favorecerá la eliminación de *Salmonella* Enteritidis en el modelo *in vivo* de *Gallus gallus domesticus*.

7 OBJETIVOS

7.1 General

Obtener microesferas de alginato por el método de gelificación iónica y evaluar su capacidad en la entrega de Fagoterapia en el modelo de *Gallus gallus domesticus* como posible tratamiento de salmonelosis en el sector avícola.

7.2 Particulares

- 1) Determinar la infectividad del Bacteriófago S1 sobre cepas de *Salmonella* de interés avícola.
- 2) Obtener microesferas de alginato conteniendo al Bacteriófago S1.
- 3) Evaluar la eficacia de encapsulación del Bacteriófagos S1 mediante pruebas *in vitro*.
- 4) Evaluar la liberación del Bacteriófago S1 encapsulado en un modelo *in vitro* de fluido gástrico e intestinal simulado.
- 5) Evaluar la eficacia de la formulación del Bacteriófago S1 para eliminar *Salmonella* Enteritidis en el modelo *in vivo* (*Gallus gallus domesticus*)

8 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

La estrategia experimental del presente trabajo se esquematiza en la Figura 5.

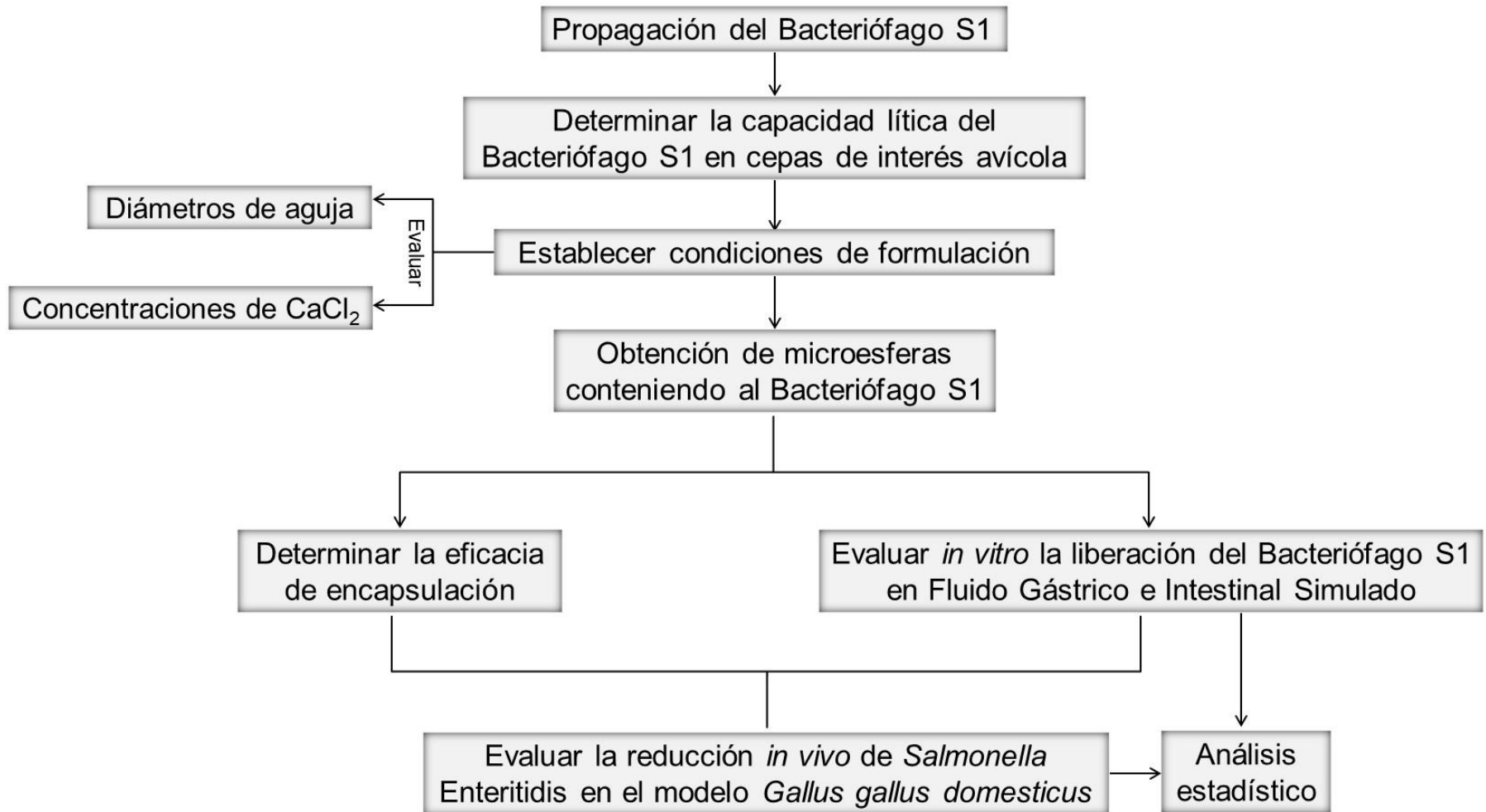


Figura 5: Estrategia experimental

9 MATERIALES

9.1 Biológicos

❖ Cepas bacterianas

- **Salmonella Enteritidis (cepa indicadora):** *Salmonella enterica* serovar Enteritidis fago tipo 13A (SE PT13A), se obtuvo de un aislado clínico en aves de corral en el Laboratorio Nacional de Servicios Veterinarios del USDA (Ames, IA, Estados Unidos) y fue donada por el Dr. Billy Hargis y el Dr. Guillermo Téllez del Departamento de Ciencias Avícolas de la Universidad de Arkansas.
- **Salmonella Pullorum (MDR-MC862-A) y Salmonella Gallinarum (MDR-MC862-B):** Obtenidas de aislados clínicos en aves de corral y donados por la Facultad de Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México.

❖ **Bacteriófago S1:** Obtenido y aislado de aguas residuales de la ciudad de Cuernavaca Morelos, identificado y caracterizado en el laboratorio 9 de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia de la UAEM.

❖ **Modelo *in vivo*:** Pollos domésticos (*Gallus gallus domesticus*).

9.2 Soluciones

❖ **Solución salina fisiológica:** Se preparó utilizando cloruro de sodio (NaCl) a una concentración de 0.85 %, se mezcló perfectamente y esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 min, finalmente se almacenó a temperatura ambiente hasta su uso.

❖ **Solución de ALG:** En 100 mL agua previamente calentada se añadió lentamente 2 g de ALG de sodio grado técnico, la solución se mantuvo en agitación constante hasta la completa disolución del ALG. Posteriormente se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 min, se sometió a prueba de esterilidad y se almacenó a temperatura ambiente hasta su uso.

❖ **Solución de cloruro de calcio (CaCl₂):** Se agregaron 2 g de CaCl₂ a 100 mL de agua destilada se homogenizó y se esterilizó en autoclave a 15 libras de presión, 121°C durante 15 min finalmente, se almacenó a temperatura ambiente hasta su uso.

❖ **Solución “Broken-Microsphere” (SBM):** En 100 mL de agua destilada se agregó la cantidad necesaria de reactivos para llegar a las concentraciones siguientes: citrato de sodio 50 mM y bicarbonato de sodio 0.2 M, posteriormente la solución se ajustó a pH 7,5 con HCl 0.2 N estéril y se filtró en esterilidad con membranas de 0.22 µm, finalmente la solución se almaceno a temperatura ambiente.

- ❖ **Agar Blando (AB):** Se preparó utilizando Agar Bacteriológico a una concentración de 7% p/v, se homogenizó y se esterilizó en autoclave a 15 libras de presión, 121°C durante 15 min finalmente, se almacenó a temperatura ambiente hasta su uso.

10 MÉTODOS

10.1 Identificación y mantenimiento de las cepas bacterias

Las cepas bacterianas *Salmonella* Enteritidis (cepa indicadora), *Salmonella* Pullorum (MDR-MC862-A) y *Salmonella* Gallinarum (MDR-MC862-B) se recuperaron de tubos conservados a -20°C y descongelados a temperatura ambiente. Posteriormente, en condiciones de esterilidad se tomó 200 µL de cada cepa bacteriana, se inocularon en tubos que contenían 5 mL de caldo soya tripticaseína (**TSB**) estéril y se incubaron a 37°C durante 24 h; al término de este lapso, se tomó un inóculo de 50 µL de cada cultivo y se sembró en cajas Petri conteniendo agar *Salmonella – Shigella* (**ASS**) y agar soya tripticaseína (**TSA**), para comprobar la identidad de las cepas se realizaron pruebas bioquímicas representativas de la especie. Todas las cepas bacterianas se mantuvieron en refrigeración a 4°C hasta su uso.

10.2 Propagación del Bacteriófago S1

El proceso de propagación del Bacteriófago S1 se realizó de acuerdo con la técnica descrita por Segundo-Arizmendi (2016). Por cada 10 mL de medio de cultivo TSB estéril se inoculó con 500 µL de un cultivo de 24 h de la cepa *Salmonella* Enteritidis, se incubó a 37°C durante 120 min con agitación a 120 rpm (incubadora Lumistell modelo ISO-45); al término de este lapso el cultivo se infectó con el Bacteriófago S1 y se utilizó una multiplicidad de infección (**MOI**) de 1 e incubó nuevamente a 37°C con agitación a 120 rpm durante 5 h. Posteriormente, el cultivo se centrifugó a 1300g durante 15 min (centrifuga Centrificient V1 CRM Globe), recuperando el sobrenadante, el cual se filtró utilizando membranas estériles de tamaño de poro de 0.45 µm, el filtrado del Bacteriófago, se almacenó a 4°C, hasta su uso posterior (Figura 6).

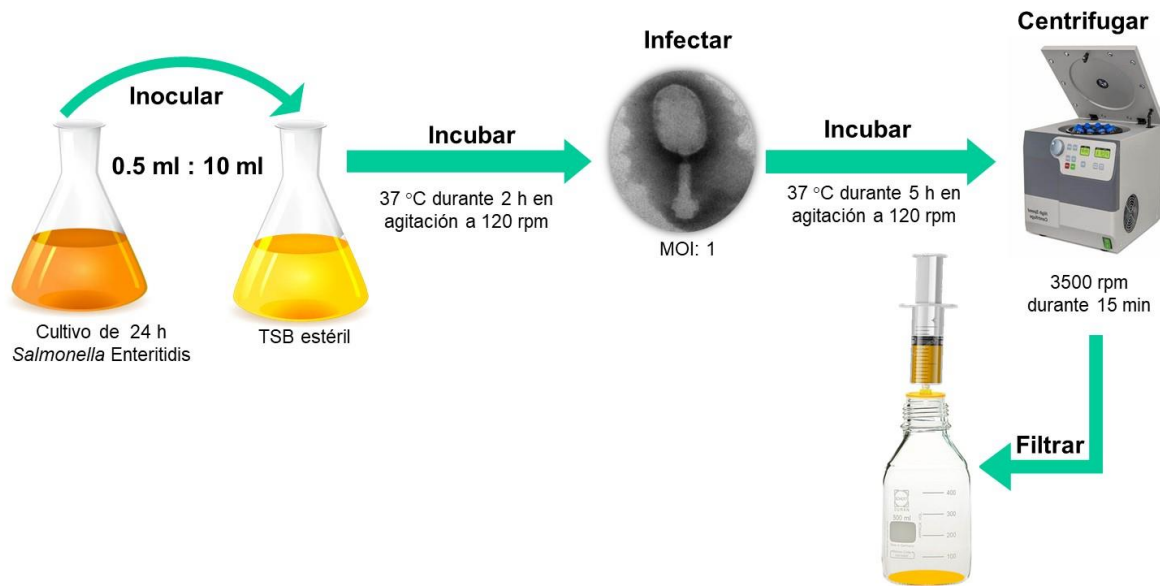


Figura 6: Método de propagación del Bacteriófago S1

10.3 Determinación del título fágico

La determinación del título fágico se llevó a cabo mediante la técnica de vaciado en doble placa reportada por Adam en 1959. Por un lado, se ajustó la cepa indicadora a una concentración de 1.6×10^8 UFC/mL, por otro lado, se realizaron diluciones seriales decimales del Bacteriófago S1 con un volumen final de 5 mL posteriormente, se inoculó una alícuota de 100 μ L de cada dilución y 100 μ L de la cepa indicadora ajustada en tubos que contenían tres mililitros de agar blando (**AB**) previamente licuado, finalmente esta mezcla se vertió en una caja de Petri que contenía 20 mL de TSA y se incubó a 37°C durante 24 h (Figura 7). Para obtener el título del Bacteriófago se empleó la Ecuación 1.

$$\text{Título fágico} = [\# \text{ de placas}] \left[\frac{1}{\text{dilución}} \right] \left[\frac{1}{\text{alícuota}} \right]$$

Ecuación 1: Fórmula para determinar el título fágico

Donde:

de placas= Promedio de las UFP (Unidades Formadoras de Placas) contabilizadas

(1/dilución) = Inverso de la dilución en la que se obtuvieron entre 25 y 250 UFP

(1/alícuota) = Inverso de la alícuota sembrada en la caja de Petri en 1 mL.

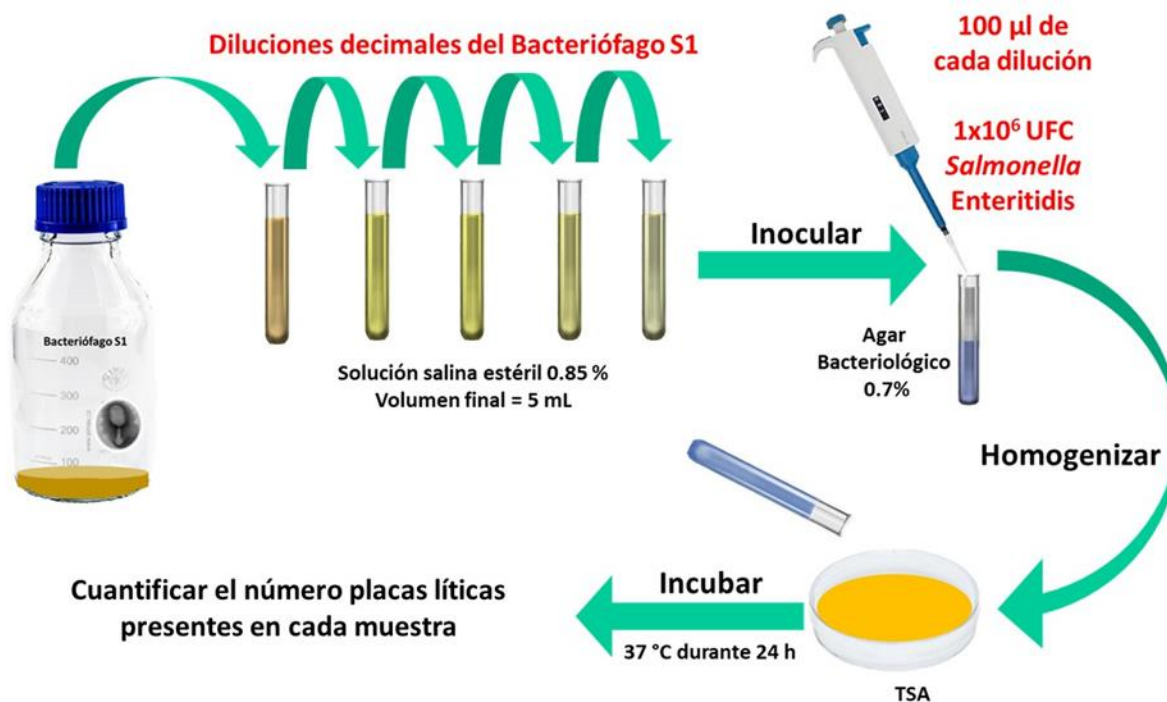


Figura 7: Método de sembrado en doble placa
Modificado de Jebri y cols., 2017.

10.4 Determinación de la actividad lítica del Bacteriófago S1 en cepas de interés avícola

La determinación de la actividad lítica del Bacteriófago S1 en *Salmonella* Pullorum (MDR-MC862-A) y *Salmonella* Gallinarum (MDR-MC862-B) se realizó de acuerdo con la técnica descrita por Kutter (2009) y Montso y colaboradores (2019) con algunas modificaciones. En primer lugar, se realizó una prueba puntual de lisis, para ello en condiciones asépticas las cepas *Salmonella* Pullorum (MDR-MC862-A) y *Salmonella* Gallinarum (MDR-MC862-B) se inocularon en placas Petri conteniendo medio de cultivo TSA por la técnica de vaciado en doble placa, posteriormente, se añadió una alícuota de 50 µL del Bacteriófago S1 propagado, la placa contenedora se mantuvo a temperatura ambiente en condiciones asépticas hasta que la gota fue absorbida en el agar. A continuación, las placas se incubaron durante 24 h a 37°C, para posteriormente buscar las denominadas zonas de lisis, es decir zonas de no crecimiento bacteriano en el punto de aplicación.

10.4.1 Determinación de la eficiencia de plaqueo (EOP)

Una vez identificadas las zonas de lisis del Bacteriófago S1 se llevó a cabo la determinación de la eficiencia de plaqueo (**EOP**), de acuerdo con la técnica descrita por Montso y colaboradores (2019). Por un lado, las cepas bacterianas se ajustaron a un título de 1.6×10^8 UFC/mL, por otro lado, se prepararon diluciones decimales seriales del Bacteriófago S1 hasta obtener un título fágico de 1×10^2

UFP/mL. Posteriormente, una alícuota de 100 µL del Bacteriófago S1 se colocó junto con 100 µL de las cepas ajustadas y se mantuvo durante 10 min a temperatura ambiente, al término del tiempo se añadieron 3 mL de agar bacteriológico al 0.7% p/v y finalmente se vertió sobre placas Petri conteniendo medio de cultivo TSA que se incubaron a 37°C durante 24 h.

El valor EOP del Bacteriófago S1 para cada cepa evaluada se obtuvo de acuerdo con la ecuación 2 reportada por Montso y colaboradores (2019) y se clasificó en alto ($EOP \geq 0.5$), medio ($0.5 > EOP > 0.1$) y bajo ($EOP \leq 0.1$).

$$\text{Valor EOP} = \left[\frac{\text{promedio de UFP en la bacteria evaluada}}{\text{promedio de UFP en la bacteria de referencia}} \right]$$

Ecuación 2: Fórmula para determinar la eficiencia de plaqueo en Bacteriófagos

10.5 Determinación de las condiciones de formulación

10.5.1 Evaluación de diámetros de agujas para la obtención de microesferas

Con la finalidad de obtener microesferas con un tamaño menor a 1 mm de diámetro se preparó una solución de ALG 2% p/v a la cual se añadió 15 mL de medio caldo soya tripticaseína con colorante cristal violeta al 30% v/v. La solución ALG-colorante se añadió por goteo a una solución de CaCl_2 0.2 M a una velocidad de 1 mL/min empleando tres diferentes agujas con diámetro interno de 0.8, 0.5 y 0.3 mm, las microesferas obtenidas se midieron utilizando un calibrador vernier electrónico. Finalmente, se seleccionó la aguja con la que se obtuvo menor tamaño de partícula para emplearse en los ensayos posteriores.

10.5.2 Evaluación de la concentración de CaCl_2 para el proceso de encapsulación

Se preparó una solución ALG – colorante que se extruyó con la aguja del diámetro seleccionado (0.3 mm) a una velocidad de goteo de 1 mL/min sobre cuatro diferentes concentraciones de CaCl_2 (0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 M); las microesferas obtenidas se expusieron durante 5, 10, 15 y 20 min en cada una de las soluciones de CaCl_2 al término del tiempo se realizaron tres lavados con agua destilada estéril. Posteriormente las microesferas se almacenaron a temperatura ambiente durante 24 h para finalmente ser medidas utilizando un calibrador vernier electrónico y observadas en un microscopio óptico Olympus Cover-015.

Para la obtención de las microesferas se seleccionó la concentración de CaCl_2 donde se observó mayor retención de colorante e integridad de la membrana periférica de las esferas.

10.6 Obtención de microesferas de alginato-CaCl₂ conteniendo al Bacteriófago S1

Se preparó 50 mL de solución de ALG al 2% y se añadió 15 mL de Bacteriófago S1 en solución. La mezcla ALG – Bacteriófago se extruyó empleando la aguja de diámetro seleccionado (0.3 mm ó 0.5 mm) a una velocidad de goteo de 1 mL/min sobre la solución de CaCl₂ a la concentración seleccionada y se mantuvieron durante 5 min, al término de ese lapso se realizaron tres lavados con agua destilada estéril y las microesferas obtenidas se almacenaron a temperatura ambiente y 4°C durante 24 h.

10.6.1 Determinación de la infectividad del Bacteriófago S1 encapsulado en microesferas de alginato-CaCl₂

Con la finalidad de determinar la infectividad del Bacteriófago S1 encapsulado en las microesferas se preparó 100 mL de SBM como se describe en el punto 7.2. En condiciones asépticas, se colocaron 1 g de microesferas y 20 mL de SBM, la mezcla se mantuvo en agitación constante a 120 rpm hasta la desintegración total de las microesferas, es decir, hasta no visualizar microesferas en la solución. Posteriormente, se realizó la prueba puntual de lisis descrita por Montso y colaboradores (2019) para la cual, en cajas Petri conteniendo medio de cultivo TSA previamente inoculado con *Salmonella* Enteritidis se colocaron 50 µL de la solución, se dejó secar al aire durante 30 min y finalmente se incubó a 37°C durante 24 h para visualizar la presencia de zonas de lisis en el punto de aplicación. Una vez garantizada la infectividad del Bacteriófago S1 encapsulado se procedió a establecer los parámetros finales para la obtención de tres formulaciones.

10.7 Determinación de la eficiencia de encapsulación

Para cada una de las formulaciones obtenidas se determinó la carga de Bacteriófago S1 contenido en las microesferas de acuerdo con lo establecido por Boggione y colaboradores (2017) y Colom y colaboradores (2015) con modificaciones. En condiciones asépticas, se colocaron 1 g de microesferas y 20 mL de SBM, se mantuvo en agitación constante a 120 rpm utilizando una incubadora con agitación orbital (Lumistell modelo ISO-45) visualizando durante intervalos de tiempo de 30 min hasta la visualización de la disolución de las microesferas. Posteriormente, se determinó el título del Bacteriófago S1 contenido en la solución como se describe en el punto 8.3. La eficacia de encapsulación del Bacteriófago S1 se determinó mediante la Ecuación 3 reportada por Boggione y colaboradores (2017).

$$\text{Eficacia de encapsulación} = \left[\frac{\text{cantidad de UFP recuperadas}}{\text{cantidad de UFP añadidas}} \right] [100]$$

Ecuación 3: Fórmula para determinar la eficacia de encapsulación

10.8 Liberación del Bacteriófago S1 encapsulado en un modelo *in vitro* de fluido gástrico e intestinal simulado

La simulación *in vitro* de la liberación del Bacteriófago S1 encapsulado en microesferas de ALG y el comportamiento del Bacteriófago no encapsulado en diferentes condiciones de pH gástrico e intestinal de pollos se evaluó de acuerdo con lo reportado por Ma y colaboradores (2016) y Gu y colaboradores (2011) con algunas modificaciones. Inicialmente se prepararon dos mezclas mostradas en la Tabla 2. Posteriormente, con el objetivo de imitar el pH y el tiempo de tránsito de las aves de corral a cada mezcla se añadió 6 mL de NaCl 0.85% ajustada a pH 5.5 se incubaron en agitación a 120 rpm y 40°C durante 30 min (simulación del buche), al término de este lapso, se centrifugó a 3500 rpm durante 1 min y se realizó 3 lavados con 5 mL de agua destilada estéril recolectando el sobrenadante. Después, se añadió 10 mL de fluido gástrico simulado que contenía NaCl 0.85% ajustada a pH 3.0 y se incubaron en agitación a 150 rpm y 40°C durante 45 min (simulación de proventrículo y molleja) posteriormente, se centrifugó y lavó como se mencionó anteriormente. Finalmente, las mezclas se expusieron a 10 mL de fluido intestinal simulado compuesto de NaCl 0.85% ajustada a pH 6.8 y se incubó en agitación a 100 rpm y 40°C durante 30 min (simulación de yeyuno + íleon) y se procedió a realizar los lavados correspondientes. El título del Bacteriófago para cada una de las muestras se determinó realizando diluciones decimales seriales de los sobrenadantes recolectados de cada compartimento simulado, mediante la técnica descrita en el punto 8.3.

Contenido	Mezcla A	Mezcla B
Bacteriófago S1 encapsulado en microesferas de alginato	N.A.	1 g
Bacteriófago S1 propagado y en solución	1 mL	N.A.
Alimento	1 g	1 g
Perlas de vidrio	1 g	1 g

N.A. No aplica

Tabla 2: Composición de mezclas para la determinación de la protección y liberación *In vitro* del Bacteriófago S1 en FGS y FIS.

10.9 Eliminación de *Salmonella enterica* serovar Enteritidis en el modelo *In vivo* (*Gallus gallus domesticus*)

El ensayo *In vivo* se realizó con base en lo reportado por Wernicki y colaboradores (2017).

10.9.1 Recepción y acondicionamiento del modelo biológico

Se utilizó un total de 60 pollos (*Gallus gallus domesticus*) de 1 día de edad los cuales se mantuvieron en el animalario de la Facultad de Farmacia de la UAEM por un período de 7 días para su adaptación con alimento comercial de iniciación y agua *ad libitum*, para garantizar que los pollos se encontrarán

libres de *Salmonella* spp., tras su llegada al animalario, se tomaron muestras de hisopados cloacales los cuales, fueron sembrados en placas Petri conteniendo A-XLD, posteriormente, se incubó 37°C durante 24 h y se determinó el género bacteriano mediante la visualización de la morfología colonial macro y microscópica y pruebas bioquímicas primarias. Finalmente, los pollos se distribuyeron en seis grupos (n=10 por grupo).

