



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DEL ESTADO DE MORELOS**



FACULTAD DE FARMACIA

**“Evaluación de esferas de alginato
conteniendo al Bacteriófago S₁ como
alternativa para el tratamiento de
salmonelosis en pollos (*Gallus gallus
domesticus*)”**

T E S I S

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

P R E S E N T A

L. F. JANETH GÓMEZ GARCÍA

DIRECTOR DE TESIS: Dr. OSCAR TORRES ANGELES

CUERNAVACA, MORELOS, JUNIO 2018.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE FARMACIA

Consejo Interno de Posgrado

MAESTRÍA EN FARMACIA

Cuernavaca, Morelos a 02 de abril de 2019

Folio: FF/D/SAC/ CIP /MF/018/2019

L.F. JANETH GÓMEZ GARCÍA
ESTUDIANTE DEL PROGRAMA DE MAESTRÍA EN FARMACIA
P R E S E N T E

Por este medio le informo que, con base en la propuesta hecha en su solicitud, el Consejo Interno de Posgrado le asigno el siguiente jurado para evaluar la tesis "Evaluación de esferas de alginato conteniendo al Bacteriófago S₁ como alternativa para el tratamiento de salmonelosis en pollos (*Gallus gallus domesticus*)"

Quedando integrado su comité de la siguiente manera:

PRESIDENTE: Dr. Jesús Rivera Islas

SECRETARIO: Dra. Nallelyt Segundo Arizmendi

V.1. Dra. Luisa Martínez Aguilar

V.2. Dra. Blanca Estela Duque Montaña

V.3. Dra. Susana Elisa Mendoza Elvira

Se le solicita entregar las tesis al jurado designado y dar fluidez a los trámites como se indica en el manual de procedimientos.

Esperando que esta resolución sea en beneficio de su desempeño académico, y sin otro particular por el momento reciba un cordial saludo.

Atentamente
Por una humanidad culta
Una universidad de excelencia

Dr. Julio César Rivera Leyva.

Jefatura de Posgrado



ccp: archivo: Dr. Jesús Rivera Islas, Dra. Nallelyt Segundo Arizmendi, Dra. Luisa Martínez Aguilar, Dra. Blanca Estela Duque Montaña, Dra. Susana Elisa Mendoza Elvira

mitv



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 trabajo 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. 825830

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por todas las bendiciones que me ha otorgado, por no olvidarse de mí y guiarme a personas que me alientan a ser mejor, por darme la dicha de llegar hasta este momento.

A mis padres Eusebia García y Elías Gómez, quienes pese a las dificultades que hemos tenido como familia jamás me han negado su apoyo incondicional. Sé que en muchas ocasiones no soy la hija que quisieran, pero agradezco que a pesar de nuestras diferencias ustedes confíen en mí y lo que hago. Gracias por sus consejos, sus regaños, sus desvelos, su fortaleza para seguir adelante; reconozco y agradezco todo lo que hacen por mí, sin ustedes esto no sería posible. Los amo demasiado y espero que se encuentren orgullosos de mí justo como yo lo estoy de ustedes.

Al Dr. Oscar Torres Angeles, por todo el apoyo que me brindo desde mi ingreso al Laboratorio 9, por enseñarme que la dedicación y el esfuerzo rinden fruto y por confiar en mí. Jefe, no tengo palabras para agradecerle todo lo que ha hecho por mí.

A la Dra. Nallelyt Segundo Arizmendi, por ser una gran amiga y consejera en este proceso, por todo el tiempo y disponibilidad para la revisión del presente proyecto. Gracias por tus consejos, tu sabiduría compartida y por la confianza de incluirme en tu familia. ¡Te quiero mucho!

Al Dr. Efrén Hernández Baltazar, por la disponibilidad para formar parte del comité tutorial, por sus observaciones y sugerencias realizadas para enriquecer este trabajo.

Al M en C. Enrique Amador González, por su amabilidad, disponibilidad, por el espacio designado cada semestre en Facultad de Química (UNAM) para la presentación de los exámenes tutorales. y las observaciones realizadas para enriquecer este trabajo

A la Dra. Blanca Duque porque gracias a ella he formado parte del grupo de trabajo del laboratorio 9 desde el año 2013.

A los Doctores Jesús Rivera Islas, Susana Elisa Mendoza Elvira y Luisa Martínez Aguilar por su apoyo en la revisión y enriquecimiento del presente proyecto.

A mi tío Israel Gómez quien me ha apoyado durante toda mi vida escolar y quien me ha tratado como una hija. No tengo palabras para agradecerle, pero usted es un pilar muy importante en vida. ¡Gracias por todo! A mi tío David Gómez, por brindarme un lugar para

vivir durante mis estudios de licenciatura y maestría, por estar al pendiente de mí y cuidarme.

A mis hermanas Rosario y Ximena, gracias por escucharme, apoyarme, aconsejarme y por ser tan divertidas. Hemos crecido y aprendido que al final siempre estaremos juntas. Las quiero demasiado. Ximena: gracias por darme lo más valioso de mi vida, mis sobrinos Santiago, Mateo y Alfonso quienes iluminan mi vida con solo mirarme.

A Max Alberto Damián Escobar y su familia, por el apoyo y el cariño. Max, gracias por apoyarme durante este proyecto e impulsarme a seguir adelante cada día, por tu paciencia, tu cariño y tu inigualable manera de ser, por estar cerca de mí a pesar de la distancia.

A mi amiga Miri Barón con quien he pasado gratos momentos, gracias por alegrar mis días con tus conversaciones, por tu apoyo incondicional, por ser mi amiga, mi cómplice, mi confidente, pero ante todo una damita y mi Hermana. Te quiero mucho

A Ulises Mendoza Salgado, por todo el apoyo brindado durante los ensayos *in vivo*, por la fuerza de voluntad, la disponibilidad y el corazón de hierro para el sacrificio de los pollitos. Mil gracias.

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS.....	3
ÍNDICE GENERAL.....	5
ÍNDICE DE FIGURAS.....	8
ÍNDICE DE TABLAS.....	10
ÍNDICE DE ECUACIONES.....	11
ABREVIATURAS.....	12
1. RESUMEN.....	13
2. ABSTRACT.....	14
3. INTRODUCCIÓN.....	15
3.1 Enfermedades Transmitidas por Alimentos.....	15
3.2 <i>Salmonella enterica</i>	15
3.3 Salmonelosis.....	16
3.3.1 Prevalencia de salmonelosis en México.....	18
3.4 <i>Salmonella</i> en aves de corral.....	20
3.4.1 Transmisión transóvarica de <i>Salmonella</i>	21
3.4.2 Tratamiento de salmonelosis en aves de corral.....	22
3.4.3 Restricción del uso de antibióticos en el sector avícola.....	23
3.5 Bacteriófagos.....	24
3.6 Fagoterapia.....	27
3.6.1 Formulaciones a base de Bacteriófagos.....	27
3.7 Polimeros utilizados en la industria farmacéutica.....	29
3.8 Alginato.....	31
3.8.1 Gelificación iónica.....	32
3.8.2 Liberación a partir de sistemas de alginato.....	34
3.9 Generalidades del Bacteriófago S ₁	35
4. ANTECEDENTES.....	36
5. JUSTIFICACIÓN.....	40
6. HIPÓTESIS.....	41
7. OBJETIVOS.....	42
7.1 General.....	42

7.2	Particulares.....	42
8.	ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	43
9.	MATERIALES.....	44
9.1	Biológicos.....	44
9.2	No biológicos.....	44
9.3	Soluciones.....	44
10.	MÉTODOS.....	45
10.1	Propagación del Bacteriófago S ₁	45
10.2	Determinación del título fágico.....	46
10.3	Determinación de la viscosidad de las soluciones de alginato.....	47
10.4	Proceso de obtención de esferas conteniendo al Bacteriófago S ₁	47
10.5	Determinación de la eficacia de encapsulación.....	48
10.6	Determinación de la pérdida del Bacteriófago.....	48
10.7	Determinación de la liberación del Bacteriófago S ₁ a pH 6.9 mediante ensayos <i>in vitro</i>	49
10.8	Evaluación de la liberación del Bacteriófago S ₁ en modelo <i>in vivo</i> (<i>Gallus gallus domesticus</i>).....	50
10.9	Eliminación de <i>Salmonella enterica</i> serovar enteritidis en modelo <i>in vivo</i> (<i>Gallus gallus domesticus</i>).....	50
10.9.1	Recepción y acondicionamiento de los animales.....	50
10.9.2	Infección de <i>Gallus gallus domesticus</i> con <i>Salmonella enteritidis</i>	51
10.9.3	Administración del tratamiento para la eliminación de la infección por <i>Salmonella enteritidis</i>	51
10.9.4	Influencia del alginato en la eliminación de <i>Salmonella enteritidis</i> (ensayo <i>in vitro</i>).....	52
11.	RESULTADOS.....	53
11.1	Determinación de la viscosidad de las soluciones de alginato.....	53
11.2	Determinación de la eficacia de encapsulación del Bacteriófago S ₁	53
11.3	Determinación de la pérdida del Bacteriófago S ₁	54
11.4	Evaluación de la liberación del Bacteriófago S ₁ a pH 6.9 en modelo <i>in vitro</i>	56
11.5	Evaluación de la liberación del Bacteriófago S ₁ en modelo <i>in vivo</i> (<i>Gallus gallus domesticus</i>).....	57
11.6	Eliminación de <i>Salmonella enteritidis</i> en modelo <i>in vivo</i> (<i>Gallus gallus domesticus</i>).....	59

11.6.1	Determinación de las bacterias presentes en TGI de pollos a su llegada al animalario	59
11.6.2	Determinación de la infección por <i>Salmonella enteritidis</i> en modelo <i>in vivo</i>	60
11.6.3	Reducción de <i>Salmonella enteritidis</i> en pollos infectados	62
11.7	Influencia del alginato en la eliminación de <i>Salmonella enteritidis</i> (ensayo <i>in vitro</i>)	64
12.	DISCUSIÓN	66
13.	CONCLUSIONES	72
14.	PERSPECTIVAS.....	73
15.	REFERENCIAS.....	74

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fuentes de infección <i>Salmonella</i> en humanos y animales.	17
Figura 2. Casos de salmonelosis en México	19
Figura 3. Esquema del tracto gastrointestinal de las aves de corral	20
Figura 4. Esquema de transmisión vertical de <i>Salmonella spp.</i> en huevos	21
Figura 5. Esquema de transmisión horizontal de <i>Salmonella spp.</i> en huevos	22
Figura 6. Estructuras de un Bacteriófago	24
Figura 7. Representación esquemática de los ciclos de replicación de los Bacteriófagos	26
Figura 8. Uso de una película polimérica conteniendo Bacteriófagos para eliminación de una infección bacteriana	29
Figura 9. Modelo de caja de huevo propuesto por Grant	33
Figura 10. Representación gráfica del proceso de liberación a partir de sistemas de alginato	34
Figura 11. Micrografía electrónica de transmisión del Bacteriófago S ₁	35
Figura 12. Diagrama general de trabajo	43
Figura 13. Método de propagación del Bacteriófago S ₁	45
Figura 14. Método de sembrado en doble placa	46
Figura 15. Presencia de zonas líticas correspondientes a la solución de CaCl ₂ posterior a la encapsulación del Bacteriófago S ₁	54
Figura 16. Determinación de la presencia del Bacteriófago S ₁ en esferas de alginato 1 posterior a la agitación continua con un gramo de perlas de vidrio a pH 6.9	56
Figura 17. Determinación de la presencia del Bacteriófago S ₁ en esferas de alginato 1 posterior a la agitación continua con diez gramos de perlas de vidrio a pH 6.9.....	57
Figura 18. Fotografía del buche de un pollo sacrificado 1 h posterior a la administración donde se observa la presencia de esferas de alginato 1	58
Figura 19. Presencia de zonas líticas (encerradas) obtenidas de muestras de buche y ciegos de pollo posterior a la administración de esferas de alginato 1 conteniendo Bacteriófago S ₁	59
Figura 20. Crecimiento bacteriano de hisopados cloacales en Agar S-S	60
Figura 21. Crecimiento bacteriano correspondiente a hisopados cloacales obtenidos 3 días post-infección con <i>Salmonella enteritidis</i>	61

Figura 22. Crecimiento bacteriano correspondiente a hisopados cloacales obtenidos 5 días post-infección con <i>Salmonella enteritidis</i>	61
Figura 23. Crecimiento bacteriano correspondiente a hisopados cloacales obtenidos 7 días post-infección con <i>Salmonella enteritidis</i>	62
Figura 24. Crecimiento bacteriano correspondiente a hisopados cloacales obtenidos 24 h post tratamiento.	63
Figura 25. Crecimiento bacteriano correspondiente a hisopados cloacales obtenidos 48 post tratamiento.....	63
Figura 26. Determinación de zonas líticas en heces de pollos posterior a la administración de tratamiento con esferas de alginato 1 conteniendo Bacteriófago S ₁	64
Figura 27. Crecimiento de <i>Salmonella enteritidis</i> tras 24 h de exposición a esferas de alginato con y sin Bacteriófago	65
Figura 28. Crecimiento de <i>Salmonella enteritidis</i> tras 48 h de exposición a esferas de alginato con y sin Bacteriófago.	65

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación del género bacteriano <i>Salmonella</i>	16
Tabla 2. Clasificación de los Bacteriófagos y sus principales características.	25
Tabla 3. Polímeros y sus aplicaciones farmacéuticas	30
Tabla 4. Productos a base de Bacteriófagos contra <i>Salmonella spp.</i>	37
Tabla 5. Registro de grupos para su infección	51
Tabla 6. Viscosidad de las soluciones de alginato	53
Tabla 7. Eficacia de encapsulación del Bacteriófago S ₁ en esferas de alginato	54
Tabla 8. Título fágico presente en material y soluciones utilizadas durante la encapsulación del Bacteriófago S ₁	55
Tabla 9. Porcentaje de pérdida del Bacteriófago S ₁ con dos diferentes alginatos.....	55
Tabla 10. Presencia de zonas líticas del Bacteriófago S ₁ en TGI de pollos posterior a la administración de esferas de alginato 1	58

ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1. Fórmula para determinar el título bacteriano	47
Ecuación 2. Fórmula para determinar la eficacia de encapsulación	48
Ecuación 3. Fórmula para determinar la pérdida de encapsulación	49

ABREVIATURAS

°C	Grados centígrados
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Agar S-S	Agar <i>Salmonella</i> - <i>Shigella</i>
ARN	Ácido ribonucleico
CaCl ₂	Cloruro de calcio
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EMB	Agar eosina y azul de metileno
ETA	Enfermedades transmitidas por alimentos
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
FDA	Administración de Alimentos y Medicamento
g	gramos
h	horas
min	minutos
ml	mililitro
MOI	Multiplicidad de infección
OIE	Organización Mundial de Sanidad Animal
OMS	Organización Mundial de la Salud
p/v	peso/volumen
pH	potencial de hidrógeno
rpm	revoluciones por minuto
SAGARPA	Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación
SENASICA	Servicio Nacional de Sanidad e Inocuidad Agroalimentaria
SINAVE	Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica
TGI	Tracto gastrointestinal
TSA	Agar Soya Trypticaseína
TSB	Caldo Soya Trypticasa
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
UFP	Unidades Formadoras de Placa
UV	ultravioleta
μl	microlitros

1. RESUMEN

Las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA) son una de principales causas de morbi-mortalidad a nivel mundial, los serotipos no típicos de *Salmonella enterica* son los principales agentes causales. Uno de los serotipos asociados mayormente a ETA es el serotipo *Salmonella enteritidis* presente en productos de origen avícola y al cual se le atribuye el 24.1% de los brotes de salmonelosis en humanos.

En el año 2017, la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó un listado en el que clasifica la urgencia de investigar y desarrollar nuevos antimicrobianos para el tratamiento de microorganismos patógenos, catalogándolos en tres niveles de prioridad tomando en cuenta las infecciones provocadas y la resistencia a antibióticos reportados. Cabe destacar, que en dicho listado *Salmonella spp* se encuentra clasificada como prioridad elevada.

La Fagoterapia ha demostrado ser una opción efectiva y costeable como tratamiento y control de afecciones producidas por bacterias patógenas. Actualmente, se investigan y desarrollan formas farmacéuticas sólidas para la administración de Bacteriófagos por vía oral, a partir de sistemas de liberación con biopolímeros como el alginato mejorando así la estabilidad a condiciones gástricas.

El presente trabajo se enfocó en obtener un sistema de entrega vía oral capaz de brindar protección al Bacteriófago S₁ tras su paso por el tracto gastrointestinal de pollos (*Gallus gallus domesticus*) de un mes de edad. Por ello, el Bacteriófago S₁ se encapsuló con dos alginatos comerciales a una concentración del 2% p/v utilizando solución de CaCl₂ al 2% p/v como agente gelificante, para cada uno de los alginatos se determinó la eficacia de encapsulación y el rendimiento fágico, posteriormente, se seleccionó el alginato 1 por mostrar mayor eficacia de encapsulación. Se procedió a realizar los ensayo *in vitro* correspondientes a la liberación del Bacteriófago S₁ a pH intestinal (6.9) por la técnica de agitación continua, se determinó que la esfera de alginato permite la liberación del Bacteriófago S₁ a partir de las tres horas de agitación, por otro lado, en los ensayos *in vivo* se corroboró a partir de la presencia de zonas líticas que las esferas de alginato permiten la entrega del Bacteriófago S₁ en duodeno y ciegos (compartimentos que coloniza *Salmonella. enteritidis*), además la infección por *Salmonella enteritidis* se vio reducida a partir de las 48 h de administrado el tratamiento.

2. ABSTRACT

The Foodborne Diseases (ETA) are one of the main causes of morbidity and mortality worldwide, the non typhoidal *Salmonella* serotypes are the main causative agents. One of the serotypes associated mostly with ETA is the serotype *Salmonella enteritidis* present in products of poultry origin and to which 24.1% of outbreaks of salmonellosis in humans are attributed.

In 2017, the World Health Organization (OMS) published a list in which it classifies the urgency of investigating and developing new antimicrobials for the treatment of pathogenic microorganisms, cataloging them into three priority levels taking into account the infections caused and the resistance to antibiotics reported. It should be noted that *Salmonella spp* is classified as a high priority in this list.

Phage therapy has proven to be an effective and affordable option as treatment and control of conditions produced by pathogenic bacteria. Currently, solid pharmaceutical forms for the administration of Bacteriophages by the oral route are investigated and developed, using release systems with biopolymers such as alginate thus improving stability to gastric conditions.

The aim of this study was to obtain an oral delivery system efficient of providing protection to Bacteriophage S₁ after passing through the gastrointestinal tract of one-month-old chickens (*Gallus gallus domesticus*). The Bacteriophage S₁ was encapsulated with two commercial alginates at a concentration of 2% w / v using 2% CaCl₂ solution w / v as a gelling agent, for each of the alginates the encapsulation efficiency and the phage yield were determined, subsequently, alginate 1 was selected for showing greater encapsulation efficiency. The *in vitro* tests corresponding to the release of Bacteriophage S₁ at intestinal pH (6.9) were carried out by the continuous agitation technique, it was determined that the alginate sphere allows the release of Bacteriophage S₁ after three hours of agitation. The *in vivo* tests, it was corroborated from the presence of lytic zones that the alginate spheres allow the delivery of Bacteriophage S₁ in the duodenum and caecum (compartments colonized by *Salmonella enteritidis*), besides the infection by *Salmonella enteritidis* It was reduced as of 48 h after the treatment was administered.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 Enfermedades Transmitidas por Alimentos

Las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA) engloban una amplia variedad de afecciones ocasionadas por la ingesta de agua o alimentos contaminados con virus, parásitos, bacterias o sustancias químicas, y representan una de las principales causas de morbi-mortalidad en el mundo (Organización Mundial de la Salud, 2015).

Cada año cerca de 600 millones de personas enferman en todo el mundo tras consumir alimentos contaminados, de las cuáles mueren al menos 420,000, siendo los niños menores de 5 años quienes contribuyen con un tercio de las muertes (Organización Mundial de la Salud, 2015). En México, el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica reportó hasta la semana 12 del año en curso (2019) un total de 1'116,342 casos de infecciones intestinales transmitidas por alimentos notando un aumento del 4.8% en los casos con respecto en el año 2018, donde para la misma semana se reportaron un total de 1'064,625 casos.

Los principales patógenos asociados a ETA en orden de importancia son *Norovirus*, *Campylobacter spp*, *Escherichia coli* y *Salmonella enterica no tifoidea*, siendo esta última asociada a la mayoría de las muertes en pacientes (Alerte, y cols, 2012; Rodríguez Torrens y cols, 2015; Organización Mundial de la Salud, 2017; Organización Mundial de la Salud, 2015; Organización Mundial de la Salud y Red Internacional de Autoridades en Materia de Inocuidad de los Alimentos, 2018).

