



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica
y del Medio Natural

Caracterización fenotípica de bacteriófago frente a
Enterococcus faecalis y Enterococcus faecium

Trabajo Fin de Máster

Máster Universitario en Ganadería de Precisión

AUTOR/A: Ochoa Burgos, Juan

Tutor/a: Pascual Amorós, Juan José

Cotutor/a externo: Sevilla Navarro, Sandra

CURSO ACADÉMICO: 2023/2024

**CARACTERIZACIÓN FENÓTIPICA DE
BACTERIÓFAGOS FRENTE A *Enterococcus faecium* y
faecalis.**

Autor:

Juan Pablo Ochoa Burgos

Directores:

Dra. Sandra Sevilla Navarro

Dr. Juan José Pascual Amorós

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER



**UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA**

FACULTAD AGRONÓMICA Y DEL MEDIO NATURAL

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA

VALENCIA

RESUMEN

La creciente aparición de cepas multirresistentes de *Enterococcus faecium* y *Enterococcus faecalis* en la avicultura constituye un problema de suma importancia. Estas bacterias no solo representan un desafío significativo para la salud pública, sino también para la producción avícola, provocando grandes pérdidas económicas. En este contexto, los fagos líticos emergen como una alternativa prometedora a los antibióticos tradicionales debido a su alta especificidad y capacidad para evolucionar junto con sus hospedadores bacterianos.

En el estudio se encontró que el 95% de los aislados de *Enterococcus* eran cepas multirresistentes. Por lo que respecta a los fagos, se aislaron un total de 17 fagos que lisaban el 79% de cepas de *Enterococcus*. Los fagos líticos encontrados mostraron una gran estabilidad en cuanto a sobrevivencia a rangos de temperatura desde los -80 hasta los 60°C y un rango de pH de 4 a 10.

Los resultados obtenidos en este estudio muestran la eficacia *in vitro* de los bacteriófagos frente a cepas de *Enterococcus* spp. multirresistentes. La alta especificidad de los fagos y su capacidad para sobrevivir en condiciones adversas los posicionan como una herramienta en el control de estas infecciones. Sin embargo, es necesario caracterizar los bacteriófagos a nivel genómico y realizar pruebas *in vivo* para evaluar su eficacia en condiciones de campo.

Palabras clave: *Enterococcus*; bacteriófagos; multirresistencias; avicultura

ABSTRACT

The increasing emergence of multidrug-resistant strains of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* in poultry farming constitutes a problem of utmost importance. These bacteria not only pose a significant challenge to public health but also to poultry production, leading to substantial economic losses. In this context, lytic phages emerge as a promising alternative to traditional antibiotics due to their high specificity and ability to co-evolve with their bacterial hosts.

In the study, it was found that 95% of the *Enterococcus* isolates were multidrug-resistant strains. As for the phages, a total of 17 phages were isolated, which were effective against 79% strains. The lytic phages identified showed high stability in terms of survival across temperature ranges from -80 to 60°C and a pH range of 4 to 10.

These results obtained in this study demonstrate the in vitro efficacy of bacteriophages against multidrug-resistant *Enterococcus* spp. strains. The high specificity of the phages and their ability to survive under adverse conditions position them as a potential tool for controlling these infections. However, it is necessary to characterize the bacteriophages at the genomic level and conduct in vivo tests to evaluate their efficacy under field conditions.

Key words: *Enterococcus*; bacteriophages; multidrug resistance; poultry

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
1. Introducción.....	7
1.1 <i>Enterococcus</i> spp.....	7
1.2 Resistencia antimicrobiana en <i>Enterococcus</i> spp.	9
1.3 Bacteriófagos.....	9
1.4 Terapia fágica frente a <i>Enterococcus</i> spp.	11
2.Objetivos.....	11
3.Materiales y métodos	12
3.1 Selección de las cepas de <i>Enterococcus</i>	12
3.2 Determinación del perfil de resistencias	12
3.3 Aislamiento de bacteriófagos.....	13
3.4 Purificación de bacteriófagos	14
3.5 Multiplicación de bacteriófagos	14
3.6 Estabilidad térmica y pH de los fagos	15
3.7 Análisis estadístico	15
4. Resultados.....	16
4.1 Determinación del perfil de resistencias	16
4.2 Aislamiento de bacteriófagos.....	17
4.3 Estabilidad térmica y de pH.....	18
5. Discusión	19
6. Conclusiones	21
7.Bibliografía	23

