



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**AISLAMIENTO Y DETERMINACIÓN DEL RANGO DE  
HOSPEDEROS DE BACTERIÓFAGOS DE *SALMONELLA* spp.  
EN MUESTRAS DE BOVINOS DE ISLA DE PASCUA**

**Carla Viviana Salazar Llanos**

Memoria para optar al Título  
Profesional de Médico Veterinario  
Departamento de Medicina  
Preventiva Animal

PROFESOR GUÍA: CHRISTOPHER HAMILTON-WEST MIRANDA

SANTIAGO, CHILE  
2018



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**AISLAMIENTO Y DETERMINACIÓN DEL RANGO DE  
HOSPEDEROS DE BACTERIÓFAGOS DE *SALMONELLA* spp.  
EN MUESTRAS DE BOVINOS DE ISLA DE PASCUA**

**Carla Viviana Salazar Llanos**

Memoria para optar al Título  
Profesional de Médico veterinario  
Departamento de Medicina  
Preventiva Animal

**Nota Final: .....**

Firma:

Profesor Guía: Christopher Hamilton-West M. ....  
Profesor Corrector: José Pizarro L. ....  
Profesor Corrector: Luis Pablo Hervé C. ....

SANTIAGO, CHILE  
2018

## **AGRADECIMIENTOS**

Porque todo final trae consigo un nuevo comienzo, hoy concluye una etapa para comenzar otra nueva, y no puedo seguir adelante, sin antes mencionar y agradecer a todos aquellos seres que me han apoyado y acompañado en este camino.

En primer lugar a mi familia, especialmente a mis padres y hermanas, quienes a lo largo de mi vida me han entregado el apoyo, los valores y las herramientas necesarias para lograr mis objetivos y metas, y poder ser quien felizmente soy hoy.

A mis sobrinos, la luz de mi vida, por llenarme de amor y ánimo, incluso en los momentos más difíciles.

A mis amigos y compañeros, ya que su compañía, ayuda y apoyo fueron muy importantes en este camino.

A mi hermana Claudia, un pilar fundamental; por su apoyo incondicional, comprensión, consejos y enseñanzas, pero sobre todo, por su amor. Sin ella, mi gran referente, nada de esto sería posible.

A mis profesores y a cada una de las personas del Laboratorio que dedicó parte de su tiempo en ayudarme a conseguir mis objetivos.

Esto va para todos quienes han creído en mí, y en especial, para quienes creemos en nosotros mismos, los que nunca bajamos los brazos.

"Únete a los que jamás dijeron: se acabó, aquí me detengo. Porque así como al invierno le sigue la primavera, nada termina: después de alcanzar tu objetivo hay que comenzar de nuevo, empleando en todo momento lo que aprendiste en el camino". (Paulo Coelho)

## ÍNDICE

RESUMEN .....	v
ABSTRACT.....	vi
INTRODUCCIÓN.....	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....	2
OBJETIVO GENERAL.....	7
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	7
MATERIALES Y MÉTODOS.....	8
RESULTADOS .....	14
DISCUSIÓN .....	18
CONCLUSIONES.....	21
BIBLIOGRAFÍA .....	22
ANEXOS .....	24

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Clasificación de fagos con base en la morfología y tipo de ácido nucleico.. .....	2
<b>Figura 2.</b> Mapa de Isla de Pascua con la ubicación de cada sector, determinados con números correlativos de 1 a 6. ....	9
<b>Figura 3.</b> Heatmap con la representación de los perfiles de lisis (PLs) de cada fago aislado. ....	16
<b>Figura 4.</b> Rango de hospederos de fagos de Isla de Pascua. Número de fagos aislados, en función de la cantidad de cepas que lisan.. .....	17

## ÍNDICE DE TABLAS

**Tabla 1.** Muestras de heces bovinas obtenidas por sector en Isla de Pascua, durante Septiembre de 2015 ..... 14

**Tabla 2.** Resumen de fagos aislados por sector en Isla de Pascua, durante Septiembre de 2015. .... 14

## RESUMEN

La alta prevalencia de enfermedades infecciosas bacterianas ha generado la continua búsqueda de nuevos elementos terapéuticos que ayuden a su control y prevención. Entre estas herramientas terapéuticas se encuentran los bacteriófagos o fagos, virus que, a través de su ciclo reproductivo lítico, destruyen bacterias. Es por esto que la investigación sobre el uso de fagos en Medicina Veterinaria se ha vuelto cada vez más importante. Fagos que infectan *Salmonella* han sido documentados, siendo abundantes y ampliamente distribuidos en ambientes relacionados a producciones bovinas. En este estudio investigamos la abundancia y diversidad de fagos de *Salmonella* en muestras de bovinos provenientes de 6 sectores distintos de Isla de Pascua. Como resultado, se aislaron en total 90 fagos, provenientes de los 6 sectores muestreados. La caracterización del rango de hospederos (RH) determinó que los fagos aislados lisan entre 1 y 19 cepas de *Salmonella* hospederas, siendo *S. Javiana*, *S. Dublin*, *S. Heidelberg*, *S. Enteritidis* y *S. Agona* las más susceptibles a la lisis. Además, según el número de cepas lisadas, 26 de los 90 fagos aislados (28,9%) fueron clasificados en estrecho RH, mientras los otros 63 (70%) en amplio RH. Solo 1 fago fue clasificado en muy amplio RH, por lisar 19 cepas hospederas. Nuestro estudio no solo mostró la considerable diversidad fenotípica que presentan los fagos de *Salmonella* que se encuentran común y ampliamente distribuidos a lo largo del territorio de Isla de Pascua, sino también muestra que fagos que lisan serotipos que comúnmente causan salmonelosis en bovinos, son obtenidos con frecuencia, sugiriendo que los fagos podrían jugar un rol importante en la ecología de *Salmonella* en estos animales.

Comentado [LPHC1]: Faltan las palabras clave

Palabras clave: Bacteriófagos de *Salmonella*, rango de hospederos, bovinos

## ABSTRACT

The high prevalence of bacterial infectious diseases has generated the continuous search for new therapeutic elements that help its control and prevention. Among these therapeutic tools are bacteriophages or phages, viruses that cross their lytic reproductive cycle, destroy bacteria. Therefore research on the use of phages in Veterinary Medicine has become increasingly important. Phages that infect *Salmonella* have been documented, being abundant and widely distributed in environments related to bovine production. In this study, we investigated the abundance and diversity of *Salmonella* phage in samples of cattle from 6 different sectors of Easter Island. As a result, a total of 90 phage were isolated from the 6 sampled sectors. The characterization of the host ranges (HR) determined that phages isolated lysed between 1 and 19 *Salmonella* host strains, being *S. Javiana*, *S. Dublin*, *S. Heidelberg*, *S. Enteritidis* and *S. Agona*, the most susceptible to lysis. In addition, according to the number of lysed strains, 26 of the 90 isolated phages (28.9%) were classified in narrow RH, while the other 63 (70%) in broad RH. Only 1 phage was classified in very broad RH, by lysing 19 host strains. Our study not only showed the considerable phenotypic diversity of the *Salmonella* phages that are common and widely distributed throughout the Easter Island territory, but also shows that phage lysing serotypes that commonly cause salmonellosis in cattle are obtained with frequency, suggesting that phages could play an important role in the ecology of *Salmonella* in these animals.

Key words: *Salmonella* phages, host ranges, bovines

## INTRODUCCIÓN

Los bacteriófagos o fagos, son virus capaces de infectar y replicarse en bacterias que se encuentran metabólicamente activas. Su acción lítica sobre bacterias patógenas permitió su uso como alternativa terapéutica frente a infecciones bacterianas. Su eficacia ha sido probada incluso contra microorganismos resistentes a antibióticos (Vispo y Puchades, 2001).