3.2 *Salmonella enterica*

El género bacteriano *Salmonella* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* la cual engloba a bacilos Gram negativos, anaerobios facultativos, no esporulados, móviles por disposición de flagelos peritricos, que miden de 1.0 a 3.0 μm de longitud y de 0.5 a 0.7 μm de diámetro y son generalmente capaces de crecer a temperaturas entre 7 °C y 45 °C y en valores de pH de 4.5 a 9.0. En cuanto a sus características bioquímicas se describen como: indol negativas, incapaces de hidrolizar urea, productoras de ácido sulfhídrico, descarboxiladoras

de lisina y ornitina, no fermentadoras de lactosa, pero sí de glucosa con producción de gas (Agbaje y cols, 2011; Brenner y cols, 2000).

Las bacterias del género *Salmonella* se dividen en dos especies *bongori* y *enteritica*, subdivididas a su vez en subespecies y serotipos o serovariedades (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación del género bacteriano <i>Salmonella</i>			
Especie	Subespecie		Serotipos
<i>Salmonella enterica</i>	I	<i>Salmonella enterica</i>	1531
	II	<i>Salmonella salamae</i>	505
	IIIa	<i>Salmonella arizonae</i>	99
	IIIb	<i>Salmonella diarizonae</i>	336
	IV	<i>Salmonella houtenae</i>	73
	VI	<i>Salmonella indica</i>	13
<i>Salmonella bongori</i>			22

Modificada de Grimont y Weill, 2008

La subespecie I de *Salmonella enterica* agrupa la mayoría de los serotipos de importancia clínica para el humano y se subdivide en dos grandes grupos, salmonelas tíficas y salmonelas no tíficas; en el primer grupo podemos encontrar a *Salmonella typhi* y *Salmonella paratyphi* agentes causales de fiebre tifoidea y paratifoidea respectivamente, por otro lado, en el grupo de salmonelas no tíficas se encuentra la mayoría de los serotipos causantes de salmonelosis (gastroenteritis por *Salmonella spp.*) (Barreto y cols, 2016; Organización Mundial de la Salud, 2018).

3.3 Salmonelosis

La OMS define a la salmonelosis como una zoonosis producida por serovariedades no tíficas del género *Salmonella* que afecta principalmente aves de corral, ganado vacuno y porcino. Como se muestra en la Figura 1, el consumo de huevo, carne de aves de corral y agua contaminada es la principal fuente de infección para el humano (Organización Mundial de la Salud y Red Internacional de Autoridades en materia de Inocuidad de los Alimentos, 2018). Debido a los brotes de salmonelosis transmitidos por alimentos en países como Estados Unidos de América, Canadá, Inglaterra, Noruega y Dinamarca la OMS declaró

desde el año 2000 a la salmonelosis como una enfermedad de notificación obligatoria (Uribe y Suarez, 2009; Rivera y cols 2012; Organización Mundial de la Salud, 2015).



Figura 1. Fuentes de infección *Salmonella* en humanos y animales.

Modificada de <https://encolombia.com/medicina/materialdeconsulta/tensiometro-virtual/transmision-de-salmonelosis/>

Una vez ingerida, *Salmonella enteritidis* es capaz de resistir el pH ácido del estómago, llegar a intestino delgado donde la alta concentración osmótica induce su internalización hacia las células epiteliales intestinales del íleon donde son fagocitadas por las células dendríticas y macrófagos, éstos últimos se consideran las células blanco en la infección. La bacteria se establece en la vacuola del macrófago donde es capaz de evadir la actividad lítica y los componentes lisosomales, multiplicarse y propagarse en el tejido intestinal a partir del mecanismo llamado “trigger”, el cual consiste en el envío de señales al cito esqueleto dando lugar a la formación de ondulaciones intestinales que le permiten ingresar a las células M donde produce efectos citotóxicos y destrucción de los enterocitos adyacentes. Para poder ser transportada a hígado y bazo *Salmonella* es capaz de producir apoptosis en macrófagos activados y fagocitosis inducida en macrófagos no activados, además, induce la migración de macrófagos para la liberación de citocinas pro inflamatorias involucradas en el proceso diarreico, entre las que destacan IL8, GM-CSF, IFN γ , TNF α y GCP-2 (Figuroa y Verdugo, 2005; Barreto y cols, 2016).

El cuadro clínico se inicia de 6 a 48 h después de la ingestión de alimentos o agua contaminados con una dosis infectiva de 10^5 a 10^8 bacterias, la infección se caracteriza por diarrea, dolor abdominal, náuseas, fiebre alta, deshidratación y en ocasiones vómito. Durante el periodo de infección se excretan bacterias en las heces, se sabe que entre el 0.3 al 0.6% de los pacientes con infecciones por salmonela no tifoidea excretan bacterias durante más de un año. Alrededor del 5% de los pacientes con gastroenteritis por *Salmonella* no tífica pueden desarrollar bacteriemia, sin embargo, esta complicación es común solo en pacientes inmunocomprometidos (Rivera y cols, 2012; Uribe y Suarez, 2009).

3.3.1 Prevalencia de salmonelosis en México

En México las infecciones por *Salmonella spp.* en humanos son reportados ante el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE) en el Boletín Epidemiológico Semanal e incluye los casos en el apartado “Enfermedades Infecciosas y parasitarias del aparato digestivo”, y los clasifica como “Fiebre Tifoidea”, “Fiebre Paratifoidea A” y “Otras Salmonelosis” incluyéndose en esta última categoría los casos de salmonelosis ocasionados por *Salmonella enterica serovar enteritidis*. La Figura 2 resume la prevalencia de los casos de salmonelosis en los últimos cuatro años, como puede observarse, los casos fluctúan entre 75 y 90 mil y no se aprecia una clara tendencia a la baja. Con respecto los casos del año 2019 se nota una pequeña disminución comparado con la misma semana en el año 2018, sin embargo, estos datos se pueden incrementar debido a que el repunte de las ETA se observa siempre en época de calor. Los estados de mayor prevalencia en estos años fueron Chiapas, Veracruz y Tabasco. (Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, 2016-2019)

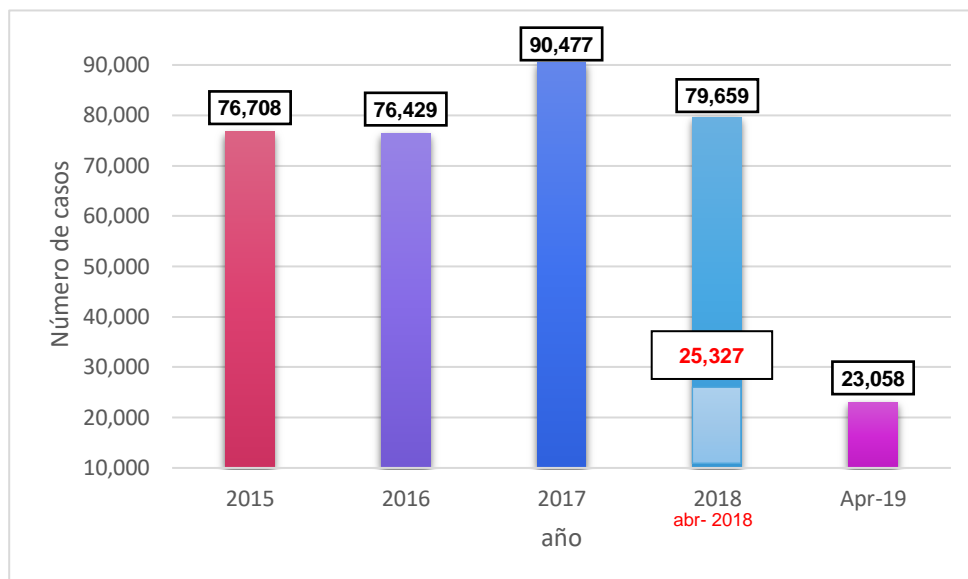


Figura 2. Casos de salmonelosis en México
 Datos obtenidos del Boletín Epidemiológico Nacional

Por otro lado, los brotes de salmonelosis en aves de corral son monitoreados por la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) y el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), quienes han declarado que desde el año 2012 México se encuentra libre de salmonelosis aviar. Cabe destacar que este reporte solo se basa en el nulo aislamiento e identificación de los serotipos de *Salmonella pullorum* y *Salmonella gallinarum* en este sector. A nivel mundial, el serotipo *Salmonella enteritidis* se ha detectado en carne de aves de corral y huevo representando un problema de salud en sector avícola (Rincón y cols, 2011; Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria, 2018; Organización Mundial de Sanidad Animal, 2018).

En México, los brotes de *Salmonella enteritidis* tanto en humanos como en aves de corral han sido poco estudiados. El estudio más reciente fue el realizado en Yucatán por Zaidi y colaboradores en 2006, quienes recolectaron un total de 295 muestras de carne de pollo determinando que el 39.7% (117 muestras) se encontraban contaminada con *Salmonella spp*, los serotipos mayormente aislados fueron *Salmonella albany* (18.2%) *Salmonella enteritidis* (16.8%), *Salmonella agona* (14%) y *Salmonella meleagridis* (14%).

3.4 *Salmonella* en aves de corral

Las aves de corral adquieren a la *Salmonella spp.* del ambiente donde se encuentran principalmente por vía oral debido al consumo de agua y alimento contaminado, una vez realizada la ingesta, *Salmonella spp.* coloniza el tracto intestinal de las aves, representado en la Figura 3, principalmente en la porción cecal (ciegos) y cloacal. Los signos y síntomas de la infección por *Salmonella spp.* en aves de corral son retraso del crecimiento, baja producción de huevos, fiebre y diarrea, por lo que las aves infectadas tienen una persistente diseminación de la bacteria en heces, facilitando así la transmisión transovarica (Rincón y cols, 2011; Herrera y Jabib, 2015).

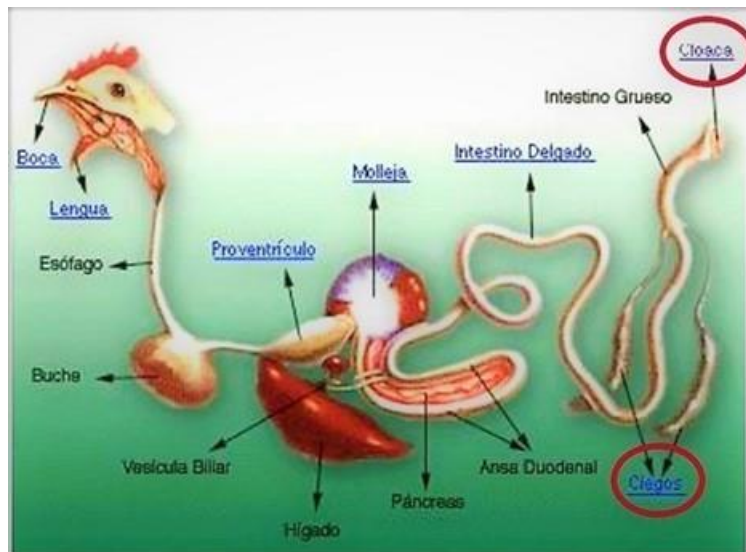


Figura 3. Esquema del tracto gastrointestinal de las aves de corral
Obtenida de <http://www.corporativo.net.co/bibliotecainsa>

3.4.1 Transmisión transóvarica de *Salmonella*

El contenido interno de los huevos recién puestos es generalmente estéril, sin embargo, tras su paso por la cloaca la superficie del huevo puede contaminarse por diversos microorganismos que, bajo condiciones apropiadas, son capaces de penetrar e infectar el interior del huevo. En la actualidad, se conocen dos vías de transmisión por las cuales *Salmonella* es capaz de contaminar el interior de los huevos (Herrera y Jabib, 2015; Yang y cols, 2017).

- Transmisión vertical: la contaminación de la yema se lleva a cabo en el ovario o en su paso por el oviducto contaminado. Además, como se observa en la Figura 4, la superficie del cascarón es contaminada al pasar por vagina (Rincón y cols, 2011).

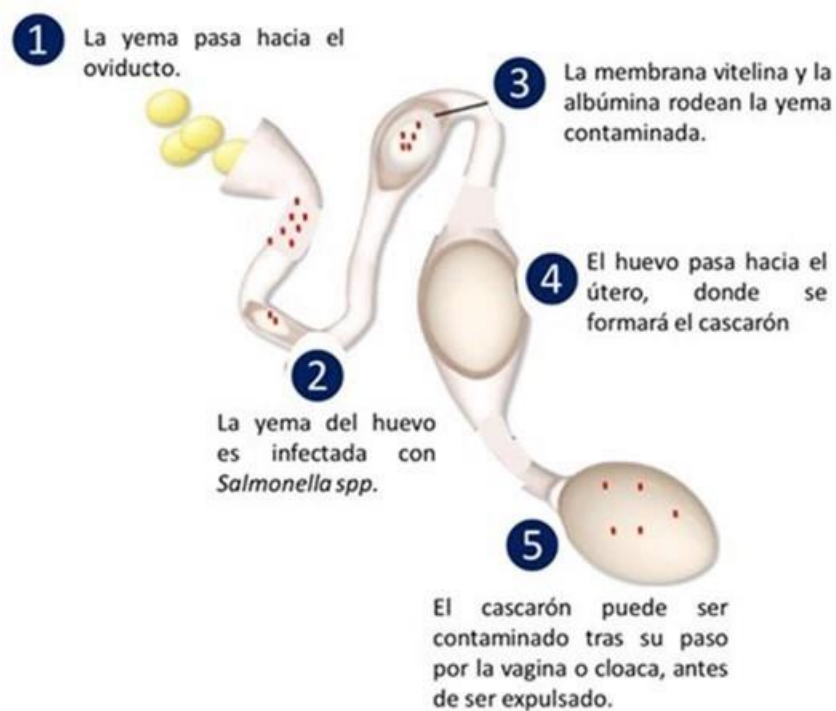


Figura 4. Esquema de transmisión vertical de *Salmonella* spp. en huevos
Modificada de <https://foodsafetycertificationpr.com/2012/01/20/la-salmonella-s-typhi>

- Transmisión horizontal: la cascara del huevo es contaminada con heces tras su paso por la cloaca. Como muestra la Figura 5, debido a la diferencia térmica entre el huevo recién puesto y el ambiente, las bacterias pueden penetrar en la albúmina a través de los poros mediante un proceso de succión (Rincón y cols, 2011).

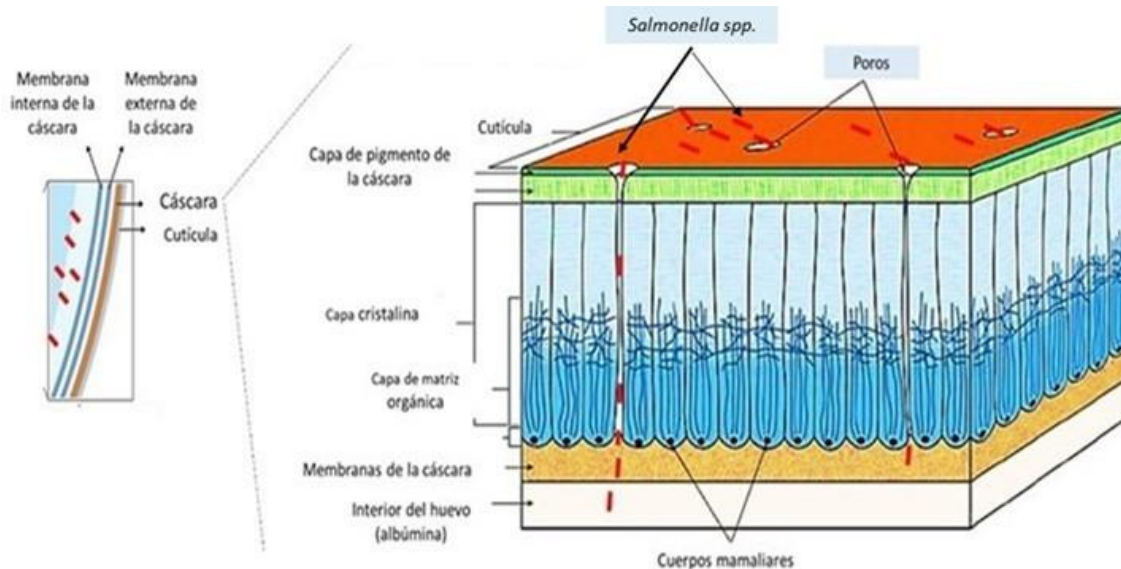


Figura 5. Esquema de transmisión horizontal de *Salmonella spp.* en huevos
 Modificada de <http://bmeditores.mx/ciencia-calidad-del-huevo/>

3.4.2 Tratamiento de salmonelosis en aves de corral

Durante varias décadas antibióticos como la kanamicina, gentamicina, cloranfenicol y furazilodona fueron utilizados en la profilaxis y tratamiento de salmonelosis en las aves de corral. Sin embargo, se ha demostrado que el uso de antibióticos en los animales puede contribuir a la aparición de resistencia a estos fármacos. Actualmente, la industria avícola emplea acidificantes en el alimento como medida profiláctica contra la salmonelosis, éstos disminuyen el pH del tracto digestivo de las aves propiciando la inhibición del crecimiento de *Salmonella*, entre los mayormente utilizados se encuentra el ácido fórmico, ácido acético y ácido propiónico (Castanon, 2007; Gonzalez y cols 2013; Organización Mundial de la Salud, 2017).

3.4.3 Restricción del uso de antibióticos en el sector avícola

A lo largo de los años, el uso de antibióticos como tratamiento de enfermedades infecciosas bacterianas demostró ser de gran utilidad en el sector avícola, 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 en animales para consumo humano (Gonzalez y cols 2013; Organización Mundial de la Salud, 2017). Sin embargo, se ha demostrado que los residuos de antibióticos en los 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 (Lozano y Arias, 2008; Cancho y cols, 2000).

Diversas organizaciones internacionales se han enfocado en regular la cantidad de residuos de antibióticos de uso veterinario presentes en animales comerciales. Por ejemplo, la FAO y la OMS integraron la Comisión del *Codex Alimentarius* que establece los límites máximos residuales (LMR) de un antibiótico en los tejidos comestibles de cada especie animal y 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 (Lozano y Arias, 2008; Comisión del *Codex Alimentarius*, 2015).

Desde el año 2013, la OMS ha enfatizado la necesidad de establecer nuevas alternativas en los tratamientos de infecciones causadas por cepas bacterianas resistentes a diversos antibióticos, por ello, diversos investigadores han retomado la Fagoterapia como una alternativa para el tratamiento de salmonelosis.

3.5 Bacteriófagos

Los Bacteriófagos son virus que infectan y lisan bacterias de manera especie-específica, se conocen como “la forma de vida más abundante en el planeta” y han sido aislados de ambientes acuáticos especialmente de aguas residuales. Fueron observados por primera vez por el británico Ernest Hankin en 1896 y posteriormente por el ruso Gamaleya en 1898, pero fueron descritos hasta 1915 por el británico Frederick Twort, quien reportó el aislamiento de entes filtrables con capacidad lítica contra *Staphylococcus spp.* Sin embargo, fue hasta 1917 cuando el francocanadiense Félix d’Herelle utilizó el término “Bacteriófagos” del griego *phagein* “comer” para describirlos por su capacidad de lisar bacterias (Nechaev y Severinov, 2008; Monk, 2010; Prada, y cols, 2015).

Los Bacteriófagos poseen un tamaño aproximado de 20 a 200 nm y se constituyen básicamente de proteínas y material genético (DNA o RNA, de cadena sencilla o doble) que se encuentra protegido por una cubierta proteica conocida como cápside. Estructuralmente pueden o no contar con cuello, láminas basales, fibras caudales, espículas y cola como se muestra en la Figura 6. De acuerdo con las características morfológicas y la naturaleza de su genoma los Bacteriófagos han sido clasificados en trece familias, ilustradas en la Tabla 2 (Ackermann, 2001; Sulakvelidze y cols, 2001; Azeredo y Sutherland, 2008; Nechaev y Severinov, 2008; Mathur. y cols, 2003; Prada y cols, 2015).