10.9.2 Infección y tratamiento de los grupos

La infección se realizó por vía oral mediante sonda nasogástrica pediátrica con 2 mL de cultivo líquido de *Salmonella* Enteritidis. a los grupos indicados en la Tabla 3. Para garantizar la presencia de la bacteria se tomaron hisopados cloacales a las 72 h post infección, las muestras se sembraron en placas Petri conteniendo A-XLD e incubaron a 37°C durante 24 h; una vez garantizada la infección debido a la presencia de *Salmonella* Enteritidis se cuantificó las UFC/mL en cada animal infectado. Posteriormente, se administró una dosis del tratamiento correspondiente a cada grupo como se indica en la Tabla 3. La reducción de *Salmonella* Enteritidis se determinó a partir de diluciones decimales seriales de muestras de hisopados cloacales obtenidas a los días 3, 5 y 7 posteriores a la última administración del tratamiento, cada dilución se sembró por triplicado en placas Petri conteniendo A-XLD, las placas se incubaron a 37°C durante 24 h, al término de este lapso se llevó a cabo la cuantificación de las UFC/mL. Por otro lado, con la finalidad de comprobar si las microesferas de alginato pueden emplearse como tratamiento profiláctico de salmonelosis en el sector avícola al sexto grupo, denominado PROF, se administró directamente sobre el alimento una dosis única de microesferas de alginato conteniendo al Bacteriófago S1 en una proporción 1:1. A las 24 h post tratamiento se infectó vía oral con 3 mL de cultivo de *Salmonella* Enteritidis a una dosis infectiva de 6.8×10^8 UFC/mL durante tres días consecutivos. Finalmente, se realizaron diluciones decimales seriales de muestras de hisopados cloacales obtenidas a los días 3, 5 y 7 posteriores a la última infección para determinar las UFC/mL presentes en el modelo biológico.

Clave	Infección	Tratamiento
CTRL		Sin tratamiento
ALGm+BS1	S.E. a 1×10^8	ALG-microesferas + S1
ALGm	UFC/mL	ALG-microesferas
TMP-SMX		Trimetoprim Sulfametoxazol veterinario
AcidBA-vet		Mezcla de ácido butírico y acético de uso veterinario
PROF*	S.E. a 6.8×10^8	ALG-microesferas + S1
	UFC/mL	

S.E. *Salmonella* Enteritidis; S1. Bacteriófago S1; ALG. Alginato. La dosis de todos los tratamientos con microesferas de alginato será 1 g de microesferas por 1 g de alimento. La dosis del tratamiento con antibiótico será 8 g de Trimetoprima-Sulfametoxazol en 4 L de agua. La dosis de la mezcla de acidificante (ácido butírico y ácido acético) será 0.05 g de polvo por 100 g de alimento. * La infección del grupo fue realizada posterior al tratamiento. n= 60 pollos, 10 por grupo

Tabla 3: Registro de infección y tratamiento en cada grupo experimental del ensayo *In vivo*

11 RESULTADOS

11.1 Determinación de la actividad lítica del Bacteriófago S1 en cepas de interés avícola

Los resultados de la prueba puntual de la actividad lítica del Bacteriófago S1 frente a *Salmonella Pullorum* (MDR-MC862-A) y *Salmonella Gallinarum* (MDR-MC862-B) se muestran en la Figura 8, en la cual se observa la presencia de zonas líticas (marcadas en rojo) indicativas de la capacidad lítica del Bacteriófago S1 sobre las cepas bacterianas evaluadas. Por otro lado, el Bacteriófago S1 mostró una alta capacidad lítica con valores de eficiencia de plaqueo de 0.61 en *Salmonella Pullorum* (MDR-MC862-A) y 0.58 en *Salmonella Gallinarum* (MDR-MC862-B).

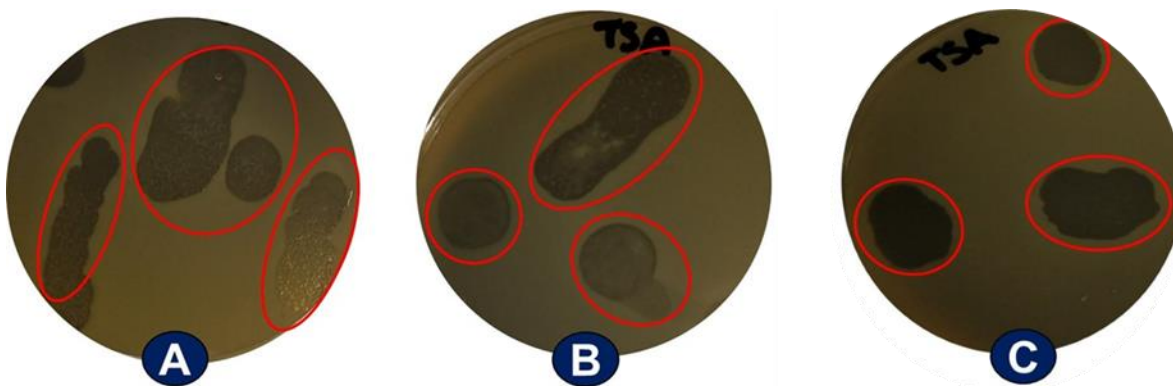


Figura 8: Zonas líticas correspondientes a la capacidad infectiva del Bacteriófago S1 contra cepas de interés avícola. A) *Salmonella Pullorum* (MDR-MC862-A); B) *Salmonella Gallinarum* (MDR-MC862-B); C) *Salmonella Enteritidis* (control positivo)

11.2 Evaluación de diámetros de agujas para la obtención de microesferas

La Tabla 4 resume el tamaño promedio de las esferas obtenidas con cada uno de los tres diferentes diámetros de aguja evaluados. Las microesferas obtenidas con la aguja de 0.3 mm de diámetro interno presentaron menor tamaño de partícula, por lo que se seleccionó este diámetro de aguja para ensayos posteriores.

Diámetro (mm)	Tamaño obtenido (mm) \pm D.E.
0.8	1.82 \pm 0.650
0.5	0.67 \pm 0.032
0.3*	0.38 \pm 0.020

* Diámetro de aguja seleccionado; D.E. Desviación estándar.

El valor de tamaño mostrado es el promedio de 100 mediciones

Tabla 4: Tamaño de esferas obtenidas de la evaluación con tres diferentes diámetros de aguja

11.3 Evaluación de la concentración de CaCl_2 en el proceso de encapsulación

Los resultados obtenidos de la medición de microesferas obtenidas con aguja de diámetro interno 0.3 mm, expuestas a diferentes concentraciones de la solución gelificante de CaCl_2 durante 5, 10, 15 y 20 min y almacenadas a temperatura ambiente se muestran en la Figura 9, donde se observa que a una mayor concentración de CaCl_2 se obtienen microesferas de mayor tamaño, sin embargo, el tamaño de las microesferas disminuye con respecto a la prolongación del tiempo de contacto en la solución gelificante.

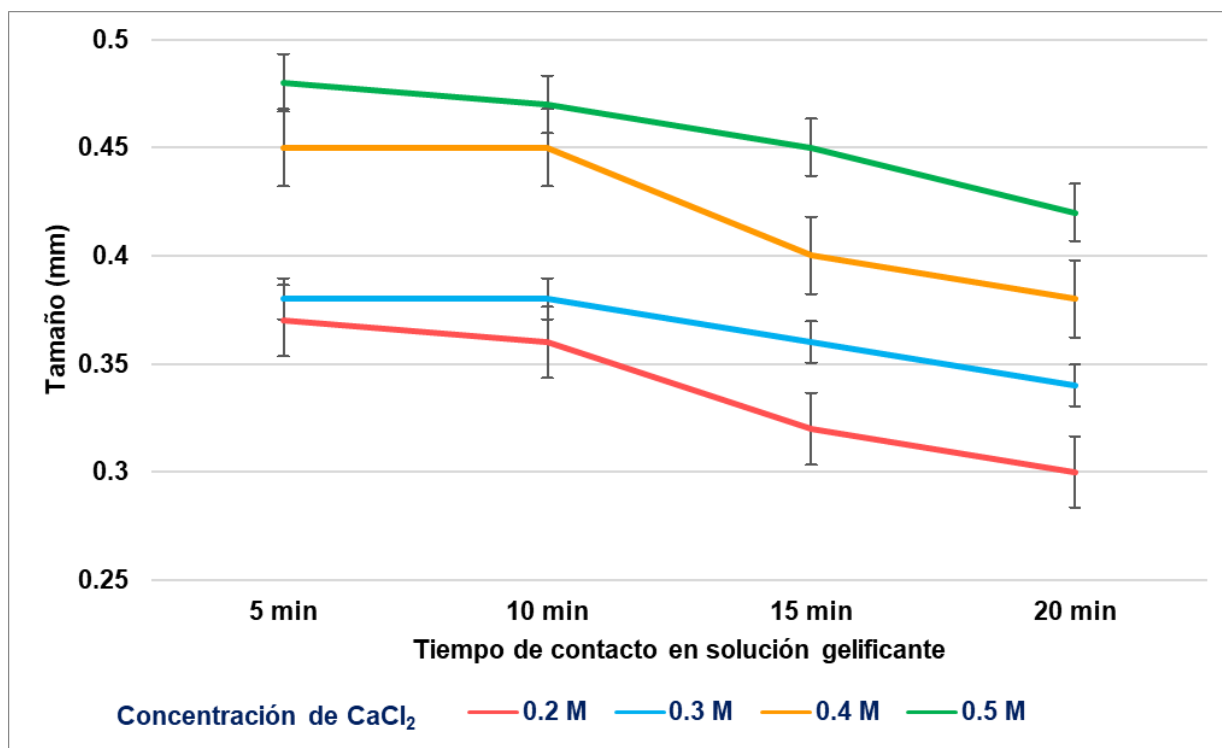


Figura 9: Influencia de la concentración de CaCl_2 y el tiempo de contacto en el tamaño de las microesferas de alginato.

Por otra parte, la Figura 10 muestra la deformación y pérdida de colorante observadas en la visualización microscópica de las microesferas expuestas al tiempo medio (10 min) en las cuatro diferentes concentraciones de CaCl_2 donde es posible observar que las microesferas de ALG a las soluciones de CaCl_2 0.4 M (imagen C) y 0.5 M (imagen D) sufren menor deformación y pérdida de coloración comparadas con las esferas expuestas en las soluciones de CaCl_2 0.2 M y 0.3 M (imágenes A y B respectivamente), cabe señalar que este comportamiento fue recurrente a los diferentes tiempos de exposición. Al observar que la periferia de las microesferas expuestas a la concentración de CaCl_2 0.5 M (imagen D) poseían mayor deformación comparada con las microesferas expuestas a la solución de CaCl_2 0.4 M (imagen C), se decidió emplear esta concentración para la obtención de las microesferas con Bacteriófago S1.

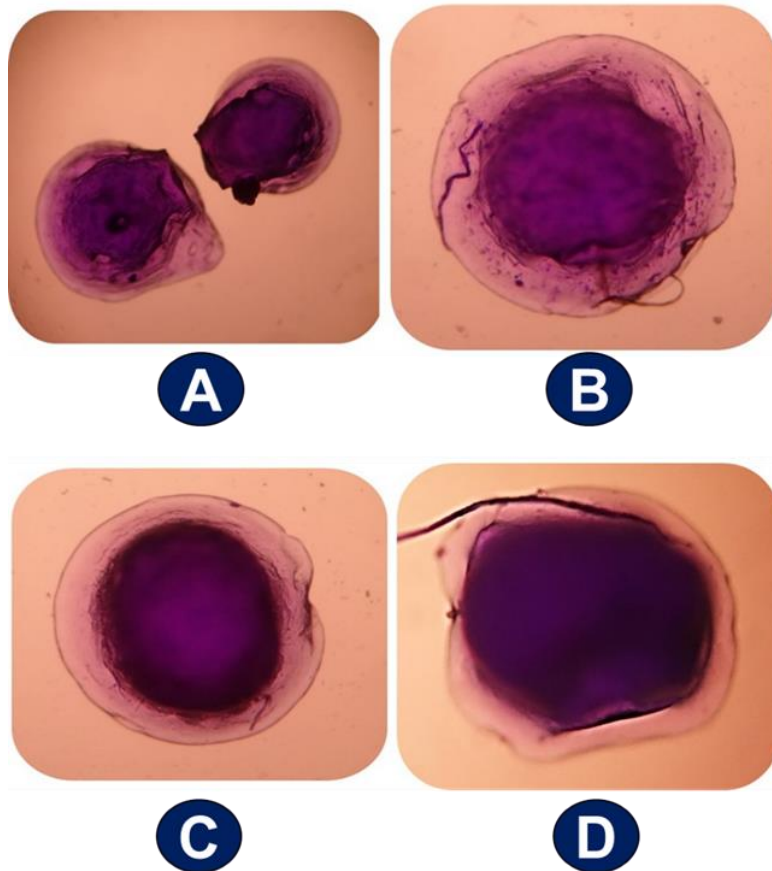


Figura 10: Microscopía óptica (40x) de microesferas de alginato expuestas durante 10 min a diferentes concentraciones de CaCl_2 y almacenadas a temperatura ambiente. A) CaCl_2 concentración de 0.2M; B) CaCl_2 concentración de 0.3M; C) CaCl_2 concentración de 0.4M; D) CaCl_2 concentración de 0.5 M.

11.4 Determinación de la infectividad del Bacteriófago S1 encapsulado

La Figura 11 muestra los resultados obtenidos sobre la determinación de la infectividad del Bacteriófago S1 después de ser encapsulado bajo las condiciones seleccionadas (aguja de diámetro interno 0.3 mm, solución de CaCl_2 0.4 M, tiempo de exposición 5 min, almacenamiento a temperatura ambiente y 4°C), es posible observar que bajo las condiciones mencionadas el Bacteriófago S1 pierde su capacidad infectiva al no observar zonas líticas sobre la bacteria *Salmonella* Enteritidis en las microesferas almacenadas a temperatura ambiente y 4°C (imágenes A y B respectivamente).

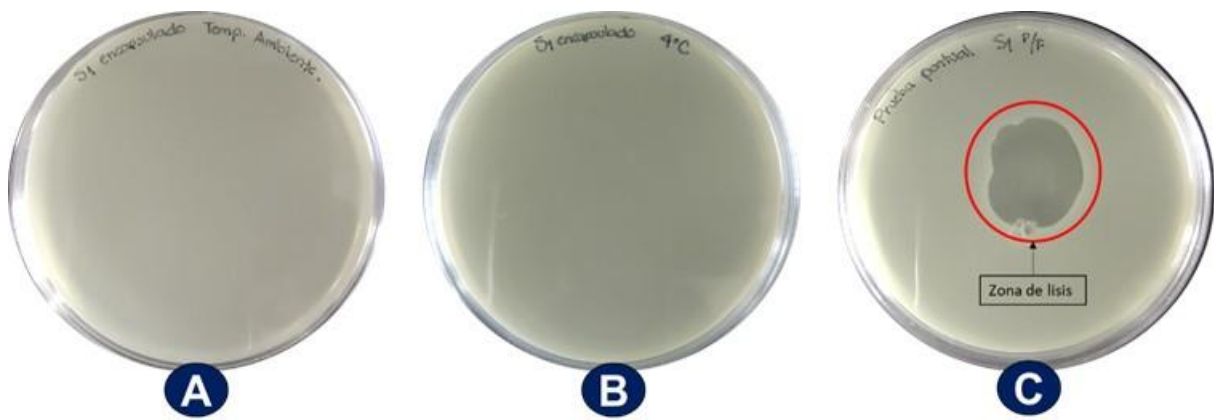


Figura 11: Determinación de la presencia del Bacteriófago S1 en microesferas obtenidas con aguja 0.3 mm de diámetro interno. A) Ausencia de zona lítica en la solución con microesferas almacenadas a temperatura ambiente; B) Ausencia de zona lítica en la solución con microesferas almacenadas a 4°C; C) Control positivo de zona lítica obtenida de la inoculación directa del Bacteriófago S1 en solución.

Una vez determinado que no se observaron zonas de lisis correspondientes al Bacteriófago S1 encapsulado bajo las condiciones anteriores y con la finalidad de obtener un tamaño de partícula menor al reportado por Gómez-García (2019), se decidió emplear una aguja de 0.5 mm de diámetro interno para la obtención de las microesferas. Las microesferas obtenidas se almacenaron a temperatura ambiente y 4°C y posteriormente se determinó la infectividad del Bacteriófago S1 encapsulado como se describe en el punto 8.6.2. Los resultados sobre la infectividad del Bacteriófago S1 contenido en microesferas obtenidas con la aguja de 0.5 mm de diámetro se visualizan en la Figura 12. La imagen A corresponde a las microesferas obtenidas y almacenadas a temperatura ambiente, donde no observaron zonas de lisis indicativas de que el Bacteriófago S1 se encuentra encapsulado e infectivo, por su parte en las microesferas almacenadas a 4°C (imagen B) se visualizó zonas de lisis del Bacteriófago S1 al igual que en la imagen C que corresponde a la inoculación directa del Bacteriófago en solución sobre la cepa *Salmonella* Enteritidis.



Figura 12: Determinación de la presencia del Bacteriófago S1 en microesferas obtenidas con aguja 0.5 mm de diámetro interno. A) Ausencia de zona lítica en la solución con microesferas almacenadas a temperatura ambiente; B) Zona lítica en la solución con microesferas almacenadas a 4°C; C) Control positivo de zona lítica obtenida de la inoculación directa del Bacteriófago S1 en solución.

11.5 Establecimiento de las condiciones de formulación

Una vez establecido que el Bacteriófago S1 mantiene su capacidad infectiva después de ser encapsulado en microesferas de ALG obtenidas con la aguja de 0.5 mm de diámetro interno y almacenadas a 4°C, se establecieron las condiciones de formulación de microesferas de ALG conteniendo al Bacteriófago S1 mostradas en la Tabla 5.

Formulación	S1	ALG	CaCl ₂	Tiempo de exposición (min)	Velocidad de goteo
MCa-5	$\geq 1 \times 10^9$			5	
MCa-10	UFP/mL	2 %	0.4 M	10	1 mL/min
MCa-15				15	

S1. Bacteriófago S1; ALG. Solución de alginato; CaCl₂. Solución de cloruro de calcio.

Tabla 5: Formulaciones de microesferas de alginato conteniendo al Bacteriófago S1

11.6 Determinación de la eficacia de encapsulación del Bacteriófago S1

Los resultados correspondientes a la visualización macroscópica de las microesferas obtenidas con las formulaciones expuestas a diferentes tiempos en SBM muestran que las tres formulaciones siguen el mismo comportamiento (Figura 13). Las imágenes A y B correspondientes al tiempo 0 y 30 min respectivamente muestran un aumento de tamaño de las microesferas, este comportamiento es originado por la hinchazón de la matriz polimérica expuesta a la solución, posteriormente a los 60 y 90 min (imágenes C y D, respectivamente) se observó una disminución en el tamaño de las microesferas,

debido al proceso de disolución-erosión de la matriz polimérica, finalmente, a los 120 min (imagen E) en todas las formulaciones se observó la desintegración de las microesferas.

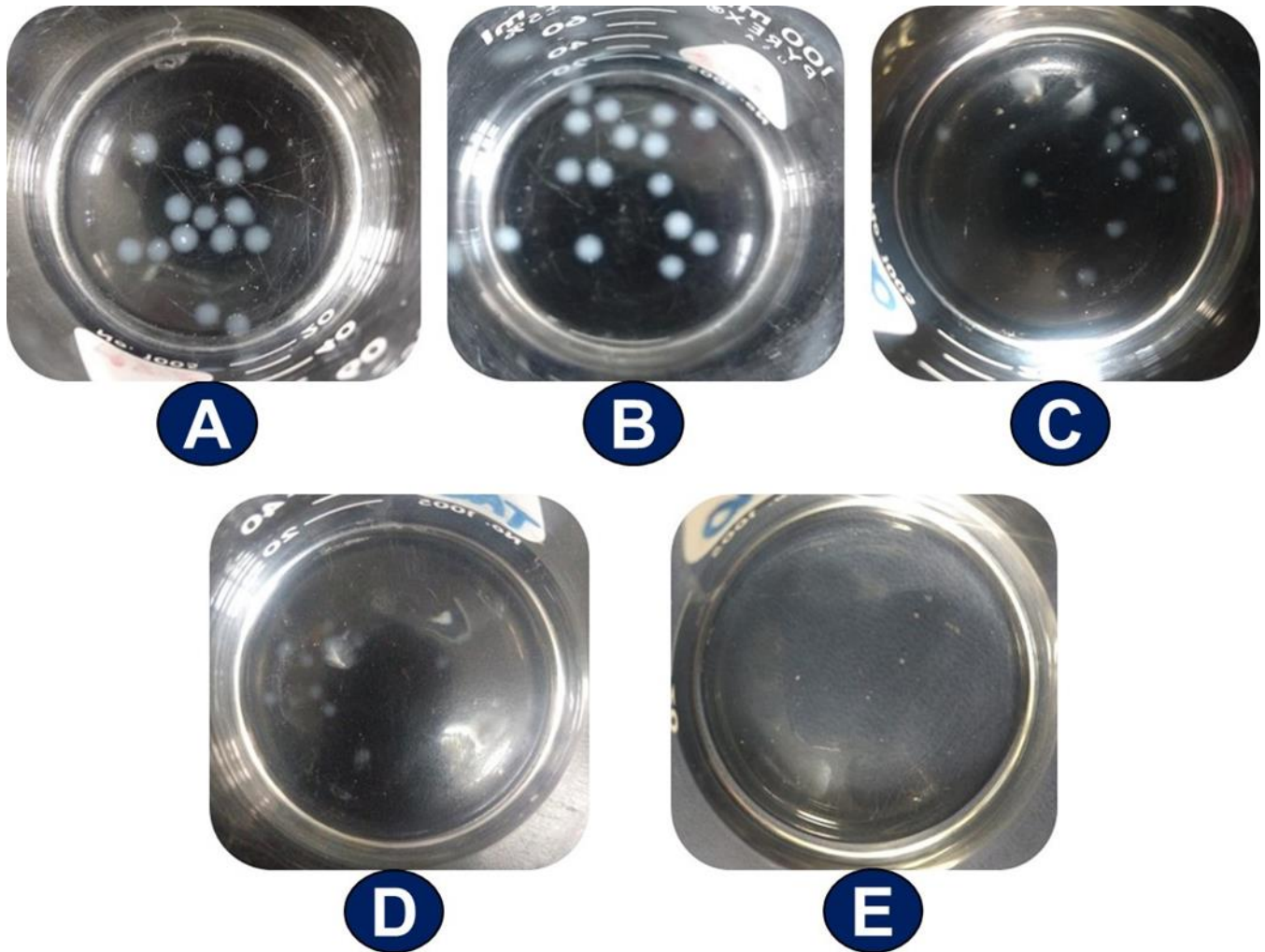


Figura 13: Fotografías de microesferas de alginato durante el proceso de desintegración en SBM A) Tiempo: 0 min; B) Tiempo: 30 min; C) Tiempo: 60 min; D) Tiempo: 90 min; E) Tiempo: 120 min.

Una vez establecido el tiempo de desintegración, se procedió a determinar la eficiencia de encapsulación del Bacteriófago en cada una de las formulaciones empleadas. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 6. Tras adicionar un título de 1.54×10^{11} UFP en todas las formulaciones se recuperaron 1.15×10^{11} , 8.28×10^{10} y 7.56×10^{10} UFP correspondientes a una eficacia de encapsulación del 74.8, 53.5 y 49.2% para las formulaciones MCa-5, MCa-10 y MCa-15. Estos resultados indicaron

que la modificación del tiempo de contacto en la solución gelificante no presenta diferencia significativa en la eficiencia de encapsulación Bacteriófago S1 en microesferas de alginato.

Formulación	%EE	Índice de recuperación de Bacteriófago S1 (UFP/mL) ± D.E.
MCa-5	74.8	$1.15 \times 10^{11} \pm 5.16 \times 10^8$ *
MCa-10	53.7	$8.28 \times 10^{10} \pm 6.15 \times 10^8$ *
MCa-15	49.1	$7.56 \times 10^{10} \pm 2.30 \times 10^9$ *

%EE. Porcentaje de eficiencia de encapsulación; S1.

* Diferencia no significativa ($P > 0,05$) en los valores de recuperación del Bacteriófago S1

Tabla 6: Eficiencia de encapsulación del Bacteriófago S1

11.7 Liberación del Bacteriófago S1 encapsulado en un modelo *in vitro* de fluido gástrico e intestinal simulado

Con el objetivo de determinar la protección y liberación del Bacteriófago encapsulado en microesferas de alginato se imitó el pH y el tiempo de tránsito intestinal de cada sección del tracto gastrointestinal de los pollos. La Figura 14 muestra los resultados obtenidos, donde es posible observar que durante la exposición a pH 5.5, las microesferas obtenidas bajo las condiciones de Formulación MCa-5 permiten una menor liberación del Bacteriófago S1 encapsulado recuperando 4.56×10^4 UFP, mientras que, con las Formulaciones MCa-10 y MCa-15 se recuperaron 1.47×10^5 y 2.17×10^5 UFP respectivamente. Por otro lado, los recuentos de la liberación del Bacteriófago no aumentaron al exponerse a pH 3, estos resultados sugieren que las microesferas de ALG obtenidas con las tres formulaciones impiden la liberación del Bacteriófago encapsulado, sin embargo, la disminución en el título fágico se atribuyó a la poca estabilidad que presenta el Bacteriófago S1 a este pH, estos resultados son concordantes con lo visualizado en la muestra control donde, se observó una decremento de tres unidades logarítmicas a pH 3.0. Finalmente, al exponer las microesferas a pH 7 se muestra que la Formulación MCa-5 permite una mayor liberación del Bacteriófago S1 encapsulado al recuperar un título de 1.85×10^6 UFP con respecto a las formulaciones MCa-10 y MCa-15 en las cuales se obtuvieron recuentos de 8.76×10^5 y 3.09×10^5 UFP. Por lo consiguiente se decidió emplear la formulación MCa-5 para la realización del ensayo *in vivo*

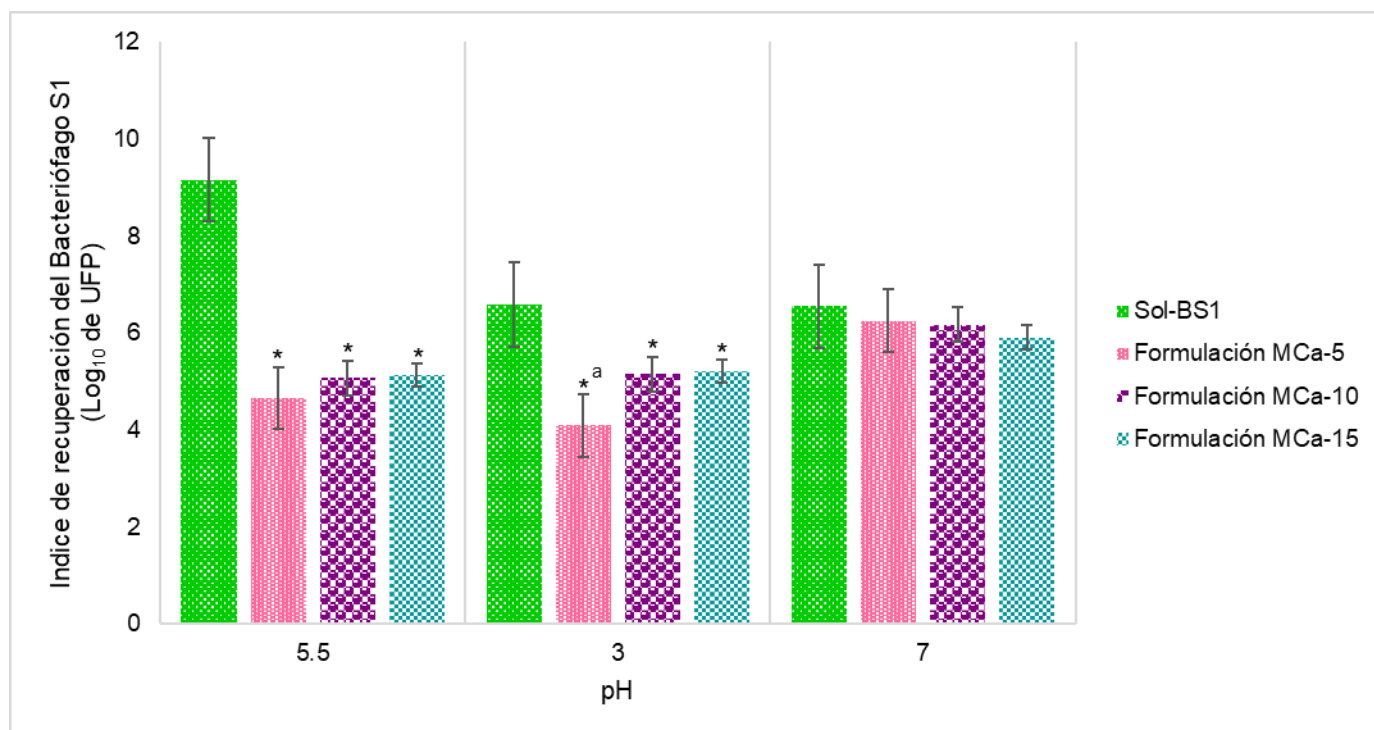


Figura 14: Liberación *in vitro* del Bacteriófago S1 encapsulado en microesferas de alginato.