Fueron descubiertos hace más de 90 años, y desde un principio se vislumbraron como instrumentos adecuados para ser usados como agentes que permitieran combatir las enfermedades infecciosas causadas por bacterias. Sin embargo, esto quedó relegado por el descubrimiento y empleo generalizado de los antibióticos. El preocupante y creciente desarrollo de la resistencia bacteriana ha hecho que, desde hace unos años, se piense de nuevo en los fagos como una alternativa terapéutica al uso de los antimicrobianos actuales (García y López, 2002).

Su abundancia y su impacto sobre las bacterias hacen que la comprensión de la ecología del fago sea cada vez más relevante para la ecología de los ecosistemas bacterianos. Estos, al tener una relación íntima de parasitismo con su hospedero para multiplicarse, disminuyen drásticamente la población bacteriana (Quiroz, 2015). Mientras los bacteriófagos probablemente juegan un rol en el control de la diversidad microbiana, el entendimiento sobre la ecología y diversidad de fagos de *Salmonella* es limitado (Moreno *et. al.*, 2013).

Isla de Pascua es parte del territorio insular chileno. Al aislamiento geográfico de este lugar, se contraponen la gran afluencia de turistas que ingresan a la isla. Cuenta con una población aproximada de 3.860 bovinos mantenidos en un tipo de manejo extensivo (Montoya, 2011), algunos de los cuales son utilizados como fuente alimenticia para sus habitantes, sin embargo, la situación sanitaria actual del ganado es desconocida.

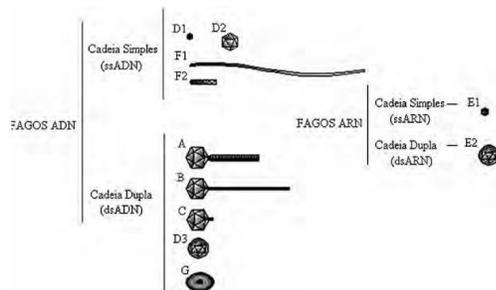
Esta memoria de título se centró en aislar bacteriófagos de *Salmonella* spp. y determinar su rango de hospederos, a partir de muestras de heces bovinas provenientes de esta isla, con el fin de conocer más sobre la naturaleza y diversidad de estos virus, su distribución y abundancia en un lugar poco investigado e interesante por sus condiciones geográficas.

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### Bacteriófagos: características y potencialidades de su uso

Los bacteriófagos líticos, descubiertos por Twort en 1915 y D'Herelle en 1917, son virus que replican al interior de una bacteria y la lisan. Cada tipo de fago reconoce una bacteria específica, se une a receptores de superficie, inyecta su genoma al interior de la célula para luego producir cientos de partículas virales que, gracias a sus enzimas, logran romper la pared celular bacteriana y liberar su progenie. En este proceso la célula bacteriana muere y el número de fagos se incrementa, amplificando el efecto antibacteriano (Gòrski y Weber-Dabrowska, 2005; Hudson *et al.*, 2005). Hasta la fecha no se ha informado que los fagos produzcan lisis en células animales, humanas ni en plantas (Sulakvelidze *et al.*, 2001; Dabrowska *et al.*, 2005).

Los fagos están divididos en 6 grupos de acuerdo con el tipo morfológico, tipo de ácido nucleico y tipo de hospedero. Estos fagos pueden ser tanto de DNA (cadena simple o doble) o RNA (cadena simple o doble). Los DNA de cadena doble pueden ser: fagos con cola contráctil (A), con cola no contráctil (B), con cola corta (C), sin cola (D3), y fagos pleomórficos protegidos por una envoltura lipídica (G). Los fagos DNA de cadena simple pueden ser icosaédricos (D1 y D2) o filamentosos (F1 y F2). Los fagos del grupo E son icosaédricos con RNA de cadena simple (E1) o doble (E2) (Figura 1) (Burbano-Rosero, 2009).



**Figura 1.** Clasificación de fagos con base en la morfología y tipo de ácido nucleico. (Burbano-Rosero, 2009).

Las primeras investigaciones con fagos estuvieron relacionadas con la definición de la naturaleza de estas partículas. Sin embargo, su capacidad de provocar la lisis celular de microorganismos patógenos constituyó la base de muchos trabajos encaminados a su uso terapéutico (Vispo y Puchades, 2001).

Desde un principio, se vislumbraron como instrumentos adecuados para ser usados como agentes que permitieran combatir las enfermedades infecciosas causadas por bacterias. Este objetivo quedó relegado por el descubrimiento y empleo generalizado de los antibióticos. Sin embargo, debido a la preocupación global por la resistencia a los antimicrobianos, se considera nuevamente a los fagos como una alternativa terapéutica al uso de los antimicrobianos actuales (García y López, 2002).

En teoría, la terapia *fágica* presenta ventajas frente a la antibioticoterapia, destacando que (García y López, 2002):

- En general, los antibióticos poseen un espectro de actividad notablemente amplio, mientras que los fagos son estrictamente específicos, por lo cual no producen el efecto de eliminación de la microbiota comensal beneficiosa.
- Los antibióticos pueden tener efectos colaterales indeseados (alergias, contraindicaciones durante el embarazo, efectos tóxicos en ciertos órganos), mientras que existen pruebas de la inocuidad de las preparaciones *fágicas* purificadas.
- Los fagos son igualmente eficaces sobre bacterias sensibles o multirresistentes.
- La producción de antibióticos es bastante costosa, mientras que la de fagos se asocia a costos menores.
- La búsqueda de nuevos antibióticos es difícil, mientras que la naturaleza constituye una fuente virtualmente inagotable de fagos.

Además de las ventajas anteriormente mencionadas, ha habido estudios en los cuales se ha demostrado el importante rol que pueden jugar los fagos en la inocuidad alimentaria. Como ejemplo de esto, los bacteriófagos pueden ser utilizados a lo largo de todo el proceso de producción y elaboración de alimentos de origen animal y vegetal. Así, pueden aplicarse en: i) animales que pueden actuar como reservorio (fagoterapia); ii) canales y productos crudos de origen animal y vegetal (biocontrol); iii) superficies y utensilios de producción (biohigienización); y iv) como conservantes naturales en productos manufacturados perecederos para aumentar su vida útil (biopreservación) (García *et al.*, 2008).

Los fagos poseen la habilidad de infectar algunas cepas o especies de bacterias, más raramente, la habilidad de infectar más de un género, estrechamente relacionados entre sí. Un grupo específico de bacterias es hospedero de cada fago, este grupo está dado solo por una especie bacteriana, pero algunas especies relacionadas pueden ser a veces infectadas con el mismo fago (Borie *et al.*, 2014). De acuerdo con esto, conocer los hospederos susceptibles a cada fago es importante para lograr escoger el fago más adecuado y efectivo contra el blanco que se desee controlar.

A pesar de que los bacteriófagos probablemente desempeñen un rol en el control de la diversidad microbiana, la comprensión sobre la diversidad y ecología de fagos es limitado. Para aportar a esto, estudios previos con objetivos similares se han realizado en distintas partes del mundo. En uno de ellos se reportó el aislamiento de fagos de *Salmonella* desde muestras de heces provenientes de 13 granjas lecheras de Estados Unidos que contaban con un historial de presencia de la bacteria en sus animales. En 10 de las 13 granjas fue posible aislar fagos de *Salmonella*, mostrando un estrecho rango de hospederos, con fagos específicos para el serotipo de mayor prevalencia (Moreno *et al.*, 2013). En otro estudio, se aislaron fagos desde pequeñas producciones lecheras de Tailandia, y se compararon sus resultados con los obtenidos en Estados Unidos, obteniendo fagos con amplio y muy amplio rango de hospederos (Wongsuntornpoj *et al.*, 2014). En el sur de Chile, fagos fueron aislados desde terneros de lecherías con historial de diarrea (Dueñas *et al.*, 2017), obteniendo resultados similares a los obtenidos en esta investigación.