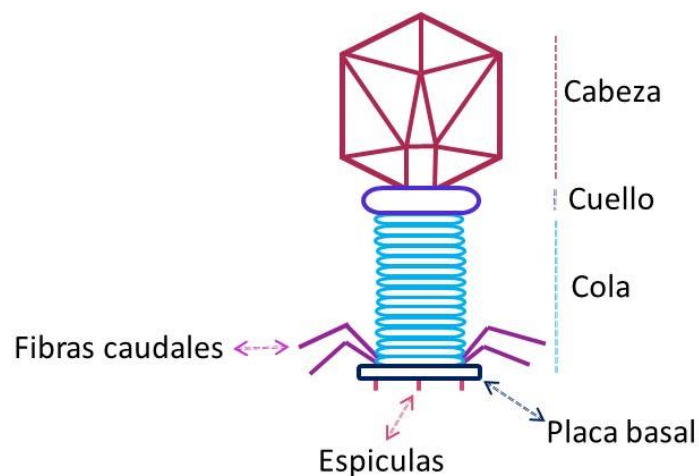

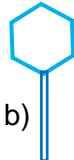
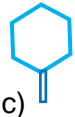
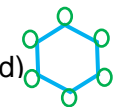





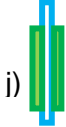
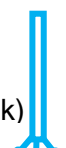




Figura 6. Estructuras de un Bacteriófago
Modificada de <http://www.microbiologia.com.ar/virologia/procariontes.php>

Tabla 2. Clasificación de los Bacteriófagos y sus principales características.

	Familia	Particularidades	Forma	Ácido Nucleico	Hospedero
a)	<i>Myoviridae</i>	Cola rígida, larga y contráctil		ADN dc,L	Bacteria y Archaea
b)	<i>Siphoviridae</i>	Cola no contráctil, larga y flexible		ADN dc,L	Bacteria y Archaea
c)	<i>Podoviridae</i>	Cola corta y no contráctil		ADN dc,L	Bacteria
			Bacteriófagos con cola		
d)	<i>Microviridae</i>	Capsómeros sobresalientes		ADN sc,C	Bacteria
e)	<i>Corticoviridae</i>	Cápside compleja		ADN dc,C,S	Bacteria
f)	<i>Tectiviridae</i>	Vesícula lipídica, pseudocola		ADN dc, L	Bacteria
g)	<i>Leviviridae</i>	Cápside carente de envoltura		ARN sc, L	Bacteria
h)	<i>Cystoviridae</i>	Cubierta lipídica		ARN dc, L, seg	Bacteria
			Bacteriófagos Poliédricos		
i)	<i>Inoviridae</i>	Filamentos largos o bastones cortos		ADN sc, C.	Bacteria
j)	<i>Lipothrixviridae</i>	Cubierta lipídica		ADN dc, L	Archaea
k)	<i>Rudiviridae</i>	Similar al virus mosaico del tabaco		ADN dc, L	Archaea
			Bacteriófagos filamentosos		
l)	<i>Plasmaviridae</i>	Cubierta lipídica, sin cápside		ADN dc, C,S	Bacteria
m)	<i>Fuselloviridae</i>	Cubierta lipídica, sin cápside y en forma de limón		ADN dc, C,S	Archaea
			Bacteriófagos pleomórficos		

NOTA: dc: cadena doble, sc: cadena sencilla; L: lineal, C: circular, S: super-helicoidal, seg: segmentado.

Modificada de Gómez y Flores, 2009

Para replicarse, los Bacteriófagos utilizan la maquinaria metabólica de las bacterias susceptibles. Una vez que los receptores fágicos reconocen los receptores bacterianos (proteínas o carbohidratos presentes en la pared bacteriana, cápsula, el pili o el flagelo) se inicia su ciclo replicativo (Azeredo y Sutherland, 2008; Prada y cols, 2015).

La replicación de los Bacteriófagos puede llevarse a cabo mediante un ciclo lítico o un ciclo lisogénico, representados en la Figura 7. El ciclo lítico es llevado a cabo por los Bacteriófagos denominados virulentos, mientras que, el ciclo lisogénico es llevado a cabo por los Bacteriófagos denominados temperados (Gómez y Flores, 2009; Prada y cols 2015).

La diferencia principal entre los dos ciclos es que, en el ciclo lítico los Bacteriófagos se replican, ensamblan y liberan inmediatamente, mientras que en el ciclo lisogénico la progenie no se produce inmediatamente, sino que lleva a cabo un tipo de infección latente durante una o varias generaciones. Sin embargo, bajo condiciones adversas como la desecación, exposición a luz UV y la exposición a químicos mutagénicos, el ciclo lisogénico puede ser terminado, a este proceso se le conoce como inducción, y permite que el Bacteriófago sintetice, ensamble y libere sus progenies (Gómez y Flores, 2009).

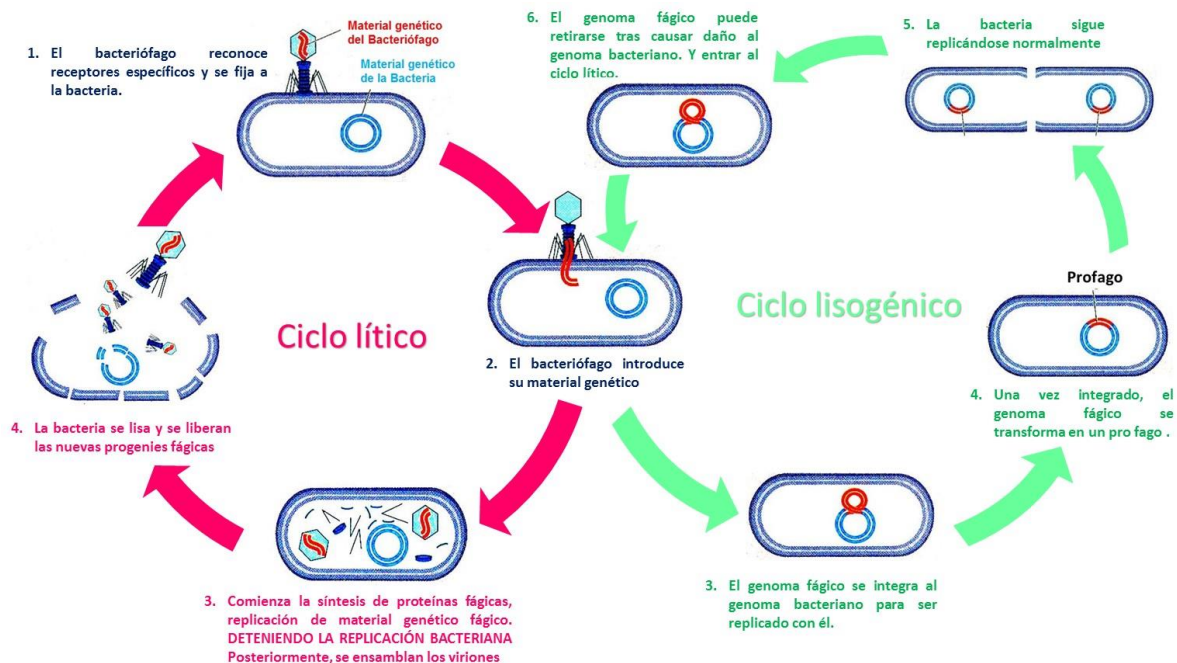


Figura 7. Representación esquemática de los ciclos de replicación de los Bacteriófagos
 Modificada de <http://www.betelgeux.es/blog/2016/04/13/bacteriofagos-pequenos-grandes-aliados-en-la-lucha-contra-los-patogenos-alimentarios/>

3.6 Fagoterapia

La Fagoterapia se define como el uso de Bacteriófagos para el tratamiento y control de infecciones bacterianas. En el campo de la medicina, la fagoterapia comienza cuando Félix d'Herelle utilizó Bacteriófagos como tratamiento para la disentería en humanos y pollos. Después, Richard Bruynoghe y José Maisin, en 1921, utilizaron Bacteriófagos en el tratamiento de infecciones en la piel causadas por *Staphylococcus spp.* Así mismo, en 1940 en Estados Unidos la empresa Eli Lilly comenzó la producción de siete lisados fágicos para uso humano. A pesar del éxito de la fagoterapia en esa época, factores como la falta de conocimiento sobre la biología de los Bacteriófagos, procedimientos para demostrar que los Bacteriófagos utilizados terapéuticamente eran líticos y tecnología para garantizar que los Bacteriófagos no estuvieran contaminados con restos celulares bacterianos, así como la aparición de los antibióticos propiciaron que la fagoterapia fuera desplazada (Sulakvelidze y cols 2001; Fernandez y cols, 2004; Prada Peñaranda y cols, 2015).

Debido a actual y creciente aparición de cepas multiresistentes a una amplia gama de antibióticos, la fagoterapia ha sido retomada en el campo de la medicina como una alternativa en la profilaxis y tratamiento de infecciones por bacterias; en la industria agropecuaria, la fagoterapia se ha utilizado para garantizar la seguridad de los alimentos permitiendo la eliminación de infecciones bacterianas en los animales evitando así el consumo de alimentos contaminados (Gabard y Jault, 2015; Domingo y Delgado, 2018).

3.6.1 Formulaciones a base de Bacteriófagos

Los avances biotecnológicos han contribuido a que el conocimiento sobre la biología de los Bacteriófagos sea mayor y permita mejorar los procedimientos para su producción y conservación. En la actualidad, distintas empresas comercializan y/o desarrollan productos a base de Bacteriófagos. Incluso algunos productos como ListShield™, EcoShield™ y SalmoFresh™ de la empresa Intralytix y SalmoNex® de la empresa Microcos Food Safety, han sido aprobados por la Administración de Drogas y Alimentos (FDA, por sus siglas en inglés) para su utilización en procesos de producción de alimentos (Gabard y Jault, 2015; <http://www.microcos.com/>; <http://www.intralytix.com/>).

Los productos a base de Bacteriófagos se encuentran en diversas formulaciones que van desde Bacteriófagos liofilizados en aerosol o spray nasal, tabletas, crema, pomada y soluciones de uso tópico, utilizando títulos desde 10^5 hasta 10^{11} sin reportes de efectos adversos o reacciones alérgicas asociadas con su uso (excepto hipersensibilidad a alguno de los componentes de las formulaciones), probablemente porque los Bacteriófagos son extremadamente comunes en el ambiente (Kutateladze y Adarnia, 2008; Mahony y cols, 2011; Haq y cols, 2012; Gabard y Jault, 2015; Kutateladze, 2015).

Se sabe que las soluciones a base de Bacteriófagos presentan una estabilidad limitada, debido a la pérdida significativa en el título del Bacteriófago durante el procesamiento y el almacenamiento, lo cual representa una problemática ante la comercialización de los Bacteriófagos como productos farmacéuticos. Actualmente diversos investigadores se han enfocado en obtener formulaciones sólidas que contenga Bacteriófagos como principio activo, evitando así la pérdida del título fágico, además de permitir administrar Bacteriófagos por vía oral, manteniéndolos protegidos durante su paso a lo largo del tracto gastrointestinal y ser liberados principalmente en el intestino delgado (Malik y cols, 2017).

El uso de biopolímeros para el desarrollo de formulaciones a base de Bacteriófagos se ha incrementado. La empresa Polymer-pharm y el Instituto Eliava desarrollaron una película a base de polímeros biodegradables que contiene diversos Bacteriófagos (Figura 8). Por otro lado, investigadores del Departamento de Genética y Microbiología de la Universidad Autónoma de Barcelona y el Instituto de Nanobiología y Nanotecnología de Catalá con la finalidad de mejorar la estabilidad de Bacteriófagos a pH estomacal, encapsularon tres fagos morfológicamente diferentes en liposomas para su administración por vía oral, determinando pérdidas de 4.8, 5.4 y 3.7 unidades logarítmicas para cada uno de los Bacteriófagos encapsulados tras ser expuestos a $\text{pH} = 2.4$ durante 60 min (Kutateladze y Adarnia, 2008; Colom y cols, 2015)



Figura 8. Uso de una película polimérica conteniendo Bacteriófagos para eliminación de una infección bacteriana

Obtenida de <http://www.intralytix.com/index.php?page=hum>

3.7 Polímeros utilizados en la industria farmacéutica

Los polímeros son moléculas orgánicas de cadena larga ensambladas a partir de muchas moléculas más pequeñas llamadas monómeros, se obtienen de fuentes naturales o sintéticas. Dentro de las propiedades que poseen destacan la biocompatibilidad, estabilidad química, resistencia mecánica, biodegradabilidad y baja toxicidad (Rubio y Guerrero, 2012; Neira y cols, 2013; Rojas y cols, 2008).

Fueron incluidos oficialmente en el campo farmacéutico en 1980 en la Farmacopea Americana USP XX, desde entonces han jugado un papel importante en la preparación de productos farmacéuticos. Sus aplicaciones abarcan desde la fabricación de diversos materiales de envasado de fármacos hasta su uso como aglutinantes en tabletas, agentes espesantes en líquidos, suspensiones y emulsiones, y como recubrimientos de película para enmascarar sabores, mejorar la estabilidad y como sistemas de liberación modificada de fármacos (Rojas y cols, 2008; Chauhan y cols, 2016).

Las propiedades de los polímeros y la aceptación de su uso por la FDA en Estados Unidos de América han permitido en la última década un aumento en la encapsulación de diversos fármacos utilizando polímeros naturales dentro de los que destacan colágeno, gelatina, gluten de trigo; lípidos como ceras y ácidos grasos y polisacáridos como el quitosano, celulosa, pectina y alginato. La Tabla 3 resume las aplicaciones farmacéuticas de algunos polímeros (Rubio y Guerrero, 2012; Neira y cols, 2013).

Tabla 3. Polímeros y sus aplicaciones farmacéuticas

Clasificación	Nombre del polímero	Aplicación en la industria farmacéutica
Polimeros sintéticos solubles en agua	Poli (óxido de etileno)	Floculante, coagulante y agente de hinchamiento
	Poli (vinilpirrolidona)	Granulación de tabletas
	Poli (alcohol vinílico)	Envases solubles en agua, aglomerante y recubrimiento de tabletas
	Poli (etilenglicol)	Plastificante y base para supositorios
Polimeros biodegradables insolubles en agua	Ácido láctico- coglicólico	Entrega de proteínas, uso en micro y nanopartículas
Polimeros a base de almidón	Glicolato de almidón sodico	Desintegrante para comprimidos y cápsulas en administración oral
	Almidón	Glidante, diluyente en tabletas y cápsulas, desintegrante en comprimidos y cápsulas, y aglutinante de comprimidos.
Plásticos	Policianocrilato	Portador de fármacos en nano y micropartículas.
Hidrocoloides	Carragenina	Liberación modificada de fármacos y agente viscosante
	Quitosan	Aplicaciones de administración controlada de fármacos y formas de dosificación mucoadhesivas.
	Pectina	Aplicaciones de administración convencional de fármacos
	Alginato	Elaboración de medicamentos orales y tópicos, agente espesante en cremas y geles, agente estabilizante para emulsiones de aceite en agua; aglutinante y desintegrante

Modificada de Chauhan y cols, 2016

3.8 Alginato

Los alginatos son polisacáridos lineales extraídos de algas marrones principalmente de las especies *Laminaria hyperborea*, *Ascophyllum nodosum*, *Macrocystis pyrifera*. Se encuentran compuestos de dos tipos de monosacáridos: el ácido manurónico y el ácido glucurónico, éstos 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. La composición en la secuencia de los monosacáridos y el peso molecular son determinantes en las propiedades mecánicas del alginato. Se sabe que, si la estructura polimérica se encuentra formada mayormente por bloques G, el gel obtenido es duro y frágil, por otro lado, si contiene mayor cantidad de bloques M, el gel formado es suave y elástico. El contenido de cada uno de estos bloques depende del tipo de alga y su grado de desarrollo (Junter y Vinet, 2009; Lupo y cols, 2012; Avedaño y cols, 2013).

La viscosidad de las soluciones depende de la longitud de la molécula de alginato, a mayor longitud de cadena más alto es el valor de la viscosidad. Por otra parte, la solubilidad en agua depende del tamaño de partícula, las partículas pequeñas se hidratan con mayor rapidez, pero pueden aglomerarse, mientras que partículas grandes son más fáciles de dispersar y suspender, pero su hidratación es lenta (Lupo y cols, 2012; Avedaño y cols, 2013).

Los alginatos son comercializados en forma de sales hidrosolubles, purificadas, en tres diferentes calidades. (Junter y Vinet, 2009).

- Calidad técnica. Productos que pueden contener cierta proporción de celulosa, de color que varía desde el blanco a amarillo marrón.
- Calidad alimentaria. Productos completamente libres de celulosa, de coloración blanca o ligeramente amarilla.
- Calidad farmacéutica. Productos blancos, libres de celulosa.

El uso de los alginatos se debe principalmente a las propiedades descritas a continuación.

- Espesante. El alginato aumenta la viscosidad de las soluciones donde se disuelve, por ello, es utilizado como estabilizante de emulsiones, suspensiones y espumas a concentraciones de 0.25% a 0.5%. La capacidad del alginato como estabilizante se

mide en función de su grado de polimerización, entendida como la cantidad de monómeros presentes en el polímero, (Avedaño y cols, 2013; Rinaudo, 2014).

- Habilidad de formar geles. La formación del gel se inicia al contacto de una solución de sal de alginato y una fuente de ciertos cationes (principalmente el calcio) como consecuencia se produce un reordenamiento estructural del alginato formando mediante el proceso de gelificación iónica, dando lugar a geles de tipo químico, no reversibles al calentarlos, de gran tensión superficial y de dureza variable según el peso molecular del alginato. El grado de gelificación depende de la hidratación del alginato, la concentración del ion calcio y la proporción de ácido glucorónico (Lupo y cols, 2012; Avedaño y cols, 2013).

Los alginatos han sido ampliamente utilizados para la encapsulación de microorganismos probióticos e inmovilización de células y enzimas mediante la técnica de gelificación iónica (Lupo y cols, 2012).

3.8.1 Gelificación iónica

Es una técnica utilizada ampliamente debido a la sencillez de su preparación a nivel laboratorio. La encapsulación por gelificación iónica puede proteger el interior de la matriz polimérica de diversas condiciones como: pH, temperatura, disolventes orgánicos y contaminación (Avedaño y cols, 2013; Rinaudo, 2014).

Para esta técnica se utiliza principalmente alginato combinado con iones divalentes de Ca^{2+} para inducir la gelificación. Para dar explicación a las propiedades gelificante de los alginatos al reaccionar con sales cálcicas, Grant propuso en 1973 el “modelo de caja de huevo” (Figura 9), donde se observa que el proceso de gelificación se lleva cabo instantáneamente al entrar en contacto el alginato con los iones Ca^{2+} . Cabe señalar que es posible manipular la dureza del gel formado modificando algunas condiciones de elaboración, por ejemplo: pH, concentración de iones y concentración de alginato (Hjorth y Karlsen cols, 2002; Lupo, y cols, 2012).

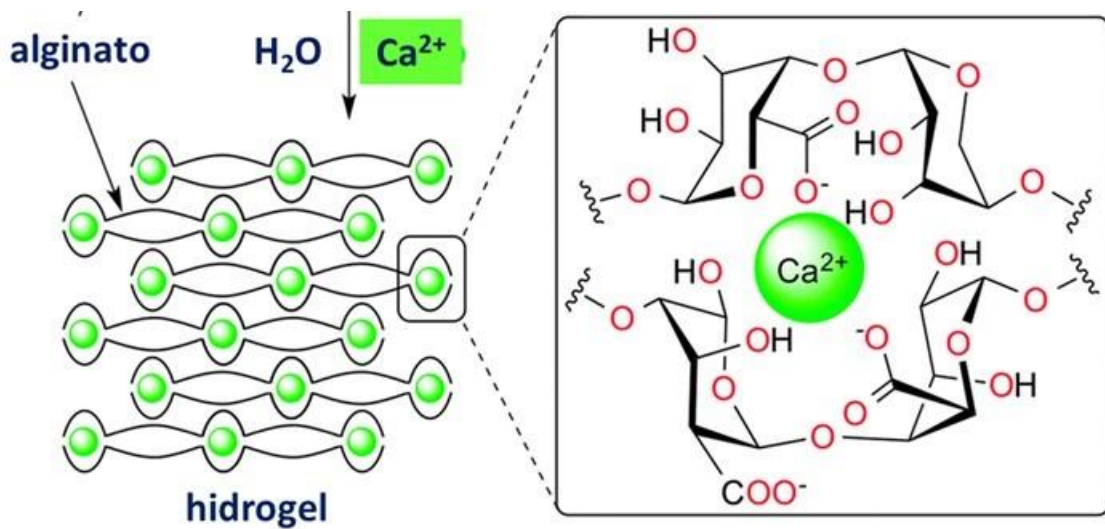


Figura 9. Modelo de caja de huevo propuesto por Grant
Obtenida de Kuhbeck y cols, 2015

La gelificación iónica se lleva a cabo mediante dos procesos: la gelificación iónica externa y la gelificación iónica interna; teniendo como única diferencia la cinética del proceso (Lupo y cols., 2012).