Sol-BS1. Bacteriófago S1 en solución. Los resultados mostrados representan las medias \pm desviación estándar de las unidades formadoras de placa por mililitro (UFP/mL) del Bacteriófago S1 recuperadas en de la simulación *in vitro* a diferentes valores de pH de acuerdo con el tiempo de tránsito de las cavidades anatómicas del TGI de pollo ($n=3$). * indica la cantidad de UFP/mL recuperadas y significativamente diferentes ($P<0,05$); ^a indica diferencia significativa entre los grupos evaluados ($P<0.05$). El análisis estadístico se evaluó mediante ANOVA unidireccional y la prueba Tukey.

11.8 Eliminación de *Salmonella enterica* serovar Enteritidis en el modelo *in vivo*

11.8.1 Determinación de bacterias presentes en heces de *Gallus gallus domesticus* tras su llegada al animalario.

Con el objetivo de determinar la presencia del género bacteriano *Salmonella* se obtuvieron hisopados cloacales de los pollos a su llegada al animalario de la Facultad de Farmacia UAEM. De un total de 60 muestras solo se observó crecimiento bacteriano en 12 muestras (20%). Los resultados del crecimiento bacteriano se muestran en la Figura 15 donde se observan colonias rosadas, por su parte la identificación bacteriana mostró como resultados, bacilos Gram negativos, móviles, fermentadores de lactosa, indol y catalasa positivos e incapaces de producir ácido sulfhídrico, con base en esto se determinó que el 100% de las bacterias aisladas e identificadas pertenecían al género *Escherichia*.

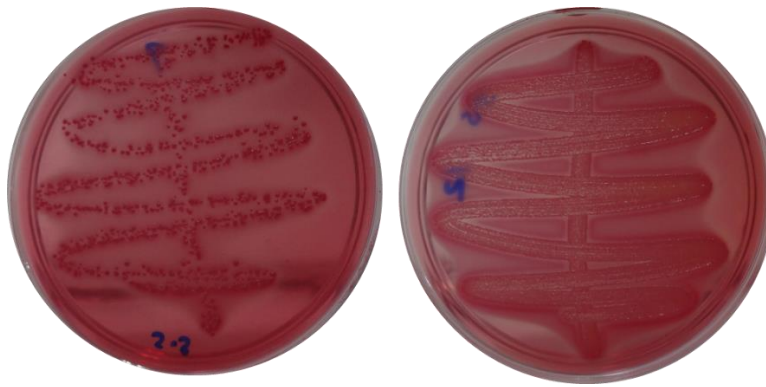


Figura 15: Crecimiento bacteriano de hisopados cloacales de pollos en Agar S-S

11.8.2 Determinación de la infección por *Salmonella* Enteritidis en *Gallus gallus domesticus*

La Figura 16 muestra los resultados de hisopados cloacales obtenidos 72 h post infección con *Salmonella* Enteritidis en los grupos indicados en punto 8.10.2. En los cinco grupos, se observó crecimiento de colonias circulares de coloración negra debido a la producción de ácido sulfhídrico, concordantes con las características del género *Salmonella* en el A-XLD, garantizando así la infección con *Salmonella* Enteritidis.

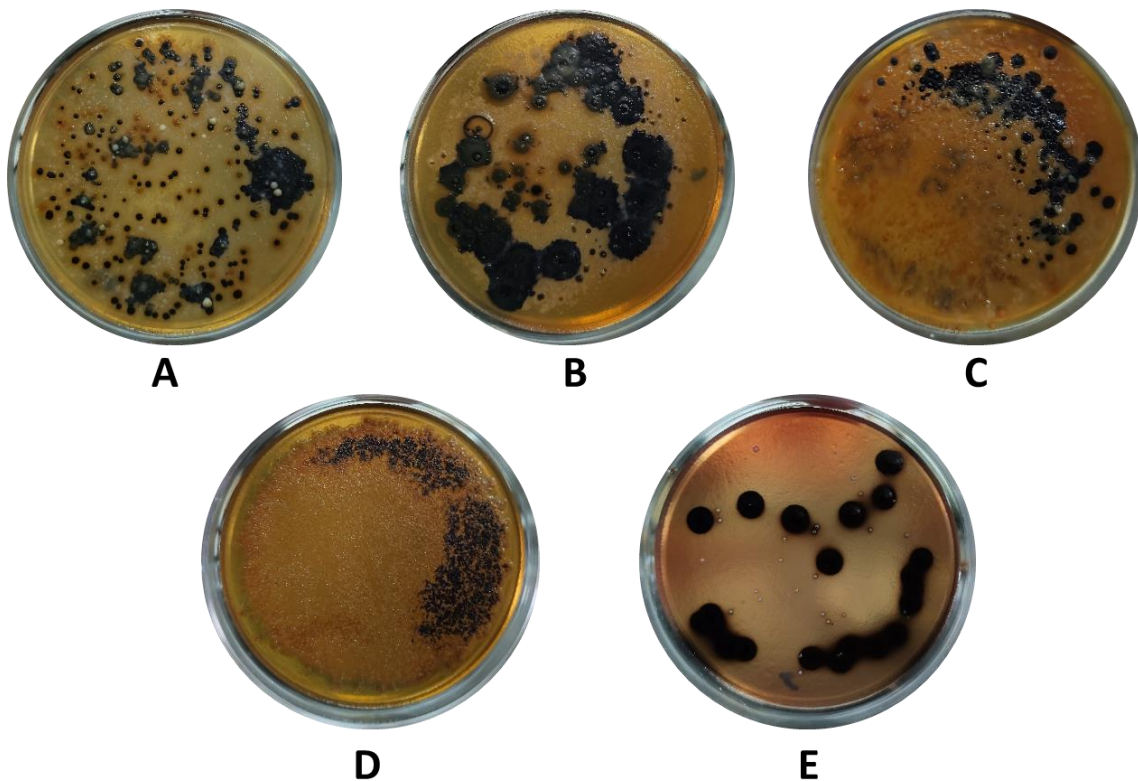


Figura 16: Crecimiento bacteriano correspondiente a hisopados cloacales obtenidos 72 h post-infección con *Salmonella* Enteritidis en los grupos A) CTRL.; B) ALGm+BS1.; C) ALG-m.; D) TMP/SMX.; E) AcidBA-Vet.

11.8.3 Reducción de *Salmonella* Enteritidis en *Gallus gallus domesticus*

En primer lugar, se garantizó que los grupos se encontraban infectados, obteniendo un título inicial promedio de *Salmonella* Enteritidis de 2.3×10^4 UFC/mL; posteriormente se administró cada uno de los tratamientos como se indica en el punto 8.10.2. La Tabla 7 muestra las cantidades promedio de microesferas y/o agua, consumidos por animal de cada grupo experimental durante 24 h.

Grupo	Consumo promedio por animal durante 24 h	
	Agua (mL)	Microesferas de alginato (g)
CTRL	N.A.	N.A.
ALGm+BS1	N.A.	3.2 ± 0.5
ALGm	N.A.	3.9 ± 0.9
TMP-SMX	50 ± 2.5	N.A.
AcidBA-vet	53 ± 1.3	N.A.

N.A. No aplica. Los resultados mostrados indican el promedio y la D.E. del consumo de agua y microesferas de alginato con el tratamiento administrado a cada animal en cada grupo experimental. $n = 50$ pollos, 10 por grupo

Tabla 7: Consumo de microesferas de alginato y agua en cada grupo experimental

Los recuentos bacterianos obtenidos 24 h post tratamiento muestran que el grupo ALGm+BS1, administrado con microesferas de alginato conteniendo Bacteriófago S1 y con un título bacteriano de 9.39×10^2 UFC/mL, y el grupo TMP/SMX, administrado con Trimetroprim-Sulfametoxazol veterinario y con un título bacteriano de 2.17×10^2 UFC/mL, presentan una reducción significativa de una unidad logarítmica en la eliminación de *Salmonella* Enteritidis con respecto al grupo CTRL al cual no se administró ningún tratamiento y que obtuvo recuentos de 9.56×10^3 UFC/mL. Por otro lado, los grupos ALG-m y AcidBA-Vet, administrados con microesferas de alginato y acidificante veterinario, obtuvieron recuentos bacterianos de 9.83×10^3 , y 9.51×10^3 UFC/mL los cuales no mostraron una disminución significativa con respecto el grupo CTRL. Las cuantificaciones de UFC/ml realizados a las 72 y 120 h mostraron que solo los grupos tratados con microesferas de alginato conteniendo Bacteriófago S1 (ALGm+BS1) y Trimetroprim-Sulfametoxazol veterinario (TMP/SMX) presentaron una disminución significativa de *Salmonella* Enteritidis con respecto al grupo CTRL. Por otro lado, la cuantificación de las UFC/mL en cada grupo no mostró ser significativa con respecto al tiempo, incluso el grupo TMP/SMX mostró un aumento de 4.66×10^2 UFC/mL.

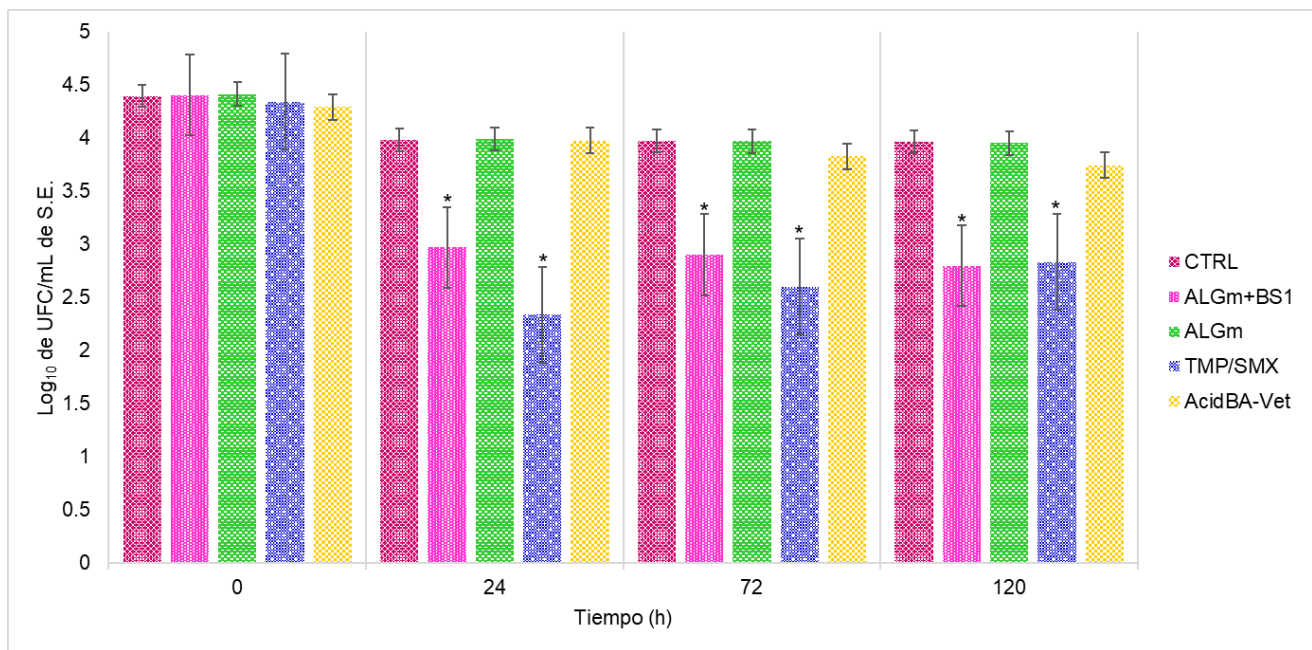


Figura 17: Eliminación de *Salmonella* Enteritidis en el modelo *Gallus gallus domesticus*

CTRL. Sin tratamiento; ALGm+BS1. Microesferas de alginato conteniendo Bacteriófago S1; ALG-m Microesferas de alginato; TMP/SMX. Trimetoprim-Sulfametoxazol veterinario; AcidBA-Vet. Ácido butírico y ácido acético. $n= 50$ pollos, 10 por grupo. Los resultados mostrados representan las medias \pm desviaciones estándar de las unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL) de *Salmonella* Enteritidis recuperadas de *Gallus gallus domesticus*. * indica las medias significativamente diferentes ($P<0,01$). El análisis estadístico se evaluó mediante ANOVA bidireccional y la prueba Tuckey.

La Figura 18 muestra la cuantificación de *Salmonella* Enteritidis en el grupo PROF, administrado con microesferas de alginato conteniendo Bacteriófago S1 previamente a la infección y el grupo CTRL, que no se administró ningún tratamiento. Los recuentos bacterianos determinados en el grupo PROF a las 24, 72 y 120 h post infección muestran valores de 3.4×10^3 , 5.90×10^3 y 6.80×10^3 UFC/mL que no mostraron una disminución significativa (valor $p= 0.048$) de las UFC/mL con respecto al grupo CTRL en el cual se obtuvieron recuentos de 9.56×10^3 , 9.42×10^3 y 9.28×10^3 UFC/mL a las 24, 72 y 120 h.

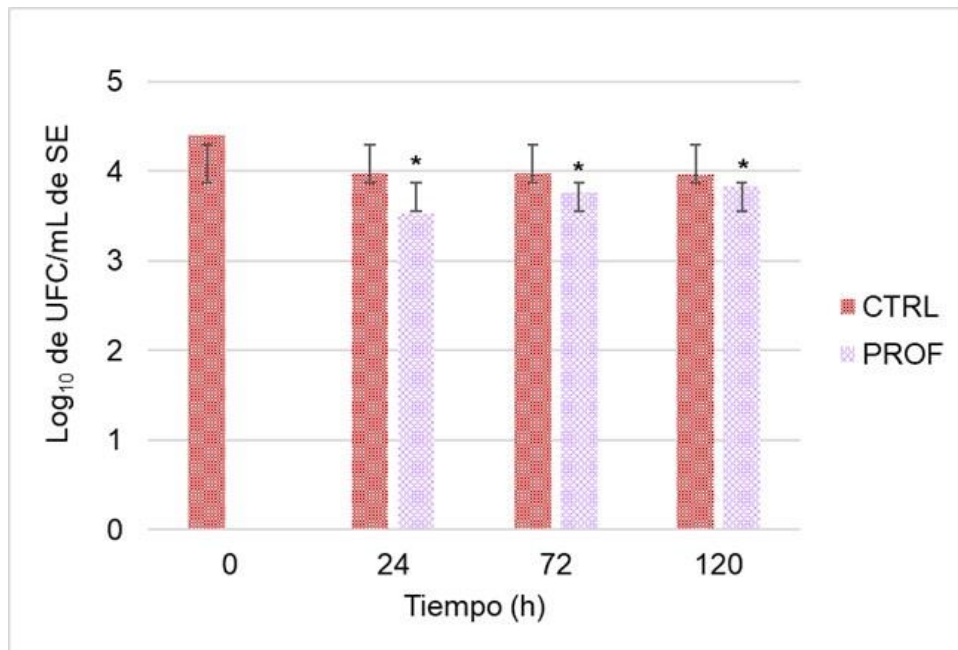


Figura 18: Evaluación *in vivo* de la actividad profiláctica del Bacteriófago S1 encapsulado en microesferas de alginato contra *Salmonella* Enteritidis

CTRL. Sin tratamiento; PROF. Microesferas de alginato conteniendo Bacteriófago S1 administradas previo a infección. $n=20$ pollos, 10 por grupo. Los resultados mostrados representan las medias \pm desviaciones estándar de las unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL) de *Salmonella* Enteritidis. recuperadas de *Gallus gallus domesticus*. * indica las medias con baja significancia ($P<0,05$).

12 . DISCUSIÓN

La microencapsulación se define como el proceso de contener sustancias sólidas, líquidas o gaseosas en matrices inertes con la finalidad de aislarlas y protegerlas del medio externo, las partículas obtenidas por este proceso presentan un tamaño de 1 μm hasta 1 mm, esta técnica se ha empleado en la industria farmacéutica para enmascarar las propiedades organolépticas como el sabor y olor de un fármaco, en el desarrollo de formulaciones para la liberación controlada y/o dirigida de fármacos y recientemente en el desarrollo formas farmacéuticas sólidas a base de biopolímeros como el ALG para la entrega vía oral de Bacteriófagos (Górski y cols., 2018; Malik y cols., 2017; Moghtader y cols., 2017; Wernicki y cols., 2017; Choińska-Pulita y cols., 2015). Los Bacteriófagos son virus que infectan bacterias de manera especie - específica por lo que generalmente solo infectan una sola especie bacteriana, o incluso cepas específicas dentro de una especie (Kasman y Porter, 2019), se han empleado en el sector avícola con la finalidad de reducir el número de patógenos que colonizan el tracto digestivo de las aves de corral, como *Salmonella*, desarrollando sistemas que garanticen la resistencia de los Bacteriófagos a las condiciones gástricas de aves, permitiendo su liberación en el intestino delgado infectado por *Salmonella* spp (Sillankorva, y cols., 2012; Qadir y cols., 2018).

Segundo-Arizmendi (2016) determinó que el Bacteriófago S1 es infectivo contra la bacteria *Salmonella enterica* serovar Enteritidis, sin embargo, los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran que el Bacteriófago S1 posee una alta capacidad lítica contra las cepas bacterianas *Salmonella Pullorum* (MDR-MC862-A) y *Salmonella Gallinarum* (MDR-MC862-B) con valores de eficacia de plaqueo de 0.61 y 0.58, respectivamente. Díaz-Muñoz y Koskella (2014) indican que la capacidad de un Bacteriófago para infectar cepas bacterianas diferentes pertenecientes a una misma especie se debe principalmente a la similitud en las proteínas específicas de unión bacteria-fago (Ross y cols., 2016); por lo anterior, la capacidad lítica del Bacteriófago contra *Salmonella Pullorum* y *Salmonella Gallinarum* se asoció a la estrecha relación filogenética debido a que estos serovares comparten un ancestro bacteriano directo con el serovar Enteritidis (Feng y cols., 2013; Hu y cols., 2019). Actualmente, se han reportado algunos Bacteriófagos con capacidad infectiva contra diversas cepas pertenecientes a una misma especie bacteriana entre las que destacan el Bacteriófago ϕ 812 que infecta alrededor de 740 cepas de *Staphylococcus aureus* y el Bacteriófago P-27/HP que infecta alrededor de 16 cepas de *Staphylococcus aureus* (Pantucek y cols., 1998; Gupta y Prasad, 2010). Puesto que el Bacteriófago S1 ha demostrado poseer capacidad lítica contra tres serovares de *Salmonella enterica* de importancia en el sector avícola, su aplicación en este sector puede representar un aporte importante como alternativa en el tratamiento de la pulorosis, tifosis aviar y salmonelosis.

En trabajos previos, el Bacteriófago S1 lítico fue encapsulado en esferas de ALG de un tamaño de 3.68 hasta 3.77 mm, sin embargo, el tamaño de las esferas obtenidas representó una limitante en la

administración por vía oral. Por lo anterior, en el presente trabajo se planeó reducir el tamaño para la obtención de microesferas empleando agujas comerciales cuyos diámetros internos fueran menores a 1 mm seleccionando tres diferentes tamaños referidos en la Tabla 4. Lengye y colaboradores (2019) indican que el término microesfera hace referencia a partículas sólidas y esféricas cuyo tamaño oscila entre 1 μm hasta 1 mm, los resultados obtenidos muestran que con la aguja de 0.8 mm de diámetro interno se obtiene esferas de 1.82 mm, un tamaño mayor al referido para las microesferas. Por otra parte, con las agujas de diámetro 0.5 y 0.3 mm se obtienen tamaños de 0.67 y 0.38 mm respectivamente, no obstante, a pesar de que los tamaños obtenidos con ambos diámetros coinciden con los referidos en la definición de microesferas para los ensayos posteriores se decidió emplear la aguja con la que se obtuvo un menor tamaño de partícula. Además, Lengye y colaboradores (2019) refieren que las microesferas con un tamaño < 800 μm son capaces recorrer el TGI sin la influencia del vaciado gástrico, lo que es un factor importante debido a que los pollos son animales que llevan a cabo un proceso constante de reflujo o regurgitación que se produce mediante contracciones retro peristálticas coordinadas tras la digestión del alimento en el proventrículo y ventrículo (cavidades estomacales de *Gallus gallus domesticus*), este proceso suele llevarse a cabo por un periodo de hasta 12 h después de la ingesta de alimento (Rodríguez y cols., 2017).

Por otra parte, las concentraciones de CaCl_2 utilizadas en estudios previos para la encapsulación de Bacteriófagos por gelificación iónica son diversas, Abdelsattar y colaboradores (2019) utilizaron una solución de CaCl_2 a una concentración de 100 mM en la encapsulación del Bacteriófago ZCEC5, por su parte Soto y colaboradores (2018) emplearon una solución de CaCl_2 al 1.5% para la encapsulación del Bacteriófago f3 α SE mientras que Yongsheng y colaboradores (2008) emplearon una concentración de 50 mM. Por lo anterior, en el presente trabajo se decidió propiciar la gelificación de la solución ALG-colorante empleando CaCl_2 a las concentraciones 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 M y mantener en contacto durante 5, 10, 15 y 20 min; los resultados mostrados en la Figura 8 indican que a mayor concentración de CaCl_2 se obtienen microesferas de mayor tamaño; este comportamiento se atribuyó al aumento de iones Ca^{2+} disponibles para interactuar con los grupos carboxílicos de la cadena de ALG formando rápidamente una red polimérica con mayores uniones con respecto a la concentración; sin embargo, el aumento en el tiempo de contacto en la solución gelificante contribuye al aumento de las uniones formadas por el ALG y el Ca^{2+} lo que limita la elasticidad del gel, favoreciendo la contracción y rigidez de la red polimérica y por consiguiente una disminución de tamaño con respecto al tiempo. Por otro lado, microscópicamente se observó que las microesferas expuestas CaCl_2 al 0.4 y 0.5 M presentaron menor pérdida en la cantidad de colorante, estos resultados concuerdan con lo reportado por El-kamel y cols (2003) quienes encapsularon el fármaco diltiazem en esferas de ALG al 4% p/v donde tras aumentar la concentración de la solución de CaCl_2 de 0.1 a 2% observaron un aumento en la carga del fármaco de 19 a 54%, de igual manera Tavakol y colaboradores (2013) reportaron que la carga del fármaco

sulfasalazina tras ser encapsulado con ALG a una concentración de 4% aumento del 12 al 55% tras aumentar la concentración de la solución de CaCl_2 de 1.5 a 4%. Con base en los resultados obtenidos en el presente proyecto, se decidió trabajar con la solución de CaCl_2 al 0.4 M debido a que la morfología periférica de la microesfera obtenida no se vio modificada, por su parte la microesfera obtenida con la solución al 0.5 M mostro una deformación en su periferia.