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Micrografía electrónica de barrido de <i>Enterococcus</i> (Obtenido de: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/5/52/Enterococcus_sp2_lores.jpg?20060418180054).	7
Figura 2. Número de fallecimientos en personas asociados a bacterias MDR (Imagen obtenida de: Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic análisis-The Lancet).....	7
Figura 3. Partes de un Bacteriófago. (imagen obtenida de: https://static.tuasaude.com/media/article/xv/xe/bacteriofago_54058_1.jpg).	10
Figura 4. Ciclo lítico y ciclo lisogénico. (Imagen creada con: Biorender).	10
Figura 5. Placa Sensititre con la inoculación de cepa de <i>Enterococcus</i> (izq), antibióticos y dosis (der).	13
Figura 6. Esquema del método de aislamiento de bacteriófagos.....	14
Figura 7. Esquema del método de purificación de bacteriófagos.....	14
Figura 8. Caracterización de los fagos en sus cepas de propagación. Tratamiento térmico y de pH.....	15
Figura 9. Porcentaje de resistencia por antibiótico de las cepas <i>E. faecalis</i> y <i>E. faecium</i> . ^{a,b,c} : Los superíndices muestran diferencias estadísticamente significativas entre los antibióticos ($p < 0.05$). VAN: Vancomicina; TEI Teicoplanin, SYN Quinuspristin, TET Tetraciclina, DAP Daptomicina, CIP Ciprofloxacina, ERY Eritromicina, TGC Tigeciclina, LZD Linezolina, Gen Gentamicina, AMP Ampicilina, CHL Cloranfenicol.	16
Figura 10. Rango de hospedadores de 17 fagos aislados a partir de muestras avícolas frente a cepas <i>Enterococcus</i> spp. El color azul indica actividad depolimerasa y elevada actividad lítica (C*), color verde: elevada actividad lítica (C), color amarillo: actividad lítica intermedia (T), color naranja: actividad lítica baja (P), color rojo: actividad lítica no detectada (N).	18
Figura 11. Porcentaje de estabilidad de temperatura tras 30 minutos de los 17 bacteriófagos con su cepa de propagación. U: referencia de fago, T: referencia de bacteria.	18
Figura 12. Porcentaje de estabilidad de temperatura tras 60 minutos de los 16 bacteriófagos con su cepa de propagación. U: referencia de fago, T: referencia de bacteria.	19
Figura 13. Porcentaje de estabilidad de pH tras 60 minutos de los 17 bacteriófagos con su cepa de propagación. U: referencia de fago, T: referencia de bacteria.	19

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Identificación de las cepas de <i>Enterococcus</i> seleccionadas para el estudio.....	12
Tabla2. Porcentajes de resistencias de cada cepa	16
Tabla 3. Fagos obtenidos con sus orígenes detallados.....	17

Anejo I. Relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible de la agenda 2030.

A. Indicar el grado de relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS).

	Alto	Medio	Bajo	No procede
ODS 1. Fin de la pobreza		X		
ODS 2. Hambre cero	X			
ODS 3. Salud y bienestar	X			
ODS 4. Educación de calidad				X
ODS 5. Igualdad de género				X
ODS 6. Agua limpia y saneamiento	X			
ODS 7. Energía asequible y no contaminante				X
ODS 8. Trabajo decente y crecimiento económico		X		
ODS 9. Industria, innovación e infraestructuras	X			
ODS 10. Reducción de las desigualdades				X
ODS 11. Ciudades y comunidades sostenibles				X
ODS 12. Producción y consumo responsables	X			
ODS 13. Acción por el clima	X			X
ODS 14. Vida submarina				X
ODS 15. Vida de ecosistemas terrestres	X			
ODS 16. Paz, justicia e instituciones sólidas				X
ODS 17. Alianzas para lograr objetivos.				X

B. Describir brevemente la alineación del TFG con los ODS, marcados en la tabla anterior, con un grado alto.

Mi trabajo de Fin de Máster, tiene una relación alta con el hambre cero ya que al reducir los costos de producción de proteína de calidad, bajará necesariamente los precios .