- La gelificación iónica externa se lleva a cabo cuando la solución de alginato es añadida a una solución de iones calcio. Los iones Ca^{2+} saturan la superficie y desplazan al sodio proveniente de la sal de alginato, por ende la formación del gel avanza hacia el interior (Avedaño-Romero y cols., 2013).
- La gelificación iónica interna se lleva a cabo cuando los iones Ca^{2+} son añadidos desde una fuente insoluble en la solución de alginato. En este caso, las sales de calcio empleadas son: carbonato de calcio y fosfato tricálcico, además de un ácido orgánico como el ácido acético que permita la acidificación del medio para solubilizar los iones calcio y llevar a cabo la formación del gel (Lupo y cols, 2012; Avedaño y cols, 2013).

3.8.2 Liberación a partir de sistemas de alginato

La liberación de principios activos contenidos en esferas de alginato se produce principalmente por difusión a partir del proceso "hinchazón-disolución-erosión". Tras exponer las esferas de alginato con el medio de disolución, el gradiente de presión que existe entre ambos aumenta, lo que provoca la hidratación, hinchamiento y disolución de la membrana o película polimérica permitiendo la liberación del principio activo hacia el exterior, como se muestra en la Figura 10. (Hjorth y Karlsen, 2002).

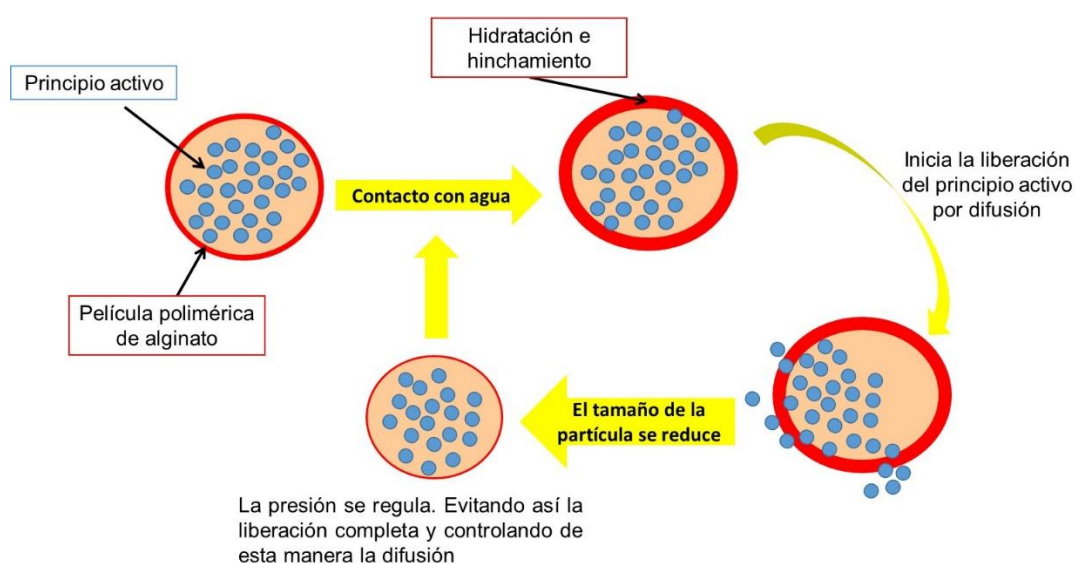


Figura 10. Representación gráfica del proceso de liberación a partir de sistemas de alginato
Modificada de Rojas y cols, 2008

Por otro lado, la presencia de moléculas activas como enzimas o concentraciones de ácido/base sobre el gel, modifican el proceso de "hidratación e hinchamiento". Por ello, bajo condiciones ácidas, por ejemplo: el estómago, la hinchazón de las perlas de alginato entrecruzado con calcio es nula por lo que no se permite la liberación del fármaco, mientras que, bajo condiciones neutras, por ejemplo: intestino, las perlas tienden a hincharse y la liberación del fármaco depende del proceso disolución-erosión (Hjorth y Karlsen, 2002).

En trabajos previos el Bacteriófago S₁ ha sido encapsulado con alginato a partir de la técnica de gelificación iónica (Gómez-García y cols, 2016).

3.9 Generalidades del Bacteriófago S₁

El Bacteriófago S₁ (Figura 11) fue aislado de aguas residuales de la ciudad de Cuernavaca Morelos y caracterizado en el Laboratorio 9 de Microbiología y Parasitología de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Es específico para *Salmonella enterica serovar enteritidis* y se clasificó dentro la familia *Myoviridae*, mide 200 nm de longitud y 50 nm de diámetro. Estructuralmente se compone de cápside, cuello, cola contráctil, lamina basal y espículas. Posee ADN de cadena doble como material genético y pierde significativamente su capacidad lítica cuando se expone a radiación Ultravioleta (UV) por periodos superiores a los tres minutos, temperaturas mayores a 50°C y valores pH inferiores a 3.0 y mayores a 9.0 (Segundo-Arizmendi y cols, 2017; Segundo-Arizmendi, 2016).

En trabajos previos, el Bacteriófago S₁ ha sido encapsulado a partir de la técnica de gelificación iónica, utilizando alginato calidad técnica al 2% p/v y CaCl₂ al 2% p/v obteniendo esferas con tamaño desde 3.68 hasta 3.77 mm, determinado que en el proceso se pierde una unidad logarítmica del título fágico (Gómez-García, 2016).



Figura 11. Micrografía electrónica de transmisión del Bacteriófago S₁
Obtenida de Segundo Arizmendi, 2016

4. ANTECEDENTES

Las investigaciones en el campo de la medicina para el uso de Bacteriófagos como tratamiento comienzan con el descubrimiento de Félix d'Herelle sobre la capacidad que tienen los Bacteriófagos de provocar lisis bacteriana (Clark, 2006). A partir de ese momento, fue tan grande el éxito de la fagoterapia que el Instituto Eliava en Georgia fundado en 1923 por Félix d'Herelle y George Eliava produjo cinco preparados fágicos que fueron comercializados por la hoy conocida empresa L'Oreal Paris y en 1940 la empresa estadounidense Eli Lilly comenzó la producción de siete lisados fágicos para uso humano. A pesar de esto, las problemáticas que surgieron en este tiempo con respecto al poco conocimiento que se tenía sobre la biología de los Bacteriófagos, la falta de procedimientos para demostrar que los Bacteriófagos utilizados terapéuticamente eran líticos y la aparición de los antibióticos hicieron que la fagoterapia quedara en el olvido (Sulakvelidze, y cols 2001; García y López, 2002).

El resurgimiento de la fagoterapia como tratamiento de enfermedades infecciosas de origen bacteriano en los últimos años se debe a la creciente aparición y propagación de cepas resistentes a múltiples antibióticos. Los avances actuales de la fagoterapia se fundamentan en la identificación, caracterización, desarrollo y producción de nuevos productos a base de Bacteriófagos líticos específicos contra bacterias patógenas; para el caso particular de *Salmonella enterica*, los Bacteriófagos se han utilizado como tratamiento de infecciones producidas por las serovariedades más prevalentes, en la Tabla 4, se mencionan algunos ejemplos. Los Bacteriófagos han sido administrados por vía oral, tópica, intravenosa e intrapleural, en formulaciones que van desde Bacteriófagos liofilizados, aerosoles, tabletas, cremas, pomadas o soluciones de Bacteriófagos para uso tópico, utilizando títulos desde 10^5 hasta 10^{11} , sin reportes de efectos secundarios o reacciones alérgicas asociadas con su uso, probablemente porque los Bacteriófagos son extremadamente comunes en el ambiente. (Hernandez, y cols, 2011; Kutateladze y Adarnia, 2008)

Tabla 4. Productos a base de Bacteriófagos contra *Salmonella spp.*

Empresa	Producto (s)	Descripción
<p>Biochimpharm JSC Tbilisi, Georgia. (http://biochimpharm.all.biz/)</p>	<p>Phagetsy™</p>	<p>Lisado fágico que contiene un coctel de Bacteriófagos, y es utilizado en el tratamiento y profilaxis de infecciones causadas por bacterias como <i>Shigella</i>, <i>Salmonella</i>, <i>Escherichia coli</i>, <i>Pseudomona</i> y <i>Staphylococcus</i>.</p>
	<p>Phagesal™</p>	<p>Liofilizado de un coctel de Bacteriófagos específicos contra <i>Salmonella paratyphi A</i>, <i>Salmonella paratyphi B</i>, <i>Salmonella typhimurium</i>, <i>Salmonella heidelberg</i>, <i>Salmonella choleraesuis</i>, <i>Salmonella oranienburg</i>, <i>Salmonella infantis</i>, <i>Salmonella newport</i>, <i>Salmonella dublin</i>, <i>Salmonella anatum</i>, <i>Salmonella newlands</i> y <i>Salmonella enteritidis</i></p>
<p>Micreos Food Safety Países Bajos (http://www.micreos.com/)</p>	<p>Salmonex®</p>	<p>Lisado fágico específico para la eliminación de <i>Salmonella</i> en los alimentos, en 2013 fue <u>aprobado por la Food and Drug Administration (FDA)</u> para su utilización en procesos de producción de alimentos.</p>
<p>Intralytix Estados Unidos (http://www.intralytix.com/)</p>	<p>SalmoLyse®</p>	<p>Preparación fágica utilizado para la eliminación de algunos serotipos de <i>Salmonella entérica</i> en procesos de molienda de carnes rojas y aves de corral, <u>la FDA lo clasifica como Generalmente Reconocido como Seguro (GRAS, por sus siglas en ingles)</u> para su uso directo sobre: aves de corral, pescados y mariscos, frutas y verduras frescas.</p>
	<p>PLSV-1™</p>	<p>Preparación fágica en desarrollo, para aplicaciones en veterinaria contra <i>Salmonella spp.</i></p>

Modificada de Gabard y Jault, 2015.

Los estudios realizados para determinar la disminución de *Salmonella spp.* van desde la aplicación de cocteles fágicos en piel de pollo hasta la evaluación de productos aprobados por la FDA. Por ejemplo, la investigación llevada a cabo por Soffer y cols 2016, quienes evaluaron la efectividad del producto SalmoLyse®, una preparación de Bacteriófagos pulverizados específicos contra *Salmonella* aplicados directamente sobre alimentos crudos como carne de pavo, pollo, lechuga, melón; determinando la reducción de una o más cepas de *Salmonella* en un 60 y hasta un 92% en diferentes productos cárnicos (Kelly, y cols, 2002; Greer, 2005; Bielke, y cols, 2007; Soffer, y cols 2016).

Anteriormente, la obtención de un producto en estado sólido con Bacteriófagos como principio activo era difícil de considerar, dado que se necesitaba de excipientes que resguardaran y protegieran al Bacteriófago a lo largo del tracto gastrointestinal para ser liberado principalmente en el intestino delgado. Sin embargo, recientemente se han realizado investigaciones para desarrollar formas farmacéuticas sólidas para la administración de Bacteriófagos por vía oral, a partir de sistemas que garanticen la resistencia de los Bacteriófagos a las condiciones gástricas (Ackermann, 2001; Hernández, y cols, 2011; Sillankorva, y cols, 2012; Choińska y cols, 2015).

Entre los diversos estudios reportados sobre la encapsulación de Bacteriófagos con biopolímeros destacan los siguientes.

El trabajo de Yongsheng y cols (2008) quienes determinaron la eficacia de encapsulación del Bacteriófago Félix O₁ específico para *Salmonella*. Tras partir de un título inicial de 10⁸ UFP/ml el Bacteriófago fue encapsulado en microesferas de alginato de baja viscosidad a una concentración de 2.2 % (p/v) y recubiertas con quitosano a una concentración de 0.4 % (p/v). La eficacia de encapsulación obtenida fue del 93.3%, además se demostró que tras la exposición de las microesferas en pepsina ajustada a pH 2.4 y después de 60 min de incubación los recuentos del Bacteriófago disminuyeron en 2.58 unidades logarítmicas.

Así mismo, Moghtader y cols (2017) con la finalidad de aumentar la estabilidad y controlar la liberación encapsularon al Bacteriófago T4 en microesferas alginato al 2 % (p/v), con un tamaño de 900–950 µm y recubiertas con quitosano ó polietilenimina. La eficacia de encapsulación obtenida fue 90 % ± 5 %, demostrando además en ensayos *in vitro* que las microesferas redujeron significativamente la pérdida del Bacteriófago cuando se exponen a pH ácido.

Por otro lado, Wernicki y cols (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 cols (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.

5. JUSTIFICACIÓN

Dentro de las enfermedades de transmisión alimentaria, la salmonelosis representa un problema de salud a nivel mundial tanto en humanos como en animales, incluidas las aves de corral. Debido a la incidencia e incremento de cepas de *Salmonella* resistentes a antibióticos incluidas las fluoroquinolonas, la OMS ha declarado como prioridad elevada la investigación y desarrollo de nuevos antimicrobianos contra esta cepa bacteriana.

En trabajos previos, el Bacteriófago S₁ fue aislado y caracterizado en el Laboratorio 9 de Microbiología y Parasitología de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, determinando que es un fago lítico y específico para *Salmonella entérica serovar enteritidis*, que pierde significativamente su capacidad lítica cuando se expone a pH menor a 3.0 y mayor a 9.0. Así mismo, el Bacteriófago S₁ fue encapsulado en esferas de alginato al 2 % (p/v) con un tamaño desde 3.68 hasta 3.77 mm, se demostró en ensayos *in vitro* que la capacidad infectiva del Bacteriófago no se ve afectada por el proceso de encapsulación.

El presente trabajo se enfocó en obtener un sistema de entrega vía oral capaz de brindar protección al Bacteriófago S₁ tras su paso por el tracto gastrointestinal del modelo *Gallus gallus domesticus* permitiendo la liberación en duodeno y ciegos.

6. HIPÓTESIS

Si las matrices poliméricas del alginato obtenidas por el método de gelificación iónica son capaces de recubrir y liberar al Bacteriófago S₁, entonces, dicho sistema será capaz de funcionar como alternativa eficaz en el tratamiento de salmonelosis en el modelo *Gallus gallus domesticus*.

7. OBJETIVOS

7.1 General

Evaluar la efectividad de esferas de alginato conteniendo al Bacteriófago S₁ lítico para *Salmonella enteritidis*, en el modelo *Gallus gallus domesticus* como posible tratamiento de salmonelosis.

7.2 Particulares

1. Determinar la viscosidad de soluciones de alginato al 2% realizadas con dos alginatos comerciales.
2. Determinar la eficacia de encapsulación del Bacteriófago S₁ en cada uno de los dos alginatos usados.
3. Determinar la liberación del Bacteriófago S₁ a pH intestinal mediante ensayos *in vitro*.
4. Evaluar la liberación del Bacteriófago S₁ en un modelo *In vivo* empleando pollos (*Gallus gallus domesticus*).
5. Evaluar la eliminación de *Salmonella enteritidis* en un modelo *In vivo* empleando pollos (*Gallus gallus domesticus*) tratado con esferas de alginato conteniendo Bacteriófago S₁.

8. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

La estrategia experimental del presente trabajo se esquematiza en la Figura 12.



Figura 12. Diagrama general de trabajo

9. MATERIALES

9.1 Biológicos

Cepa indicadora. *Salmonella entérica* serovar enteritidis obtenida de aislado clínico de pollo, donado por Department of Poultry Science, University of Arkansas.

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

Modelo *In vivo*. Pollos domésticos (*Gallus gallus domesticus*) obtenidos de la comercializadora “Granja Cuevas”, ubicada en Toluca, Estado de México; los cuales se mantuvieron en el animalario de la Facultad de Farmacia, UAEM.

9.2 No biológicos

Alginato. Se utilizaron dos alginatos grado técnico de marcas comerciales diferentes, los cuales se denominaron arbitrariamente como 1 y 2.

9.3 Soluciones

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

Soluciones de alginato: en 100 ml agua previamente calentada se añadió lentamente 2 g de alginato de sodio de dos diferentes marcas comerciales, la solución se mantuvo en agitación constante hasta la completa disolución del alginato. 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.

10. MÉTODOS

10.1 Propagación del Bacteriófago S₁

El proceso de propagación del Bacteriófago S₁ fue realizado con base en la estandarización realizada en el laboratorio 9 de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Se inocularon 500 µl de un cultivo de 24 h de cepa indicadora por cada 10 ml de TSB estéril y se incubó a 37 °C durante 120 min con agitación a 120 rpm utilizando una incubadora con agitación orbital marca Lumistell modelo ISO-45. Al término de este lapso, se infectó el cultivo con el Bacteriófago S₁ utilizando una multiplicidad de infección (MOI) de 1 e incubando nuevamente a 37 °C en agitación a 120 rpm durante 5 h. Posteriormente, el cultivo se centrifugó a 3500 rpm durante 15 min en una centrifuga modelo Centrifugant V1 marca CRM Globe, el sobrenadante fue recuperado y filtrado con membranas estériles de tamaño de poro 0.45 µm (Figura 13).

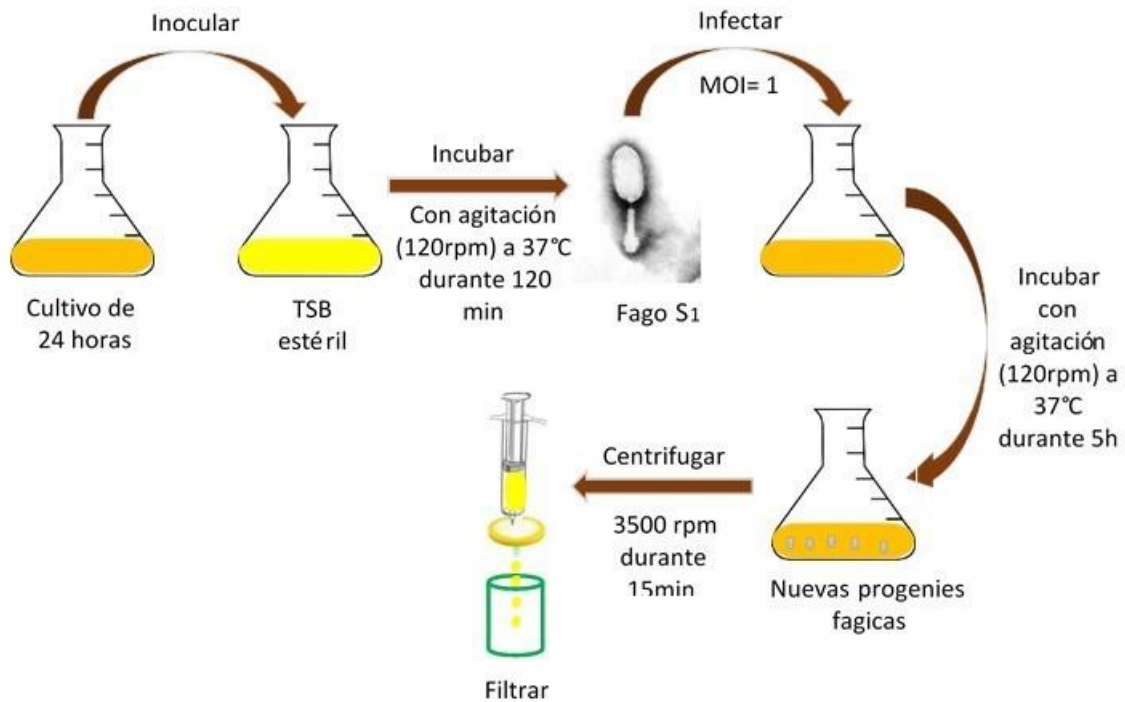


Figura 13. Método de propagación del Bacteriófago S₁

10.2 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 llevó a cabo diluciones seriales decimales del Bacteriófago con un volumen final de 5 ml. Posteriormente se colocaron 100 μ l de la dilución y 100 μ l de la cepa ajustada en tubos que contenían tres mililitros de agar blando previamente licuado, la mezcla fago-bacteria se homogenizó y colocó por duplicado en cajas Petri que contenían 20 ml de agar soya tripticaseína (TSA), se incubó a 37°C durante 24 h (Figura 14). Posteriormente se contabilizó las UFP/ml y se determinó el título fágico mediante la Ecuación 1.