Con la finalidad de establecer los parámetros óptimos de formulación y obtención de las microesferas, se encapsuló un volumen de 15 mL de Bacteriófago a una concentración $\geq 1 \times 10^9$ UFP/mL empleando una aguja de 0.3 mm de diámetro interno, solución de ALG al 2%, solución de CaCl_2 0.4 M y un tiempo de exposición de 5 min, las microesferas obtenidas se almacenaron a 4°C y temperatura ambiente. Los resultados mostrados en la Figura 10 indican la ausencia de zonas de lisis del Bacteriófago S1 encapsulado en las microesferas obtenidas. Actualmente, no existen reportes sobre la pérdida de capacidad infectiva en los Bacteriófagos encapsulados con ALG por la técnica gelificación iónica, sin embargo, los resultados obtenidos del presente trabajo hacen inferir que el tamaño de microesfera obtenido con la aguja de 0.3 mm de diámetro no permite la incorporación del Bacteriófago S1 en la matriz polimérica, originado quizá por la formación rápida de las interacciones entre las cadenas de ALG en la superficie de la microesferas y el ión calcio. Por lo anterior, se decidió obtener microesferas empleando la aguja con diámetro de 0.5 mm (que había originado un tamaño partícula de 0.67 mm) y las condiciones de formulación mencionadas anteriormente, las microesferas obtenidas fueron almacenadas a temperatura ambiente y 4°C. Los resultados obtenidos mostraron que las microesferas almacenadas a temperatura ambiente no conservan al Bacteriófago S1 al no observar zonas líticas. Iriarte y colaboradores (2007) indican que la desecación es el principal factor ambiental implicado en pérdida de infectividad de Bacteriófagos, por lo que, los resultados obtenidos sugieren la pérdida del Bacteriófago S1 se asocia a la desecación que sufren las microesferas almacenadas a temperatura ambiente. Por otro lado, en las microesferas almacenadas a 4°C se logró la visualización de zonas líticas del Bacteriófago S1, como se muestra en la Figura 11, lo que indica que la capacidad infectiva no se vio afectada; por ello, en los ensayos consecuentes las microesferas se almacenaron a 4°C

Una vez determinada la técnica para la obtención de las microesferas, se determinó el tiempo de desintegración de las microesferas. Durante los primeros 30 min se observó el proceso de hinchazón que se origina por la diferencia de concentración de iones en el interior de la membrana polimérica y el medio de disolución SBM, conllevando la formación parcial de ALG de sodio hidratado debido al intercambio de iones de calcio presentes en la red polimérica con iones de sodio no gelificantes. Posteriormente, se presentó el proceso de disolución-erosión al observar una disminución del tamaño de partícula, esto se debe al efecto quelante del carbonato y citrato sobre los iones de calcio entrecruzados, intercambiándolos por el ion sodio que no actúa como gelificante (Ostberg y cols., 1994;

Rojas y cols., 2008). Finalmente, a los 120 min se visualizó la desintegración total de las microesferas obtenidas con las tres formulaciones.

Una vez desintegradas las microesferas en SBM se determinó que las formulaciones MCa-5, MCa-10 y MCa-15 presentan eficiencias de encapsulación de 74.8, 53.5 y 49.2% respectivamente. La disminución en la cantidad de UFP del Bacteriófago S1 retenido en las formulaciones MCa-10 y MCa-15 se asoció a la presencia de rugosidades en la superficie de la matriz, que pueden favorecer la formación de poros facilitando la difusión del Bacteriófago S1 hacia el medio externo durante el almacenamiento de las microesferas (Rojas y cols., 2008). Pese a esto, las eficacias de encapsulación del Bacteriófago S1 contenido en microesferas de ALG obtenidas en el presente trabajo son mayores a la reportada por Gómez-García (2019) que obtuvo una eficacia de encapsulación del 31.2%, esta diferencia en porcentaje de eficacia de encapsulación del Bacteriófago S1 se asoció principalmente al método utilizado para la desintegración de las esferas, Gómez-García (2019) empleó la técnica de maceración de esferas por lo que quizá la técnica no favoreció la liberación total del Bacteriófago S1, manteniéndolo retenido en los remanentes de la matriz polimérica de ALG. Por otro lado, las eficacias obtenidas en la presente son menores a las eficacias obtenidas en otros trabajos de encapsulación de Bacteriófagos entre los que destacan el llevado a cabo por Moghtader y colaboradores (2017) que encapsularon al Bacteriófago T4 en microesferas de ALG al 2% (p/v) obteniendo una eficacia de encapsulación de 90%, Boggionea y colaboradores (2017) que obtuvieron una eficacia de encapsulación del 82.5% del Bacteriófago UFV-AREG1 contenido en microcápsulas formuladas con ALG al 1.5% p/v y Yongsheng y colaboradores (2008) quienes encapsularon al Bacteriófago Félix O1 en microesferas de ALG obteniendo una eficacia de encapsulación del 93.3%, cabe señalar que en las microesferas obtenidas por de Moghtader y colaboradores (2017) y Yongsheng y colaboradores (2008) se encuentran recubiertas con quitosán, mientras la formulación de microcápsulas realizadas por Boggionea y colaboradores (2017) contienen SPAN 80, estas diferencias pueden influir en la diferencia en las eficacias de encapsulación obtenidas. Sin embargo, es importante resaltar que pese a las diferencias en los valores de eficacia de encapsulación del presente trabajo con los trabajos de Moghtader y colaboradores (2017), Yongsheng y colaboradores (2008) y Boggionea y colaboradores (2017) los productos a base de Bacteriófagos que actualmente se comercializan contienen títulos fágicos que van desde 10^5 hasta 10^{11} UFP, por lo que los índices de recuperación del Bacteriófago S1 obtenidos en el presente trabajo no representan una limitante para el desarrollo de una formulación para el empleo de fagoterapia.

En trabajos previos, el Bacteriófago S1 empleado en el presente proyecto ha demostrado perder significativamente su capacidad lítica cuando se expone a valores pH inferiores a 3.0 y mayores a 9.0 (Segundo-Arizmendi, 2016). Por lo anterior, es importante garantizar que la formulación de

microesferas de ALG brinde protección al Bacteriófago S1 tras su paso por el TGI de pollos especialmente en las cavidades de proventrículo + molleja que presentan valores de pH de 2.5 a 3.5 y permita su liberación en duodeno, yeyuno e íleon, secciones donde se establece *Salmonella* Enteritidis. Por lo anterior, se imitó el pH y el tiempo de tránsito del buche (pH 5.5 durante 30 min), el proventrículo + molleja (pH 3 durante 45 min) y finalmente el yeyuno + íleon (pH 7 durante 30 min), empleando como control 1 mL de Bacteriófago en solución expuesto a las condiciones descritas anteriormente. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 14, donde es posible visualizar que durante la exposición a pH 5.5 la Formulación MCa-5 presenta menor liberación del Bacteriófago S1 encapsulado, estos resultados se asociaron al aumento en el tiempo de contacto en la solución gelificante de CaCl₂ lo que contribuye al aumento de las uniones formadas por el ALG y el Ca²⁺ que favorece la rigidez de la red polimérica (Sosnik, 2014; Rinaudo, 2014) conllevando a la formación de una superficie rugosa en las Formulaciones MCa-10 y MCa-15, las rugosidades en la superficie de la matriz pueden favorecer la formación de poros facilitando la difusión del Bacteriófago S1 hacia el medio externo (Rojas y cols., 2008). Por otro lado, la simulación a pH 3.0 mostró que las tres formulaciones impiden la liberación del Bacteriófago S1 encapsulado, esto es concordante con lo descrito por Lee y Mooney (2012) quienes indican que a valores de pH ácido se favorece la formación y estabilidad de enlaces de hidrógeno en la red polimérica de las microesferas lo que impide la liberación del ingrediente activo encapsulado (Bacteriófago). Con respecto a la simulación a pH 7, los resultados concuerdan que a pH básico se favorece la despolimerización de la matriz de ALG (Hjorth y Karlsen, 2002) permitiendo la liberación del Bacteriófago S1 en las tres formulaciones. Sin embargo, la Formulación MCa-5 mostró una mayor liberación del Bacteriófago S1 encapsulado con respecto a las Formulaciones MCa-10 y MCa-15, lo anterior se asoció a la posible la rigidez de la matriz en las formulaciones MCa-10 y MCa-15, lo que limite el proceso de hidratación, disolución- erosión de las microesferas de ALG conllevando a una menor liberación el principio activo encapsulado, pese a estos los resultados sugieren las microesferas de ALG liberaran con éxito al Bacteriófago S1 en yeyuno e íleon.

Por último, y con el fin de determinar si la formulación 1 es capaz de reducir la infección por *Salmonella* Enteritidis se procedió a realizar un ensayo *in vivo* utilizando un total de 60 pollos (*Gallus gallus domesticus*). En primer lugar y con la finalidad de asegurar la ausencia de bacterias del género *Salmonella*, se identificaron las bacterias presentes en heces de 60 pollos a partir de muestras hisopados cloacales sembradas en Agar S-S, determinando la presencia de bacilos Gram negativos, móviles, fermentadores de lactosa, indol y catalasa positivos e incapaces de producir ácido sulfhídrico, no concordantes con las características del género *Salmonella* (Ajmeray Shabbir, 2022). Una vez asegurado la ausencia de *Salmonella* spp, se procedió a realizar la infección inoculando a *Gallus gallus domesticus* por vía oral mediante sonda nasogástrica pediátrica con una dosis infectiva de 2x10⁸ UFC de *Salmonella* Enteritidis, esto con base en la literatura donde se indica que para originar una infección

sintomática por *Salmonella* spp la cantidad de inóculo ingerido debe ser desde 10^6 hasta 10^9 UFC (Herrera y Jabib, 2015). El periodo de incubación de *Salmonella* en aves de corral varía desde cuatro a siete días (Herrera y Jabib, 2015; Rincón-Acero y cols., 2011; Andreatti Filho, y cols., 2007)., por lo anterior, para garantizar la infección se obtuvieron hisopados cloacales a las 72 h post-infección en donde se determinó la presencia de colonias redondas, de coloración negruzca debido a la producción de ácido sulfhídrico característico de *Salmonella* Enteritidis en A-XLD ver Figura 17 (Ajmeray Shabbir, 2022).

Tras determinar la infección de *Salmonella* Enteritidis se administraron los tratamientos como se indica en la Tabla 3. Después de la administración de los tratamientos, los recuentos bacterianos de *Salmonella* Enteritidis en los grupos tratados con microesferas de alginato conteniendo al Bacteriófago S1 (ALGm+BS1) y con antibiótico veterinario (TMP-SMX) mostraron una disminución significativa de una unidad logarítmica comparados con el grupo que no recibió tratamiento (CTRL), si bien actualmente no se han reportado evaluaciones *in vivo* de microesferas de alginato conteniendo Bacteriófagos en la eliminación de *Salmonella* Enteritidis, los resultados obtenidos muestran que la formulación de microesferas con Bacteriófago S1 desarrollada en el presente trabajo permite la liberación del fago y consecuentemente promueve la eliminación de *Salmonella* Enteritidis. Los resultados obtenidos son concordantes con otros trabajos realizados como el de Andreatti Filho y colaboradores (2007) quienes evaluaron la reducción de *Salmonella* Enteritidis con dos Bacteriófagos no encapsulados (individual y coctel), donde a las 48 h post tratamiento a partir de muestras de ciegos no se observó crecimiento bacteriano bajo ninguna de las condiciones evaluadas; por otro lado, Colom y colaboradores (2015) determinaron la reducción *in vivo* de *Salmonella typhimurium* utilizando un coctel de fagos encapsulados en liposomas que mostraron una reducción significativa en ciegos de 3.8, 3.9 y 1.5 unidades logarítmicas de *Salmonella typhimurium* en los días 8, 10 y 15 post tratamiento respectivamente; así mismo y Bardina y colaboradores (2012) quienes administraron una solución de coctel de fagos contra *Salmonella typhimurium* dos veces al día durante los días 4 y 5 post infección, obteniendo una reducción de una unidad logarítmica al quinto y sexto día post tratamiento.

Por su parte, los pollos pertenecientes a los grupos tratados con microesferas de alginato (ALGm) y acidificante veterinario (AcidBA-vet) no mostraron disminución significativa con respecto a los pollos que no recibieron tratamiento (CTRL) a los intervalos de tiempo evaluados. Es importante destacar que actualmente no existen reportes sobre efectos bactericidas relacionados con el ALG lo que es concordante con los resultados obtenidos con respecto al grupo ALGm que demuestran que el alginato no presenta actividad bactericida frente a *Salmonella* Enteritidis. Por otro lado, el efecto de los ácidos orgánicos empleados en la industria avícola es dependiente de la dosis (Lopez, 2010), por lo que el efecto observado en el presente trabajo se asoció a este factor.

Con respecto al grupo administrado con microesferas de alginato conteniendo Bacteriófago S1 previo a la infección (PROF) se obtuvieron recuentos de 3.4×10^3 , 5.90×10^3 y 6.80×10^3 a las 24, 72 y 120 h post infección lo que sugiere que el tratamiento profiláctico con una sola dosis de microesferas de alginato conteniendo Bacteriófago S1 no previene la infección por *Salmonella* Enteritidis, sin embargo, el número de UFC/mL recuperadas a las 24 h post infección fue significativamente menor que las obtenidas inicialmente en los grupos evaluados que presentaron un título bacteriano promedio de 2.3×10^4 UFC/mL. Ahmedi y colaboradores (2016) compararon la eficiencia del tratamiento profiláctico contra el tratamiento terapéutico del Bacteriófago PSE contra *Salmonella* Enteritidis en codornices (n=25), el grupo profiláctico fue administrado por vía oral con 100 μ L de 1×10^6 UFP/mL durante 3 días, posteriormente se infectó con 1.2×10^7 UFC de *Salmonella* Enteritidis, las determinaciones cualitativas del crecimiento bacteriano a las 24 h mostraron en el grupo terapéutico la presencia de la bacteria en el 100% de los animales mientras que en el grupo profiláctico el crecimiento bacteriano solo se obtuvo en el 20% de las muestras.

13 CONCLUSIONES

1. El Bacteriófago S1 posee alta capacidad lítica con valores de eficacia de plaqueo de 0.61 y 0.58 contra las cepas bacterianas *Salmonella Pullorum* MDR-MC862-A y *Salmonella Gallinarum* MDR-MC862-B.
2. Las microesferas de alginato se formularon empleando una aguja de 0.5 mm de diámetro, solución de alginato al 2%, solución de CaCl₂ como agente gelificante a 0.4 M manteniendo en contacto durante 5, 10 y 15 min y almacenamiento a 4°C.
3. Se obtuvieron tres formulaciones de microesferas de alginato denominadas MCa-5, MCa-10 y MCa-15 que contenían de forma infectiva al Bacteriófago S1,
4. Las formulaciones MCa-5, MCa-10 y MCa-15 presentaron eficiencias de encapsulación de 74.8% 53.5% y 49.2% respectivamente.
5. Las formulaciones MCa-5, MCa-10 y MCa-15 demostraron brindar protección al Bacteriófago S1 frente a pH 3.0 y permitir su liberación a valores de pH superiores a 5.0 equivalentes a los valores reportados del duodeno, yeyuno e íleon en pollos, cavidades colonizadas por *Salmonella* Enteritidis, sin diferencia significativa entre los recuentos de UFP/mL.
6. La formulación MCa-5 (microesferas obtenidas con aguja de 0.5 mm de diámetro interno, solución de alginato 2% p/v, solución de CaCl₂ 2% p/v como agente gelificante y un tiempo de exposición de 5 min en la solución gelificante) se seleccionó para la realización del ensayo *in vivo* en el modelo de *Gallus gallus domesticus*.
7. Se determinó en ensayos *in vivo* que una dosis única de 3.2 ± 0.5 gramos de microesferas de alginato conteniendo Bacteriófago S1, obtenidas bajo las condiciones de la formulación MCa-5, es eficaz en la eliminación de una unidad logarítmica de *Salmonella* Enteritidis en *Gallus gallus domesticus*.
8. El alginato empleado en la formulación no presenta efecto en la reducción significativa de *Salmonella* Enteritidis en el modelo de *Gallus gallus domesticus*.
9. El grupo tratado con una dosis única de antibiotico veterinario (Trimetoprim Sulfametoxazol) disminuyó significativamente a *Salmonella* Enteritidis en *Gallus gallus domesticus* durante las primeras 24 h post tratamiento, sin embargo, a las 72 y 120 h post tratamiento la cantidad de UFC/mL mostró un aumento.
10. El grupo que recibió como tratamiento una dosis única de acidificante veterinario (ácido butírico y ácido cítrico) no mostró una disminución significativa de *Salmonella* Enteritidis.
11. La administración profiláctica de microesferas de alginato conteniendo Bacteriófago S1 no evita la infección por *Salmonella* Enteritidis en el modelo *in vivo* de *Gallus gallus domesticus*

14 PERSPECTIVAS

- 1) Determinar la actividad lítica del Bacteriófago S1 en diversas especies de *Salmonella* y/o enterobacterias.
- 2) Determinar la topografía de las microesferas mediante técnicas de microscopía electrónica de barrido y transmisión
- 3) Determinar la dosis terapéutica de las microesferas de alginato conteniendo Bacteriófago S1 para la eliminación total de *Salmonella* Enteritidis en *Gallus gallus domesticus*
- 4) Evaluar en ensayos *in vitro* la eficacia de las microesferas de alginato conteniendo Bacteriófago S1 en la eliminación de *Salmonella* Pullorum MDR-MC862-A y *Salmonella* Gallinarum MDR-MC862-B.

15 REFERENCIAS

- Abdelsattar, A. S., Abdelrahman, F., Dawoud, A., Connerton, I. F., y El-Shibiny, A. (2019). Encapsulation of *E. coli* phage ZCEC5 in chitosan-alginate beads as a delivery system in phage therapy. *AMB Express*, 9(1), 87. <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0810-9>
- Ahmadi M., Karimi Torshizi M.A., Rahimi S., y Dennehy J.J. (2016). Prophylactic Bacteriophage Administration More Effective than Post-infection Administration in Reducing *Salmonella enterica* serovar enteritidis Shedding in Quail. *Front. Microbiol*, 7(1253). doi: 10.3389/fmicb.2016.01253
- Ajmera, A., y Shabbir, N. (2022). *Salmonella*. En StatPearls. StatPearls Publishing.
- Andreatti Filho, R. L., Higgins, J. P., Gaona, G., Wolfenden, A. D., Tellez, G., y Hargis, B. M. (2007). Ability of Bacteriophages Isolated from Different Sources to Reduce *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis *In Vitro* and *In Vivo*. *Poultry Science*, 86(9), pp. 1904–1909, <https://doi.org/10.1093/ps/86.9.1904>
- Antunes, P., Mourão, J., Campos, J., y Peixe, L. (2016). Salmonellosis: the role of poultry meat. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 22(2), 110–121. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.12.004>
- Avedaño-Romero, G. C., López- Malo, A. y Palou, E. (2013). Propiedades del alginato y aplicaciones en alimentos. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 7(1), pp. 87–96. Recuperado de <http://web.udlap.mx/tsia/files/2013/12/TSIA-71-Avendano-Romero-et-al-2013.pdf>
- Barrow, P. A., y Freitas-Neto, O. C. (2011). Pullorum disease and fowl typhoid--new thoughts on old diseases: a review. *Avian pathology: journal of the W.V.P.A*, 40(1), pp. 1–13. <https://doi.org/10.1080/03079457.2010.542575>
- Boggione, D. M. G., Batalha, L. S., Gontijo, M. T. P., Lopez, M. E. S., Teixeira, A. V. N. C., Santos, I. J. B., y Mendonça, R. C. S. (2017). Evaluation of microencapsulation of the UFV-AREG1 bacteriophage in alginate-Ca microcapsules using microfluidic devices. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 158. pp. 182-189 <https://doi.org/10.1016/j.cols.urf.2017.06.045>
- Borie, C, Zurita, P, Sánchez, ML, Rojas, V, Santander, J, y Robeson, J. (2008). Prevención de la infección por *Salmonella enterica* subespecie enterica serotipo Enteritidis (*Salmonella Enteritidis*) en pollos mediante un bacteriófago. *Archivos de medicina veterinaria*, 40(2), pp. 197-201. <https://dx.doi.org/10.4067/S0301-732X2008000200013>
- Castanon, J. (2007) History of the Use of Antibiotic as Growth Promoters in European Poultry Feeds. *Poultry Science*, 86(11), pp. 2466–2471. Recuperado de: <https://doi.org/10.3382/ps.2007-00249>

- Chandak, M., Adhao, V.S., y Thenge, R. (2016) Microsphere: A Novel Drug Delivery System. *International Journal of Pharmacy and Technology*. 12. pp. 31955 - 31973
- Choińska-Pulita, A., Mituła, P., Śliwka, P., Łabaa, W., Skaradzińska, A. (2015). Bacteriophage encapsulation: Trends and potential applications. *Trends in Food Science and Technology*. 45 (2), pp. 212-221.
- Colom, J., Cano-Sarabia, M., Otero, J., Cortés, P., Maspoch, D., y Llagostera, M. (2015). Liposome-Encapsulated Bacteriophages for Enhanced Oral Phage Therapy against *Salmonella* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(14), pp. 4841-4849. doi:10.1128/AEM.00812-15.
- Comisión del *Codex Alimentarius*. (2015) Límites máximos de residuos (LMR) y recomendaciones sobre la gestión de riesgos para residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos Recuperado de http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/dbs/vetdrugs/species-detail/es/?sp_id=2
- Diaz-Muñoz S. L., Koskella B. (2014). Bacteria-phage interactions in natural environments. *Adv. Appl. Microbiol.* 89, pp. 135–183. 10.1016/B978-0-12-800259-9.00004-4
- Ditoe, D. K., Ricke, S. C., y Kiess, A. S. (2018). Organic Acids and Potential for Modifying the Avian Gastrointestinal Tract and Reducing Pathogens and Disease. *Frontiers in veterinary science*, 5, 216. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00216>
- El-kamel, Amal., Al-Gohary, O., y Hosny, Ehab (2003) Alginate-diltiazem hydrochloride beads: Optimization of formulation factors, in vitro and in vivo availability. *Journal of microencapsulation* 25 (20), DOI: 10.1080/02652040210162568
- EFSA (2010). Trends and sources of zoonoses and zoonotic agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2008. *EFSA Journal*, 8(1), pp. 1–368.
- Feng, Y., Johnston, R. N., Liu, G. R., y Liu, S. L. (2013). Genomic comparison between *Salmonella* Gallinarum and Pullorum: differential pseudogene formation under common host restriction. *PLoS one*, 8(3), e59427. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059427>
- Fiorentin, L., Viera, N., y Barioni, W. (2005) Oral treatment with bacteriophages reduces the concentration of *Salmonella Enteritidis* PT4 in caecal contents of broilers. *Avian Pathology*, 34(3), pp. 258-263. DOI: 10.1080 / 01445340500112157
- Food and Drug Administration. Food Additive Status List. Disponible en: <https://www.fda.gov/food/food-additives-petitions/food-additive-status-list>

Foley, S. L., Johnson, T.J., Ricke, S.C., Nayak, R., Danzeisen, J. (2013) *Salmonella* Pathogenicity and Host Adaptation in Chicken-Associated Serovars. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 77(4), pp. 582-607. <http://mmb.asm.org/content/77/4/582.abstract>

Gantois, I., Ducatelle, R., Pasmans, F., Haesebrouck, F., Gast, R., Humphrey, T. J., y Van Immerseel, F. (2009). Mechanisms of egg contamination by *Salmonella* Enteritidis. *FEMS microbiology reviews*, 33(4), pp. 718–738. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00161.x>

Gheorghita Puscaselu, R., Lobiuc, A., Dimian, M., y Covasa, M. (2020). Alginate: From Food Industry to Biomedical Applications and Management of Metabolic Disorders. *Polymers*, 12(10), 2417. <https://doi.org/10.3390/polym12102417>

Ghosal, K., y Ray, S. D. (2011) Alginate/hydrophobic HPMC (60M) particulate systems: new matrix for site-specific and controlled drug delivery. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 47(4), pp. 833-844. <https://doi.org/10.1590/S1984-82502011000400021>

Gomez-Garcia, J., Chavez-Carbajal, A., Segundo-Arizmendi, N., Baron-Pichardo, M. G., Mendoza-Elvira, S. E., Hernandez-Baltazar, E., Hynes, A. P., y Torres-Angeles, O. (2021). Efficacy of *Salmonella* Bacteriophage S1 Delivered and Released by Alginate Beads in a Chicken Model of Infection. *Viruses*, 13(10), 1932. <https://doi.org/10.3390/v13101932>

González, S., Icochea, E., Reyna, P., Guzmán, J., Cazorla, F., Lúcar, J., Carcelén, F., y San Martín, V. (2013) Effect of the supplementation of organic acids on productive parameters in broilers. *Rev Inv Vet Perú*, 24(1), pp. 32-37 Recuperado de <http://www.scielo.org.pe/pdf/rivep/v24n1/a04v24n1.pdf>

Górski, A., Jończyk-Matysiak, E., Międzybrodzki, R., Weber-Dąbrowska, B., Łusiak-Szelachowska, M., Bagińska, N., Borysowski, J., Łobocka, M. B., Węgrzyn, A., y Węgrzyn, G. (2018). Phage Therapy: Beyond Antibacterial Action. *Frontiers in medicine*, 5 (146). doi:10.3389/fmed.2018.00146

Gu, F., Gao, J., Ruan, H., y He, G. (2011). In vitro evaluating the activities and stabilities of the multihydrolases produced by *Aspergillus Niger* zju-Y1 in simulated poultry digestive tract pH levels. *Procedia Engineering*. <https://doi.org/10.1016/j.proeng.2011.11.065>

Gupta R., Prasad Y. (2010). Efficacy of polyvalent bacteriophage P-27/HP to control multidrug resistant *Staphylococcus aureus* associated with human infections. *Curr. Microbiol.* 62. pp. 255–260. 10.1007/s00284-010-9699-x

Herrera, B., y Jabib, R. (2015). Salmonelosis, zoonosis de las aves y una patogenia muy particular. REDVET. *Revista Electrónica de Veterinaria*, 16 (1), pp. 1-19. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=63638739002>

- Hjorth Tønnesen, H., y Karlsen, Jan. (2002) Alginate in Drug Delivery Systems. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 28(6), pp. 621-630, DOI: 10.1081/ DDC-120003853
- Hu, Y., Wang, Z., Qiang, B., Xu, Y., Chen, X., Li, Q., y Jiao, X. (2019). Loss and Gain in the Evolution of the *Salmonella enterica* Serovar Gallinarum Biovar Pullorum Genome. *mSphere*, 4(2), e00627-18. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00627-18>
- Huberman, Y. D., Terzolo, H. R. (2014) Tifosis aviar. *Engormix*. Obtenido de <https://www.engormix.com/avicultura/articulos/tifosis-aviar-t31420.htm>
- Jebri, S., Muniesa, M. and Jofre, J. (2017). General and host-associated bacteriophage indicators of faecal pollution. In: J.B. Rose and B. Jiménez-Cisneros, (eds) Water and Sanitation for the 21st Century: Health and Microbiological Aspects of Excreta and Wastewater Management (Global Water Pathogen Project). (A. Farnleitner, and A. Blanch (eds), Part 2: Indicators and Microbial Source Tracking Markers), Michigan State University, E. Lansing, MI, UNESCO. <https://doi.org/10.14321/waterpathogens.7>
- Iriarte, F. B., Balogh, B., Momol, M. T., Smith, L. M., Wilson, M., y Jones, J. B. (2007) Factors Affecting Survival of Bacteriophage on Tomato Leaf Surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, 73 (6) pp. 1704 – 1711. <http://aem.asm.org/content/73/6/1704.abstract>
- Kasman L.M., y Porter L.D. Bacteriophages. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK493185/>
- Kutateladze, M., y Adarnia, R. (2008). Phage therapy experience at the Eliava Institute. *Medicine et Maladies Infectieuses*, 38 (8), pp. 426-430. Recuperado de: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0399077X08001807>
- Kutter E. (2009) Phage host range and Efficiency of plating. In: Clokie M.R. Kropinski A.M. (ed) Bacteriophages. Methods in Molecular Biology, vol. 51. Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-164-6_14
- Lee, K. Y., y Mooney, D. J. (2012). Alginate: Properties and biomedical applications. *In Progress in Polymer Science (Oxford)*. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.06.00>
- Lengyel, Miléna., Kállai-Szabó, Nikolett., Antal Vince., József Laki, András., Antal, Elstván. (2019). Microparticles, Microspheres, and Microcapsules for Advanced Drug Delivery *Sci. Pharm* 87 (3), <https://doi.org/10.3390/scipharm87030020>
- López Coello, C. (2010) Efecto del uso de los Ácidos Orgánicos en la Nutrición De Aves. México. II Congreso Nacional de Nutrición Animal 2010.