Esta información es de importancia, ya que los datos obtenidos en estos estudios no solo mostraron una gran cantidad de diversos fagos de *Salmonella* aislados desde estas granjas lecheras, sino también muestran que fagos aislados que lisan serotipos que comúnmente infectan a bovinos, son obtenidos frecuentemente, lo cual sugiere que los fagos pueden desempeñar un rol importante en la ecología de *Salmonella* en granjas lecheras (Moreno *et al.*, 2013).

### **Ganado bovino en Isla de Pascua y su situación sanitaria**

Según los resultados oficiales del último censo realizado en el año 2017 por el Instituto Nacional de Estadísticas (INE, 2017), Isla de Pascua cuenta con 7750 habitantes, en una superficie de 163,6 Km<sup>2</sup>. Montoya (2011) describe la existencia, en la isla, de una población de 3.860 bovinos que son mantenidos en un tipo de manejo extensivo. Estas explotaciones se orientan a la producción de carne para el abastecimiento domiciliario y venta de carne local. Se puede describir la elaboración de algunos subproductos como leche y queso fresco, pero con escasos volúmenes de producción debido a las limitantes de forraje y agua, no convirtiéndose en una actividad productiva, sino obteniendo estos subproductos para consumo familiar (Vergara, 2013).

A pesar de que nuestro país cuenta con un reconocimiento internacional de la situación sanitaria, ya que ha logrado obtener y mantener oficialmente el estatus sanitario libre de importantes enfermedades de notificación obligatoria de la lista de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), este territorio insular posee una situación sanitaria casi completamente desconocida. Aunque no se han detectado animales con signología compatible con enfermedades de denuncia obligatoria, no existen datos completos sobre el real estado sanitario del ganado (Vergara, 2013). Si bien lo característico de este lugar es su condición de aislamiento geográfico, lo cual nos haría pensar en una barrera física a la transmisión de agentes microbiológicos, existe una gran afluencia de turistas de todo el mundo, además de la migración de aves. Esto podría contraponerse al aislamiento geográfico, y producir, contrariamente a lo pensado, una mayor diversidad de agentes microbiológicos en el lugar.

Considerando el riesgo que significa el creciente desarrollo de resistencia microbiana frente a los antibióticos, y la importancia que los fagos pueden tener como alternativa al control bacteriano; además de las ventajas que presentan las distintas aplicaciones que pueden tener estos virus, es que en la actualidad continúa el interés por investigarlos. Debido a eso, esta memoria de título se centró en aislar y determinar el rango de hospederos de bacteriófagos de *Salmonella* spp. en muestras de heces provenientes de bovinos de Isla de Pascua, con el fin de continuar ampliando la información disponible sobre estos virus, y más específicamente, aportar información sobre la abundancia y diversidad de bacteriófagos de *Salmonella* en un lugar poco investigado y con características particulares, como lo es Isla de Pascua.

### **OBJETIVO GENERAL**

Aislar y determinar el rango de hospederos de bacteriófagos de *Salmonella* spp. desde muestras de heces obtenidas de bovinos que habitan en Isla de Pascua, Región de Valparaíso.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Aislar bacteriófagos de *Salmonella* spp. en muestras provenientes de heces de bovinos de la Isla de Pascua.
2. Determinar el rango de hospederos de los bacteriófagos aislados desde heces de bovinos de la Isla de Pascua.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Zona de estudio**

Isla de Pascua corresponde a una parte del territorio insular de Chile, perteneciente a la Región de Valparaíso. Está ubicada en el Océano Pacífico Sur, en su parte oriental, entre el continente americano y la Polinesia, a una distancia de 3.790 Km de la costa de Chile continental, frente al puerto de Caldera. Además, se sitúa a 2.075 Km al este de las Islas Pitcairn y a 4.351 Km al sudeste de Papeete (Tahiti), siendo ambas las islas más cercanas, por lo que la Isla de Pascua es una de las tierras insulares habitadas más aisladas del mundo. Posee clima marítimo, de características subtropicales, templado cálido con lluvias todo el año.

Según un diagnóstico técnico y social de las prácticas ganaderas en Isla de Pascua (Montoya, 2011), se identificaron 42 ganaderos, de los cuales 37 cuentan con ganado bovino. Para este estudio, se definió realizar una expedición a Isla de Pascua por un período de 30 días, durante todo el mes de Septiembre de 2015, con el fin de tomar la mayor cantidad de muestras posibles, realizando un muestreo no probabilístico, por conveniencia (Dohoo et al., 2003). Sin embargo, las actividades en terreno se vieron dificultadas por un conflicto social existente en el momento del muestreo, lo cual limitó la movilización y acceso a ciertos lugares y personas. Debido a lo anterior, sólo fue posible tener acceso a los animales de 6 productores. Los animales se ubicaban en distintas zonas de la Isla (Figura 2).



**Figura 2.** Mapa de Isla de Pascua con la ubicación de cada sector, determinados con números correlativos de 1 a 6. **1:** Vaihu, **2:** Maunga Otu'u, **3:** Rano Raraku, **4:** Puna Pau, **5:** Akahanga, **6:** Orito

### Toma de muestras

#### Muestras rectales

Debido al contexto socio-cultural antes mencionado, se obtuvieron muestras solo de productores que accedieron a participar de este estudio. Para el muestreo, se procedió a la sujeción de los animales, de la forma más firme y segura posible. Las muestras se tomaron directamente del recto de los bovinos, utilizando hisopos estériles con medio de transporte Cary-Blair. Cada muestra fue rotulada inmediatamente con un código único. Desde el momento de la toma de las muestras hasta su aislamiento, éstas se conservaron refrigeradas a 4°C. El tiempo de almacenamiento no superó los 30 días.

**Comentado [LPHC2]:** Creo que corresponde indicar la fuente de esta imagen, que asumo no generó el autor de la tesis.

Asimismo, la imagen parece estar cortada en el límite inferior.

La imagen entrega información irrelevante y dificulta la observación de la información clave, como los números. ¿Tienen que estar los moais en el mapa? ¿Es necesaria la profundidad del agua en la figura?

**Comentado [CVSL(3R2):** Cambié la imagen por una más simple, donde se ve con mayor claridad dónde se ubica cada sector en la isla.

La imagen fue extraída de Google, como aparece en ella.

### **Aislamiento y purificación de bacteriófagos líticos**

Se realizó el aislamiento de bacteriófagos de *Salmonella* spp. a partir de muestras de heces de bovinos, en el Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Colina de la Universidad Andrés Bello. Los fagos fueron aislados usando un método de aislamiento post enriquecimiento de fagos, con una mezcla de 4 cepas de *Salmonella*, siguiendo el Protocolo de Aislamiento y Purificación de bacteriófagos líticos, del mismo laboratorio, el cual se describe brevemente a continuación (Moreno Switt *et al.*, 2013).