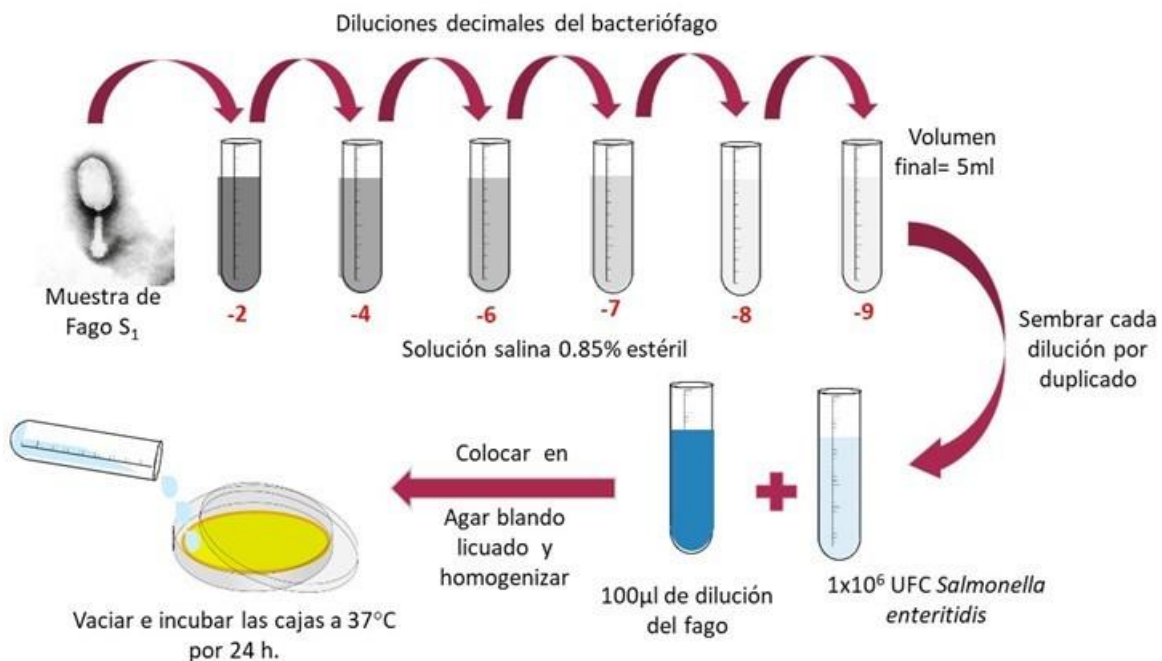


Figura 14. Método de sembrado en doble placa

$$\text{Título} = (\# \text{ de Placas}) \left(\frac{1}{\text{dilución}} \right) \left(\frac{1}{\text{alícuota}} \right)$$

Ecuación 1. Fórmula para determinar el título bacteriano

Donde:

de placas= Promedio de las UFP contabilizadas

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

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

10.3 Determinación de la viscosidad de las soluciones de alginato

Se preparó tres diferentes lotes de soluciones de alginato 1 y 2 como se describe en el punto 9.3. La viscosidad se determinó empleando un viscosímetro marca Brookfield modelo DV3-T utilizando una aguja número 34 con agitación a 150 y 120 rpm para el alginato 1 y 2 respectivamente; tomando lecturas cada 24 h durante 5 días.

10.4 Proceso de obtención de esferas conteniendo al Bacteriófago

S₁

Para cada alginato, se preparó 50 ml de solución a una concentración de 2% p/v, posteriormente se añadió 15 ml de Bacteriófago S₁ propagado, la mezcla alginato-Bacteriófago se homogenizó y vació en un embudo de separación añadiendo por goteo a una solución estéril de CaCl₂ al 2 % p/v, provocando así la formación de esferas, éstas fueron decantadas y lavadas con agua destilada estéril para eliminar el exceso de CaCl₂. Posteriormente se secaron a temperatura ambiente por una hora y se almacenaron a 4 °C.

10.5 Determinación de la eficacia de encapsulación

En condiciones asépticas, se colocó en un mortero estéril una muestra de 1 g de perlas obtenidas con cada uno de los alginatos y 2 ml de solución salina estéril al 0.85 %, se maceró durante 10 min. Posteriormente, el macerado se colocó en un tubo estéril y centrifugó a 3500 rpm durante 1 min. Se determinó por duplicado el título del Bacteriófago contenido en las perlas y el control (Bacteriófago propagado) mediante la técnica en vaciado en placa. Finalmente se determinó la eficacia de encapsulación mediante la Ecuación 2 reportada por Boggionea y cols (2017).

$$Eficacia\ de\ encapsulación = \frac{(Cantidad\ UFP\ obtenido)(Cantidad\ de\ lote)}{Cantidad\ de\ UFP\ original} (100)$$

Ecuación 2. Fórmula para determinar la eficacia de encapsulación

Donde:

Cantidad de UFP obtenido: Es la concentración del Bacteriófago S₁ presente en el gramo de esferas maceradas

Cantidad de lote: Es el peso total de las esferas por lote producido

Cantidad de UFP original: Es la concentración de Bacteriófago S₁ inicialmente utilizada para realizar las esferas de alginato.

10.6 Determinación de la pérdida del Bacteriófago

Con la finalidad de determinar la presencia del Bacteriófago S₁ en la solución gelificante posterior a la formación de esferas de alginato; se tomaron 50 µl de la solución de CaCl₂ previamente utilizada en el proceso de gelificación iónica y se colocaron por triplicado en caja petri conteniendo agar soya tripticaseína previamente inoculada con *Salmonella enteritidis*, las cuales se incubaron a 37 °C durante 24 h, para observar la presencia de zonas líticas.

Posteriormente se realizaron diluciones seriales de la solución de CaCl₂ y agua de lavado utilizadas previamente en el proceso de obtención de perlas, mientras que, para el material

empleado (matraz y embudo) se enjuago con 20 ml de solución salina estéril. Finalmente, se determinó la cantidad de Bacteriófago contenido en la solución de lavado y material mediante la técnica en vaciado en placa, para proceder a determinar la pérdida de encapsulación mediante la ecuación 3 reportada por Boggionea y cols (2017)

$$\text{Pérdida de encapsulación} = \frac{(\text{Cantidad UFP recuperado})}{(\text{Cantidad de UFP original})} \times 100$$

Ecuación 3. Fórmula para determinar la pérdida de encapsulación

Donde:

Cantidad de UFP recuperado: Es la suma de concentración del Bacteriófago S₁ presente en el material y soluciones utilizadas

Cantidad de UFP original: Es la concentración de Bacteriófago S₁ inicialmente utilizada para realizar las esferas de alginato.

10.7 Determinación de la liberación del Bacteriófago S₁ a pH 6.9 mediante ensayos *in vitro*

Se tomó 1 g de esferas de alginato y se colocó en un vaso de precipitado junto con uno y diez gramos de perlas de vidrio estériles, se agregó 20 ml de solución salina estéril al 0.85% ajustada a pH 6.9 y se mantuvo en agitación durante 24 h. Con la finalidad de determinar la presencia de Bacteriófago, se tomó una muestra de 20 µl a las 0, 8, 16 y 24 h, las cuales fueron inoculada por duplicado en cajas Petri que contenían la cepa indicadora, finalmente las cajas se incubaron durante 24 h a 37 °C.

10.8 Evaluación de la liberación del Bacteriófago S₁ en modelo *in vivo* (*Gallus gallus domesticus*)

Para este ensayo se utilizaron un total de 8 pollos de un mes de nacidos obtenidos de la comercializadora “Granja Cuevas”, ubicada en Toluca, Estado de México, éstos se mantuvieron en el animalario de la Facultad de Farmacia, UAEM. A cada uno de los pollos se administró un gramo de esferas de alginato 1 contenido Bacteriófago S₁ con un título de 4.9×10^9 . Posteriormente, se sacrificaron arbitrariamente dos pollos a las 1, 3, 5 y 18 h posterior a la administración. Finalmente, se llevó a cabo la búsqueda de perlas de alginato en el tracto gastrointestinal (TGI) de los pollos y la evaluación de la presencia del Bacteriófago S₁ en el buche, la molleja, los ciegos y el duodeno de los pollos mediante prueba de gota.

10.9 Eliminación de *Salmonella enterica* serovar enteritidis en modelo *in vivo* (*Gallus gallus domesticus*)

10.9.1 Recepción y acondicionamiento de los animales

Para este ensayo se utilizaron un total de 30 pollos domésticos de un mes de nacidos, a su llegada fueron distribuidos en 5 grupos (n=6) como se indica en la Tabla 4. Todos los grupos se mantuvieron en fase de acondicionamiento durante siete días suministrándoles alimento comercial de crecimiento y agua *ad libitum*.

Con la finalidad de garantizar que los pollos se encontraran libres de *Salmonella* en el ensayo *In vivo*, a su llegada al animalario se muestrearon mediante la obtención de hisopados cloacales que fueron sembrados en placas Petri conteniendo Agar Eosina y Azul de Metileno (EMB) y se incubaron a 37°C durante 24 h, para posteriormente identificar las bacterias presentes mediante la determinación de morfología y pruebas bioquímicas primarias.

10.9.2 Infección de *Gallus gallus domesticus* con *Salmonella enteritidis*

Al término de la fase de acondicionamiento y tras determinar la ausencia de *Salmonella spp.*, los grupos indicados en la Tabla 5 fueron infectados durante dos días por vía oral mediante sonda nasogástrica pediátrica, se administró un mililitro de cultivo de *Salmonella entérica serovar enteritidis* a una concentración de 4×10^6 el primer día y 4×10^7 UFC/ml el segundo día, por otro lado, al tercer día se suministró en el alimento 25 ml de bacterias con un título de 1×10^8 UFC/ml. Para garantizar la presencia de *Salmonella entérica serovar enteritidis* se tomaron muestras de hisopados cloacales de todos los grupos a los días 3, 5, y 7 post infección, las cuales fueron sembradas en placas Petri conteniendo Agar *Salmonella – Shigella* e incubadas a 37 °C durante 24 h.

Tabla 5. Registro de grupos para su infección				
Grupo	Infección con <i>Salmonella enteritidis</i>	Tratamiento		
		Antibiótico	Esferas de alginato conteniendo al Bacteriófago S ₁	Esferas de alginato vacías
CRT	NO	NO	SI	NO
ST	SI	NO	NO	NO
ANT	SI	SI	NO	NO
EFS₁	SI	NO	SI	NO
PLA	SI	NO	NO	SI

Nota: CRT= Grupo control, ST= Grupo sin tratamiento, ANT= grupo tratado con antibiótico, EFS₁= Grupo tratado con Esferas de alginato conteniendo al Bacteriófago S₁, PLA= Grupo tratado con esferas de alginato sin el Bacteriófago S₁

10.9.3 Administración del tratamiento para la eliminación de la infección por *Salmonella enteritidis*

Tras garantizar la infección de los grupos con *Salmonella enteritidis* se llevó a cabo la administración del tratamiento de la siguiente manera: el grupo CRT fue administrado con un gramo de esferas de alginato 1 conteniendo Bacteriófago S₁ con un título de 4.9×10^9 , al grupo ST no se administró ningún tratamiento, el grupo ANT fue administrado con antibiótico Trimetoprim-Sulfametoxazol de uso veterinario añadiendo 8 g de polvo en 4 litros de agua de acuerdo a las indicaciones del fabricante, para el grupo EFS₁ se administró

con un gramo de esferas de alginato 1 conteniendo Bacteriófago S₁ con un título de 4.9x10⁹ y el grupo PLA se administró 1 g de esferas de alginato sin contener Bacteriófago. Todos los grupos recibieron solo una toma de su tratamiento.

Finalmente, para observar la reducción de *Salmonella enteritica serovar enteritidis* se obtuvieron hisopados cloacales a las 24 y 48 h posteriores a la administración para cada uno de los grupos y fueron sembrados en placas Petri conteniendo Agar *Salmonella – Shigella* e incubados a 37 °C durante 24 h. Por otro lado, se buscó la presencia del Bacteriófago S₁ en las heces de pollo del Grupo 3 y Grupo control mediante la técnica de prueba de gota.

10.9.4 Influencia del alginato en la eliminación de *Salmonella enteritidis* (ensayo in vitro)

Para determinar la influencia de las perlas de alginato en la eliminación de *Salmonella enteritidis* se montaron dos matraces erlenmeyer conteniendo 50 ml de TSB estéril, y se inocularon con 2.5 ml de un cultivo de 24 h de *Salmonella enteritidis*, posteriormente se incubó a 37 °C durante 120 min con agitación a 120 rpm utilizando una incubadora con agitación orbital marca Lumistell modelo ISO-45. Al término de este lapso, al matraz 1 se agregó un gramo de esferas de alginato sin Bacteriófago S₁ y al matraz 2 un gramo de perlas de alginato conteniendo al Bacteriófago S₁. Los matraces se mantuvieron en parrilla de agitación a nivel 6 tomando muestras a las 24 y 48 h, las cuales se sembraron por duplicado en cajas Petri conteniendo Agar *Salmonella -Shigella* mediante la técnica de sembrado en césped, las cajas fueron incubadas durante 24 h a 37 °C para determinar cualitativamente el crecimiento bacteriano.

11. RESULTADOS

11.1 Determinación de la viscosidad de las soluciones de alginato

El valor de la viscosidad de las soluciones de alginato al 2% de las dos marcas empleadas se muestran en la Tabla 6 como el promedio de cinco mediciones de tres lotes diferentes para cada marca. Podemos observar que a una temperatura promedio de 27 °C la viscosidad del alginato 1 es menor que la del 2.

Tabla 6. Viscosidad de las soluciones de alginato					
Alginato	Viscosidad promedio (mPa*s)	Limite inferior	Limite superior	Torque promedio	Temperatura (°C)
1	192.408	165.271	219.54	47.67 ± 11.95	27.9 ± 0.8
2	241.420	233.206	249.633	48.38 ± 3.02	27.6 ± 0.5

Nota: Se utilizó una aguja #34 a una velocidad de 150 y 120 rpm para los alginatos "1" y "2" respectivamente

11.2 Determinación de la eficacia de encapsulación del Bacteriófago S₁

La tabla 7 muestra la cantidad de Bacteriófago recuperado tras la maceración de las esferas obtenidas con el alginato 1 y 2, demostrando que la eficacia de encapsulación fue mayor para el alginato 1 (31.20%) con respecto al alginato 2 (24.13%).

Tabla 7. Eficacia de encapsulación del Bacteriófago S ₁ en esferas de alginato				
Alginato	Promedio de UFP original	Promedio de UFP obtenido (UFP/ gramo de perla)	Peso promedio de lote de perlas (g)	Eficacia de encapsulación (%)
1	2.82x10 ¹¹	2.54x10 ⁹	34.63 ± 2.5	31.20
2	3.05 x10 ⁹	2.23x10 ⁷	33.0 ± 2.7	24.13

11.3 Determinación de la pérdida del Bacteriófago S₁

Una vez determinada la eficacia de encapsulación y con la finalidad de establecer los puntos críticos del procedimiento de encapsulación en donde pudiera perderse la carga fágica, se procedió a determinar la pérdida del Bacteriófago en el material y soluciones utilizadas.

Como primer paso, se realizó una prueba de gota en la solución de CaCl₂. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 15, donde se evidencia la presencia del Bacteriófago S₁ a partir de la observación de placas líticas (marcadas en rojo).

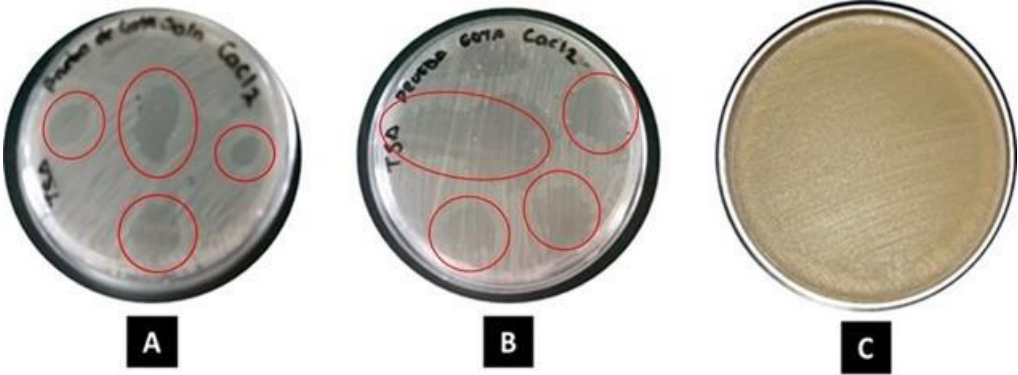


Figura 15. Presencia de zonas líticas correspondientes a la solución de CaCl₂ posterior a la encapsulación del Bacteriófago S₁
A: Solución de CaCl₂ utilizada en el proceso de encapsulación con alginato 1.
B: Solución de CaCl₂ utilizada en el proceso de encapsulación con alginato 2.
C: Control negativo.

Posteriormente, se llevó a cabo la cuantificación fágica en el material y soluciones utilizados los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 8, donde se aprecia que la mayor pérdida del Bacteriófago se da en el matraz utilizado para contener la mezcla fago-alginato. Por otro lado, la Tabla 9 muestra que el alginato 1 presenta mayor porcentaje de pérdida con durante el proceso de encapsulación del Bacteriófago S₁

Tabla 8. Título fágico presente en material y soluciones utilizadas durante la encapsulación del Bacteriófago S₁		
Material o Solución	Título fágico promedio obtenido (UFP)	
	Alginato 1	Alginato 2
Matraz	1.31x10¹⁰ ± 0.15	9.1x10⁹ ± 0.15
Embudo	1.91x10⁹ ± 4.22	1.61x10⁹ ± 0.30
Solución de CaCl₂	5.16x10⁷ ± 0.40	8.28x10⁷ ± 0.97
Agua de lavado	4.29x10⁶ ± 0.40	3.70x10⁶ ± 0.97

Tabla 9. Porcentaje de pérdida del Bacteriófago S₁ con dos diferentes alginatos			
Alginato	Promedio del título fágico adicionado al proceso de encapsulación (UFP)	Título fágico recuperado de material y soluciones (UFP)	Porcentaje de pérdida (%)
1	1.19x10¹¹	1.50x10¹⁰	12.60%
2		1.08x10¹⁰	9.07%

Finalmente, al analizarse la eficacia de encapsulación (tabla 7), los títulos obtenidos para material y soluciones (tabla 8) y el porcentaje de pérdida (tabla 9), se encontró que el alginato 1 contenía mejor al Bacteriófago, por ello se decidió continuar con éste en los subsecuentes experimentos.

11.4 Evaluación de la liberación del Bacteriófago S₁ a pH 6.9 en modelo *in vitro*

Como se mencionó en el apartado de metodología, la evaluación de la liberación *in vitro* del Bacteriófago contenido en las esferas de alginato se realizó por el método de agitación continua con perlas de vidrio. La figura 16 muestra que el Bacteriófago S₁ es liberado de la esfera de alginato tras 8 h de agitación continua con un gramo de perlas (imágenes C y D). Por otro lado, la Figura 17 muestra que tras la agitación continua con diez gramos de perlas de vidrio, la liberación del Bacteriófago S₁ se lleva a cabo a partir de las 3 h (imágenes B, C y D) observando la presencia de zonas líticas.