Lozano A, M., y Arias M, D. (2008). Residuos de fármacos en alimentos de origen animal: panorama actual en Colombia. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 21(1), pp.121-135. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=295023520012>

Lupo-Pasin, B., González-Azon, C., y Maestro-Garriga, A. (2012). Microencapsulación con alginato en alimentos, *Técnicas y aplicaciones. Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*. 3(1), pp. 130-151.

Ma, Y. H., Islam, G. S., Wu, Y., Sabour, P. M., Chambers, J. R., Wang, Q., Wu, S. X. Y., y Griffiths, M. W. (2016). Temporal distribution of encapsulated bacteriophages during passage through the chick gastrointestinal tract. *Poultry Science*. <https://doi.org/10.3382/ps/pew260>

Malik, D., Sokolov, I., Vinner, G., Mancuso, F., Cinquerrui, S., Vladisavljevic, G., Clokie, M., Garton, N., Stapley, A., y Kirpichnikova, A. (2017) Formulation, stabilisation and encapsulation of bacteriophage for phage therapy, *Advances in Colloid and Interface Science*, 249, pp. 100-133 Recuperado de <https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.05.014>.

Martelli, F., y Davies, R. H. (2012) *Salmonella* serovars isolated from table eggs: An overview. *Food Research International*, 45(2), pp. 745–754. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.03.054>

Moghtader, F., Eğri, S., y Piskin, E. (2017) Phages in modified alginate beads. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 45(2), pp. 357-363, DOI: 10.3109/21691401.2016.1153485

Monk, A., Rees, C., Barrow, P., Hagens, S., y Harper, D. (2010) Bacteriophage applications: where are we now?. *Letters in Applied Microbiology*, 51. pp. 363-369. doi:10.1111/j.1472-765X.2010.02916.x

Montso, P. K., Mlambo, V., y Ateba, C. N. (2019). Characterization of Lytic Bacteriophages Infecting Multidrug-Resistant Shiga Toxigenic Atypical *Escherichia coli* O177 Strains Isolated From Cattle Feces. *Frontiers in Public Health*. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2019.00355>

Organización Mundial de la Salud Animal (OIE). Capítulo 6.6: Prevención, detección y control de las infecciones de aves de corral por *Salmonella*. *Código Sanitario para Animales Terrestres Actualización 2019*. Obtenido de: https://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahc/current/chapitre_prevent_salmonella.pdf

Organización Mundial de Sanidad Animal. (2020) Enfermedades, infecciones e infestaciones de la Lista de la OIE en vigor en 2020. Recuperado de <http://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/enfermedades-de-la-lista-de-la-oie-2020/>

Organización Mundial de la Salud. (2019) Temas de Salud – Enfermedades de Transmisión Alimentaria. Disponible en: https://www.who.int/topics/foodborne_diseases/es/

Organización Mundial de la Salud y Red Internacional de Autoridades en materia de Inocuidad de los Alimentos. (2018) Enfermedades de transmisión alimentaria. Recuperado de https://www.who.int/foodsafety/areas_work/foodborne-diseases/es/

Organización Mundial de la Salud. (2017) Lista de prioridades globales de bacterias resistentes a los antibióticos para guiar la investigación, el descubrimiento y el desarrollo de nuevos antibióticos. Recuperado de <https://www.who.int/es/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>

Ostberg, T., Lund, E.M., and Graffner, C. (1997) Calcium alginate matrices for oral multiple unit administration: IV. Release characteristics in different media. *International Journal of Pharmaceutics*. 112. pp. 241-248.

Pantucek R., Rosypalova A., Doskar J., Kailerova J., Ruzicková V., Borecka P., et al. (1998). The polyvalent staphylococcal phage ϕ 812: its host-range mutants and related phages. *Virology* 246, pp. 241–252. 10.1006/viro.1998.9203

Prada-Peñaranda, C., Holguín-Moreno, A.-V., González-Barrios, A.-F., y Vives-Flórez, M.-J. (2015). Fagoterapia, alternativa para el control de las infecciones bacterianas. Perspectivas en Colombia. *Universitas Scientiarum*, 20(1), pp. 43–59. <http://doi.org/10.11144/Javeriana.SC20-1.faci>

Qadir, M. I., Mobeen, T., y Masood, A. (2018). Phage therapy: progress in pharmacokinetics. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 54(1), e17093. Epub May 14, 2018. <https://dx.doi.org/10.1590/s2175-97902018000117093>

Reig, M., y Toldra, F. (2008). Veterinary drug residues in meat: Concerns and rapid methods for detection. *Journal of Meat Science*, 78(1–2), pp. 60–67. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.07.029>

Rinaudo, M. (2014) Biomaterials based on a natural polysaccharide: alginate. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 17(1): pp. 92-96 Recuperado de: <http://www.scielo.org.mx/pdf/tip/v17n1/v17n1a7.pdf>

Rodríguez-Fernández, Casilda., Waxman, Samanta., y De Lucas-Burneo José Julio. (2017) Particularidades anatómicas, fisiológicas y etológicas con repercusión terapéutica, en medicina aviar (II): aparato digestivo, aparato cardiovascular, sistema músculo esquelético, tegumento y otras características. Disponible en: <https://botplusweb.portalfarma.com/documentos/2017/3/10/113722.pdf>

- Rojas, M.G., Vallejo, B.M., Perilla, J.E. (2008) Biopolymers as materials for developing products in pharmaceutical applications and biomedical uses. *Revista Ingeniería e Investigación*, 28(1) pp. 57-71 https://www.researchgate.net/publication/262759490_Biopolymers_as_materials_for_product_development_in_pharmaceutical_applications_and_biomedical_uses
- Ross, A., Ward, S., y Hyman, P. (2016). More Is Better: Selecting for Broad Host Range Bacteriophages. *Frontiers in microbiology*, 7, 1352. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01352>
- Ruiz Flores, Griselda, Constantino Casas, Fernando, Quintana López, José Antonio, Cedillo Peláez, Carlos, y Urquiza Bravo, Odette. (2008). Patogenia de *Salmonella enteritidis* FT 13a y *Salmonella enteritidis* biovar Issatschenko en pollos de engorda. *Veterinaria México*, 39(2), pp. 145-160. Recuperado de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0301-50922008000200004&lng=es&tlng=es.
- Segundo-Arizmendi, N., Gómez-García, J., Flores-Cuevas, K.G., Duque-Montaña, B.E., López-Villegas, E.O., Baltazar-Hernández, E., Torres-Angel, O. (2017) Caracterización parcial del Bacteriófago S₁, lítico contra *Salmonella enterica*, con posible uso farmacéutico. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 48(2), pp 36 – 48.
- Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. Seguimiento a Programas de Vigilancia Epidemiológica Activa 2022. Recuperado de <https://www.gob.mx/senasica/documentos/informes-zoosanitarios-semanales-2022?state=published>
- Sillankorva, S.M., Oliveira, H., y Azeredo, J. (2012). Bacteriophages and Their Role in Food Safety. *International Journal of Microbiology*. Article ID 863945
- Sosnik, A. (2014) Alginate Particles as Platform for Drug Delivery by the Oral Route: State-of-the-Art. *International Scholarly Research Notices* <https://doi.org/10.1155/2014/926157>
- Soto, M.J., Retamales, J., Palza, H., Bastías, R. (2018) Encapsulation of specific *Salmonella* Enteritidis phage f3αSE on alginate-spheres as a method for protection and dosification. *Electronic Journal of Biotechnology*, 31(57) <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2017.11.006>
- Suzuki S. (1994). Pathogenicity of *Salmonella enteritidis* in poultry. *International journal of food microbiology*, 21(1-2), pp.89–105. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(94\)90203-8](https://doi.org/10.1016/0168-1605(94)90203-8)
- Szekalska, M., Puciłowska, A., Szymańska, E., Ciosek, P., y Winnicka K. (2016) Alginate: Current Use and Future Perspectives in Pharmaceutical and Biomedical Application. *International Journal of Polymer Science*. <https://doi.org/10.1155/2016/7697031>

Tavakol, M., Vasheghani-Farahani, E., y Hashemi-Najafabadi, S. (2013). The effect of polymer and CaCl₂ concentrations on the sulfasalazine release from alginate-N,O-carboxymethyl chitosan beads. *Progress in biomaterials*, 2(1). doi:10.1186/2194-0517-2-10

Terzolo, H. R., y Chacana, P. (2003). Revisión sobre pullorosis y tifosis aviar: nuevos enfoques para viejos conceptos. *Revista de Medicina Veterinaria*, 84(1); pp.14-20

Unión Nacional de Avicultores. Situación de la avicultura en México: Expectativas 2021. <https://una.org.mx/industria/>

Unión Nacional de Avicultores. (2019) México, promedio de consumo anual: 345 huevos por habitante. Disponible en: <http://una.org.mx/mexico-promedio-de-consumo-anual-345-huevos-por-habitante/>

Vaid, R. K., Thakur, Z., Anand, T., Kumar, S., & Tripathi, B. N. (2021). Comparative genome analysis of *Salmonella enterica* serovar Gallinarum biovars Pullorum and Gallinarum decodes strain specific genes. *PloS one*, 16(8), e0255612. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0255612>

Wernicki, A., Nowaczek, A., y Urban-Chmiel, R. (2017) Bacteriophage therapy to combat bacterial infections in Poultry. *Virology Journal*, 14(179), DOI 10.1186/s12985-017-0849-7

Wessels, K., Rip, D., y Gouws, P. (2021). *Salmonella* in Chicken Meat: Consumption, Outbreaks, Characteristics, Current Control Methods and the Potential of Bacteriophage Use. *Foods (Basel, Switzerland)*, 10(8), 1742. <https://doi.org/10.3390/foods10081742>

Yongsheng, Ma. Pacan, J., Wang, Q., Yongping, X., Huang, X., Korenevsky, A., y Sabour, P. (2008) Microencapsulation of Bacteriophage Felix O1 into Chitosan-Alginate Microspheres for Oral Delivery. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(15), pp. 4799–4805. doi:10.1128/AEM.00246-08

Zaidi. M.B., Lopez, M.C., y Calva E. (2006) Estudios mexicanos sobre *Salmonella*: epidemiología, vacunas y biología molecular. *Microbiología*, 48(2), pp. 121-125.

16 ANEXOS



viruses



an Open Access Journal by MDPI

CERTIFICATE OF PUBLICATION



Certificate of publication for the article titled:

Efficacy of *Salmonella* Bacteriophage S1 Delivered and Released by Alginate Beads in a Chicken Model of Infection

Authored by:

Janeth Gomez-Garcia; Alejandra Chavez-Carbajal; Nallelyt Segundo-Arizmendi; Miriam G. Baron-Pichardo; Susana E. Mendoza-Elvira; Efren Hernandez-Baltazar; Alexander P. Hynes; Oscar Torres-Angeles

Published in:

Viruses 2021, Volume 13, Issue 10, 1932







Academic Open Access Publishing
since 1996

Basel, August 2022

Article

Efficacy of *Salmonella* Bacteriophage S1 Delivered and Released by Alginate Beads in a Chicken Model of Infection

Janeth Gomez-Garcia ¹, Alejandra Chavez-Carbajal ², Nallelyt Segundo-Arizmendi ¹,
Miriam G. Baron-Pichardo ¹, Susana E. Mendoza-Elvira ³, Efren Hernandez-Baltazar ¹, Alexander P. Hynes ^{2,*}
and Oscar Torres-Angeles ^{1,*}

¹ Laboratory of Microbiology and Parasitology, School of Pharmacy, Autonomous University of the State of Morelos, 1001 University Avenue, Chamilpa, Cuernavaca 62209, Mexico; janeth.gomezgar@uaem.edu.mx (J.G.-G.); san_ff@uaem.mx (N.S.-A.); dpmg_ff@uaem.mx (M.G.B.-P.); efrenhb@uaem.mx (E.H.-B.)

² Department of Medicine, McMaster University, 1280 Main Street West, Hamilton, ON L8S 4K1, Canada; carbajaa@mcmaster.ca

³ Laboratory of Virology Postgraduate Field 1, Cuautitlán School of Higher Studies, National Autonomous University of Mexico, 1st May Avenue, Sta María Guadalupe las Torres, Cuautitlán Izcalli 54740, Mexico; seme_6@yahoo.com.mx

* Correspondence: hynes@mcmaster.ca (A.P.H.); tao_ff@uaem.mx (O.T.-A.);
Tel.: +1-905-525-9140 (ext. 28155) (A.P.H.); +52-777-3-29-70-00 (ext. 3373) (O.T.-A.)



Citation: Gomez-Garcia, J.; Chavez-Carbajal, A.; Segundo-Arizmendi, N.; Baron-Pichardo, M.G.; Mendoza-Elvira, S.E.; Hernandez-Baltazar, E.; Hynes, A.P.; Torres-Angeles, O. Efficacy of *Salmonella* Bacteriophage S1 Delivered and Released by Alginate Beads in a Chicken Model of Infection. *Viruses* **2021**, *13*, 1932. <https://doi.org/10.3390/v13101932>

Academic Editors: Chao-Nan Lin and Peck Toung Ooi

Received: 24 August 2021
Accepted: 22 September 2021
Published: 25 September 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Modern bacteriophage encapsulation methods based on polymers such as alginate have been developed recently for their use in phage therapy for veterinary purposes. In birds, it has been proven that using this delivery system allows the release of the bacteriophage in the small intestine, the site of infection by *Salmonella* spp. This work designed an approach for phage therapy using encapsulation by ionotropic gelation of the lytic bacteriophage S1 for *Salmonella enterica* in 2% *w/v* alginate beads using 2% *w/v* calcium chloride as crosslinking agent. This formulation resulted in beads with an average size of 3.73 ± 0.04 mm and an encapsulation efficiency of 70%. In vitro, the beads protected the bacteriophages from pH 3 and released them at higher pH. To confirm that this would protect the bacteriophages from gastrointestinal pH changes, we tested the phage infectivity in vivo assay. Using a model chicken (*Gallus gallus domesticus*) infected with *Salmonella* Enteritidis, we confirmed that after 3 h of the beads delivery, infective phages were present in the chicken's duodenal and caecal sections. This study demonstrates that our phage formulation is an effective system for release and delivery of bacteriophage S1 against *Salmonella* Enteritidis with potential use in the poultry sector.

Keywords: phage therapy; *Salmonella* enteritidis; poultry sector; alginate

1. Introduction

Bacteria of the genus *Salmonella* can infect humans and animals. Two of the main pathogens of these genera infecting animals, and specifically poultry, are *Salmonella enterica* serovar Pullorum (*S. Pullorum*) and *Salmonella enterica* serovar Gallinarum (*S. Gallinarum*) [1]. Their economic impact in terms of loss in the poultry sector is due to their killing effect after infection. Both strains can cause death in up to 90% of birds affected [1,2]. Another example is *Salmonella enterica* serovar Enteritidis (*S. Enteritidis*), which can infect humans through consumption of contaminated meat and eggs. At the same time, poultry infected with *S. Enteritidis* infect their healthy neighbors contributing to further economic loss. *S. Enteritidis* is one of the main foodborne pathogens responsible for spreading *Salmonella* in humans, representing a public health issue [3,4]. The indiscriminate use of antibiotics as growth promoters for weight gain in poultry contributed to the spread of antibiotic-resistant microorganisms in humans and has prompted the prohibition of antibiotics in the poultry sector, so bacteriophages or phages (viruses that infect and lyse

bacteria) have emerged as a strategy bio-control of *Salmonella*. This can include applications intended to limit the spread of the bacterium or directly for the treatment of salmonellosis in poultry, an approach known as phage therapy [5–12].

Currently, a wide variety of studies on phage therapy in the poultry sector demonstrated that its use is effective in reducing bacterial loads of *Salmonella* that colonize the digestive tract [13–15]. In one example, Fiorentin et al. [16] demonstrated the effectiveness of a cocktail of lytic phages to reduce *Salmonella* Enteritidis in cecal tonsils of day-old chickens. Five days after treatment, *Salmonella* Enteritidis loads decreased by 3.5 orders of magnitude. Andreatti-Filho et al. [17] demonstrated that the oral administration of a cocktail of selected phages helped to reduce the colonization of *Salmonella* Enteritidis in cecal tonsils during the first 24 h. However, the treatment failed to achieve a significant reduction after 48 h. Despite these reported successes of the solutions and cocktails, they have limited stability due to loss of the phage titer during processing and storage, which in a few months could represent losses as high as 99% of the initial titer.

In fact, one of the main challenges of phage delivery forms has been their stability, which is why different authors have been inclined to look for solid pharmaceutical options such as nanosomes, liposomes or microspheres [18]. Currently, alginate (ALG) is the main biopolymer used to encapsulate phages due to its biocompatibility, low price and low toxicity [19]. One of the first reports about the encapsulation of bacteriophages in ALG using the ionic gelation technique with calcium as a cross-linking agent was published in 2008 by Yongsheng et al. [20], who encapsulated the *Salmonella* spp. phage Felix O1 in a chitosan-alginate-calcium chloride system, demonstrating that the ALG allowed Felix O1 to be infective in the gastrointestinal tract (GIT), promoting the phage delivery in their intestines.

We previously isolated and partially characterized a phage, “S1”, capable of infecting *Salmonella enterica* in vitro [21]. Briefly, phage S1 has a plaque morphology consistent with a lytic life cycle, a burst size of 28–40, and is resistant to temperatures up to 50 °C. For these reasons, phage S1 was considered a candidate for phage therapy in poultry with the goal of preventing the transmission of *Salmonella enterica* to humans.

In order to use S1 in phage therapy, a thorough genetic characterization of the phage is required to ensure it is virulent (strictly lytic) and carries no genes that would be a barrier to its use; furthermore, as the gastrointestinal pH of chickens varies from 1 to 4 in the gizzards, while ranging from 5 to 7 in the duodenum, the phage would experience a wide-range of pHs which could impair its efficacy [22,23]. For this reason, the phage might require a delivery vehicle in order to be effective in therapeutic applications [19]. Accordingly, we set out to complete the genetic characterization of the phage, develop a suitable formulation to encapsulate S1, and assess the delivery and release of phage S1 in vitro and in vivo models.

2. Materials and Method

2.1. Bacterial Strains

A clinical poultry isolate of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis phage type 13A (SE PT13A), was obtained from the USDA National Veterinary Services Laboratory (Ames, IA, USA) and donated by Dr. Billy Hargis and Dr. Guillermo Tellez of the Department of Poultry Science, University of Arkansas. SE PT13A was grown on tryptic soy agar (TSA) (BD Bioxon, Mexico City, Mexico) or tryptic soy broth (TSB) (BD Bioxon, Mexico City, Mexico) according to the assay needs. Strains *Salmonella enterica* serovar Pullorum (MDR-MC862-A) and *Salmonella enterica* serovar Gallinarum (MDR-MC862-B), were isolated from clinical trials in poultry and donated by the Faculty of Veterinary, National Autonomous University of Mexico. The strain *Salmonella enterica* serovar Cholerasuis (*S. Cholerasuis*), *Salmonella enterica* serovar Typhi (*S. Typhi*), *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) and *Citrobacter freundii* (*C. freundii*), *Enterobacter cloacae* (*E. cloacae*) and *Escherichia coli* (*E. coli*) were isolated from clinical trials in humans (Table S1).

2.2. Phage S1 Isolation

Phage S1 was isolated from wastewater from the city of Cuernavaca Morelos, Mexico [21]. Propagation of phage S1 was carried out according to what was reported by Segundo-Arizmendi et al. [21], when the host bacterial culture SE PT13A reached mid-exponential phase in TSB at 37 °C and 120 rpm, (0.2A with OD₆₃₀ nm) the culture was infected with phage S1 at multiplicity of infection (MOI) of 1 and incubated for a further 5 h. The culture was then centrifuged at 1300 × *g* for 15 min (Centrifugent V1, CRM GLOBE). The supernatant was filtered by passage through 0.45-µm cellulose acetate membrane filter (MF-Millipore, Merck KGaA, Burlington, MA, USA) and stored at 4 °C.

2.3. Enumeration of Phages

The enumeration of phage S1 was performed using the double-layer agar method described by Adams [24], with some modifications. An aliquot of 100 µL of mid-exponential SE PT13A was added to 100 µL of ten-fold serial dilutions of phage S1 with sterile saline solution 0.85% *w/v* (NaCl ACS Fermont, Monterrey, Nuevo León, Mexico) to a tube containing 3 mL of bacteriological agar at 0.7% *w/v* and was poured in triplicate into TSA plates that were incubated at 37 °C for 24 h.

2.4. Sequencing and Annotation of Phage S1

After obtaining a high titer ($>1 \times 10^{11}$ PFU/mL) of phage S1, a phage DNA extraction was performed with Invitrogen PureLink Viral RNA/DNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific HR Services Mexico, S. de R.L. de C.V. Mexico, Mexico.) following the kit protocol. Library preparation of the resultant DNA was performed by tagmentation using Illumina Nextera protocol. The final library was prepared for sequencing with the reagent MiSeq kit v2 (Illumina Inc, San Diego, CA, USA 92122, EE.UU.) and sequenced using Illumina MiSeq System. The fragments obtained were paired-end reads with lengths of 150 bp. Host reads and adapters were trimmed using Trimmomatic v0.36 [25] resulting in more than 8 million paired-end sequence reads. De novo assembly was carried out with ABySS v2.0.1 [26] using default parameters. To determine similarities of the assembled genome among all genomic sequences we used BLASTn [27]. Genome annotation was performed with PROKKA v1.14.6 [28]. Phage annotation was performed by HMMER v 3.3.2 [29] to search phage protein similarities against UniProt database. Alternately, an alignment of the closest phage S1 relatives *Salmonella* phage ZCSE2 (NC_048179) and S144 (MT663719) was used to identify protein hits and their *e*-values. For each protein comparisons the *e*-value from the full sequence was taken into consideration. Additional protein searching was made with the open reading frames (ORF's) using HHpred toolkit [30]. To classify the phylogeny of S1, we used ViPTree to generate the viral proteomic tree [31]. Three sequences from the *Loughboroughvirus* genus (*Salmonella* phage ZCSE2; NC_048179, phage S144; MT663719 and phage SE4; NC_048764) were uploaded into the web server to generate the phylogenetic tree. The completeness of the final assembly was confirmed by mapping the sequences from the last and first portions of S1 genome and compared with the linear assembly. The obtained tandem repeat was visualized by Tablet v.1.17.08.17 [32] for quality control. The manual curation and final annotation were done by Artemis v18.1.0 [33]. Blastp was used to identify the non-redundant protein sequences. DNAPlotter [34] was used to obtain the circular organization from the final genome annotation. An alignment of protein coding genes among phages with >87% of nucleotide identity was built up using a Python script [35]. Additionally, predictive analysis to identify the phage lifecycle was made using PhageAI [36]. The sequence was deposited in the NCBI repository under the accession number: MZ127825.

2.5. Efficiency of Plating of Phage S1

The efficiency of plating (EOP) of phage S1 was determined in five serovars of *Salmonella enterica* (*S. Gallinarum*, *S. Pullorum*, *S. Typhi*, *S. Typhimurium* and *S. Choleraesuis*). Additionally, the EOP was tested in other gram-negative species; *C. freundii*, *E. cloacae*

and *E. coli* (Table S1). The EOP was done according to the technique described by Montso et al. [37] with some modifications. The strains were adjusted at a set titre of 1.6×10^8 CFU/mL, while ten-fold serial dilutions of phage S1 were made with sterile saline solution 0.85% *w/v* until obtaining 1×10^2 PFU/mL. Then, 100 μ L of phage S1 was mixed with 100 μ L of each strain during 10 min at room temperature. The mixture was added into 3 mL of bacteriological agar at 0.7% *w/v* and poured on top of TSA plates and incubated at 37 °C for 24 h. The relative EOP of phage S1 was determined by equation 1, from the average of five trials.

$$\text{Relative EOP} = \frac{\text{average number of plaques on targeted host bacterium (PFU's)}}{\text{average number of plaques on reference host bacterium (PFU's)}} \quad (1)$$

The EOP value obtained was classified as high ($\text{EOP} \geq 0.5$), medium ($0.5 > \text{EOP} > 0.01$), and low ($\text{EOP} \leq 0.1$) [34].

2.6. Encapsulation of Phage S1 in ALG Beads

Bacteriophage S1 was encapsulated using the ionic gelation technique by extrusion [12,19,38]. A solution of ALG (Drogueria Cosmopolita, México city, Mexico) was prepared at a concentration of 2% *w/v* and 1.19×10^{11} PFU of phage S1 was added, the mixture was extruded using a 5 mm internal diameter needle to a sterile calcium chloride solution 2% *w/v* (Fermont, Monterrey, Nuevo León, Mexico). To remove excess calcium chloride solution from the beads, three washes were made with 150 mL of sterile deionized water for 3 min and kept at room temperature for two hours to remove excess water. Finally, 100 beads were measured with a digital calibrator UltraTech® (General Tools, New York, NY, USA) and stored at 4 °C.