### **Aislamiento y purificación de los fagos**

El contenido fecal del hisopo fue inoculado en frascos estériles, utilizando 1 gramo de muestra, y añadiendo 9 ml de Caldo Tripticasa de Soya (TSB BD® -Becton, Dickinson and Company, Estados Unidos-). A esto se agregó una mezcla de cultivos de *Salmonella* en fase estacionaria, en una concentración aproximada de  $10^8$  UFC/mL, previamente incubados por 12-18 horas a 37°C, y diluidos 1:10; utilizando 25µl de cada una (definidas como *Salmonella* A, B, C y D, donde A corresponde a *Salmonella* Infantis, B a *Salmonella* Heidelberg, C a *Salmonella* Typhimurium y D a *Salmonella* Enteritidis). Se incubó a 37° durante toda la noche. (El certificado de bioseguridad y acta de bioética se encuentran disponibles en la sección “anexos”).

El segundo día se centrifugó a 10000 revoluciones por minuto durante 10 minutos, y posteriormente se filtró la mezcla incubada, con filtros Millipore de 0,45µm y luego 0,22µm, con el fin de eliminar la materia gruesa y bacterias restantes. Posteriormente se procedió a tomar 100µL de la muestra filtrada para depositarla en un tubo de ensayo. A esto se agregó 300µL de un cultivo previo de *Salmonella* (concentración aproximada de  $10^8$  UFC/mL), diluido 1:10. En este paso las *Salmonella* se agregan por separado, por lo tanto, se utilizó un tubo distinto para cada una. Se incubó el tubo a temperatura ambiente durante 15 minutos, luego se agregó a la mezcla 4mL de agar semisólido 0,7%, se agitó suavemente, y se vertió todo el contenido sobre placas de Agar Tripticasa de Soya (TSA BD®, Estados Unidos). Se incubó durante 12-18 horas a 37°C.

Al día siguiente se identificaron las placas de lisis de los fagos, y se procedió a la purificación de estos. Para esto, se retiraron las zonas de crecimiento de los fagos como sacabocado, y se depositaron en 500  $\mu$ L de solución salina 0,9%. Se incubó durante 15 minutos a 37°C. Posteriormente, se volvió a preparar una mezcla con 100 $\mu$ L de la dilución, más 300  $\mu$ L de cada cultivo diluido, por separado, y 4 mL de agar semisólido 0,7%. Se vertió todo el contenido sobre placas de TSA, y se dejó incubar por 12-18 horas a 37°C.

Se prepararon placas individuales de esta manera, hasta obtener una sola morfología de placas de lisis, es decir, con misma intensidad y tamaño de lisis (al menos 3 pasajes, hasta asegurar en la medida posible, que los fagos purificados fueran 1 solo tipo).

Cuando las placas de lisis de los fagos tuvieron morfología idéntica, lo cual sugiere que, según su efecto lítico, los fagos podrían ser los mismos (eventualmente podrían ser distintos a nivel molecular, con el mismo efecto lítico); se añadió sobre ellas 5ml de Buffer SM (100mM NaCl, 8mM MgSO<sub>4</sub>, 50mM Tris-Cl [pH 7,5] ), y se dejaron a temperatura ambiente durante toda la noche. Al día siguiente se extrajo el Buffer SM y se traspasó a tubos Eppendorff de 2mL. Se centrifugaron a 10000 revoluciones por minuto durante 10 minutos. Se extrajo el sobrenadante, se filtró con filtro de 0,22 $\mu$ m, y se añadió una gota de Cloroformo (Merck®, Alemania). Finalmente, los fagos aislados se guardaron a 4°C.

### **Determinación del título de los fagos**

Este procedimiento se realizó siguiendo el protocolo de titulación de fagos líticos, del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Colina de la Universidad Andrés Bello (Moreno Switt *et al.*, 2013).

El día previo a la titulación, se dejaron incubando las *Salmonellas* hospederas de cada fago a titular, en 9 mL de TSB durante toda la noche. Transcurrido este tiempo, se preparó una dilución 1:10 de cada cultivo de *Salmonella* hospedera, utilizando TSB.

Antes de comenzar con la titulación, se calentó en el microondas el agar semisólido (TSA 0,7%). Una vez disuelto completamente, se deja la botella en un baño de agua pre establecido a 50°C para equilibrar, por una hora aproximadamente.

**Comentado [LPHC4]:** Ajuste el tiempo verbal a pasado.

Utilizando un tubo estéril de 16 mm, se prepararon 300 µL del cultivo hospedero diluido 1:10, para ser agregado con el agar semisólido para hacer la capa. Se prepararon suficientes tubos para hacer la capa para todos los stocks de fagos purificados.

Se utilizó una pipeta serológica para transferir 4 mL de agar semisólido de la botella equilibrada previamente en el baño de agua a 50°C, a cada tubo preparado del paso anterior. Se mezcló ligeramente en el vortex y se vertió el contenido de los tubos sobre una capa de TSA 1,5%. Se dejó solidificar la capa superior durante 10 a 15 minutos.

Se realizó una dilución seriada (12 veces) de la preparación de fagos previamente aislados y contenidos en Buffer SM. Para esto, se colocaron 180 µL de NaCl 0,9% en cada pocillo de una placa de 96 pocillos. Se diluyeron los fagos líticos 1:10. Para esto, se agregaron 20 µL de cada fago a utilizar, sobre los 180 µL de NaCl 0,9% de la primera fila (fila A), identificando cada pocillo para cada fago. Posteriormente, se tomaron 20 µL de cada pocillo de la fila A, y se agregó a su correspondiente en la fila B, y así sucesivamente hasta completar la última fila de dilución.

Para el paso siguiente, se requirió etiquetar las placas con el serotipo de *Salmonella*, y marcar cada placa con una cuadrícula para indicar la ubicación puntual de cada fago. Se utilizó una placa con *Salmonella* por cada fago (en una placa van las 12 diluciones del fago). Se agregó (como gota) 5 µL de cada dilución del fago en su cuadrícula correspondiente, y, además, 5 µL del fago sin diluir (control positivo), y 5 µL de NaCl 0,9% (control negativo), en cada placa. Se dejó secar por 15 minutos, y luego se **incubó** a 37°C durante toda la noche. Transcurrido este tiempo, se contó el número de placas de lisis producidas. Estas tuvieron diferentes intensidades (visualizadas como transparencia del agar), según la concentración de cada fago almacenado por separado tras el aislamiento.

Según la dispersión que presentaron los títulos fágicos, se seleccionó la mayor dilución que incluyera todos los títulos, a modo de asegurar su actividad lítica en la prueba de rango de hospederos.

Comentado [LPHC5]: pasado

### Determinación del rango de hospederos (RH)

Se inocularon 26 cepas de *Salmonella*, cada una identificada con un número correlativo: 1) Muenster, 2) Virchow, 3) Saintpaul, 4) Choleraesuis, 5) Panama, 6) Javiana, 7) Kentucky, 8) Montevideo, 9) Infantis, 10) Oranienburg, 11) Typhimurium, 12) Agona, 13) Heidelberg, 14) Typhimurium, 15) Newport, 16) Corvalis, 17) Mbandaka, 18) Dublin, 19) Weltevreden, 20) Newport, 21) Typhimurium, 22) Stanley, 23) Anatum, 24) Braenderup, 25) Enteritidis, 26) 4,5,12:i:-. Éstas fueron adquiridas desde el Food Safety Laboratory del Dr. Martín Wiedmann, de la Universidad de Cornell, validadas por el International Life Sciences Institute, y son las utilizadas por el Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Colina de la Universidad Andrés Bello, ya que representan serotipos comunes, globalmente aislados en humanos y animales, según datos de la Organización Mundial de la Salud. Estos serotipos, se inocularon en TSB, a 37°C por 16 horas. Transcurrido el tiempo, se realizó una dilución 1:10 del cultivo del hospedero.