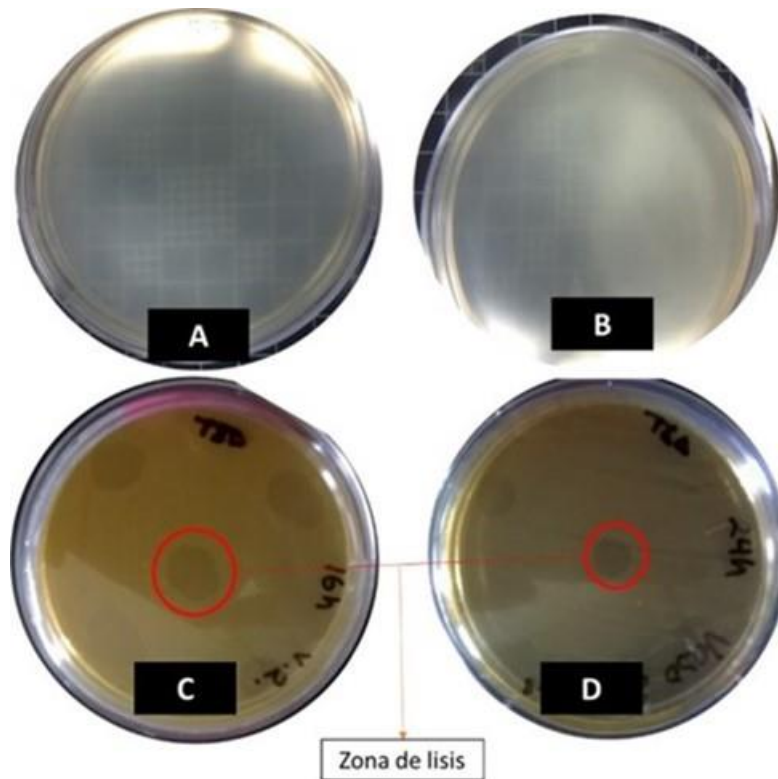


Figura 16. Determinación de la presencia del Bacteriófago S₁ en esferas de alginato 1 posterior a la agitación continua con un gramo de perlas de vidrio a pH 6.9

A: Tiempo 0; B: Agitación durante 8 h; C: Agitación durante 16 h; D: Agitación durante 24

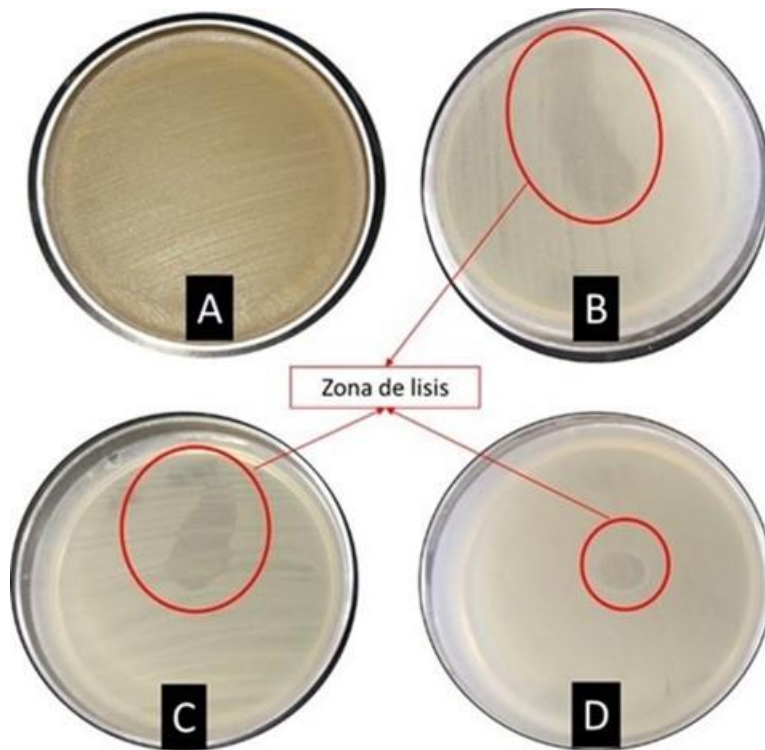


Figura 17. Determinación de la presencia del Bacteriófago S₁ en esferas de alginato 1 posterior a la agitación continua con diez gramos de perlas de vidrio a pH 6.9

A: Tiempo 0; B: Agitación durante 3 h; C: Agitación durante 12 h; D: Agitación durante 21 h

11.5 Evaluación de la liberación del Bacteriófago S₁ en modelo *in vivo* (*Gallus gallus domesticus*)

Con el fin de analizar el paso de las perlas en el TGI del pollo se realizó una cinética de seguimiento. Se sacrificó dos animales al azar a 1, 3, 5 y 17 h, se diseccionó y buscó las perlas en TGI del pollo. Las esferas de alginato solo se visualizaron en el buche de pollos sacrificados 1 h post-administración como se muestra en la Figura 18.

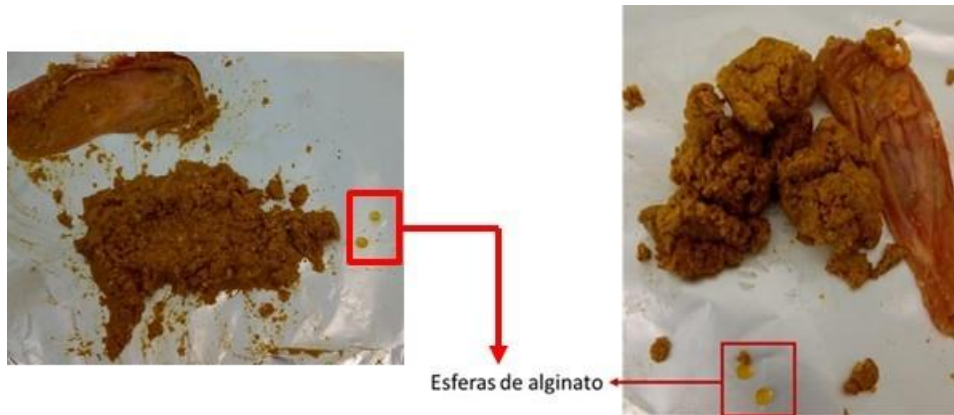


Figura 18. Fotografía del buche de un pollo sacrificado 1 h posterior a la administración donde se observa la presencia de esferas de alginato 1

Con respecto a la determinación de la presencia de Bacteriófago S_1 en buche, molleja, ciegos y duodeno mediante prueba de gota, la tabla 10 resume los hallazgos encontrados. Se observa que la presencia de zonas líticas deja de apreciarse a partir de las 3 h, en el caso de la molleja ninguna de las pruebas de gota desarrollada mostró la presencia de zonas líticas. Por otro lado, en la Figura 19 observamos las zonas líticas (marcadas en rojo) producidas por el Bacteriófago S_1 presente en las muestras de buche y ciegos a los tiempos de 1 y 3 h respectivamente.

Tabla 10. Presencia de zonas líticas del Bacteriófago S_1 en TGI de pollos posterior a la administración de esferas de alginato 1

Órgano	Tiempo (h)							
	1		3		5		17	
	Pollo 1	Pollo 2	Pollo 3	Pollo 4	Pollo 5	Pollo 6	Pollo 7	Pollo 8
Buche	+	+	-	+	-	+	-	-
Molleja	-	-	-	-	-	-	-	-
Duodeno	-	-	-	+	-	+	-	-
Ciegos	-	-	+	+	-	+	-	-

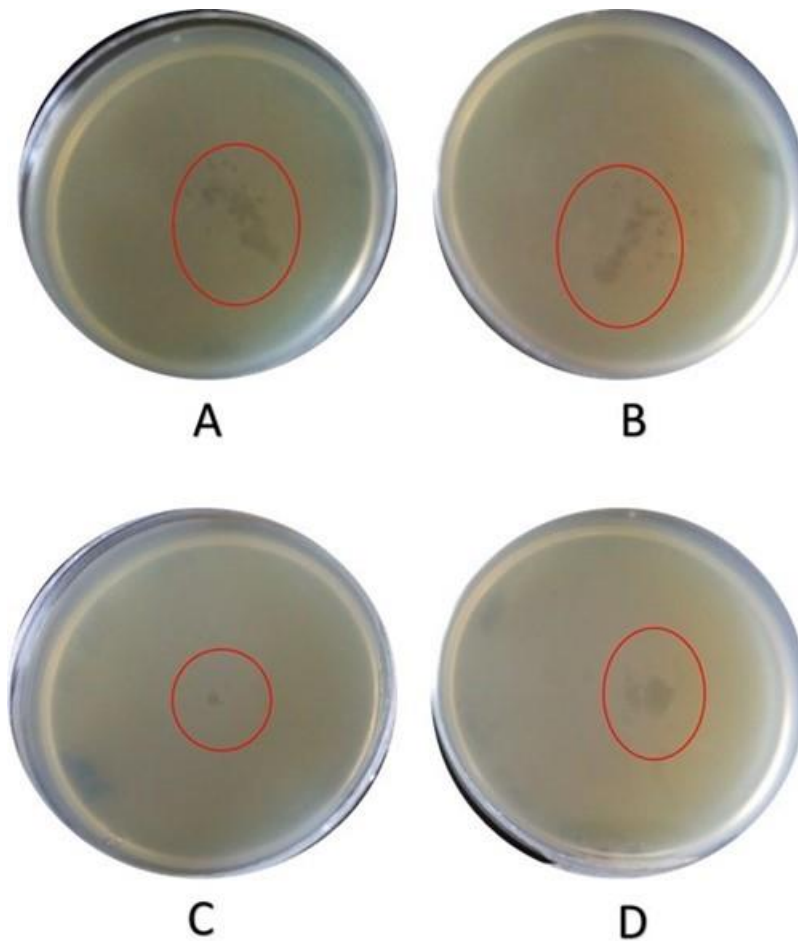


Figura 19. Presencia de zonas líticas (encerradas) obtenidas de muestras de buche y ciegos de pollo posterior a la administración de esferas de alginato 1 conteniendo Bacteriófago S₁
Nota: **A)** Zona lítica de buche del Pollo 1, 1 h posterior a la administración. **B)** Zona lítica de buche del Pollo 2, 1 h posterior a la administración. **C)** Zona lítica de ciegos del Pollo 1, 3 h posteriores a la administración. **D)** Zona lítica de ciegos del Pollo 2, 3 h posteriores a la administración

11.6 Eliminación de *Salmonella enteritidis* en modelo *in vivo* (*Gallus gallus domesticus*)

11.6.1 Determinación de las bacterias presentes en TGI de pollos a su llegada al animalario

Los resultados de los hisopados cloacales obtenidos de los pollos a su llegada al animalario de la Facultad de Farmacia UAEM se muestran en la Figura 20, donde se aprecia el

crecimiento de colonias rosadas, lactosa positiva, a las cuales se realizó tinción Gram y pruebas bioquímicas dando como resultados, bacilos Gram negativos, móviles, catalasa positivos, incapaces de producir ácido sulfhídrico. En base a su morfología y las pruebas bioquímicas realizadas se determinó que dichas bacterias pertenecían al género *Escherichia*.



Figura 20. Crecimiento bacteriano de hisopados cloacales en Agar S-S

11.6.2 Determinación de la infección por *Salmonella enteritidis* en modelo *in vivo*

Los resultados de hisopados cloacales obtenidos a los tres, cinco y siete días posteriores a la infección con *Salmonella entérica serovar enteritidis* se muestran en las Figura 21 a la Figura 23. Donde se observa que al tercer y quinto día post infección todos los grupos presentaron crecimiento de colonias bacterianas no productoras de ácido sulfhídrico, lo que evidencia la ausencia de *Salmonella enteritidis*. Por otro lado, al séptimo día solo el grupo CTR mostró crecimiento de colonias lactosa positivo no productoras de ácido sulfhídrico, mientras que el resto de los grupos mostraron crecimiento de colonias circulares de coloración negra debido a la producción de ácido sulfhídrico, concordantes con las características del género *Salmonella* en el medio S.S. En ese momento se confirmó que los pollos se encontraban infectados con *Salmonella entérica serovar enteritidis*.

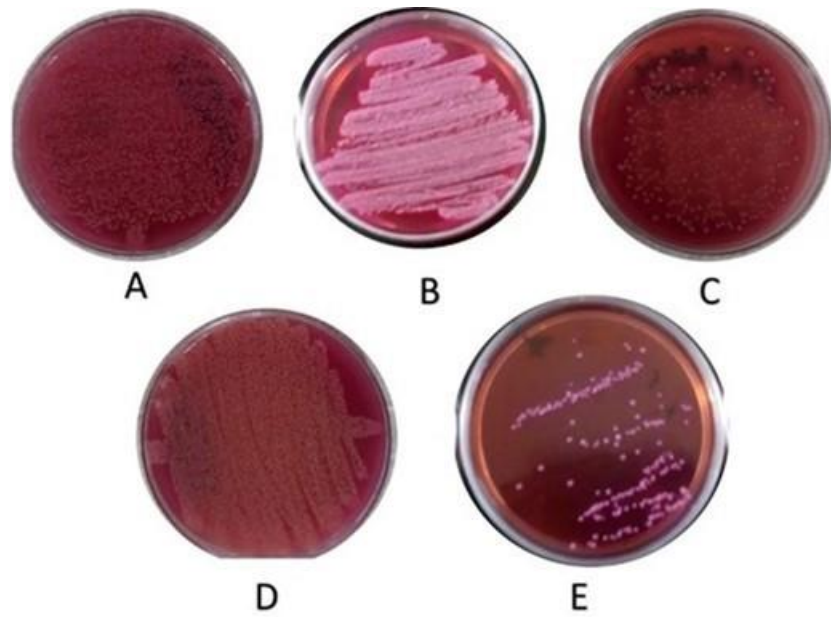


Figura 21. Crecimiento bacteriano correspondiente a hisopados cloacales obtenidos 3 días post-infección con *Salmonella enteritidis*
Nota: A) ST, B) ANT, C) EFS₁, D) PLA, E) CTR (no infectado)

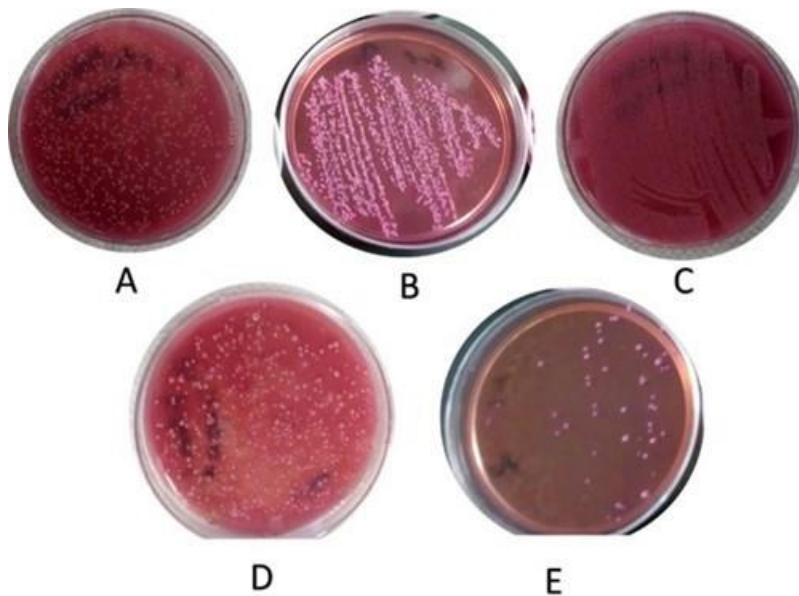


Figura 22. Crecimiento bacteriano correspondiente a hisopados cloacales obtenidos 5 días post-infección con *Salmonella enteritidis*.
A) ST, B) ANT, C) EFS₁, D) PLA, E) CTR (no infectado)

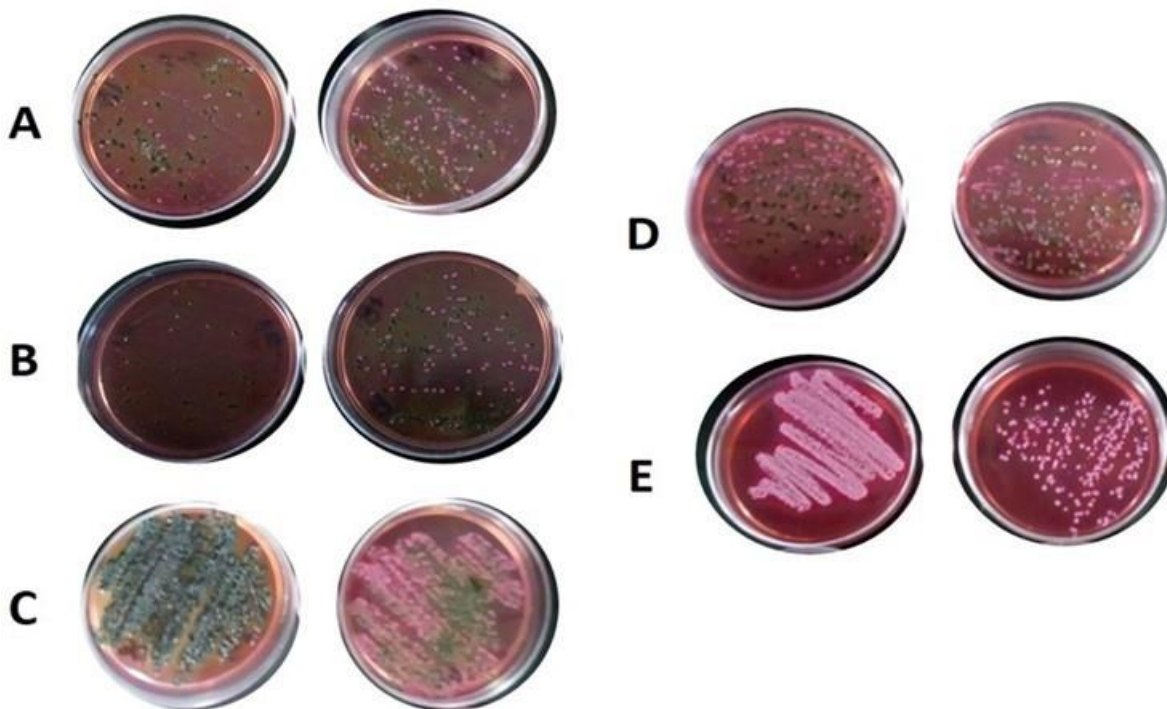


Figura 23. Crecimiento bacteriano correspondiente a hisopados cloacales obtenidos 7 días post-infección con *Salmonella enteritidis*.

A) ST, B) ANT, C) EFS₁, D) PLA, E) CTR (no infectado)

11.6.3 Reducción de *Salmonella enteritidis* en pollos infectados

La reducción de *Salmonella enteritidis* se determinó con base en los resultados de los hisopados cloacales obtenidos 24 y 48 h posterior a la administración del tratamiento como se indica en el punto 10.9.3. La Figuras 24 y 25 resumen que los grupos ANT y EFS₁ (B y C, respectivamente) muestran eliminación de *S. enteritidis* de manera equiparable. Los resultados mostrados en la Figura 24 sugieren que el antibiótico elimina también las bacterias inicialmente presentes en la microbiota de los pollos, notando que el crecimiento de las colonias es menor que en el resto de los grupos, en contraste con el tratamiento experimental, que elimina de manera específica a la bacteria patógena protegiendo la microbiota del ave.

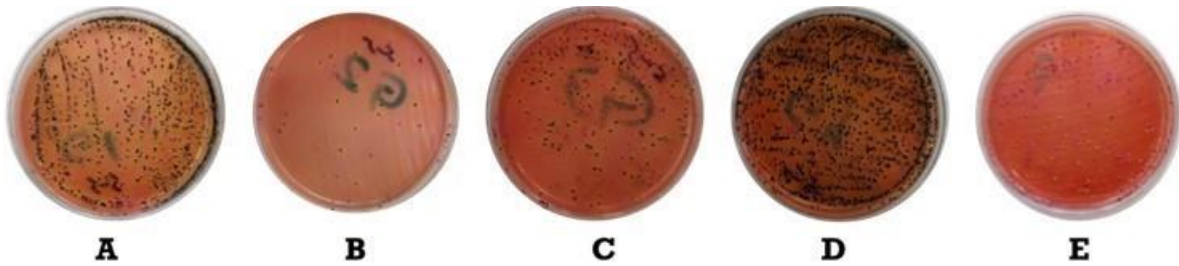


Figura 24. Crecimiento bacteriano correspondiente a hisopados cloacales obtenidos 24 h post tratamiento.

NOTA: A) ST, B) ANT, C) EFS₁, D) PLA, E) CTR (no infectado)



Figura 25. Crecimiento bacteriano correspondiente a hisopados cloacales obtenidos 48 post tratamiento.

NOTA: A) ST, B) ANT, C) EFS₁, D) PLA, E) CTR (no infectado)

Por otro lado, con la finalidad de determinar la presencia del Bacteriófago S₁ se analizaron las heces presentes en las camas de los grupos CTR y EFS₁, la Figura 26 muestra la presencia de placas líticas correspondiente al Bacteriófago S₁ en heces del grupo CTR lo que corrobora que la esfera de alginato es capaz de permitir la liberación del fago en el tracto intestinal de pollos, y demuestra que aún al ser eliminado en heces el Bacteriófago S₁ mantiene su capacidad infectiva contra *Salmonella* lo que puede ayudar en la prevención de reinfección por vía fecal-oral en pollos.

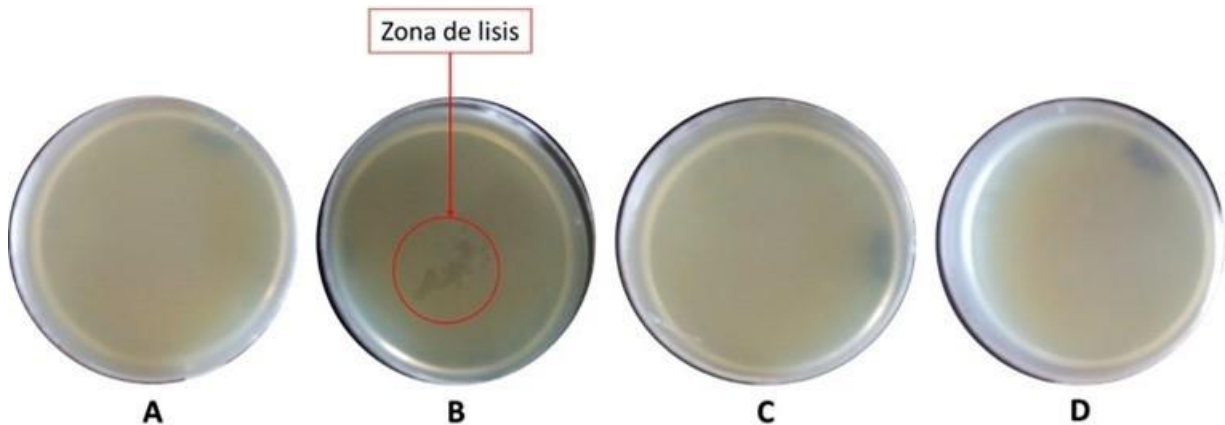


Figura 26. Determinación de zonas líticas en heces de pollos posterior a la administración de tratamiento con esferas de alginato 1 conteniendo Bacteriófago S₁
NOTA: **A)** Muestra del Grupo 3, 24 h posterior a la administración, **B)** Muestra del Grupo Control, 24 h posteriores a la administración, **C)** Grupo 3, 48 h posteriores a la administración, **D)** Grupo Control, 48 h posteriores a la administración.