2.7. Determination of the Encapsulation Efficiency

The encapsulation efficiency (%EE) was determined according to what was reported by Colom et al. [38] and Boggione et al. [39] with modifications. The encapsulated phage S1 was recovered from beads inoculated in denominated broken microsphere solution containing 50 mM sodium citrate (Fermont, Monterrey, Nuevo León, Mexico) and 0.2 M sodium bicarbonate (Fermont, Monterrey, Nuevo León, Mexico) adjusted to pH 7.5 with HCl 0.2 M (Fermont, Monterrey, Nuevo León, Mexico) and shaken at 120 rpm until macroscopic and visible disintegration for the liberation of the phage. The amount of phage S1 that not encapsulated during the alginate ion gelling process was determinate of the calcium chloride solution and the bead wash water. Finally, ten-fold serial dilutions of the broken microsphere solution, calcium chloride solution and the water for washing the beads were made on sterile saline solution 0.85% *w/v*. The determination of the total PFU was made using the double layer agar method by Adams [24]. The %EE of phage S1 was calculated as the percentage of phage encapsulated within the beads compared to the total phage titer and was determined using equation 2 reported by González-Menéndez et al. [37]

$$\%EE = \frac{\text{encapsulated phage (PFU)}}{\text{total phage (PFU)}} \times 100 \quad (2)$$

where the encapsulated phage is the amount of PFU of phage S1 recovered from beads and total phage is the sum of PFU recovered from beads and PFU of non-encapsulated.

2.8. Comparison of SE PT13A Growth under the Exposure of ALG and ALG + Phage

SE PT13A cultures were grown to the middle of the exponential growth phase, then inoculated with 1 g of alginate beads with and without phage S1. The cultures were maintained at 37 °C with constant agitation at 120 rpm. Samples were taken at 0, 12, 24, 36 and 48 h after inoculation and ten-fold dilutions were performed with sterile saline solution 0.85% *w/v*. An aliquot of 500 μ L of each dilution per triplicate was seeded in

TSA plates by spatulation technique and incubated at 37 °C for 24 h. The bacterial titer (CFU/mL) was calculated according to equation 3 as follows:

$$\frac{CFU}{mL} = [number\ of\ colonies][dilution\ factor] \left[\frac{1}{aliquot} \right] \quad (3)$$

2.9. In Vitro Protection and Release of Free Phages and Encapsulated Phages in ALG Beads

To determine whether the alginate beads protect bacteriophage S1, we designed the following experiment. Free phages at a fixed concentration of 9.56×10^8 PFU were mixed on 10 mL of sterile saline solution 0.85% *w/v*, the final pH was adjusted to 3, 5, 7 and 8.5 with HCl 0.2 M and NaOH 0.2 M (Fermont, Monterrey, Nuevo León, México), accordingly. The mixture was incubated at 40 °C and in agitation for 100 rpm, aiming to mimic the average temperature of the chicken GIT, and at either pH 3 for 45 min, pH 5 for 15 min, pH 7 for 30 min, and pH 8.5 for 20 min, aiming to mimic the pH and transit time of the proventriculus + gizzard, duodenum, jejunum + ileum or cecum, respectively [22,23,40]. The free phages maintained at pH 3 and 5 were neutralized with a 0.2 M NaOH solution for 5 min and placed in 5 mL of sterile saline solution at pH 7 in order not to affect bacterial viability at the time of titration of the phage, as *Salmonella* grows in an optimum pH of 6.5 to 7.5 and its growth is inhibited at $pH < 3.8$ [41].

On the other hand, 1 g of ALG beads containing the phage were incubated under the same conditions as the free phages described above. After incubation, the beads on pH 3 and 5 were adjusted at pH 7 with 0.2 M NaOH for 5 min and rinsed with sterile distilled water three times and placed in 20 mL of the broken microsphere solution at pH 7.5 and stirred at 120 rpm until macroscopic and visible disintegration for the release of the phage [20] as the ALG beads disintegrate at $pH > 7$. Then the beads on pH 7 and 8.5 were rinsed with sterile distilled water and placed in 20 mL of the broken microsphere solution at pH 7.5 and stirred at 120 rpm until macroscopic and visible disintegration for the release of the phage. Each sample was titered as described previously by the Adams technique [24]. The PFU/g were calculated using the PFU/mL multiplied by 20 mL of the broken microsphere solution used for the beads disintegration. The percentage of phage recovery was calculated using the titers from the initial phage concentration at time zero.

2.10. In Vivo Assays

2.10.1. Experimental Animals

A sample size of 38 one-month-old chickens was calculated taking into consideration 5% of chicken loss during the transportation. We obtained all animals from a commercial supplier (Comercializadora Granja Cuevas, Toluca, Mexico). The Institutional Project Review Board "Ad hoc Committee for admission to Doctorate in Pharmacy" assigned by Faculty of Pharmacy, UAEM approved the ID# 2019/003 research protocol in 17 June 2019. Chickens were transferred and handled in accordance with the Official Mexican Standard NOM-051-ZOO-1995, Humanitarian treatment in the mobilization of animals [42]. After one week of observation after they arrived, the chickens were used to perform the in vivo experiments. The animals were kept in the School of Pharmacy, UAEM, under the specifications of the facilities established in Guide for the Care and Use of Agricultural Animals in Research and Teaching, 3rd edition. [43] and the Manual of Good Livestock Practices in Broiler Production Units, 2nd edition [44]. To guarantee that the chickens were free of *Salmonella*, upon arrival, samples were taken from the cloaca with sterile swabs that were sown in TSB and incubated at 37 °C for 24 h. The animals were kept in the conditioning phase for seven days by supplying them with commercial growth food Flagasa™ (Azcapotzalco, Mexico) and water ad libitum. Thirty chickens were distributed in five groups for elimination test and eight were used for the identification of the degradation of the ALG beads and phage S1 release test. Finally, the animals were euthanized by cervical dislocation in accordance with the 4th edition of the Guide for the Care and Use of Agricultural Animals in Research and Teaching [43] Chapter 2:

Agricultural Animal Health Care and by the American Veterinary Medical Association and the provisions of the Official Mexican Standard NOM-033-SAG/ZOO-2014; Methods for killing domestic and wild animals [45].

2.10.2. Degradation of the ALG Beads and Phage S1 Release

To observe the degradation process of the ALG beads during their passage through the gastrointestinal tract, a total of eight chickens were administered 1 g of alginate beads containing 4.9×10^9 PFU phage S1. Two randomly chosen chickens were sacrificed at 1, 3, 5 and 18 h after administration and macroscopic search for ALG beads was performed in crop, gizzard, cecum and duodenum cavities of the GIT. In addition, the presence of phage S1 was determined as follows: the contents of each of the mentioned cavities was homogenized in 20 mL of sterile saline solution 0.5% *w/v* and centrifuged at $1300 \times g$ for 15 min, the supernatant was filtered using a 0.45- μm filter. An aliquot of 50 μL from that filtrate was inoculated on TSA plates which contained a lawn of SE PT13A (spot test technique). Plates were incubated at 37 °C for 24 h. The presence of lytic zones was considered as a positive for phage activity in each of the analyzed chicken organs.

2.10.3. Elimination of SE PT13A in Chickens

Knowing that phages are biological agents that replicate in the host cell, we designed an assay that would corroborate their presence in organs that *Salmonella* spp. infects. The chickens' infection with SE PT13A and administration of the corresponding treatments were performed as indicated in Table 1. Post infection day three, five, and seven samples were taken with swabs from the cloacae in each group. Then, they were seeded in Petri dishes containing TSA and incubated at 37 °C for 24 h. One-day post-infection (Day 8) with SE PT13A, each chicken received a single dose of the treatment indicated for their group (one gram of beads with or without phage, or antibiotic). The reduction of SE PT13A was determined by qualitative analysis of the bacterial growth of the cloacal samples, obtained from each group 24 and 48 h after treatment administration, on TSA at 37 °C for 24 h. Additionally, 10 g of stool sample obtained from the chicken beds in groups 1 and 4 were considered for phage screening after 24 h of the treatment with ALG beads. Stool samples were hydrated in 10 mL of sterile saline and centrifuged at $1300 \times g$ for 15 min. The supernatant was analyzed by spot test as described previously, to determine if the encapsulated phage S1 had passed through the GIT, been released, and remained infectious.

Table 1. Infection registration and types of treatments in each experimental group.

Group	Infection			Treatments
	Day 1	Day 2	Day3	Day 8
A		No infection		ALG beads + S1 at 4.9×10^9 PFU
B				No treatment
C				Antibiotic treatment
D	S.E. at 4×10^6 UFC	S.E. at 4×10^7 UFC	S.E. at 2.5×10^9 UFC	ALG beads + S1 at 4.9×10^9 PFU
E				ALG beads

S.E., *Salmonella* Enteritidis (SE PT13A). S1, phage S1. ALG, alginate. All ALG treatments weighted 1 g of mass. Antibiotic treatment indicates a mixture of 8 g of Trimethoprim/Sulfamethoxazole in 4 L of water. $n = 30$ chickens, 6 per group.

3. Results and Discussion

3.1. Sequencing of Phage S1

We obtained a complete and novel assembled phage genome of 53,394 base pairs in length, with an average coverage of $7000 \times$ and genomic guanine and cytosine (G + C) content of 45.8%. The genome annotation of phage S1 resulted in 75 ORF's, while the prediction of the protein functions assigned only 29 ORF's (Table 2 from the NCBI database, HMMER or HHpred at the time of the search (26 July 2021).

Table 2. Bacteriophage S1 ORFs with known and putative functions.

ORF	Product	Chromosomal Locus (nt)	Accession Number	Database	e-Value
1	Major capsid protein	1–978	YP009821716.1	NCBI	5.2×10^{213}
6	Putative tail protein 1	2907–3527	QMV47842.1	NCBI	3×10^{-134}
7	Putative tail protein 2	3527–6484	Q6QGE2	UniProtKB	0
8	Putative tail protein 3	6554–7195	Q6QGE2	UniProtKB	9.5×10^{-10}
9	Putative tail protein 4	7208–9082	QMV47844.1	NCBI	6.8×10^{-32}
10	Putative sheath protein	9170–10,309	Q24LI4	UniProtKB	5.6×10^{-19}
11	Putative structural protein	10,320–10,751	D6RRG7	UniProtKB	1.8×10^{-13}
12	Putative tail assembly chaperone protein	10,768–11,196	PF10876.10	Pfam	5.6×10^{-15}
13	Putative tape measure protein	11,362–13,023	Q6KGH8	UniProtKB	7.2×10^{-06}
16	Putative baseplate protein 1	14,250–15,200	10312	UniProtKB	1.8×10^{-02}
17	Putative puncturing protein	15,190–15,834	PF18352.3	Pfam	5×10^{-18}
18	Putative baseplate protein 2	15,843–16,214	P09425	UniProtKB	4.1×10^{-7}
19	Putative baseplate protein 3	16,218–17,381	Q9T1V2	UniProtKB	3×10^{-10}
21	Tail fiber protein S	18,020–19,369	Q9T1V0	UniProtKB	6.9×10^{-18}
22	Tail fiber assembly protein U	19,369–19,911	Q71TD6	UniProtKB	2.9×10^{-18}
23	Putative tail fiber assembly protein U'	19,914–20,423	Q71TD7	UniProtKB	6.9×10^{-18}
24	Putative holin	20,525–20,788	PF16080.7	Pfam	6.7×10^{-04}
25	SAR-endolysin	20,763–21,308	Q37875	UniProtKB	7.4×10^{-13}
26	Putative spanin inner membrane subunit	21,287–21,616	Q9T1X1	UniProtKB	2×10^{-9}
29	DNA polymerase	22,342–24,312c	P19822	UniProtKB	1.5×10^{-49}
31	Thymidylate synthase	25,340–26,224c	P00471	UniProtKB	3.4×10^{-40}
36	Putative ATP-dependent DNA helicase	28,586–30,259c	P20703	UniProtKB	2.3×10^{-32}
38	Putative exonuclease	31,377–30,466c	P03697	UniProtKB	1.8×10^{-04}
39	Putative deoxycytidylate deaminase	31,343–31,807c	P00814	UniProtKB	1.4×10^{-13}
54	Anaerobic NTP reductase small subunit	38,921–41,455	YP009821771.1	NCBI	0
55	Putative resolvase	41,950–42,378	Q98VP9	UniProtKB	1.6×10^{-04}
68	Putative dihydrofolate reductase	46,756–47,427	Q6QGJ4	UniProtKB	6.4×10^{-06}
73	Putative terminase large subunit	49,484–50,932	P54308	UniProtKB	6.3×10^{-16}
74	Portal protein	50,934–52,496	O64207	UniProtKB	6.5×10^{-10}

Complementary strand, c.

S1 has a core of the main proteins expected in its genome; genes encoding major capsid proteins, phage tail fibers, lysis and replication (DNA polymerase I and ATP-dependent RNA helicase) and phage terminase proteins. We did not detect tRNAs, transposases, integrases or phage repressors. A schematic gene organization is shown in Figure 1.

To predict its lifecycle, we used a predictive analysis tool (PhageAI), which anticipated phage S1 as 100% virulent. We confirmed the completeness of the phage S1 after mapping their reads from the end and beginning of its linear sequence.

The coverage of these tandem repeats resulted in an average 50×. However, we couldn't determine the phage termini due the tagmentation protocol used in the library preparation.

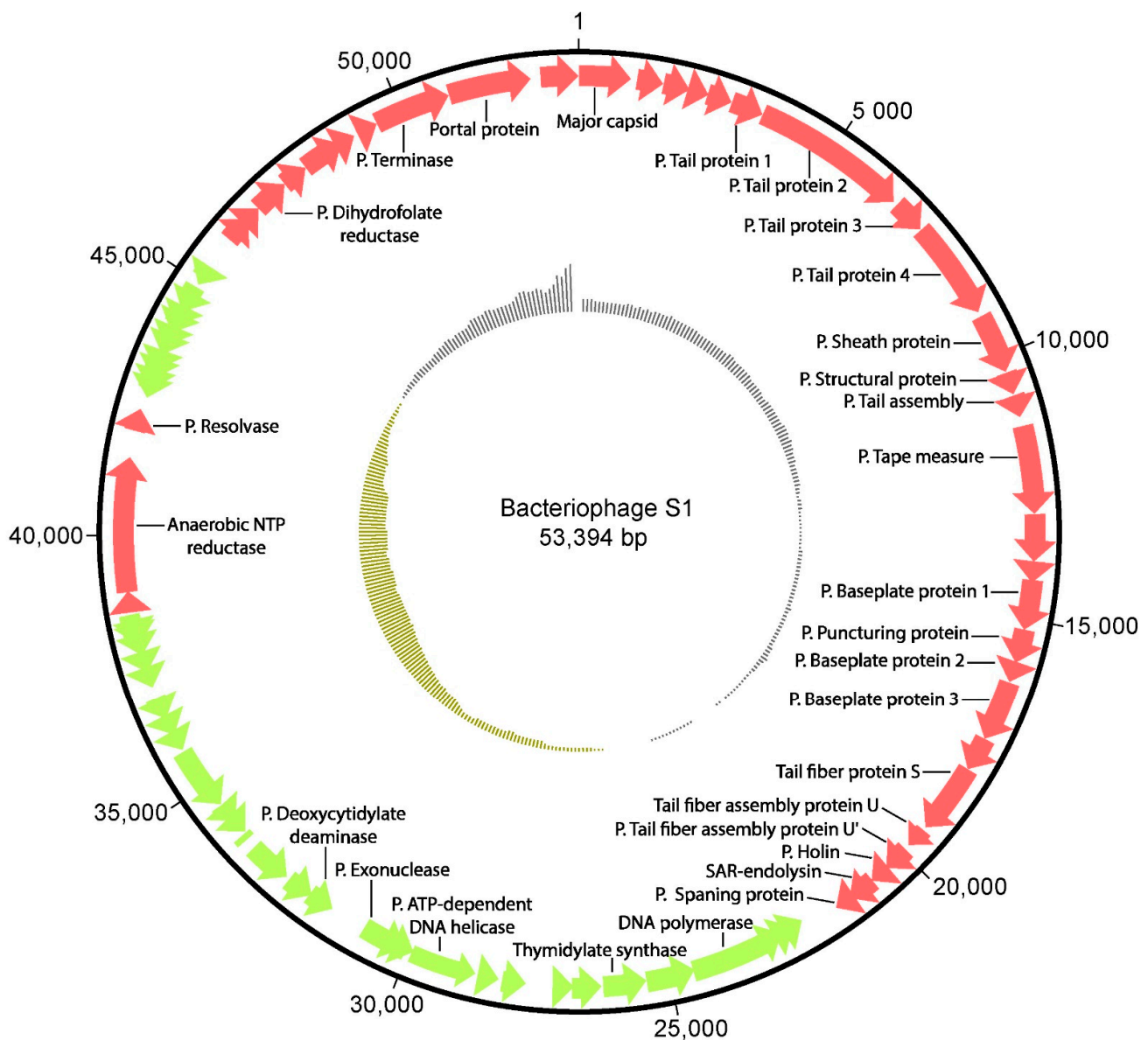


Figure 1. Genome representation of phage proteins with putative and known functions. The outside of the circle represents the positions of the protein-coding genes and arrow shows the direction they are transcribed. The inside of the circle represents plots of the GC content.

Nucleotide analyses on BLASTn shown that the genomic content from phage S1 shared the highest percentage of identity with three *Salmonella* phages; S144 (97.64%), ZCSE2 (97.58%) and SE4 (87.05%), the accession numbers are NC_048179, MT663719 and NC_048764 respectively. These three phages belong to the family *Myoviridae* and genus *Loughboroughvirus*. We carried out a phylogenetic analysis using a full viral protein alignment to classify S1 through the database from ViPTree. Phage sequences from ZCSE2 and S144 are considered relatively new. The release of these sequences to the NCBI database happened during 2020. For that reason, we added the new genomes into the webserver to identify the phylogeny of S1. The proteomic tree showed that S1 had the closest relationship with phage ZCSE2, suggesting that S1 comes from the same lineage, the genus *Loughboroughvirus*. Also, we denoted a second cluster showed a close relationship between ZCSE2 and S144 and a third cluster showing the relation of SE4 with the rest of phages from the same genus (Figure 2).

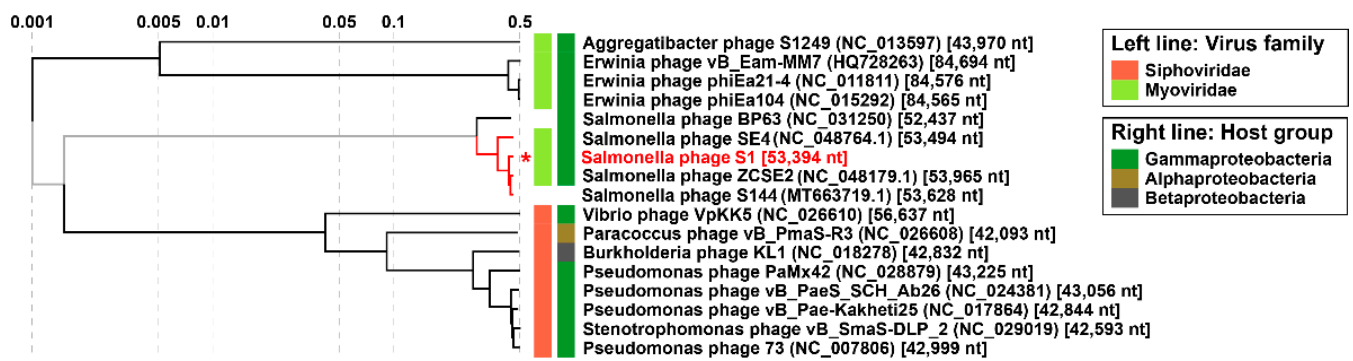


Figure 2. Phylogenetic tree. Phylogenetic analyses constructed by full viral protein alignment of the closest relatives phage sequences on ViPTree database and new phages from the genus *Loughboroughvirus*. Red lines indicated phages from genus *Loughboroughvirus*. And a red asterisk indicates where the phage S1 is positioned inside of the tree for easy visualization.

Phage S144 is the closest phage related to S1 with 97.64% nucleotide identity over the length of its genome. From the 75 proteins in S1, only 70 were found in S1 with 85% amino acid similarity cutoff (Figure 3).

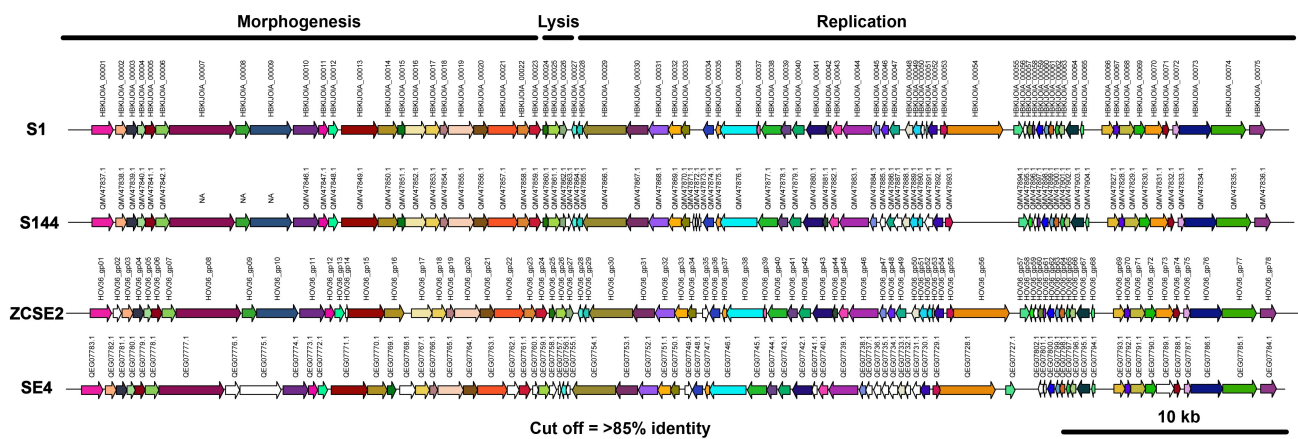


Figure 3. Genome alignment of viral proteins sharing >85% identity in phages from the genus *Loughboroughvirus*. From top to the bottom, the figures show phage S1, ZCSE2, S144 and SE4. ORF's are shown with arrows and the number of each ORF is indicated on top of the arrow. Arrows with the same colors among all of them represent homologous proteins sharing >85% identity, otherwise they are shown in white. Arrows to the right indicate forward sense, arrows to the left indicate reverse sense.

Three proteins with the open reading frame in the complementary strand were not more than 85% similar among phages from the same genus. From these proteins, just two had a predictive regulatory function.

A remarkable characteristic of phage S144 is the fact that it can infect 25 *Salmonella* serovars but also can infect at least 4 *Cronobacter sakazakii* strains and *Enterobacter cloacae*, with complete different plaque morphology in different hosts. This broad host infectivity positioned the phage S144 as a polyvalent phage [46]. In our study, we did not detect polyvalence. Nonetheless, it is interesting that within the less than 2.3% of dissimilarity at the nucleotide level exists impactful differences across this new genus.

Phage ZCSE2 it is a mere 571 bp shorter than S1 and 97.58% identical over the entire length of its genome arising two gaps at the beginning and end of their sequences. S1 encodes 75 proteins, all but 73 of which can be found in S1 as well (85% amino acid similarity cutoff). We noticed that the ORFs 50 and 56 in phage S1 are unique proteins that are not present in any other phage from the same genus (at more than 85% amino acid similarity cutoff). These are small proteins with 50 and 58 amino acids, respectively (Figure 3), with their open reading frame in the complementary strand with unknown function even after

the predictive searching with HHpred. ZCSE2 has a broad host range against 24 *Salmonella* strains representing 16 serotypes and is stable in a high titer concentration on an extensive pH spectrum (4.5–9 pH) up to 24 h [47]. These features highlight the importance of the discovery of other phages as S1 with high similarity to ZCSE2, considering these features that allow fighting against pathogens that are potentially harmful to humans and animals.

A phage less closely related to S1 but from still the same genus is SE4, which is 100 bp longer than S1 and 87.05% identical over the entire length of its genome. From the 75 proteins in S1, only 57 were found in S1 and in the others with 85% amino acid similarity cutoff (Figure 3). The majority of these 57 proteins are hypothetical proteins. Only four of them had annotated functions in their proteins on the ORFs 36, 49, 50 and 63. The first three proteins had functions implicated in tail fibers, major tail and tail assembly, respectively, and are in the same location of the proteins involved in morphogenesis than the other phages. But in the fourth protein (ORF 63), we identified an annotated protein that codifies to an enzyme involved in the pathway of galactose metabolism, the UDP-Glucose 4-epimerase. These four ORFs together may indicate a remarkable and unique difference among SE4 and the rest phages from the same genus. Not less important than ZCSE2 and S144, the host range of SE4 is extensive as well, leading to infect 36 different strains of *Salmonella enterica*, indicating that SE4 also has a broad spectrum of bacterial killing [48] and high potential to use against a wide range of *Salmonella* spp.

The conserved proteins across their phylogenetic neighbors is shown in Figure 4, in which the alignment of the proteins set at 95% cutoff of the amino acid similarity. The ORF 38 in phage S1 correspond at a putative exonuclease and ORFs 50, 56, 66 and 70 have unknown functions but are different across the rest of the phages.

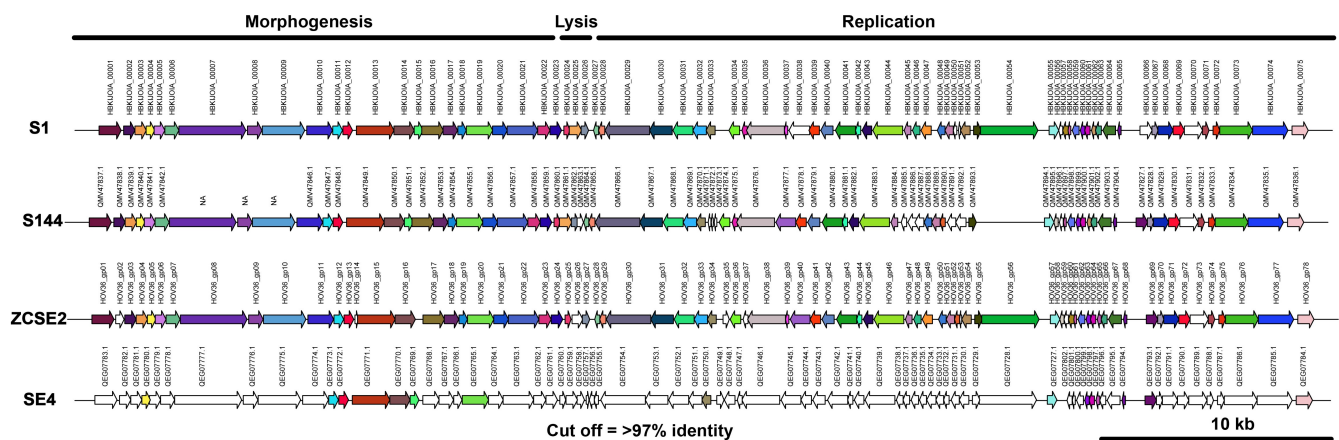


Figure 4. Genome alignment of viral proteins sharing >97% identity in phages from the genus *Loughboroughvirus*. From top to the bottom figures shows phage S1, S144, ZCSE2 and SE4. ORFs are shown with arrows and the number of each ORF is indicated on top of the arrow. Arrows with the same colors among all phage genomes represents homologous proteins sharing >97% identity. White arrows show <97% identity with any other protein. Arrows to the right indicate forward sense and arrows to the left indicate reverse sense.