Para determinar el rango de hospederos (Moreno Switt *et al.*, 2013), se utilizó la dilución de los fagos más apropiada, es decir, la mayor dilución que incluyera todos los títulos, según los resultados obtenidos en la titulación previa.

Se prepararon tubos y placas de TSA con capa de agar semisólido mezclado con cada *Salmonella* hospedera, en cantidad suficiente para todo el stock de fagos titulados.

Una vez listas las placas con capa de agar semisólido más *Salmonella*, se etiquetaron las placas con cada serotipo, y se marcaron con una cuadrícula para indicar la ubicación puntual de cada fago. Posteriormente, se agregó (como gota) 5 µL de cada fago diluido. Se dejaron secar por 15 minutos, y se incubaron a 37°C durante toda la noche.

Al día siguiente se leyeron los resultados. Cada placa de lisis, es decir, cada zona del agar que se tornó traslúcida, indicó que la *Salmonella* hospedera fue lisada por los fagos, es decir, que es susceptible al fago correspondiente.

Comentado [LPHC6]: está bien esto?

Comentado [CVSL(7R6)]: Sí, es el nombre de una de las cepas utilizadas tanto en este estudio, como en los otros mencionados (EE.UU, Tailandia y Chile).

## RESULTADOS

### Muestras obtenidas

Se logró obtener un total de 47 muestras de heces bovinas, el detalle por sector se muestra a continuación en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Muestras de heces bovinas obtenidas por sector en Isla de Pascua, durante Septiembre de 2015

Sector	N° de muestras	Porcentaje del total
Vaihu	8	17,02%
Maunga Otu'u	8	17,02%
Rano Raraku	3	6,38%
Puna Pau	9	19,15%
Akahanga	3	6,38%
Orito	16	34,04%
<b>Total</b>	<b>47</b>	<b>100%</b>

### Aislamiento de fagos

A partir de las 47 muestras analizadas, luego del aislamiento post enriquecimiento, se obtuvo un total de 90 fagos; 34 de *S. Enteritidis* (37,8%), 29 de *S. Heidelberg* (32,2%), 14 de *S. Infantis* (15,6%), y 13 de *S. Typhimurium* (14,4%). De éstos, 56 son de muestras provenientes de Orito (62,2%), 12 de Maunga Otu'u (13,3%), 8 de Vaihu (8,9%), 5 de Rano Raraku (5,6%), 5 de Puna Pau (5,6%) y 4 de Akahanga (4,4%) (Tabla 2).

**Tabla 2.** Resumen de fagos aislados por sector en Isla de Pascua, durante Septiembre de 2015. Detalle del número de fagos aislados desde cada serotipo de *Salmonella* utilizado como enriquecimiento.

Sector	Fecha Muestreo	N° muestras	Total fagos aislados	N° fagos <i>Salmonella</i> aislados			
				Infantis (A)	Heidelberg (B)	Typhimurium (C)	Enteritidis (D)
Vaihu	6/9/2015	8	8	0	5	0	3
Maunga Otu'u	10/9/2015	8	12	0	6	0	6
Rano Raraku	15/9/2015	3	5	0	3	0	2
Puna Pau	25/9/2015	9	5	0	1	0	4
Akahanga	25/9/2015	3	4	0	1	0	3
Orito	27/9/2015	16	56	14	13	13	16
<b>Total</b>		<b>47</b>	<b>90</b>	<b>14</b>	<b>29</b>	<b>13</b>	<b>34</b>

**Comentado [LPHC8]:** Enriquecer el título, debe ser autoexplicativo incluyendo lugar, año, etc.

**Comentado [CVSL(9R8):** Por error eliminé el comentario anterior, el cual hacía referencia al espacio extra en las tablas. Ese espacio fue extraído.

### Determinación del rango de hospederos (RH)

La determinación del rango de hospederos de los 90 fagos aislados obtenidos desde Isla de Pascua fue realizada con 26 cepas de *Salmonella* (representando 23 serotipos). El mismo panel de rango de hospederos (con además una cepa de *E. coli*, y *S. Cerro* en reemplazo de *S. Choleraesuis*) fue utilizado previamente para caracterizar 108 fagos aislados obtenidos desde granjas lecheras en Estados Unidos (Moreno Switt *et al.*, 2013), y para caracterizar 62 fagos aislados obtenidos desde granjas lecheras en Tailandia (Wongsuntornpoj *et al.*, 2014). El mismo, con además un aislado de *E. coli* y un aislado de *Pseudomonas spp.*, para caracterizar 45 fagos obtenidos desde terneros de granjas lecheras en el sur de Chile (Dueñas *et al.*, 2017).

Los 90 fagos aislados lisaron entre 1 y 19 de las cepas de *Salmonella* hospederas. Las cepas más susceptibles a la lisis fueron *S. Javiana*, lisada por 78 de los 90 fagos (86,7%); *S. Dublin*, lisada por 75 fagos (83,3%); *S. Heidelberg*, lisada por 52 fagos (57,7%); *S. Enteritidis*, lisada por 51 fagos (56,7%); y *S. Agona*, lisada por 42 fagos (46,7%). Por el contrario, hubo cepas que no fueron lisadas por algún fago. Estas son *S. Muenster*, *S. Corvalis*, *S. Weltevreden*, y una de las 3 cepas de *S. Typhimurium*. De acuerdo con las cepas hospederas que cada fago lisó, los fagos aislados fueron clasificados en 44 Perfiles de Lisis (PLs) (Figura 3). Se observó una amplia variabilidad en los PLs, no obstante, un número de esos PLs difieren por solo una o dos cepas, por ejemplo, fagos aislados con PL4 lisan 3 cepas (*S. Heidelberg*, *S. Javiana*, *S. Dublin*), y fagos aislados con PL2 lisan las mismas 3 cepas, más *S. Enteritidis*. Ambos PLs fueron los más comunes. 14 PLs fueron encontrados en más de 1 fago. El PL2 fue representado por 12 fagos aislados, obtenidos de 4 diferentes sectores (6 fagos Maunga Otu'u, 4 de Vaihu, 1 Rano Raraku, 1 de Orito). El PL4 fue representado por 12 fagos aislados, obtenidos de 5 diferentes sectores (8 de Orito, 1 de Maunga Otu'u, 1 de Rano Raraku, 1 de Akahanga, 1 de Puna Pau).

Los fagos aislados fueron también clasificados según el número de cepas lisadas, siguiendo los mismos parámetros utilizados por los estudios previo, en (i) estrecho rango de hospederos (previamente definido como la lisis de 1 a 3 cepas hospederas), (ii) amplio rango de hospederos (lisis de 4 a 18 cepas hospederas), y (iii) muy amplio rango de hospederos (lisis

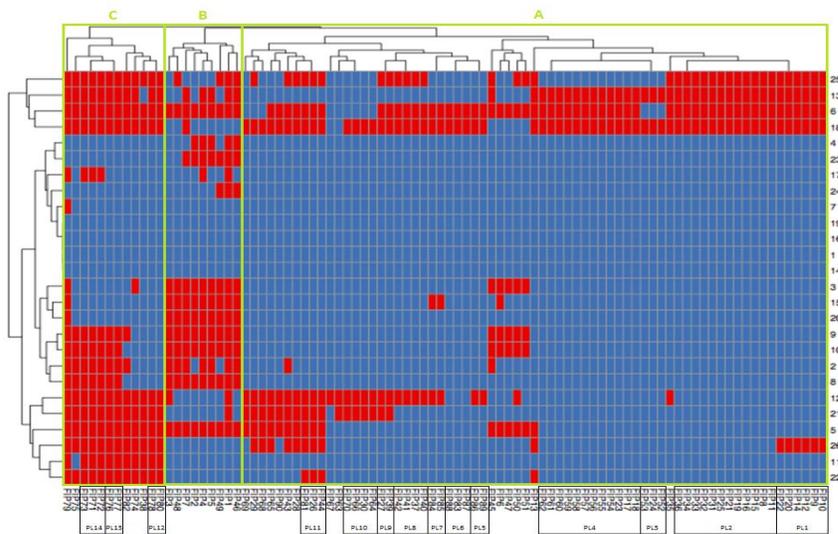
**Comentado [LPHC10]:** No entiendo, ¿S. cerro por S. Choleraesuis?