11.7 Influencia del alginato en la eliminación de *Salmonella enteritidis* (ensayo *in vitro*)

Con la finalidad de determinar si el alginato influye en la eliminación de *Salmonella enteritidis* se comparó cualitativamente el crecimiento de la cepa al exponerse a esferas de alginato conteniendo y no conteniendo el Bacteriófago S₁. Los resultados obtenidos se muestran en las Figura 27 y 28, y sugieren que el alginato no presenta ningún efecto bactericida frente a la cepa indicadora, ya que es posible notar a partir de la presencia de *Salmonella enteritidis* que el cultivo expuesto a esferas de alginato sin Bacteriófago; presenta mayor crecimiento comparado con el cultivo expuesto a esferas con Bacteriófago.

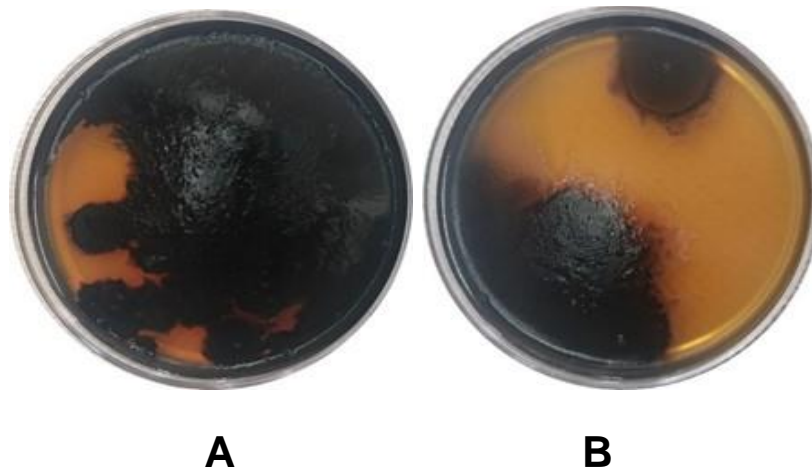


Figura 27. Crecimiento de *Salmonella enteritidis* tras 24 h de exposición a esferas de alginato con y sin Bacteriófago

A) Muestra correspondiente al cultivo con esferas de alginato vacías

B) Muestra correspondiente al cultivo con esferas de alginato conteniendo Bacteriófago S₁

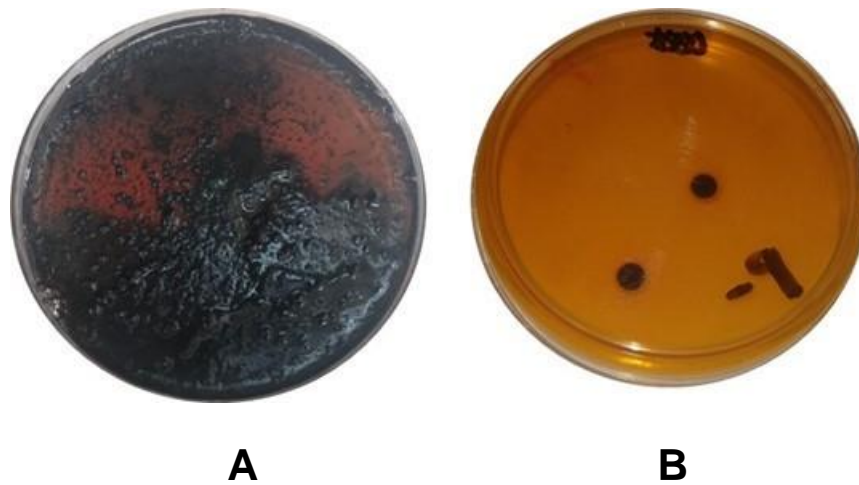


Figura 28. Crecimiento de *Salmonella enteritidis* tras 48 h de exposición a esferas de alginato con y sin Bacteriófago.

A) Muestra correspondiente a una dilución de 10^{-9} del cultivo expuesto a esferas de alginato vacías

B) Muestra correspondiente a una dilución de 10^{-9} del cultivo expuesto a esferas de alginato conteniendo Bacteriófago S₁

12. DISCUSIÓN

Dentro de las enfermedades de transmisión alimentaria, las ocasionadas por *Salmonella entérica*, se distinguen por la distribución cosmopolita de su agente causal, pues se ha encontrado en mascotas, agua y alimentos como, carne, leche, huevo y embutidos (Afshari y cols, 2018; Organización Mundial de la Salud, 2015; Méndez y cols, 2011). Representando un problema grave en humanos y el sector avícola en México, ya que la carne de pollo y huevo son alimento altamente consumidos; se estima que en el año 2018 el consumo anual per cápita de carne de pollo y huevo fue de 28.42 y de 22.96 kg respectivamente (Unión Nacional de Avicultores, 2018).

Debido al incremento de cepas de *Salmonella* resistentes a fluoroquinolonas y la restricción del uso de antibióticos en el sector avícola, la OMS ha solicitado a la comunidad científica buscar tratamientos efectivos que eviten la infección de las aves de corral y el uso indiscriminado de los antibióticos sin mermar la producción y seguridad de este tipo de alimento (Organización Mundial de la Salud, 2017).

Una estrategia que ha retomado fuerza en los últimos años es el uso de Bacteriófagos (Fagoterapia) ya que han demostrado ser una opción efectiva en el tratamiento de enfermedades infecciosas bacterianas, por lo que diversos autores han desarrollado diversas estrategias para la entrega de Bacteriófagos via oral (Górski y cols, 2018; Malik y cols, 2017; Choińska y cols, 2015).

Existen una amplia cantidad de estudios enfocados en el uso de la Fagoterapia en el sector avícola que 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*. El alginato es uno de los biopolímeros mayormente utilizados para obtención de formulaciones de Bacteriófagos para liberación en TGI de aves de corral (Moghtader y cols, 2017; Wernicki y cols, 2017).

Por lo anterior, el presente trabajo se enfocó en obtener un sistema de esferas de alginato probando dos marcas comerciales distintas, con el fin de seleccionar uno de ellos y evaluar su capacidad de brindar protección al Bacteriófago S₁, lítico para *Salmonella enteritidis*, como un sistema de entrega vía oral en pollos (*Gallus gallus domesticus*).

Para empezar con los ensayos se determinó la viscosidad que es una de las propiedades más importantes de las soluciones polimérica; en el presente trabajo, se obtuvieron valores de viscosidad de 192.40 mPa•s, 241.42 mPa•s para las soluciones al 2% del alginato 1 y 2 respectivamente, estos resultados muestran que el alginato 1 es de baja viscosidad mientras que el alginato 2 es de viscosidad media; de acuerdo a lo referido por la empresa Alginate Industrie, que menciona que soluciones de alginato de baja viscosidad son aquellas desde 50 mPa•s hasta 200 mPa•s y de media viscosidad desde 200 mPa•s hasta 450 mPa•s: además, sugieren que el alginato 1 formara esferas de mejor calidad, por el contrario, el alginato 2 al tener un mayor grado de polimerización las esferas obtenidas serán duras, lo que quizá disminuya la eficacia de la encapsulación y liberación del Bacteriófago S₁. (Muniswamy, y cols, 2000; Avedaño y cols, 2013; ECURED, 2017)

Una vez obtenida la viscosidad de las soluciones se procedió a determinar la eficacia de encapsulación, a partir de la maceración de las esferas; para el alginato 1 se adiciono un promedio de 2.82×10^{11} UFP, mientras que para el alginato 2 el título fágico promedio añadido fue de 3.05×10^9 ; posteriormente se determinó un promedio de 8.80×10^{10} UFP y 7.36×10^8 UFP retenidas en las esferas, lo que representa una eficacia de encapsulación del 31.20% y 24.13% para el alginato 1 y 2 respectivamente; los resultados obtenidos muestran que la eficacia de encapsulación obtenida para el Bacteriófago S₁ es significativamente menor con respecto a otros trabajos de encapsulación de Bacteriófagos entre los que destacan el llevado a cabo por Moghtader y cols (2017) que encapsularon al Bacteriófago T4 en esferas de alginato al 2% (p/v) obteniendo una eficacia de encapsulación de 90%, y el de Yongsheng y cols (2008), quienes a partir de un título de 10^8 UFP/ml encapsularon al Bacteriófago Félix O₁ microesferas de alginato obteniendo una eficacia de encapsulación del 93.3%.

Con base en los resultados obtenidos de eficacia de encapsulación y con la finalidad de determinar las fases críticas del proceso de encapsulación donde pudiera perderse la carga fágica, se procedió a cuantificar el porcentaje de pérdida en el material y soluciones utilizadas, los resultados obtenidos indican que durante el proceso de encapsulación se lleva a cabo una pérdida correspondiente al 12.68% y 9.07% para el alginato 1 y 2, respectivamente; demostrando que la mayor cantidad de placas líticas es observada en el matraz, por lo que se sugiere que la mezcla fago – alginato se realice directamente en el embudo de separación, favoreciendo así la disminución de la pérdida del Bacteriófago antes del proceso. Por otro lado, los resultados sugieren que es posible que la eficacia la

encapsulación del Bacteriófago S₁ es mayor al valor obtenido en el ensayo previo; a pesar de que la maceración ha sido utilizada para determinar la eficacia de encapsulación (Vargas y cols, 2004), quizá la técnica no favorezca la liberación total del Bacteriófago, manteniéndolo retenido al fago en los remanentes de la matriz polimérica de alginato; recientemente Boggionea y cols (2017) reportaron la utilización de una solución denominada “Broken-Microsphere” que contenía citrato de sodio 50 mM, bicarbonato de sodio 0.2 M y Tris-HCl 50 mM (pH 7,5) para la determinación de eficacia de encapsulación del Bacteriófago UFV-AREG1 contenido en esferas de alginato; por lo que es importante que en estudios posteriores, la eficacia de encapsulación sea evaluada mediante esta técnica. Finalmente cabe señalar que los trabajos de Moghtader y cols (2017) y Yongsheng y cols (2008) se utilizan microesferas recubiertas con quitosan, lo que puede influir en la con la diferencia en las eficacias de encapsulación obtenidas.

Posteriormente, se procedió a realizar la liberación *in vitro* utilizando agitación continua con solución salina a pH 6.9 para las perlas obtenidas con alginato 1, los resultados indican que la liberación del Bacteriófago S₁ se encuentra relacionada con fuerza de fricción brindada por la cantidad de perlas de vidrio añadidas (Chiappetta y cols, 2006; Visceras y cols, 2010) Es posible observar que a mayor cantidad de perlas de vidrio el Bacteriófago es liberado más rápidamente, observando la presencia de zonas líticas a las 3 h cuando se utilizaron diez gramos de perlas de vidrio, y hasta las 16 h cuando se utilizó solo un gramo; esto es concordante con lo reportado por Hjorth y Karlsen (2002) quienes indican que liberación de principios activos retenidos en esferas de alginato se modula por difusión mediante el hinchamiento y la disolución/erosión en la periferia de la matriz, por lo que a mayor cantidad de perlas de vidrio se promueve la erosión permitiendo liberación del contenido de las esferas a menor tiempo; este resultado sugiere que de la misma manera la liberación del Bacteriófago S₁ se vería promovida al exponerse *in vivo* debido a que las aves de corral, ingieren piedras que favorecen el aplastamiento y pulverización de granos y alimento presente en la molleja, (Roa y Meruane, 2012)

Por lo anterior, se procedió a realizar una cinética de liberación del Bacteriófago S₁ en un modelo *in vivo*, primeramente, se visualizó la presencia de esferas en el TGI de *Gallus gallus domesticus*, observando la presencia de esferas intactas solamente en el buche de los pollos sacrificados 1 h post-administración lo cual se puede deber a que fue muy poco el tiempo de exposición de las perlas en el buche de los pollos; posteriormente se determinó la presencia del Bacteriófago S₁ en los diversos compartimentos del TGI, donde los

resultados obtenidos mostraron presencia de zonas líticas en el buche a 1 h post-administración y en duodeno y ciegos a 3 y 5 h post-administración. Estos resultados sugieren que las esferas de alginatos son desintegradas en la molleja de los pollos, la cual tiene como función el mezclado y molienda del alimento (Roa y Meruane, 2012), sin embargo, la presencia de zonas de lisis no se visualiza en este segmento, debido a la sensibilidad del Bacteriófago S₁ a pH < 4.5, recordando que la literatura menciona que el contenido de la molleja se encuentra pH 2.5. (Segundo-Arizmendi y cols, 2017; Roa y Meruane, 2012) aunado a esto, y concordante con los resultados del ensayo de liberación *in vitro* se sugieren que la digestión concomitante con el alimento podría anticipar la liberación del Bacteriófago. Por otro lado, se corroboró que el Bacteriófago S₁ es capaz de alcanzar las estructuras de duodeno y ciegos, lo que se sugiere que la formulación con esferas de alginato 1 garantiza la llegada del Bacteriófago a estos sitios, brindando protección frente a la exposición al pH ácido de la molleja.

Por último, y con el fin de determinar si el sistema de alginato conteniendo Bacteriófago S₁ es capaz de reducir la infección por *Salmonella* se procedió a realizar un ensayo *in vivo* utilizando un total de 30 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 el TGI de los pollos a partir de muestras hisopados cloacales sembradas en Agar S-S, determinando la presencia de bacilos Gram negativos, lactosa positivos, no productores de ácido sulfhídrico, no concordantes con las características de *Salmonella spp* (Agbaje y cols, 2011)

Una vez asegurado la ausencia de bacterias del género *Salmonella*, se procedió a realizar la infección inoculando a *Gallus gallus domesticus* vía oral con tres cargas bacterianas de *S. enteritidis* con títulos de 4x10⁶ UFC, 4x10⁷ UFC y 25ml de bacterias con un título de 1x10⁸ UFC; esto con base a que la literatura indica que la infección por *Salmonella spp* depende principalmente de la ingesta de la cantidad de inóculo, que para originar una infección sintomática este varía desde 10⁶ hasta 10⁹ UFC (Herrera y Jabib, 2015); posteriormente se determinó el crecimiento de *S. enteritidis* en Agar S-S como colonias redondas, de coloración negruzca debido a la producción de ácido sulfhídrico característico de este género bacteriano (Brenner y Staley, 2000) en los hisopados cloacales obtenidos hasta el séptimo día post infección (Figura 22), esto debido a que el periodo de incubación de *Salmonella* en aves de corral el periodo varía desde cuatro a siete días, colonizando el

tracto intestinal de las aves principalmente la porción cecal (ciegos) y cloaca, (Herrera y Jabib, 2015; Rincón-Acero y cols, 2011; Andreatti Filho, y cols, 2007).

Posteriormente y tras identificar la presencia de *S. enteritidis*, se procedió a administrar el tratamiento como se indica en el punto 11.9.3; los resultados post tratamiento, muestran que los grupos tratados con antibiótico (ANT) y esferas de alginato conteniendo la Bacteriófago S₁ (EFS₁) mostraron reducción en el crecimiento de *Salmonella enteritidis* a partir de las 48 h post tratamiento donde se observó crecimiento de bacterias rosas no productoras de ácido sulfhídrico, iguales a las presentes en el grupo Control (CTR) al cual no se administró ningún tratamiento, estos resultados indican que las esferas de alginato conteniendo al Bacteriófago S₁ permiten la eliminación de *Salmonella enteritidis* en el modelo *Gallus gallus domesticus* empleado; además es posible notar que el crecimiento bacteriano en el grupo ANT es menor con respecto al grupo EFS₁, lo que sugiere que antibiótico no solo elimina a *Salmonella enteritidis*, sino a las bacterias inicialmente presentes en la microbiota de los pollos, en contraste con el tratamiento de esferas con Bacteriófago, que elimina de manera específica a la cepa indicadora, protegiendo de esta manera la microbiota de *Gallus gallus domesticus*. (Cardona-Castro, y Figueroa-Ochoa, 2003; Verdugo-Rodríguez, 2005; Avedaño-Romero, y cols, 2013; Herrera y Jabib, 2015) Los resultados obtenidos son concordantes con otros trabajos realizados como el de Andreatti Filho y cols (2007) quienes evaluaron la reducción de *Salmonella enteritidis* con dos Bacteriófagos no encapsulados por separado y en coctel, donde a las 48 h post tratamiento a partir de muestras de ciegos no se observó el crecimiento de *Salmonella enteritidis* tanto en los Bacteriófagos por separado como en el coctel de ambos; por otro lado, Colom y cols (2015) determinaron la reducción *In vivo* de *Salmonella typhimurium* utilizando un coctel de Bacteriófagos 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 cols (2012) quienes administraron una solución de coctel de Bacteriófagos 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.

Así mismo, dado que el grupo infectado y tratado con esferas de alginato vacías (PLA); mostro reducción en el crecimiento de *Salmonella enteritidis*; se realizó un ensayo cualitativo *in vitro*, con el fin de determinar la influencia del alginato en la eliminación de *Salmonella enteritidis*; los resultados obtenidos indican que las esferas de alginato sin

Bacteriófago no reducen el crecimiento de *Salmonella enteritidis* presentándose un mayor crecimiento de *Salmonella enteritidis* con respecto al cultivo expuesto a esferas conteniendo Bacteriófago, lo que nos garantiza que el alginato no tiene actividad en la eliminación de *Salmonella enteritidis*. Finalmente, se analizó la presencia del Bacteriófago S₁ en heces de las camas de los grupos control (CTR) y con esferas de alginato (EFS₁) la Figura 24 que el Bacteriófago S₁ es eliminado en heces del grupo CTR lo sugiere que, tras la liberación del fago en el tracto intestinal de pollos, y aún al ser eliminado en heces el Bacteriófago S₁ mantiene su capacidad infectiva contra *Salmonella* lo que puede ayudar en la prevención de reinfección por vía fecal-oral en pollos. Hasta el momento de realizar este trabajo no se encontraron reportes en los cuales se evaluó la presencia de Bacteriófagos en las camas de los animales de experimentación posteriores al tratamiento de los pollos con Bacteriófagos.

13. CONCLUSIONES

1. Se logró desarrollar una formulación sólida para el Bacteriófago S₁ en esferas de alginato capaz de reducir la infección por *Salmonella* en *Gallus gallus domesticus*
2. Se determinó que el alginato 1 a una concentración del 2% y viscosidad de 192.40 mPa*s tiene una eficacia de encapsulación del 31.20% y se logró determinar que el 12.68% de la pérdida se encuentra en el material y las soluciones utilizadas.
3. Se determinó que el alginato 2 a viscosidad de 241.42 mPa*s tiene una eficacia de encapsulación del 24.13%, y se logró determinar que el 9.07% de la pérdida se encuentra en el material y las soluciones utilizadas
4. Se estableció que durante el proceso de encapsulación la mayor pérdida del Bacteriófago S₁ se presenta en el matraz utilizado para contener la solución fago-alginato.
5. Los ensayos *In vitro* a pH 6.9 mostraron que la agitación mecánica influye de manera directa en la liberación del Bacteriófago S₁
6. Se comprobó en ensayos *In vivo* que las esferas de alginato 1 brindan protección al Bacteriófago S₁ tras su paso por el TGI de pollos garantizando su llegada a duodeno y ciegos.
7. Se determinó en ensayos *In vivo* que la formulación de Bacteriófago S₁ encapsulado en esferas de alginato 1 al 2% permite la reducción de la infección por *Salmonella enteritidis* en aves de corral
8. Se demostró que el Bacteriófago S₁ mantiene su capacidad infectiva después de ser eliminado en las heces de *Gallus gallus domesticus*, lo que puede disminuir el riesgo de re-infección por la vía fecal-oral a las aves en un mismo espacio.