3.2. Host Range by EOP

The EOP of phage S1 in *S. Pullorum* MDR-MC862-A was 0.61 while with *S. Gallinarum* MDR-MC862-B was 0.58 (Table 3). The type of plaques in both strains were clear; however, we could not see plaques as a proof of infectivity on *S. Typhi*, *S. Typhimurium*, *S. Choleraesuis*, nor on gram-negative isolates from humans. Although the subspecies of *Salmonella enterica* share a common bacterial ancestor [49], the presence of lytic plaques on *S. Pullorum* and *S. Gallinarum* was associated with a close phylogenetic relationship because these serotypes share a direct bacterial ancestor with Enteritidis serotype [50,51].

Table 3. Efficiency of Plating (EOP) of phage S1.

Bacteria	Identification of Bacteria	EOP
S. Enteritidis (SE PT13A)	Host strain	1
S. Typhi	ICTH	0
S. Pullorum	ICTP	0.61
S. Gallinarum	ICTP	0.58
S. Cholerasuis	ICTH	0
<i>C. freundii</i>	ICTH	0
<i>E. cloacae</i>	ICTH	0
<i>E. coli</i>	ICTH	0

ICTP: Isolated from clinical trials in poultry, ICTH: Isolated from clinical trials in humans.

3.3. Particle Size and Encapsulation Efficiency

The phage S1 encapsulated by ionic gelation in ALG beads using calcium chloride as a crosslinking agent resulted in an average size of 3.73 mm with a range of 3.69 to 3.77 mm. The size of the beads formed by the ionic gelation technique by extrusion depends mainly on the diameter of the nozzle used, which is the determining factor for obtaining the desired size [52]. Considering that the pressure exerted with the nozzle increased when the diameter of the nozzle decreased [53], and at higher pressure tailed phages could release their genetic material, resulting in loss of infectivity [12], we used a nozzle with an internal diameter of 5 mm. In this work, the size of ALG beads used to encapsulate the bacteriophage S1 are higher than in other studies [20,39,54]. The bead size reported by Abdelsattar et al. [55], was 2.38 ± 0.14 , 2.8 ± 0.11 and 2.33 ± 0.12 mm for three different formulations of the bacteriophage ZCEC5. However, our formulation's bead size can be advantageous because increasing the particle size of the chicken food improves gizzard functionality and development [56–58]. On the other hand, the assessment of the percentage of encapsulation efficiency showed an average of 88.09% (1.11×10^{11} PFU). This encapsulation percentage was slightly less than reported in other studies where the beads disintegrated under the same conditions, such as that by Moghtader et al. [59], who reported an efficiency of 90% in the encapsulation of bacteriophage T4 in 2% *w/v* alginate beads coated with chitosan and polyethyleneimine, as well as the study by Yongsheng et al. [20], who obtained an efficiency of 93.3% when encapsulating the phage Felix O1 in alginate microbeads coated with chitosan. However, it is important to highlight that our formulation does not contain other additional polymers like chitosan or polyethylenimine. Also, several products based on phages are traded in diverse preparations such as aerosol lyophilizes or nasal sprays, pills, creams, ointments and liquid preparations with titers from 10^5 up to 10^{11} [60,61]. For these reasons, we consider that the PFU of bacteriophage S1 contained in the ALG beads is suitable for their implementation as phage therapy.

3.4. Comparison of SE PT13A Growth under the Exposure of ALG and ALG + Phage

We first set out to ensure the alginate beads would not interfere with our ability to detect phage activity *in vitro*. We compared the bacterial growth exposing the ALG beads and ALG beads + phage. When SE PT13A was grown in the presence of ALG beads, the viable bacterial counts increased X-fold over the first 24 h, with a drop of less than 2-fold over the following 24 h (Figure 5), consistent with standard exponential growth and eventual 'death phase'. This is consistent with the fact that no previous study has reported any antimicrobial properties of alginate. In contrast, when SE PT13A was grown in presence of ALG + phages, bacterial growth was drastically inhibited (Figure 5), with this effect persisting for the full 48 h, with no increase in host growth that would be expected from escape mutants. The presence of ALG blocks neither our ability to detect phage activity, nor the activity itself.

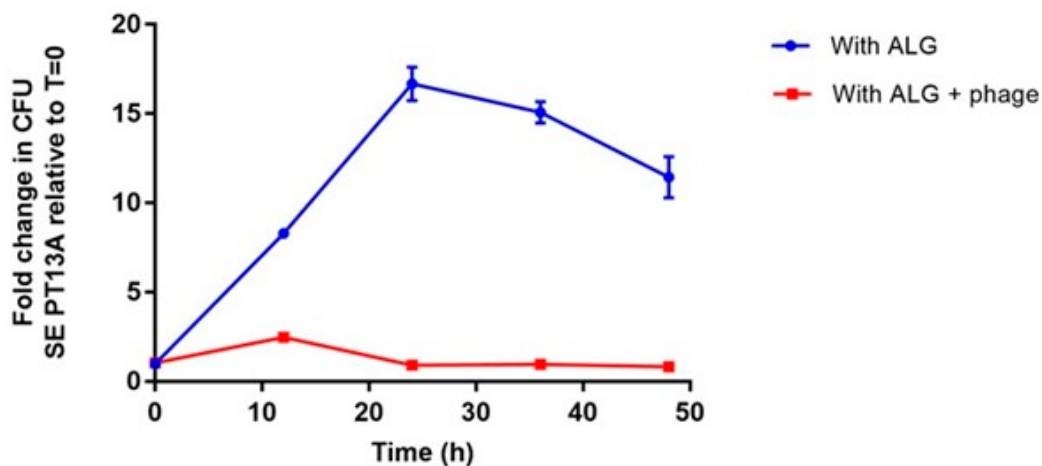


Figure 5. In vitro assay showing the relative influence of ALG and ALG + phage beads on the growth of *Salmonella* Enteritidis PT13A over 48 h.

3.5. In Vitro Protection and Release of Free Phages and Encapsulated Phages in ALG Beads

The alginate bonds are strengthened when they are in the presence of acidic pH values. For this reason, the pH is relevant to preserve ALG beads made by ionic gelation. As more basic pH, the beads depolymerize, resulting in the delivery of phages [62,63]. In contrast, at more acidic pH, polymers favour the formation of higher amounts of hydrogen bonds in the polymeric network, which prevents the delivery of the active ingredient [64]. Knowing this, we aimed to test the phage protection and release on ALG beads mimicking the pH and the gastrointestinal transit time of each GIT section of the chickens. For that, we exposed the phage S1 to pH 3 for 45 min, pH 5 for 15 min, pH 7 for 30 min and pH 8.5 for 20 min, followed by neutralization with NaOH (0.2M) to identify the percentage of phage recovery as described in the methods section. Figure 6 shows that at a pH of 3; the number of phages recovered after neutralization was 38.27%. While the phage encapsulated in ALG after neutralization and breaking the beads, the recovered phage was 85.23%, suggesting that the ALG beads prevent the release of the encapsulated virus in the polymeric matrix, favouring its protection at this pH. At pH of 5; the release conditions did not change regardless of whether the virus was free or encapsulated. In contrast, at pH 7 and 8.5 where the beads were expected to begin to release phages (Figure 6, Right), the encapsulated phages showed a recovery percentage up to 60%, while we obtained 90.08% of recovery with the free phages. Together, this suggests that ~40% of the phages had been released from the beads in this time—indicative of the ALG beads successfully release—albeit with some delay—phage at these pH values (see Table S2). This agrees with Hjorth and Karlsen [62], who indicate that the beads undergo a process of hydration, dissolution and erosion for the release of the active ingredients. The encapsulation of bacteriophages in ALG demonstrated to prevent bacteriophages from being released at acidic pH values where its host is not likely living and enable the phage release at an appropriate pH of the GIT where *Salmonella* lives, from duodenum to the cloacal zone, where the pH ranges from 6 to 8 on average [65]. This is relevant because it shows that the ALG beads are capable of preserving the biological activity of the virus at low pH values, where it is likely where the bacteria wouldn't be colonizing, but is released where the pH is optimal for its host. We conclude that the formulation allows the release of the phage in a controlled manner at pH values where SEPT13A could be colonizing the gastrointestinal tract, thus prolonging their release.

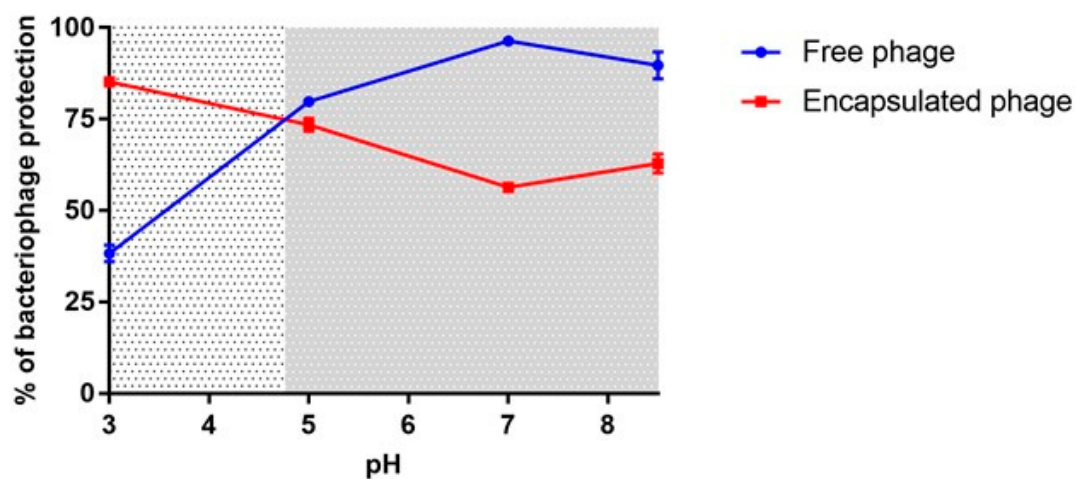


Figure 6. Phage recovery from exposure to pH mimicking in vivo conditions. The dotted shading (left) represents values where the beads would be expected to protect the phages and therefore high recovery indicates a high level of protection, while the grey shading (right) represents pHs where the ALG matrix would be expected to release phages, so a low recovery would indicate a high level of release. Phages were exposed to pH according to the transit time of the anatomical sections of the chicken GIT (proventriculus + gizzard at pH 3 for 45 min, duodenum at pH 5 for 15 min, jejunum + ileum at pH 7 for 30 min and cecum at pH 8.5 for 20 min).

3.6. In Vivo Assays

3.6.1. Degradation of the ALG Beads and Phage S1 Release

The passage of the beads in the GIT of the chicken was visualized macroscopically when dissecting two animals at random at 1, 3, 5, and 17 h after administration. It was only possible to observe the alginate beads in the crop of chickens sacrificed 1 h after administration. These results are in agreement with the literature, indicating that there exists a decrease in particle size of chicken feed caused by the process of crushing and maceration by the gizzard [66,67]. Besides, Amerah et al. [56] determined that the food should have a particle size < 0.1 mm to reach the duodenum. One of the main concerns about triturating the ALG beads is the release and exposure of the phage S1 into the gizzards' pH (2.5–3.5) due to their sensitivity at pH < 3. For this reason, to ensure that phage S1 was infective in the duodenum and cecum after the beads passing through the gizzard, we performed an in house beads test which is summarized in Table 4. We obtained plaques from the chicken crops at 1, 3 and 5 h. Neither of the samples showed lytic plaques in the gizzards but, 50% of the sacrificed chickens at 3 and 5 h showed lytic plaques in the duodenum. Finally, 100% of the chickens at 3 h and 50% at 5 h showed lytic plaques in the cecum samples. These results suggest that even after the beads' trituration by the chicken gizzards', our formulation at 2% w/v of ALG beads protects the phage when it is exposed at acidic pH, keeping it infective in the duodenum and cecum, cavities that are infected by the *Salmonella* genus.

Table 4. Presence and absence of lytic zones of phage S1 in GIT of chickens after ALG beads administration.

Section of the GIT	1 H Post Infection		3 H Post Infection		5 H Post Infection		17 H Post Infection	
	C #1	C #2	C #1	C #2	C #1	C #2	C #1	C #2
Crop	+	+	–	+	–	+	–	–
Gizzard	–	–	–	–	–	–	–	–
Duodenum	–	–	–	+	–	+	–	–
Cecum	–	–	+	+	–	+	–	–

GIT, gastrointestinal tract. Chicken, C. +, Presence of lytic plaques. –, Absence of lytic plaques. *n* = from 38 chickens, 8 were randomized selected.

3.6.2. Elimination of SE PT13A in Chickens

By ensuring the absence of the genus *Salmonella* in the experimental animals and after the conditioning phase through cloacal swabs, the corresponding infection was performed in each group. *Salmonella* colonizes the GIT of birds, mainly the cecum and cloaca. The incubation period of *Salmonella* infection in poultry varies from four to seven days, so the cloacal samplings obtained at three, five, and seven days after infection with SE PT13A showed that at days three and five, in all groups, the presence of lactose-positive, nonproducing hydrogen sulfide colonies, not consistent with the biochemical characteristics of SE in the TSA, were observed [68]. Finally, on day seven, groups 2 to 5 showed growth of circular, black colonies due to the production of hydrogen sulfide, consistent with the characteristics of the genus SE PT13A in TSA. Once the infection was confirmed, the treatment corresponding to each group was administered. The reduction in SE PT13A was determined in the cloacal samples obtained 24 and 48 h after the administration of the corresponding treatment. Figure 7 shows the elimination of SE PT13A in the five groups. Group A was the control group, which consisted of uninfected and untreated chickens. Group B was the group infected with SE PT13A without treatment. Group C were chickens infected with the bacteria and treated with antibiotics. Group D consisted of chickens infected with SE PT13A and treated with 1 g of ALG beads containing the encapsulated phages. And group E consisted of infected chickens treated with ALG beads without phages. Our results indicate that the alginate beads containing phage S1 resulted in the elimination of SE PT13A in the *Gallus gallus domesticus* model. Group C had a visibly decreased bacterial growth compared with group D. The results obtained are consistent with those reported by Andreatti Filho et al. [17] who evaluated the reduction in SE by two unencapsulated bacteriophages separately and in a cocktail, where at 48 h after treatment in cecum samples, the growth of SE was not observed in any group. Colom et al. [38] measured the in vivo reduction in *S. Typhimurium* by a cocktail of phages encapsulated in liposomes and detected a significant reduction in the cecum of 3.8, 3.9, and 1.5 logarithmic units of *S. Typhimurium* on days eight, 10 and 15 posttreatment, respectively. Likewise, Bardina et al. [69] administered a solution of phage cocktail against *S. Typhimurium* twice a day on days four and five after infection, which reduced the bacterium by one logarithmic unit on days five and six after treatment. This reduction in bacterial loads and shedding of phages could also have further benefits, as it could actively lower *Salmonella* loads in the environment, reducing the potential for feedback contamination [70,71].

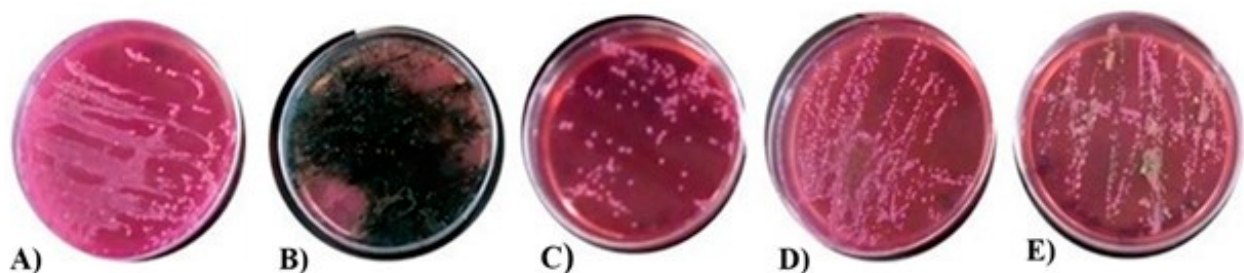


Figure 7. Reduction of growth SE PT13A in the cloacal samples obtained 48 h after the administration of the corresponding treatment. (A) Control group, uninfected and non-treated chickens; group (B) chickens infected with SE PT13A without treatment; group (C) chickens infected with SE PT13A and treatment with antibiotics; group (D) chickens infected with the bacteria and treatment with 1 g of beads containing phage; and group (E) chickens infected with SE PT13A and treatment with beads without phage.

4. Conclusions

Bacteriophage S1 is a virulent phage lacking any genes that would prevent its use in therapy, and is capable of lysing three of five strains of *Salmonella enterica* tested. Ionic gelation was an efficient encapsulation process, conferred protection of the phage from low pHs, and enabled the release of infectious particles capable of preventing *Salmonella* growth

both in vitro and in vivo. Further work quantifying in vivo release and efficacy would be warranted to enable regular therapeutic or prophylactic use of encapsulated phage S1 in this context.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/v13101932/s1>, Table S1: Bacterial strains used in the present study. Table S2: Percentage of infectives bacteriophages post-exposure gastric conditions of poultry.

Author Contributions: O.T.-A. and N.S.-A. initially conceived of the study, with A.P.H. and A.C.-C. contributing to later additions; J.G.-G., N.S.-A. and M.G.B.-P. carried out the experiments under the supervision of O.T.-A., with A.C.-C. carrying out bioinformatics and other analyses under the supervision of A.P.H., E.H.-B. and S.E.M.-E.; facilitated the procurement of laboratory materials and equipment, and supported the interpretation of results; N.S.-A., J.G.-G., A.C.-C. and A.P.H. contributed to the writing process. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by “Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), Mexico”, grant number 745928 (CVU: 825830) and APH acknowledges funding from the New Frontiers in Research Fund Exploration Grant 2019-01441, Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada Discovery Grant 2018-05996, and the Farncombe Family Chair in Phage Biology.

Institutional Review Board Statement: The ethical review and approval of this study was carried out by the “Ad hoc Committee for Admission to the Doctorate in Pharmacy” assigned by the Internal Postgraduate Council of the Faculty of Pharmacy of the Autonomous University of the State of Morelos. The study was conducted according to the guidelines of the American Society of Animal Science in Guide for the Care and Use of Agricultural Animals in Research and Teaching, 3rd edition, along with described guidelines on Manual of Good Livestock Practices in Broiler Production Units, 2nd edition, and the Official Mexican Standards: NOM-051-ZOO-1995, Humanitarian treatment in the mobilization of animals., and NOM-033-SAG/ZOO-2014, Methods for killing domestic and wild animals.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Taken in part from the experimental work of the Ph. D. student Janeth Gomez-Garcia. The genome sequence of the bacteriophage S1 is available at the NCBI repository under the accession number MZ127825.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Xiong, D.; Song, L.; Pan, Z.; Jiao, X. Identification and Discrimination of *Salmonella enterica* Serovar Gallinarum Biovars Pullorum and Gallinarum Based on a One-Step Multiplex PCR Assay. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 1718. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Berhanu, G.; Fulas, A. Pullorum Disease and Fowl Typhoid in Poultry: A Review. *Br. J. Poult. Sci.* **2020**, *9*, 48–56. [[CrossRef](#)]
3. World Health Organization (WHO). *Salmonella* (Non-Typhoidal). 2018. Available online: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-\(non-typhoidal\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-(non-typhoidal)) (accessed on 1 January 2021).
4. Desin, T.S.; Lam, P.K.; Koch, B.; Mickael, C.; Berberov, E.; Wisner, A.L.; Townsend, H.G.; Potter, A.A.; Köster, W. *Salmonella enterica* serovar enteritidis pathogenicity island 1 is not essential for but facilitates rapid systemic spread in chickens. *Infect. Immun.* **2009**, *77*, 2866–2875. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Ardoino, S.M.; Toso, R.E.; Álvarez, H.L.; Mariani, E.L.; Cachau, P.D.; Mancilla, M.V.; Oriani, D.S. Antimicrobianos como promotores de crecimiento (AGP) en alimentos balanceados para aves: Uso, resistencia bacteriana, nuevas alternativas y opciones de reemplazo. *Cienc. Vet.* **2017**, *19*, 50–66. [[CrossRef](#)]
6. Lozano, A.M.C.; Arias, M.D.C. Residuos de fármacos en alimentos de origen animal: Panorama actual en Colombia. *Rev. Colomb. Cienc. Pecu.* **2008**, *21*, 121–135.
7. Gonzáles, A.S.; Icochea, D.E.; Reyna, S.P.; Guzmán, G.J.; Cazorla, M.F.; Lúcar, J.; Carcelén, C.F.; San Martín, V. Effect of the supplementation of organic acids on productive parameters in broilers. *Rev. Investig. Vet. Perú (RIVEP)* **2013**, *24*, 32–37.
8. Górski, A.; Jończyk-Matysiak, E.; Miedzybrodzki, R.; Weber-Dabrowska, B.; Łusiak-Szelachowska, M.; Bagińska, N.; Borysowski, J.; Łobocka, M.B.; Węgrzyn, A.; Węgrzyn, G. Phage therapy: Beyond antibacterial action. *Front. Med.* **2018**, *5*, 146. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Kazi, M.; Annappure, U.S. Bacteriophage biocontrol of foodborne pathogens. *J. Food Sci. Technol.* **2016**, *53*, 1355–1362. [[CrossRef](#)]

10. Berghaus, R.D.; Thayer, S.G.; Law, B.F.; Mild, R.M.; Hofacre, C.L.; Singer, R.S. Enumeration of *Salmonella* and *Campylobacter* spp. in environmental farm samples and processing plant carcass rinses from commercial broiler chicken flocks. *Appl. Environ. Microbiol.* **2013**, *79*, 4106–4114. [[CrossRef](#)]
11. Liu, H.; Whitehouse, C.A.; Li, B. Presence and Persistence of *Salmonella* in Water: The Impact on Microbial Quality of Water and Food Safety. *Front. Public Health* **2018**, *6*, 159. [[CrossRef](#)]
12. Choińska-Pulit, A.; Mituła, P.; Śliwka, P.; Łaba, W.; Skaradzińska, A. Bacteriophage encapsulation: Trends and potential applications. *Trends Food Sci. Technol.* **2015**, *45*, 212–221. [[CrossRef](#)]
13. Wernicki, A.; Nowaczek, A.; Urban-Chmiel, R. Bacteriophage therapy to combat bacterial infections in poultry. *Viol. J.* **2017**, *14*, 179. [[CrossRef](#)]
14. Kim, K.H.; Lee, G.Y.; Jang, J.C.; Kim, J.E.; Kim, Y.Y. Evaluation of Anti-SE Bacteriophage as Feed Additives to Prevent *Salmonella* enteritidis (SE) in Broiler. *Asian Australas. J. Anim. Sci.* **2013**, *26*, 386–393. [[CrossRef](#)]
15. Zbikowska, K.; Michalczyk, M.; Dolka, B. The use of bacteriophages in the poultry industry. *Animals* **2020**, *10*, 872. [[CrossRef](#)]
16. Fiorentin, L.; Vieira, N.D.; Barioni, W., Jr. Oral treatment with bacteriophages reduces the concentration of *Salmonella* Enteritidis PT4 in caecal contents of broilers. *Avian Pathol.* **2005**, *34*, 258–263. [[CrossRef](#)]
17. Andreatti Filho, R.L.; Higgins, J.P.; Higgins, S.E.; Gaona, G.; Wolfenden, A.D.; Tellez, G.; Hargis, B.M. Ability of bacteriophages isolated from different sources to reduce *Salmonella enterica* serovar enteritidis in vitro and in vivo. *Poult. Sci.* **2007**, *86*, 1904–1909. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Loh, B.; Singh-Gondil, V.; Manohar, P.; Mehmood-Khan, F.; Yang, H.; Leptihn, S. Encapsulation and delivery of therapeutic Phages. *Appl. Environ. Microbiol.* **2021**, *87*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Malik, D.J.; Sokolov, I.J.; Vinner, G.K.; Mancuso, F.; Cinquerrui, S.; Vladislavljevic, G.T.; Clokie, M.; Garton, N.J.; Stapley, A.; Kirpichnikova, A. Formulation, stabilisation and encapsulation of bacteriophage for phage therapy. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2017**, *249*, 100–133. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Yongsheng, M.; Pacan, J.C.; Wang, Q.; Xu, Y.; Huang, X.; Korenevsky, A.; Sabour, P.M. Microencapsulation of bacteriophage felix o1 into chitosan-alginate microspheres for oral delivery. *Appl. Environ. Microbiol.* **2008**, *74*, 4799–4805. [[CrossRef](#)]
21. Segundo-Arizmendi, N.; Gómez-García, J.; Flores-Cuevas, K.G.; Duque-Montaña, B.E.; López-Villegas, E.O.; Baltazar-Hernández, E.; Torres-Angeles, O. Caracterización parcial del bacteriófago S1, lítico contra *Salmonella enterica*, con posible uso farmacéutico. *Rev. Mex. Cienc. Farm.* **2017**, *48*, 36–48.
22. Pang, Y.; Applegate, T.J. Effects of dietary copper supplementation and copper source on digesta pH, calcium, zinc, and copper complex size in the gastrointestinal tract of the broiler chicken. *Poult. Sci.* **2007**, *86*, 531–537. [[CrossRef](#)]
23. Morgan, N.K.; Walk, C.L.; Bedford, M.R.; Burton, E.J. The effect of dietary calcium inclusion of broiler gastrointestinal pH: Quantification and method optimization. *Poult. Sci.* **2014**, *93*, 354–363. [[CrossRef](#)]
24. Adams, M.H. Bacteriophages, Enumeration of bacteriophage particles. *Intersci. Publ.* **1959**, *74*, 164. [[CrossRef](#)]
25. Bolger, A.M.; Lohse, M.; Usadel, B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* **2014**, *30*, 2114–2120. [[CrossRef](#)]
26. Jackman, S.D.; Vandervalk, B.P.; Mohamadi, H.; Chu, J.; Yeo, S.; Hammond, S.A.; Jahesh, G.; Khan, H.; Coombe, L.; Warren, R.L.; et al. ABySS 2.0, Resource-efficient assembly of large genomes using a Bloom filter. *Genome Res.* **2017**, *27*, 768–777. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Altschul, S.F.; Madden, T.L.; Schäffer, A.A.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Miller, W.; Lipman, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 3389–3402. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Seemann, T. Prokka: Rapid Prokaryotic Genome Annotation. *Bioinformatics* **2014**, *30*, 2068–2069. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Eddy, S.R. Accelerated Profile HMM Searches. *PLoS Comput. Biol.* **2011**, *7*, e1002195. [[CrossRef](#)]
30. Zimmermann, L.; Stephens, A.; Nam, S.Z.; Rau, D.; Kübler, J.; Lozajic, M.; Gabler, F.; Söding, J.; Lupas, A.N.; Alva, V. A Completely Reimplemented MPI Bioinformatics Toolkit with a New HHpred Server at its Core. *J. Mol. Biol.* **2018**, *430*, 2237–2243. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Nishimura, Y.; Yoshida, T.; Kuronishi, M.; Uehara, H.; Ogata, H.; Goto, S. ViPTree: The viral proteomic tree server. *Bioinformatics* **2017**, *33*, 2379–2380. [[CrossRef](#)]
32. Milne, I.; Bayer, M.; Cardle, L.; Shaw, P.; Stephen, G.; Wright, F.; Marshall, D. Tablet—next generation sequence assembly visualization. *Bioinformatics* **2010**, *26*, 401–402. [[CrossRef](#)]
33. Carver, T.; Harris, S.R.; Berriman, M.; Parkhill, J.; McQuillan, J.A. Artemis: An integrated platform for visualization and analysis of high-throughput sequence-based experimental data. *Bioinformatics* **2012**, *28*, 464–469. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Carver, T.; Thomson, N.; Bleasby, A.; Berriman, M.; Parkhill, J. DNAPlotter: Circular and linear interactive genome visualization. *Bioinformatics* **2009**, *25*, 119–120. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Labrie, S.J.; Mosterd, C.; Loignon, S.; Dupuis, M.E.; Desjardins, P.; Tremblay, D.M.; Romero, D.A.; Horvath, P.; Fremaux, C.; Moineau, S. A mutation in the methionine aminopeptidase gene provides phage resistance in *Streptococcus thermophilus*. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 13816. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Tynecki, P.; Guziński, A.; Kazmierczak, J.; Jadczyk, M.; Dastyk, J.; Onisko, A. PhageAI—Bacteriophage Life Cycle Recognition with Machine Learning and Natural Language Processing. *BioRxiv* **2020**. [[CrossRef](#)]
37. Montso, P.K.; Mlambo, V.; Ateba, C.N. Characterization of Lytic Bacteriophages Infecting Multidrug-Resistant Shiga Toxigenic Atypical *Escherichia coli* O177 Strains Isolated From Cattle Feces. *Front. Public Health* **2019**, *7*, 355. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