**Comentado [CVSL(11R10):** En mi estudio no se usó S. Cerro, esta fue reemplazada por S. Choleraesuis. Lo corregí, espero quede más claro

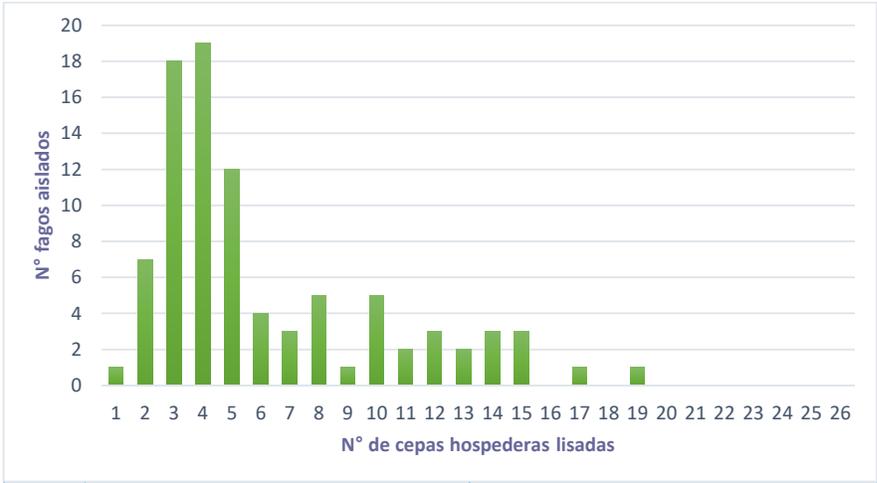
**Comentado [LPHC12]:** Nombres científicos en cursiva.

**Comentado [CVSL(13R12):** Según la bibliografía consultada, los serotipos se escriben con inicial mayúscula y sin cursiva (Cursiva hasta subespecie).

de más de 19 cepas) (Moreno Switt *et al.*, 2013). De los 90 fagos aislados, 26 (28,9%) fueron clasificados como estrecho RH, representando 7 PLs; 63 (70%) como amplio RH, representando 36 PLs; y solo 1 fago fue clasificado como muy amplio, por lisar 19 cepas hospederas (Figura 4). Además, se realizó una agrupación jerárquica utilizando el método de distancia binaria de Ward con el software R (versión 2.10.0; R Development Core Team. Vienna, Austria; www.R-project.org). Los PLs se agruparon en clusters, según similitud de cepas lisadas, representando fagos relacionados de acuerdo con sus PLs (Dueñas *et al.*, 2017). Se identificó un cluster mayor (identificado con la letra “A” en la Figura 3), que contiene 69 fagos (representando 27 PLs); todos los fagos aislados en este cluster fueron caracterizados por lisar entre 1 y 8 cepas hospederas. Los otros fagos aislados, agrupados en 2 clusters, fueron caracterizados por lisar entre 10 y 19 cepas hospederas.



**Figura 3.** Heatmap con la representación de los perfiles de lisis (PLs) de cada fago aislado. En eje vertical, las 26 cepas de *Salmonella* hospederas, y en eje horizontal, los fagos aislados y PLs encontrados en más de un fago. Lisis es representada con color rojo, no lisis con color azul.



**Figura 4.** Rango de hospederos de fagos de Isla de Pascua, Número de fagos aislados, en función de la cantidad de cepas que lisan. El número de fagos aislados está representado en el eje Y, el número de cepas hospederas lisadas, en el eje X.

**Comentado [LPHC14]:** Saque el título de dentro del gráfico, ese va abajo. Elimine la Leyenda, no es necesaria, la información está contenida en los ejes.

**Comentado [LPHC15]:** Enriquezca el título.

## DISCUSIÓN

Con el fin de ampliar el entendimiento sobre la ecología y diversidad de fagos de *Salmonella*, en este trabajo se aisló, purificó y caracterizó según rango de hospederos, fagos de *Salmonella* de muestras de heces bovinas provenientes de distintos sectores de Isla de Pascua. Este estudio indicó que (i) los fagos de *Salmonella* son comunes y ampliamente distribuidos a lo largo del territorio de Isla de Pascua, lo cual demuestra su abundancia aún en un territorio geográficamente aislado; (ii) los fagos de *Salmonella* aislados desde bovinos de Isla de Pascua presentan una considerable diversidad fenotípica, incluyendo perfiles de lisis de rango de hospederos tanto estrechos como amplios; y (iii) muchos de los fagos de *Salmonella* aislados desde Isla de Pascua lisan serotipos de *Salmonella* asociados con salmonelosis tanto bovina como humana.

Las muestras reflejaron una alta frecuencia de aislamiento de fagos de *Salmonella*, con un 83% de las muestras obtenidas, provenientes de los 6 sectores, produciendo fagos aislados, incluyendo un gran número de muestras que produjeron fagos aislados con múltiples perfiles de lisis distintos. Similares resultados se obtuvieron en Estados Unidos (Moreno Switt *et al.*, 2013), donde la frecuencia de aislamiento fue también alta, representando un 78%; y en Tailandia, donde la frecuencia de aislamiento alcanzó un 67% (Wongsuntornpoj *et al.*, 2014).

Los fagos de *Salmonella* aislados en este estudio fueron caracterizados por una considerable biodiversidad, con 44 diferentes perfiles de lisis. Esta gran diversidad nos hace pensar en cómo se sobrepone al aislamiento geográfico, la gran afluencia de personas provenientes de distintas partes del mundo. Si bien lo característico de este lugar es su condición de aislamiento geográfico, lo cual nos hace pensar en una barrera física a la transmisión de agentes microbiológicos, y por tanto, una menor diversidad, existe una gran afluencia de turistas de todo el mundo, en especial chilenos. Esto último parece contraponerse al aislamiento geográfico, y producir, contrariamente a lo pensado, una mayor diversidad de agentes microbiológicos en el lugar.

**Comentado [LPHC16]:** Extrañé este comentarios en la introducción y revisión. Creo que lo clave acá es la aislación geográfica de la isla. Sabe cuándo fue la última vez que se introdujeron bovinos en pie a la Isla?

**Comentado [LPHC17]:** Esta frase no me deja conforme. Por favor expláyese un poco mejor. ¿Qué quiere decir?

A pesar de la diversidad de fagos encontrados aquí, también se identificaron fagos aislados con PLs muy similares, en diferentes áreas geográficamente separadas. Por ejemplo, algunos fagos aislados desde muestras provenientes de Rano Raraku comparten el mismo perfil de lisis con fagos aislados de muestras provenientes de los sectores más distantes a este (14 Km aproximadamente): Orito y Puna Pau. Similares resultados fueron reportados en granjas lecheras de Estados Unidos, donde 2 de las granjas muestreadas, separadas por aproximadamente 65 km, mostraron 2 tipos de fagos con idéntico perfil de lisis (Moreno Switt *et al.*, 2013). No solo se aislaron fagos con igual PL a distancia. La mayoría de los fagos (10 de 12) que presentaron PL2, provienen de 2 sectores: 6 de Maunga Otu'u y 4 de Vaihu. Ambos sectores son cercanos entre sí, lo cual hace muy probable el contacto entre ambos rebaños, ya que la mayor parte del tiempo estos pastorean libremente en sectores muy cercanos. Estos datos podrían indicar una conexión entre estos grupos de animales, como una fuente común de alimentación, animales, o intercambio de vectores (insectos, roedores, aves) (Pangloli *et al.*, 2008).