14. PERSPECTIVAS

- 1.- Aumentar la eficacia de encapsulación a partir del recubrimiento de las esferas de alginato conteniendo al Bacteriófago S₁ con un polímero como el quitosan
- 2.- Evaluar si la concentración de la solución de CaCl₂ y el tiempo de contacto de las esferas de alginato en la solución de CaCl₂ son factores que intervienen en la retención del Bacteriófago S₁
- 3.- Disminuir el tamaño de partícula de las esferas de alginato para mejorar la administración vía oral en el modelo *Gallus gallus domesticus*

15. REFERENCIAS

- Ackermann, H. W. (2001). Frequency of morphological phage descriptions in the year 2000. *Archives of Virology*, 146(5), pp. 843–857.
- Agbaje, M., Begum, R.H., Oyekunle M.A., Ojo O.E., y Adenubi, O.T. (2011) Evolution of *Salmonella* nomenclature: a critical note. *Folia Microbiol*, 56, pp.497-503. DOI:10.1007/s12223-011-0075-4
- Adil, S., Banday, T., Bhat, G. A., Mir, M. S., y Rehman, M. (2010). Effect of dietary supplementation of organic acids on performance, intestinal histomorphology, and serum biochemistry of broiler chicken. *Veterinary Medicine International*, 2010 DOI:10.4061 / 2010/479485
- Afshari, A., Baratpour, A., Khanzade, S., y Jamshidi, A. (2018). *Salmonella Enteritidis* and *Salmonella Typhimurium* identification in poultry carcasses. *Iranian journal of microbiology*, 10(1), pp. 45-50. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6004630/>
- Alerte, V., Cortés, S., Díaz, J., Vollaire, J., Espinoza, M. E., Solari, V., Cerda, J., y Torres, M. (2012). Brotes de enfermedades transmitidas por alimentos y agua en la Región Metropolitana, Chile (2005-2010). *Revista Chilena de Infectología*, 29(1), pp. 26-31. Recuperado de <https://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182012000100004>
- 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>
- 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>
- Azeredo, J., y Sutherland, I. W. (2008). The use of phages for the removal of infectious biofilms. *Current pharmaceutical biotechnology*, 9(4), pp. 261-266.

Bardinaa, Carlota., Spricigoa, Denis A., Cortésa, Pilar., y Llagosteraa, Montserrat. (2012) Significance of the Bacteriophage treatment schedule in reducing *Salmonella* colonization of Poultry. *Applied and Environmental Microbiology*, 78 (18), pp. 6600 – 6607.

Barreto, M., Castillo-Ruiz, M., y Retamal, P. (2016) *Salmonella enterica*: a review or the trilogy agent, host and environment and its importance in Chile. *Revista Chilena de Infectología*, 33(5), pp. 547-557. Recuperado de <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rci/v33n5/art10.pdf>

Bielke, L. R., Higgins, S. E., Donoghue, A. M., Donoghue, D. J., Hargis, B. M., y Tellez, G. (2007). Use of wide-host-range bacteriophages to reduce *Salmonella* on poultry products. *International Journal of Poultry Science*, 6(10), pp. 754–757.

Boggionea, D., Batalhaa, L., Gontijoa, M., Lopez, M., Teixeirac, M., Santos, I., Mendonçaa, R. (2017) *Colloids and Surfaces B*, 158. pp. 182-189.

Brenner, F. W., Villar, R. G., Angulo, F. J., Tauxe, R., y Swaminathan, B. (2000). *Salmonella* Nomenclature. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(7), pp. 2465–2467. Recuperado de <http://jcm.asm.org/content/38/7/2465.full#cited-by>

Cancho-Grande, B., García-Falcón, M., Simal-Gándara, J. (2000). El uso de los antibióticos en la alimentación animal: perspectiva actual. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 3 (1), pp. 39-47. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=72430206>

Cardona-Castro, Nora María., Sánchez-Jiménez, Miryan Margot. (2003) Mecanismos de interacción de *Salmonella* con la mucosa intestinal. *Asociación Colombiana de Infectología*. Recuperado de: https://www.researchgate.net/publication/259822841_Mecanismos_de_interaccion_de_Salmonella_con_la_mucosa_intestinal

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>

Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC). National Antimicrobial Resistance Monitoring System for Enteric Bacteria (NARMS): *Human Isolates Surveillance Report for 2015* (Final Report). Atlanta, Georgia: U.S. Department of Health and Human Services, CDC, 2018 Recuperado de https://www.cdc.gov/narms/pdf/2015-NARMS-Annual-Report-cleared_508.pdf#page=17

Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC). Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet): FoodNet Surveillance Report for 2011 (Final Report). Atlanta, Georgia: U.S. Department of Health and Human Services. Recuperado de: https://www.cdc.gov/foodnet/PDFs/2011_annual_report_508c.pdf

Chávez-de la Peña, M. E., Higuera, A. L., Huertas, M. A., Báez, R., Morales de León, J., Arteaga, F., Rangel, S., y Ponce de León, S. (2001). Brote por *Salmonella enteritidis* en trabajadores de un hospital. *Salud Pública de México*, 43(3), pp. 211-216. Recuperado de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S003636342001000300006&lng=es&tlng=es.

Chiappetta, G., Gergic, E., Legaspi, M. (2006) Comprimidos bioadhesivos formulados con excipientes hidrofílicos para uso bucofaríngeo. *Acta Farm Bonaerense*, 25(3), pp. 360-365.

Choińska-Pulita, A., Mitulab, P., Śliwkaa, P., Łabaa, W., Skaradzińskaa, A. (2015). Bacteriophage encapsulation: Trends and potential applications. *Trends in Food Science and Technology*. 45 (2), pp. 212-221.

Clark, Jason R., March, John B. (2006) Bacteriophages and biotechnology: vaccines, gene therapy and antibacterials. *Trends Biotechnol*, 24(5), pp. 212-218. doi:10.1016/j.tibtech.2006.03.003.

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/es/>

Colom, J., Cano-Sarabia, M., Otero, J., Cortés, P., MasPOCH, D., y Llagosteraa, 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.

Domingo-Calap, P., y Delgado-Martínez, J. (2018). Bacteriophages: Protagonists of a Post-Antibiotic Era. *Antibiotics*, 7(3), 66. doi:10.3390/antibiotics7030066 Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6163168/>

ECURED. *Alginatos* Disponible en: <http://www.ecured.cu/Alginato>

Empresa Microos Food Safety. <http://www.micreos.com/>

Empresa Intralytix. <http://www.intralytix.com/>

Fernández, J. R., Purchades, Y., y Vispo, N. S. (2004) Capítulo 3: Los Bacteriófagos en la biología molecular pasada y actual. *En Combinatoria Molecular*, 1st ed., pp. 41-56. Recuperado de <http://elfoscientiae.cigb.edu.cu/PDFs/Muestras/chapter03.pdf>

Figuroa-Ochoa, I. M., y Verdugo-Rodríguez, A. (2005) Mecanismos moleculares de patogenicidad de *Salmonella sp.* *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 47(1), pp. 25-42. Recuperado de: http://www.medigraphic.com/pdfs/lamicro/mi-2005/mi05-1_2e.pdf

Gabard, J. y Jault, P. (2015) Phage Therapy – Back to the Future, en *AMR Control*. Recuperado de http://www.globalhealthdynamics.co.uk/wpcontent/uploads/2015/05/17_GABARD.pdf

García Ceja, A. y López Malo , A. (2012). Biópolímeros utilizados en la encapsulación. *Temas selectos de Ingenieria en Alimentos*, 1(6), pp. 84-96. Recuperado de [http://www.udlap.mx/wp/tsia/files/No6-Vol-1/TSIA-6\(1\)-Garcia-Ceja-et-al-2012.pdf](http://www.udlap.mx/wp/tsia/files/No6-Vol-1/TSIA-6(1)-Garcia-Ceja-et-al-2012.pdf)

Gómez-García, J., Segundo-Arizmendi, N., Torres-Ángeles, O. (2016) Tesis Licenciatura: Determinación de la concentración de alginato y CaCl₂ para la obtención de perlas del Bacteriófago S₁ lítico para *Salmonella entérica* serovar *enteritidis*. *Universidad Autónoma del Estado de Morelos*.

Gómez., M.C., Flores, M. J. (2009) Bacteriófagos: Virus de bacterias que curan infecciones. *Apuntes científicos uniandinos*, (10). Recuperado de: <http://hipotesis.uniandes.edu.co/hipotesis/images/stories/ed10pdf/Bacteriófagos.pdf>

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., Łoboocka, M. B., Węgrzyn, A., y Węgrzyn, G. (2018). Phage Therapy: Beyond Antibacterial Action. *Frontiers in medicine*, 5 (146). doi:10.3389/fmed.2018.00146

Greer, G. (2005) Bacteriophages control of foodborne bacteria. *Journal of Food Protection*. 68(5), pp. 1102-1111.

Grimont, P., y Weill, F.-X. (2008). Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. *WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella*, pp. 1–167. Recuperado de <https://www.pasteur.fr/ip/portal/action/WebdriveActionEvent/oid/01s->

Gut, A.M., Vasiljevic, T., Yeager, T., y Donkor, O.N. (2018) *Salmonella* infection - prevention and treatment by antibiotics and probiotic yeasts: a review. *Microbiology*, 164(11), pp. 1327-1344. DOI: 10.1099/mic.0.000709.

Haq, U. I., Chaudhry, W. N., Akhtar, M. N., Andleeb, S., y Qadri, I. (2012) Bacteriophages and their implications on future biotechnology: A review. *Virology Journal*, 9(9)

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>

Hernandez Santiago, R., Jiménez Salas, Z., y Pla Soler, R. (2011) Aplicaciones de los Bacteriófagos en alimentos. *Revista Salud Pública y Nutrición*, 12(3). Recuperado de <http://www.respyn.uanl.mx/xii/3/ensayo/ensayo.htm>

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

Junter, G. A., Vinet, F. (2009) Compressive properties of yeast cell-loaded Ca-alginate hydrogel layers: Comparison with alginate–CaCO₃ microparticle composite gel structures. *Chemical Engineering Journal*, 145. pp. 514- 521. DOI: 10.1016/j.cej.2008.09.034

Jurado Jiménez, R., Arenas Muñoz, C., Doblas Delgado, A., Rivero, A., y Torre-Cisneros, J. (2010) Fiebre tifoidea y otras infecciones por *Salmonella*. *Medicine*, 10(52), pp. 497-501. Recuperado de: http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/pdf/Tifoidea_otras_salmonellas_Medicine201o0.pdf

Kelly, M., McGeer, A., Willey, B. (2002) Antibacterial therapy for multi-drug resistant bacteria. Mount Sinai Hospital. Estados Unidos, Patente nº US2002/0001590.

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>

- Kutateladze, M. (2015). Experience of the Eliava Institute in bacteriophage therapy. *Virologica Sinica*, 30 (1), pp. 80-81. doi: 10.1007/S12250-014-3557-0
- 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., Gonzáles-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.
- Mahony, J., McAuliffe, O., Ross, P., Sinderen, D. (2011) Bacteriophages as biocontrol agents of food pathogens. *Current Opinion in Biotechnology*, 22, pp. 157-163
- Malik, D., Sokolov, I., Vinner, G., Mancuso, F., Cinquerrui, S., Vladislavljevic, 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>.
- Mathur, M. D., Vidhani, S., y Mehndiratta, P. L. (2003) Bacteriophage therapy: An alternative to conventional antibiotics. *Journal of Association of Physicians of India*, 51(1), pp. 593-596
- Méndez, I., Badillo, C., Ortiz Parra, G., y Faccini, Á. (2011). Caracterización microbiológica de *Salmonella* en alimentos de venta callejera en un sector universitario de Bogotá, Colombia. Julio a octubre de 2010. *REVISTA MÉDICAS UIS*, 24(1). Recuperado de <http://revistas.uis.edu.co/index.php/revistamedicasuis/article/view/2559/2885>
- Moghtader, F., Eđri, 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
- Muniswamy, B; Krishna, G y Sreenath, HL. (2000). Encapsulation techniques for producing synthetic seeds in coffee. IN. *Indian Coffee*. 64(2): pp 3-5.

Nechaev, S., y Severinov, K. (2008). The elusive object of desire—Interactions of bacteriophages and their hosts. *Current Opinion in Microbiology*, 11(2), pp. 186–193. Recuperado de <http://doi.org/10.1016/j.mib.2008.02.009>

Neira-Carrillo, A., Yáñez Muñoz, D., Aguirre Zazzali, P., Amar Marini, Y., Vidal Vilches, S., y Egaña-Palma, R. (2013) Encapsulación de Biomoléculas Usando Polímeros Naturales: “Un Nuevo Enfoque en la Entrega de Fármacos en Medicina”. *Avances en Ciencias Veterinarias*, 28(2), pp. 31-40.

Organización Mundial de la Salud y Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura OMS/FAO. (2002) Risk assessments of *Salmonella* in eggs and broiler chickens. Recuperado de: <https://www.who.int/foodsafety/publications/micro/salmonella/en/>

Organización Mundial de la Salud. (2015) Estimates of the global burden of foodborne diseases: foodborne disease burden epidemiology reference group 2007-2015. Recuperado de: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/199350/9789241565165_eng.pdf?sequence=1

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/medicines/publications/global-priority-list-antibiotic-resistant-bacteria/en/>

Organización Mundial de la Salud. (2017) Inocuidad en los alimentos. Recuperado de: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>

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. (2018) Nota descriptiva: *Salmonella* no tifoidea. Recuperada de [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-\(non-typhoidal\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-(non-typhoidal))

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 Sanidad Animal. (2018) *Enfermedades, infecciones e infestaciones de la Lista de la OIE en vigor en 2018*. Recuperado de <http://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/enfermedades-de-la-lista-de-la-oie-2018/>

Organizacion Panamericana de la Salud. (2018) *Enfermedades Transmitidas por Alimentos. Inocuidad de Alimentos - Control Sanitario – HACCP*. Disponible en: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=10836:2015-enfermedades-transmitidas-por-alimentos-eta&Itemid=41432&lang=es

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>

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>

Rincón-Acero, D.P, Ramírez-Rueda, R. Y., y Vargas-Medina, J. C. (2011) Transmission of *Salmonella enterica* through chicken eggs and their importance in public health. *Revista de la Universidad Industrial de Santander. Salud*, 43(2), pp. 167-177. Recuperado de: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-08072011000200008&lng=en&tlng=es.

Rivera Calderón, L. G., Motta Delgado, P. A., Cerón Urbano, M. F., y Chimonja Coy, F. A. (2012). Resistencia de la Salmonela a los antimicrobianos convencionales para su Tratamiento. *CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 7 (1), pp. 116-129. Recuperado de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1900-96072012000100010&lng=en&tlng=es

Roa, I., y Meruane, M. (2012) Desarrollo del aparato digestivo. *Int. J. Morphol.*, 30(4), pp. 1285-1294.

Rodriguez-Torrens, H., Barreto, G., Sedrés, M., Bertot, J., y Sáez, S. (2015) The foodborne diseases, a health problema inherited and increased in the new millenium. *Revista Electrónica de Veterinaria*, 16.

Rojas, Cortés, M.G., Vallejo, Díaz, 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.

Rubio-Anaya, M. y Guerrero-Beltrán, J.A. (2012) Polímeros utilizados para la elaboración de películas biodegradables. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, (6) 2, pp. 173-181. Recuperado de <http://web.udlap.mx/tsia/files/2013/12/TSIA-62Rubio-Anaya-et-al-2012.pdf>

Segundo-Arizmendi, N., Gómez-García, J., Flores-Cuevas, K.G., Duque-Montaña, B.E., López-Villegas, E.O., Baltazar-Hernández, E., Torres-Angeles, 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.

Segundo Arizmendi, N., Torres Ángeles, O. (2016) Tesis Doctoral: Estudios de pre formulación del Bacteriófago S₁. *Universidad Autónoma del Estado de Morelos*.

Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria *Informes Zoosanitarios Semanales 2018*. Recuperado de <https://www.gob.mx/senasica/documentos/informes-zoosanitarios-semanales-2018?idiom=es>

Sillankorva, S.M., Oliveira, H., y Azeredo, J. (2012). Bacteriophages and Their Role in Food Safety. *International Journal of Microbiology*. Article ID 863945

Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológico. *Histórico Boletín Epidemiológico* Recuperado de <https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/historico-boletin-epidemiologico>

Soffer, N., Abuladze, T., Woolston, J., Li, M., Leigh Farris, H., Heyse, S., Charbonneau, D. y Sulakvelidze, A. (2016) Bacteriophages safely reduce *Salmonella* contamination in pet food and raw pet food ingredients. *Bacteriophage*, 6(3), <http://doi.org/10.1080/21597081.2016.1220347>

Sulakvelidze, A., Alavidze, Z., y Glenn Morris, J. (2001) Bacteriophage Therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(3), pp. 649-659. doi:10.1128/AAC.

Uribe, C., y Suárez, M. (2009). Salmonelosis no tifoidea, transmisión a través del consumo de alimentos contaminados de origen aves de corral. *Colombia Medica*, 37(2), pp. 151-158. Recuperado de <http://colombiamedica.univalle.edu.co/index.php/comedica/article/view/427/1088>

Viseras, C., Sanchez, R., Damas, R. (2010) Uso de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) en liberación modificada de fármacos. *Farmespaña Industrial*, pp. 48-51.

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

Yang, Y., Ricke, S. C., Tellez, G., y Kwon, Y. M. (2017). Quantitative Tracking of *Salmonella Enteritidis* Transmission Routes Using Barcode-Tagged Isogenic Strains in Chickens: Proof-of-Concept Study. *Frontiers in veterinary science*, 4(15). DOI:10.3389/fvets.2017.00015

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., López Macías, C., y Calva, E. (2006) Estudios Mexicanos sobre *Salmonella*: Epidemiología, vacunas y biología molecular. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 48(2), pp. 121–125. Recuperado de <http://www.medigraphic.com/pdfs/lamicro/mi-2006/mi062l.pdf>

Portal de contenido: <https://encolombia.com/medicina/materialdeconsulta/tensiometro-virtual/transmision-de-salmonelosis/>



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

VOTO APROVATORIO



Facultad de Farmacia

Conocimiento al servicio de la salud

PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA FACULTAD DE FARMACIA, UAEM

Nombre del alumno: Janeth Gómez García

Título de la tesis:

"Evaluación de esferas de alginato conteniendo al Bacteriófago S₁ como alternativa para el tratamiento de salmonelosis en pollos (*Gallus gallus domesticus*)"

Grado a obtener:

Maestría
 Doctorado

Miembro del jurado: Dr. Jesús Rivera Islas

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

La tesis:

Si se aprueba tal y como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____

Firma

Dr. Jesús Rivera Islas
Miembro del Jurado

30 de abril del 2019

Fecha



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

VOTO APROVATORIO



Facultad de Farmacia
Conocimiento al servicio de la salud

PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA FACULTAD DE FARMACIA, UAEM

Nombre del alumno: Janeth Gómez García

Título de la tesis:

"Evaluación de esferas de alginato conteniendo al Bacteriófago S₁ como alternativa para el tratamiento de salmonelosis en pollos (*Gallus gallus domesticus*)"

Grado a obtener:

Maestría
 Doctorado

Miembro del jurado: Dra. Nallelyt Segundo Arizmendi

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

La tesis:

Si se aprueba tal y como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____


Firma

Dra. Nallelyt Segundo Arizmendi
Miembro del Jurado

02 de mayo del 2019

Fecha



VOTO APROVATORIO

PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA FACULTAD DE FARMACIA, UAEM

Nombre del alumno: Janeth Gómez García

Título de la tesis:

"Evaluación de esferas de alginato conteniendo al Bacteriófago S₁ como alternativa para el tratamiento de salmonelosis en pollos (*Gallus gallus domesticus*)"

Grado a obtener:

Maestría
 Doctorado

Miembro del jurado: Dra. Luisa Martínez Aguilar

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

La tesis:

Si se aprueba tal y como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____

Firma

Dra. Luisa Martínez Aguilar
Miembro del Jurado

29 de abril del 2019

Fecha



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

VOTO APROVATORIO



Facultad de Farmacia
Conocimiento al servicio de la salud

PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA FACULTAD DE FARMACIA, UAEM

Nombre del alumno: Janeth Gómez García

Título de la tesis:

"Evaluación de esferas de alginato conteniendo al Bacteriófago S₁ como alternativa para el tratamiento de salmonelosis en pollos (*Gallus gallus domesticus*)"

Grado a obtener:

Maestría
 Doctorado

Miembro del jurado: Dra. Blanca Estela Duque Montaña

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

La tesis:

Si se aprueba tal y como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____

Firma

Dra. Blanca Estela Duque Montaña
Miembro del Jurado

03 de mayo del 2019

Fecha



VOTO APROVATORIO

PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA FACULTAD DE FARMACIA, UAEM

Nombre del alumno: Janeth Gómez García

Título de la tesis:

"Evaluación de esferas de alginato conteniendo al Bacteriófago S₁ como alternativa para el tratamiento de salmonelosis en pollos (*Gallus gallus domesticus*)"

Grado a obtener:

Maestría
 Doctorado

Miembro del jurado: Dra. Susana Elisa Mendoza Elvira

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

La tesis:

Si se aprueba tal y como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____

Susana E. Mendoza
Firma

Dra. Susana Elisa Mendoza Elvira
Miembro del Jurado

29 de abril de 2019

Fecha