38. Colom, J.; Cano-Sarabia, M.; Otero, J.; Cortés, P.; Maspoch, D.; Llagostera, M. Liposome-Encapsulated Bacteriophages for Enhanced Oral Phage Therapy against *Salmonella* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* **2015**, *81*, 4841–4849. [CrossRef]
39. Boggione, D.; Batalha, L.S.; Gontijo, M.; Lopez, M.; Teixeira, A.; Santos, I.; Mendonça, R. Evaluation of microencapsulation of the UFV-AREG1 bacteriophage in alginate-Ca microcapsules using microfluidic devices. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2017**, *158*, 182–189. [CrossRef] [PubMed]
40. Ravindran, V. Feed enzymes: The science, practice, and metabolic realities. *J. Appl. Poult. Res.* **2013**, *22*, 628–636. [CrossRef]
41. Jajere, S.M. A review of *Salmonella enterica* with particular focus on the pathogenicity and virulence factors, host specificity and antimicrobial resistance including multidrug resistance. *Vet. World* **2019**, *12*, 504–521. [CrossRef]
42. NOM-051-ZOO-1995. Trato Humanitario en la Movilización de Animales. Available online: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/563487/NOM-051-ZOO-1995_230398.pdf (accessed on 1 January 2020).
43. American Society of Animal Science. *Guide for the Care and Use of Agricultural Animals in Research and Teaching*, 3rd ed. Available online: <https://www.asas.org/services/ag-guide> (accessed on 1 April 2020).
44. *Manual of Good Livestock Practices in Broiler Production Units*, 2nd ed. Available online: http://oncesega.org.mx/archivos/Manual_de_Buenas_Prcticas_Pecuarrias_de_Producci_n_de_Pollo_de_Engorda_4.pdf (accessed on 1 January 2020).
45. NOM-033-SAG/ZOO-2014. Métodos Para dar Muerte a los Animales Domésticos y Silvestres. Available online: <https://www.gob.mx/senasica/documentos/nom-033-sag-zoo-2014?state=published> (accessed on 1 January 2020).
46. Gambino, M.; Nørgaard-Sørensen, A.; Ahern, S.; Smyrlis, G.; Gencay, Y.E.; Hendrix, H.; Neve, H.; Noben, J.P.; Lavigne, R.; Brøndsted, L. Phage S144, A New Polyvalent Phage Infecting *Salmonella* spp. and *Cronobacter sakazakii*. *Int. J. Mol.* **2020**, *21*, 5196. [CrossRef]
47. Mohamed, A.; Taha, O.; El-Sherif, H.M.; Connerton, P.L.; Hooton, S.P.T.; Basim, N.D.; Connerton, I.F.; El-Shibiny, A. Bacteriophage ZCSE2 is a Potent Antimicrobial Against *Salmonella enterica* Serovars: Ultrastructure, Genomics and Efficacy. *Viruses* **2020**, *12*, 424. [CrossRef] [PubMed]
48. Fong, K.; LaBossiere, B.; Switt, A.I.M.; Delaquis, P.; Goodridge, L.; Levesque, R.C.; Danyuk, M.D.; Wang, S. Characterization of Four Novel Bacteriophages Isolated from British Columbia for Control of Non-typhoidal *Salmonella* in vitro and on Sprouting Alfalfa Seeds. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 2193. [CrossRef] [PubMed]
49. Porwollik, S.; Wong, R.M.; McClelland, M. Evolutionary genomics of *Salmonella*: Gene acquisitions revealed by microarray analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 8956–8961. [CrossRef]
50. Hu, Y.; Wang, Z.; Qiang, B.; Xu, Y.; Chen, X.; Li, Q.; Jiao, X. Loss and Gain in the Evolution of the *Salmonella enterica* Serovar Gallinarum Biovar Pullorum Genome. *MSphere* **2019**, *4*, e00627-18. [CrossRef] [PubMed]
51. Feng, Y.; Johnston, R.N.; Liu, G.R.; Liu, S.L.; Feng, Y. Genomic comparison between *Salmonella* Gallinarum and Pullorum: Differential pseudogene formation under common host restriction. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e59427. [CrossRef]
52. Lupo, B.; González, C.; Maestro, A. Microencapsulación con alginato en alimentos. Técnicas y aplicaciones. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos* **2012**, *3*, 130–151.
53. Aguado, B.A.; Mulyasmita, W.; Su, J.; Lampe, K.J.; Heilshorn, S.C. Improving viability of stem cells during syringe needle flow through the design of hydrogel cell carriers. *Tissue Eng. Part A* **2012**, *18*, 806–815. [CrossRef] [PubMed]
54. González-Menéndez, E.; Fernández, L.; Gutiérrez, D.; Pando, D.; Martínez, B.; Rodríguez, A.; García, P. Strategies to Encapsulate the *Staphylococcus aureus* Bacteriophage phiIPLA-RODI. *Viruses* **2018**, *10*, 495. [CrossRef]
55. Abdelsattar, A.S.; Abdelrahman, F.; Dawoud, A.; Connerton, I.F.; El-Shibiny, A. Encapsulation of *E. coli* phage ZCEC5 in chitosan–alginate beads as a delivery system in phage therapy. *AMB Express* **2019**, *9*, 87. [CrossRef] [PubMed]
56. Amerah, A.M.; Ravindran, V.; Lentle, R.G.; Thomas, D.G. Influence of feed particle size and feed form on the performance, energy utilization, digestive tract development, and digesta parameters of broiler starters. *Poult. Sci.* **2007**, *86*, 2615–2623. [CrossRef]
57. Chewning, C.G.; Stark, C.R.; Brake, J. Effects of particle size and feed form on broiler performance. *J. Appl. Poult. Res.* **2012**, *21*, 830–837. [CrossRef]
58. Zaefarian, F.; Abdollahi, M.R.; Ravindran, V. Particle size and feed form in broiler diets: Impact on gastrointestinal tract development and gut health. *Worlds Poult. Sci. J.* **2016**, *72*, 277–290. [CrossRef]
59. Moghtader, F.; Eğri, S.; Piskin, E. Phages in modified alginate beads. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* **2017**, *45*, 357–363. [CrossRef]
60. Mahony, J.; McAuliffe, O.; Ross, R.P.; van Sinderen, D. Bacteriophages as biocontrol agents of food pathogens. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2011**, *22*, 157–163. [CrossRef] [PubMed]
61. Kutateladze, M. Experience of the Eliava Institute in bacteriophage therapy. *Virol. Sin.* **2015**, *30*, 80–81. [CrossRef] [PubMed]
62. Hjorth, T.; Karlsen, J. Alginate in Drug Delivery Systems. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2002**, *28*, 621–630. [CrossRef]
63. Gheorghita-Puscaselu, R.; Lobiuc, A.; Dimian, M.; Covasa, M. Alginate: From food industry to biomedical applications and management of metabolic disorders. *Polymers* **2020**, *12*, 2417. [CrossRef]
64. Lee, K.Y.; Mooney, D.J. Alginate: Properties and biomedical applications. *Prog. Polym. Sci.* **2012**, *37*, 106–126. [CrossRef] [PubMed]
65. Ruiz-Flores, G.; Casas, F.C.; Quintana-López, J.A.; Cedillo-Peláez, C.; Urquiza-Bravo, O. Patogenia de *Salmonella enteritidis* FT 13a y *Salmonella enteritidis* biovar Issatschenko en pollos de engorda. *Vet. México* **2008**, *39*, 145–160.
66. Svihus, B. The gizzard: Function, influence of diet structure and effects on nutrient availability. *Worlds Poult. Sci. J.* **2011**, *67*, 207–224. [CrossRef]
67. Roa, I.; Meruane, M. Desarrollo del Aparato Digestivo. *Int. J. Morphol.* **2012**, *30*, 1285–1294. [CrossRef]

68. Barrow, G.; Feltham, R. Enterobacteria. In *Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria*; Barrow, G.I., Feltham, R.K.A., Eds.; Cambridge University Press: Cambridge, UK, 1993; p. 141.
69. Bardina, C.; Spricigo, D.A.; Cortés, P.; Llagostera, M. Significance of the bacteriophage treatment schedule in reducing *Salmonella* colonization of poultry. *Appl. Environ. Microbiol.* **2012**, *78*, 6600–6607. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Grygorcewicz, B.; Grudziński, M.; Wasak, A.; Augustyniak, A.; Pietruszka, A.; Nawrotek, P. Bacteriophage-mediated reduction of *Salmonella* Enteritidis in swine slurry. *Appl. Soil. Ecol.* **2017**, *119*, 179–182. [[CrossRef](#)]
71. Cristobal-Cueto, P.; García-Quintanilla, A.; Esteban, J.; García-Quintanilla, M. Phages in Food Industry Biocontrol and Bioremediation. *Antibiotics* **2021**, *10*, 786. [[CrossRef](#)]



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE FARMACIA

Secretaría de Investigación

Jefatura de Posgrado

Cuernavaca, Mor., a 7 de diciembre de 2023

Asunto: asignación de jurado

Folio: FF/CIP/OF/028/2023

M. en F. JANETH GÓMEZ GARCÍA
ALUMNA DEL DOCTORADO EN FARMACIA

PRESENTE

Por este medio le informo que el Consejo Interno de Posgrado (CIP), en su Sesión ordinaria del 6 de diciembre 2023, designó a los siguientes sinodales como integrantes de la Comisión Revisora y Jurado para la revisión y evaluación de la tesis titulada **“Obtención y evaluación de microesferas de alginato conteniendo al Bacteriófago S1”**,

Sinodal		Adscripción
Presidente	Dra. Verónica Rodríguez López ^{NA}	Facultad de Farmacia-UAEM
Secretaria	Dra. Adriana Valladares Méndez	Facultad de Farmacia-UAEM
Vocal 1	Dr. Víctor Manuel Hernández Velázquez	CEIB-UAEM
Vocal 2	Dra. Jazmín Flores Monroy	FES-Cuautitlán, UNAM
Vocal 3	Dra. Alejandra Chávez Carbajal	McMaster University, Ontario, Canadá
Suplente 1	Dra. Susana Elisa Mendoza Elvira	FES-Cuautitlán, UNAM
Suplente 2	Dr. Efrén Hernández Baltazar ^{NA}	Facultad de Farmacia-UAEM

^{NA} = Núcleo Académico de Posgrado en Farmacia

Se le solicita entregar el presente oficio y manuscrito de tesis a esta comisión, así como dar fluidez a los trámites como se indica en el manual de procedimientos.

Nota (Art. 74 RGEF-UAEM): Los sinodales tendrán un plazo máximo de 20 días hábiles contados a partir de la recepción del documento de tesis para entregar los comentarios de la revisión y para emitir un voto aprobatorio o negatorio. En caso de condicionar el voto a la entrega de un documento en el que el tesista deberá solventar lo revisado, este contará con un plazo no mayor a 20 días hábiles, contados a partir de la notificación del primer dictamen emitido, para integrar las correcciones señaladas, una vez fenecido dicho plazo el sinodal emitirá el voto aprobatorio o negatorio que corresponda.

Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente

“Por una humanidad culta”
Una universidad de excelencia

efirma-UAEM

Dr. Sergio Alcalá Alcalá
Jefe de Posgrado en Farmacia

c.c.p Dra. Verónica Rodríguez, Dra. Adriana Valladares, Dr. Víctor Hernández, Dra. Jazmín Flores, Dra. Alejandra Chávez, Dra. Susana Elisa Mendoza, Dr. Efrén Hernández.

c.c.p. Archivo

Av. Universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca Morelos, México. C.P. 62209, Edificio 61, ala C, 2° piso.

Tel. (777) 329 7000, Ext. 7986 Jefatura de Posgrado en Farmacia, posgrado_ff@uaem.mx



Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

SERGIO ALCALA ALCALA | Fecha:2024-04-16 15:28:50 | FIRMANTE

U+Ti2guuIDMTJbdzRCLwyXkxZUh6wVicIgvCr82xPabpfGC5R+P61JRUX+6bdKXhMBeWEkFLTX41QEDHXMAD+Cn+AjiMSg6CrUcfhGVot7Hd4cwIIX28+F05IsJXonZvZjO/i02Tr9YOvfFu8GwKIMLSNz8C3ythHtNgPnduaHdbRiJu0PCpUPrdb6iK187DFZcvsjWu5iplyQazeyNgiXQBZ5W/OHX1MFIW50z+HjjQ6GHZtcaBk5agxcnAZXmeyvzvOR76Mnp7vGk30xq6CkSYQglOaXufOSyzJ+ExTKgzOEJKj76iumL2dG1tM8Y94rSlouOZcB+uSn15fac1w==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[h6a3RfWgF](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/5dUL1FPC66jleLhAZswq19Ej5vHhNPr>



UAEM
RECTORÍA
2023-2029

**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Janeth Gómez García

Título de la tesis:

“Obtención y evaluación de microesferas de alginato conteniendo al Bacteriófago S1”

Grado a obtener:

 Maestría
 X Doctorado

Miembro del Jurado: Dra. Verónica Rodríguez López

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

 X Sí se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____

Firma
Dra. Verónica Rodríguez López
Miembro del Jurado

13 de mayo de 2024
Fecha



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

VERONICA RODRIGUEZ LOPEZ | Fecha:2024-05-12 11:04:43 | FIRMANTE

TrnYmffJGUmAgP4UwUzRKW44lbb14cPCj3jDtrM3x0K8nRh6uG4Z6tPFrbGC3GYpSgNvKYGge7JDjdp4iHm7KJFJt1A5EWy7bz1ee31Utwj74sM9VIZ7sJjOZxMoWhiPy9bmSCQggEAMLJ5+Ccs4RQREROOoy5f+DKtdWdwuzZv8y7vKbpQWfVxU4Dr9yUbbM3sVQBLme5HjEqS5vZ7//vvKkC+Jbi56sJoGOECWifdKHFxjvccISS5HscPFmrZByv4HZkrKOlua23KeFnVCIHbNLDcylxZhQWofhvDrsIX4G8n8hfq5cojOdhUzlcMGItUpJbbGC22X7M8W84Cw==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[bxMCwlaBL](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/UtkKH4awvJlaUNMxo1NBCu9KNIo4DRMg>



UAEM
RECTORÍA
2023-2029

**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Janeth Gómez García

Título de la tesis:

“Obtención y evaluación de microesferas de alginato conteniendo al Bacteriófago S1”

Grado a obtener:

 Maestría
 X Doctorado

Miembro del Jurado: Dra. Adriana Valladares Méndez

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

 X Sí se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____

Firma
Dra. Adriana Valladares Méndez
Miembro del Jurado

06 de mayo de 2024
Fecha



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

ADRIANA VALLADARES MENDEZ | Fecha:2024-05-07 12:08:46 | FIRMANTE

vu6PmAa2o8PI895c0p5OjWunhPyxtUTteGQTmOCi7AI+dtgY0rPSHVwllXacYKlq3y9yYY/OZEBdMHUu2zgL/MAs0aJT3ni3LYGa47/1JZ+5nPv1S/DGRInk8EuDyhPNvPkK
GKoQGOSN89+/W45UXfHzpC/E3xTsyVrMcCDkyl6u1mlxL/g1gaGfYQX0V34hsdP/d3kqnBA4NycwAcWBJ6INx/dICMEAMWY+bfPDAwjj0FavNhykB/GCrGOSsmC0YNtxl/O
Ql2tQ3Q2qCBTMJwho8a97PwxY74aGOYzVR1y8DUXaKj7rabYbjvhZa2qRr9KwwbQ6t1yTTpg563AoA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[Nt4u2dofJ](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/ZDTbbfSPZhnfCYdBvhETe8IcFV5BvN1X>



UAEM
RECTORÍA
2023-2029

**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Janeth Gómez García

Título de la tesis:

“Obtención y evaluación de microesferas de alginato conteniendo al Bacteriófago S1”

Grado a obtener:

 Maestría
 X Doctorado

Miembro del Jurado: Dr. Víctor Manuel Hernández Velázquez

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

 X Sí se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____

Firma
Dr. Víctor Manuel Hernández Velázquez
Miembro del Jurado

13 de mayo de 2024
Fecha



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

VICTOR MANUEL HERNANDEZ VELAZQUEZ | Fecha:2024-05-08 15:38:35 | FIRMANTE

ta+YjyULyypicDXNpHppP2WHMoV/kgnE3hE+VVACOyPmGd91jOUcn5Yz1EgRFnsnRPDJRYS6csH1zdwGQuh4kVW437ge5C5tvXhR5aFLA2dhXw301VGmGZWb5N/wZuFEmoa//KFpS3j+a+IK8ubarYSoTOi6p3JaCIPF+qL0dJluJ8GPYnvPgN0u6/YwTNotc84yFLkxSkh4hErlJgGFYeZqxsuk6iANWq/mQb+Y8Pqw7VWWKsYwweCM44eVTO5oS u0c//pmxeOPdkNGGpKNUww/VlxUlwG1dhleAZ1FSfhfSy2V021jJS+W7bTiDtmjWDhsG1k3rBQxRI1np28RIQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[YtrhIbZHW](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/x9rFCC9n7vYlj1wVneiUAdw3t9y5atfO>



UAEM
RECTORÍA
2023-2029

**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Janeth Gómez García

Título de la tesis:

“Obtención y evaluación de microesferas de alginato conteniendo al Bacteriófago S1”

Grado a obtener:

 Maestría
 X Doctorado

Miembro del Jurado: Dra. Jazmín Flores Monroy

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

 X Sí se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____

Firma
Dra. Jazmín Flores Monroy
Miembro del Jurado

06 de mayo de 2024
Fecha



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

JAZMÍN FLORES MONROY | Fecha:2024-05-07 10:10:26 | FIRMANTE

IFxJWwaX+MidXZhrG69/rUIY5nPYsNRdWchai/Q/VqXptkXff80/9gBgbPP2B/jL1Amk3a8gKO731OpicNYY+PM56Do8MEzSRr62bqbbp+YjgmnXnPH04XsD92wOJ5feWyTQRHhkmFOijmEv8pPHiejBhfzcbJi0eqX+XKwCKLS+FDB4w5LbHwMRiyK6PMiBG2jZD/k6Q18JX7IIN7Di0/wZlympuP86zD180dziedsgUw+vi5NJozHpDmKYpHKm81Tavn3b8NmSOEe2FZw1b5L9w1pC9KyGBnni0Xjj8KmLFy+RESqE/IMbzqkjYrLd80wv8UOtqSmsLP7Ck76dw==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[eQvx6waB7](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/WiGFvTndxajWVd4DjKejVNk1JNm3f6HR>



UAEM
RECTORÍA
2023-2029

**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Janeth Gómez García

Título de la tesis:

“Obtención y evaluación de microesferas de alginato conteniendo al Bacteriófago S1”

Grado a obtener:

 Maestría

 X Doctorado

Miembro del Jurado: Dra. Alejandra Chávez Carbajal

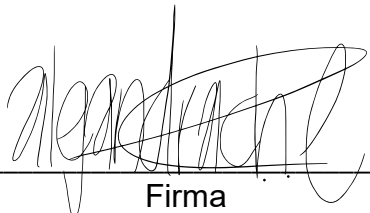
La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

 X Sí se aprueba tal como se presenta

 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____



Firma

Dra. Alejandra Chávez Carbajal
Miembro del Jurado

13 de mayo de 2024

Fecha



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

ALEJANDRA CHAVEZ CARBAJAL | Fecha:2024-05-14 15:34:05 | FIRMANTE

NyclDc6dY14SizxORWGv4XYPJbLFKK+piYlKfHpk0xCUR7tVOI7e6PeCfP4Y74gDIArDNuRfk09oT0/yVVAQjtQvR4vKzdpLkEPV3YKIdPyz4g3HlhW9MHNxC6pxbR3OZEIjQ50FwkgIAbLK3UbjrcD8DjvaHJRss8LQEuiyfl+g0P4pk++YmbUEdb6zOvpspNeT4d5SLu1rZJosJ64NDcEVerwjiYtzABWwWw+CQ4X+epwr2epH5gyR6W6bnIX8MXyOD+7r+UdAxH9u62NHvLr5YpZwIzV4mD74XmNwFXdZkTepScE+0Rfvc93cdDwo/+HNwF0jn6cJMnVR4GqCiw==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[CGUzVWufr](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/5tDTWjfo7xbuGtxVO6axs4wogRrd7baV>



UAEM
RECTORÍA
2023-2029

**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Janeth Gómez García

Título de la tesis:

“Obtención y evaluación de microesferas de alginato conteniendo al Bacteriófago S1”

Grado a obtener:

 Maestría
 X Doctorado

Miembro del Jurado: Dra. Susana Elisa Mendoza Elvira

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

 X Sí se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____

Firma
Dra. Susana Elisa Mendoza Elvira
Miembro del Jurado

13 de mayo de 2024
Fecha



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

SUSANA ELISA MENDOZA ELVIRA | Fecha:2024-05-07 10:00:17 | FIRMANTE

WSYtn9ff0Vqd5+Ev3MOefBFmbBO6H8jBW9X5/8VSttST2U5lZd1FfeamnJ+B5nTywRjAnMpiO/IHZTWwa8Jk3MQLIAzGtmi3s8jDfZRXXMhCn9cUzNJYsZAjsjiVqYNMAdaGRtGyZq4b8Y45HGmov/byijKdoDqVfyg436Ds0xj445GBA6mvWOTvqA7amb1ff27i43+TTM5YPe+OGDLSlr/SPW/cNwiR2NYtaq9NC7i+OcSVv/t5tNfK8LV5BjiAlf97ny5H93dp5FDGUYZ3jgePE6TE2BcxmWQJS3UFsvOLY7k+rCIFaCsnSTKdV24sRurYHyADa1t2B9R5Jk7sQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[5bXcYEI8I](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/7fwVdVIP65A5kmYFdY5gTswASbBU6uY2>



UAEM
RECTORÍA
2023-2029

**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Janeth Gómez García

Título de la tesis:

“Obtención y evaluación de microesferas de alginato conteniendo al Bacteriófago S1”

Grado a obtener:

 Maestría
 X Doctorado

Miembro del Jurado: Dr. Efrén Hernández Baltazar

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

 X Sí se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____

Firma
Dr. Efrén Hernández Baltazar
Miembro del Jurado

06 de mayo de 2024
Fecha



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

EFREN HERNANDEZ BALTAZAR | Fecha:2024-05-06 16:00:12 | FIRMANTE

sapVHp7howFe1IMAp2WzBN2MRvZTasqX2EbbwFJF8nsWa6lAdiBwnW1YVdcSoWgNR2O4EN8C1ISGVuLLHmIV1Vm93izUj/aWZFUZLuxG2f1eg+Nw80O8pZkvoY3sRzoB/aUon274O0euz7SGaOdfLQ0hxAMLu1i1kHG1IalMgT8D52MjSvk9o8KjrAiU+tUblYHw0olz4R69irpZZpsyZTPjV3QQQuJBHyKDGDB93WxRZbOKnInCrs4WZc7dANqw/szXXTtBwqRCI6clO5R+pcvpLtyOyCotOeeRIOF7jUSuVNfDXGrI4QFhpmVtrvzfbhyBVZ4vOYEI5psQGKmiHVw==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[o18QrZjX4](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/LMBvO2VzmnNpcfyQ6ZKI5dBTO076X54J>



UAEM
RECTORÍA
2023-2029