La clasificación de fagos aislados en diferentes PLs, y la similitud o igualdad de PLs entre fagos, no necesariamente implica que estos sean fagos distintos. Para determinar esto, sería necesario llevar a cabo una caracterización molecular de estos fagos, como por ejemplo una secuenciación genómica (Moreno Switt *et al.*, 2013).

Es importante mencionar que los puntos de corte utilizados en la definición del rango de hospederos de nuestros fagos, fueron los mismos utilizados en los estudios previos similares a este (Dueñas *et al.*, 2017; Moreno Switt *et al.*, 2013; Wongsuntornpoj *et al.*, 2014), y se definieron iguales con la finalidad de comparar resultados. A pesar de que, según los rangos estrecho y amplio, definidos previamente, nuestros fagos están mayormente clasificados como amplios, la mayoría de ellos tiene un PL muy cercano al punto de corte entre estrecho y amplio, contrariamente a lo obtenido en producciones de pequeña escala en Tailandia, donde todos los fagos tuvieron amplio y muy amplio rango de hospederos (Wongsuntornpoj *et al.*, 2014). Sin embargo, nuestros resultados podrían asemejarse más a lo obtenido en producciones intensivas de Estados Unidos, en las cuales fue común obtener fagos con estrecho rango (Moreno Switt *et al.*, 2013). Sin duda, los resultados que más se asemejan a

los nuestros, fueron los obtenidos de muestras provenientes de predios lecheros del sur de Chile. El perfil de lisis más común entre esos fagos aislados, lisó las mismas cepas que uno de nuestros perfiles de lisis más comunes (PL2): *S. Enteritidis*, *S. Javiana* y *S. Dublin* (Dueñas *et al.*, 2017). En este estudio del sur de Chile, además se probaron los fagos aislados para *E. coli* y *Pseudomonas* spp., siendo ningún fago capaz de lisarlas, y sugiriendo por lo tanto, que los fagos aislados ahí, parecen ser específicos de *Salmonella*. Sin embargo, en nuestros fagos no fueron probadas dichas bacterias, por lo que la única manera de saber si nuestros fagos presentan también esta condición de posible especificidad, es caracterizando su rango de hospederos con un panel que las incluya. Se formuló la hipótesis de que las distintas prácticas agrícolas pueden tener un rol en la diversidad de fagos de *Salmonella*. Mientras producciones intensivas-confinadas pueden facilitar una alta densidad de un serotipo; vacas a pastoreo libre y presencia de otros animales, puede facilitar una baja densidad de *Salmonella*, y co-presencia de serotipos de *Salmonella* asociados con diferentes animales hospederos. Alta densidad de un solo serotipo puede conducir hacia fagos con estrecho rango de hospederos; por el contrario, baja densidad de múltiples serotipos puede conducir hacia fagos con amplio rango de hospederos (Wongsuntornpoj *et al.*, 2014).

Nuestros fagos presentan características similares a los estudios previos mencionados (Dueñas *et al.*, 2017; Moreno Switt *et al.*, 2013; Wongsuntornpoj *et al.*, 2014), en los cuales se han aislados fagos a partir de predios con historial de *Salmonella*, incluso desde animales clínicamente sanos, lo cual podría sugerir la posibilidad de que en Isla de Pascua exista o haya existido alguna población de *Salmonella* que dé origen a esta gran diversidad de fagos aislados. Además, la gran similitud con los resultados obtenidos por Dueñas *et al.* (2017) en muestras del sur de Chile, podría ser una evidencia que sugiera que los bovinos presentes en Isla de Pascua provendrían de Chile.

Como hemos podido ver, los ambientes de producciones bovinas son ricos en abundancia y diversidad de fagos. Fagos aislados usando muestras de distintos continentes, representando distintos sistemas productivos, pueden mejorar aún más la habilidad de aislar fagos con rangos hospederos deseados. Estos fagos podrían ser incluso usados como agentes de biocontrol y en aplicaciones diagnósticas (Wongsuntornpoj *et al.*, 2014).

Comentado [LPHC18]: cursiva

Comentado [LPHC19]: Es clara la evidencia de que los animales de I de Pascua provendrían de Chile, o no? Al menos los fagos se parecen. Revise este tema y si puede, lo agrega a la discusión.

Comentado [LPHC20]: Falta, de acuerdo con la rúbrica, "Se expone las limitaciones de los resultados descritos". ¿Hay limitaciones? ¿Cuáles serían?

Comentado [CVSL(21R20)]: Si bien entiendo, mis limitaciones tuvieron que ver con temas de conflictos sociales en el momento del muestreo, por lo que no pude acceder a todos los productores ni obtener la cantidad de muestras esperada. Esto se menciona al final de la página 8. Si no se refería a esto, entonces no entendí bien.

## CONCLUSIONES

La presente investigación permite concluir que:

1. Existe gran abundancia y diversidad de fagos de *Salmonella* spp. en bovinos de Isla de Pascua.
2. Se determinaron una gran cantidad de perfiles de lisis entre los fagos, tanto similares como distintos entre ellos; presentando desde estrecho a amplio rango de hospederos.
3. Fagos podrían jugar un rol importante en la ecología de *Salmonella* en estos sistemas productivos.

## BIBLIOGRAFÍA

**BORIE, C.; ROBESON, J.; GALARCE, N.** 2014. Bacteriófagos líticos en Medicina Veterinaria: ¿Una opción terapéutica frente a patógenos bacterianos?. Archivos de Medicina Veterinaria 46: 167-179.

**BURBANO-ROSETO, E.** 2009. Frecuencia e diversidade de colifagos somáticos aislados de amostras de agua do mar, plancton e bivalves da Baixada Santista, canal de Sao Sebastiao e Ubatuba. Universidad de Sao Paulo, Brasil. (Citado por Quiroz, M. 2015. Variabilidad genética de colifagos somáticos aislados a partir de muestras de agua del Lago Guamuez (Nariño-Colombia). In: Trabajo de investigación para título de Biólogo. San Juan de Pasto, Colombia. Universidad de Nariño. Fac. de Ciencias Exactas y Naturales. 72p.

**DABROWSKA, K.; SWITALA-JELEN, K.; OPOLSKI, A.; WEBER-DABROWSKA, B.; GORSKI, A.** 2005. Bacteriophage penetration in vertebrates. *J Appl Microbiol* 98, 7-13. (Citado por Borie *et al.* 2008. Prevención de la infección por *Salmonella enterica* subespecie *enterica* serotipo Enteritidis (*Salmonella* Enteritidis) en pollos mediante un bacteriófago. In: Archivos de Medicina Veterinaria. 40(2): 197-201.

**DOHOO, I.; MARTIN, W.; STRYHN, H.** 2003. Veterinary Epidemiologic Research. Atlantic Veterinary College. Charlottetown, PE, Canada. 706pp.

**DUEÑAS, F.; RIVERA, D.; TOLEDO, V.; TARDONE, R.; HERVÉ-CLAUDE, L.; HAMILTON-WEST, C.; MORENO SWITT, A.** 2017. Characterization of *Salmonella* phages from dairy calves on farms with history of diarrhea. *Journal Dairy Science*. 100: 1-5.

**GARCÍA, E.; LÓPEZ, R.** 2002. Los bacteriófagos y sus productos génicos como agentes antimicrobianos. *Revista Española de Quimioterapia*. Madrid, España. 15(4): 306-312.

**GARCÍA, P.; MARTÍNEZ, B.; OBESO, J.M.; RODRÍGUEZ, A.** 2008. Bacteriophages and their application in food safety. *Letters in Applied Microbiology*. 47: 479-485.

**GORSKI, A.; WEBER-DABROWSKA, B.** 2005. The potential role of endogenous bacteriophages in controlling invading pathogens. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 62, 511-519. (Citado por Borie *et al.* 2008. Prevención de la infección por *Salmonella enterica* subespecie *enterica* serotipo Enteritidis (*Salmonella* Enteritidis) en pollos mediante un bacteriófago. In: Archivos de Medicina Veterinaria. 40(2): 197-201. Valdivia, Chile.)

**HUDSON, J.; BILLINGTON, C.; CAREY-SMITH, G.; GREENING, G.** 2005. Bacteriophages as biocontrol agents in food. *Journal of Food Protection*. 68: 426-437. (Citado por Borie *et al.*, 2008. Prevención de la infección por *Salmonella enterica* subespecie *enterica* serotipo Enteritidis (*Salmonella* Enteritidis) en pollos mediante un bacteriófago. In: Archivos de Medicina Veterinaria. 40(2): 197-201.

**INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICAS (INE).** 2017. Cantidad de personas por sexo y edad [en línea]. <<http://www.censo2017.cl/descargue-aqui-resultados-de-comunas/>> [consulta: 07-06-2017]

**MONTOYA, M.** 2011. Diagnóstico técnico y social de las prácticas ganaderas en Isla de Pascua. CONADI / CONAF / MOBA. Chile.

**MORENO SWITT, A.; DEN BAKKER, H.; VONGKAMJAN, K.; HOELZER, K.; WARNICK, L.; CUMMINGS, K.; WIEDMANN, M.** 2013. Salmonella bacteriophage diversity reflects host diversity on dairy farms. *Food Microbiology*. 36 (2): 275-285.

**PANGLOLI, P.; DJE, Y.; AHMED, O.; DOANE, C.; OLIVER, S.; DRAUGHON, F.** 2008. Seasonal incidence and molecular characterization of Salmonella from dairy cows, calves, and farm environment. *Foodborne Pathog. Dis.* 5 (1), 87e96. Citado por Moreno Switt *et al.*, 2013. Salmonella bacteriophage diversity reflects host diversity on dairy farms. **In:** *Food Microbiology*. 36 (2): 275-285.

**QUIROZ, M.** 2015. Variabilidad genética de colifagos somáticos aislados a partir de muestras de agua del Lago Guamuez (Nariño-Colombia). Trabajo de investigación para título de Biólogo. San Juan de Pasto, Colombia. Universidad de Nariño. Fac. de Ciencias Exactas y Naturales. 72p.

**SULAKVELIDZE, A.; ALAVIDZE, Z.; MORRIS, J.** 2001. Bacteriophage therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 45: 649-659. (Citado por Borie *et al.*, 2008. Prevención de la infección por *Salmonella enterica* subespecie *enterica* serotipo Enteritidis (*Salmonella* Enteritidis) en pollos mediante un bacteriófago. **In:** *Archivos de Medicina Veterinaria*. 40(2): 197-201.

**VERGARA, F.** 2013. Estudio prospectivo de la seroprevalencia de Diarrea Viral Bovina, Rinotraqueítis Infecciosa Bovina, Brucelosis, Leptospirosis y Neosporosis en bovinos de Isla de Pascua. Memoria título Médico Veterinario. Chillán, Chile. Universidad de Concepción, Fac. de Ciencias Veterinarias. 41p.

**VISPO, N.; PUCHADES, Y.** 2001. Bacteriófagos: de la terapia con fagos a la biología combinatoria. *Biotecnología Aplicada*. 18:135-147.

**WONGSUNTORNPOJ, S.; MORENO SWITT, A.; BERGHOLZ, P.; WIEDMANN M.; CHATURONGAKUL, S.** 2014. *Salmonella* phages isolated from dairy farms in Thailand show wider host range than a comparable set of phages isolated from U.S. dairy farms. *Veterinary Microbiology* 172(2014) 345-352.

## ANEXOS

### ANEXO NRO. 1: PLANIFICACIÓN

Actividad	Mes 1	Mes 2	Mes 3	Mes 4	Mes 5	Mes 6
Presentación proyecto	X					
Aislamiento fagos		X	X			
Titulación Fagos			X	X		
Rango de hospederos Fagos			X	X		
Redacción tesis			X	X	X	
Avance				X		
Presentación final						X

## ANEXO NRO. 2: CERTIFICADO DE BIOSEGURIDAD



DEPARTAMENTO DE ECOLOGÍA Y BIODIVERSIDAD  
FACULTAD DE ECOLOGÍA Y RECURSOS NATURALES  
UNIVERSIDAD ANDRÉS BELLO

Santiago, 27 de Noviembre del 2014

Señor  
Luis Gutiérrez Lazo  
Director Fondecyt  
Presente

Estimado Sr. Gutiérrez:

A través de la presente quisiera informar a usted que la manipulación de muestras fecales de animales y de cepas de *Salmonella* y de fagos, propuesta en el proyecto Fondecyt de Iniciación N°11140108: "Genetic Diversity of *Salmonella* phage and CRISPR spacer arrays as a signature of *Salmonella* animal origin", recientemente adjudicado por la Dra. Andrea Moreno Switt de la Universidad Andrés Bello, cumple con las normas establecidas en el Manual de Normas de Bioseguridad 2008 de CONICYT.

Sin otro particular, le saluda muy cordialmente,

  
  
DIRECTOR  
Departamento de Ecología y Biodiversidad  
Facultad de Ecología y Recursos Naturales  
Universidad Andrés Bello

### ANEXO NRO. 3: ACTA DE BIOÉTICA



COMITÉ DE BIOÉTICA  
VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y DOCTORADO  
UNIVERSIDAD ANDRÉS BELLO

Santiago, 24 de diciembre de 2014

#### Acta de Bioética 019/2014

Comité constituido en conformidad al Decreto Universitario 1939/2012 de la Universidad Andrés Bello con fecha 2 de agosto de 2012.

El Comité de Bioética de la Universidad Andrés Bello, certifica mediante esta acta que el **proyecto n°11140108**, aprobado en el Concurso Iniciación en Investigación 2014, cuyo Investigador Principal es la Dra. Andrea Isabel Moreno Switt y que se titula **"Genetic Diversity of Salmonella phage and CRISPR spacer arrays as a signature of Salmonella animal origin"**, ha entregado los antecedentes necesarios para corroborar que esta iniciativa **no requiere de certificación bioética**.

Se reitera al investigador que cualquier cambio que se postule a este proyecto y que involucre una certificación por parte de este Comité, debe ser presentado en forma previa a la ejecución de la parte experimental. Por otro lado se indica que cualquier cambio o consulta debe ser dirigido al correo institucional del comité, [comite\\_bioetica@unab.cl](mailto:comite_bioetica@unab.cl)

Sin otro particular, les saluda cordialmente

Rodolfo Paredes, PhD  
Presidente  
Comité de Bioética  
Universidad Andrés Bello

c.c.: -Dra. Andrea Isabel Moreno Switt  
-Archivo.