Al igual que la salud y el bienestar ya que el TFM se enfoca en gran medida en One Health, ya que se enfoca en solucionar problemas de bacterias con multirresistencias disminuyendo y eliminando el uso de antibióticos en animales de consumo.

No tiene relación con educación de calidad ni con igualdad de género.

Agua limpia y saneamiento, producción y consumo responsable, acción por el clima y vida de ecosistemas terrestres, se relaciona directamente, ya que al tener animales más sanos y sin uso de antibióticos habrá menos contaminación tanto de aguas, costos de producción, contaminación ambiental y menos enfermedades y resistencias de bacterias mejorando así la vida en ecosistemas terrestres.

1. Introducción

1.1 *Enterococcus* spp.

Los Enterococos son microorganismo anaerobios facultativos cocos grampositivos, no formadores de esporas, altamente resistentes a ambientes hostiles. Toleran temperaturas de crecimiento que van desde los 10 a los 45º C, atmósferas con o sin oxígeno, y ambientes ácidos o alcalinos (Ferreira Araujo & de Luces Fortes Ferreira, 2013) (**Figura 1**). Su cultivo se realiza en agar sangre donde forman colonias de color blanco de entre 0.5-1mm hemolíticas o no, con un tamaño entre 0.5 y 1mm. Fue descubierto en 1889 por Thiercelin, el cual luego fue clasificado como *Streptococcus* para finalmente en 1984 volverlo a clasificar de forma definitiva como *Enterococcus*. Hasta la fecha se han descrito más de 60 especies, entre las cuales, las más comunes son *Enterococcus faecium* (*E. faecium*) y *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*). Estos se encuentran en diferentes ambientes, pero principalmente en el intestino de los animales y de las persona (García Solache & Arroz, 2019).

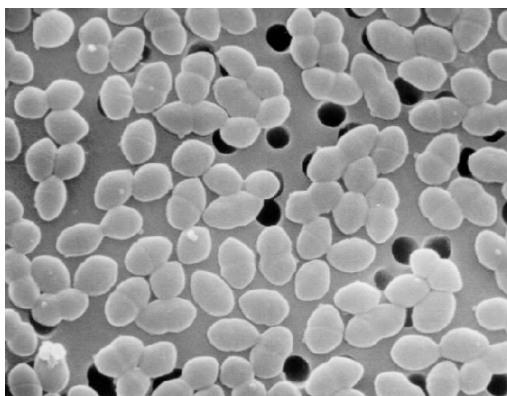


Figura 1. Micrografía electrónica de barrido de *Enterococcus* (Obtenido de: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/5/52/Enterococcus_sp2_lores.jpg?20060418180054).

Enterococcus spp. forma parte de la microbiota comensal de personas y animales, sin embargo, en las personas, pueden provocar infecciones cuando actúan como patógenos oportunistas/secundarios. En el caso de las personas, *E. faecalis* tiene una presencia en materiales médicos en un 80-90%, seguido del *E. faecium* con un 8-16% (Devriese et al., 2006). La principal sintomatología clínica asociada a procesos por *Enterococcus* son endocarditis, infecciones urinarias e intraabdominales (Bush & Vazquez-Peretejo, 2023).

Enterococcus spp. pertenece al grupo de patógenos ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter* spp.) conocidos por ser microorganismos multirresistentes (MDR; en sus siglas en inglés) que "escapan" a la acción de los antibióticos (Naghavi, 2022). En particular, *E. faecium* y *E. faecalis* son especies asociadas con una alta mortalidad en personas debido a la falta de tratamientos antibióticos eficaces (**Figura 2**). Estos patógenos poseen mecanismos de resistencia múltiple a los antibióticos y la capacidad de sobrevivir en diversos entornos médicos, pudiéndose encontrar en herramientas de hospitales y clínicas a nivel mundial (Fariñas & Torres, 2007).

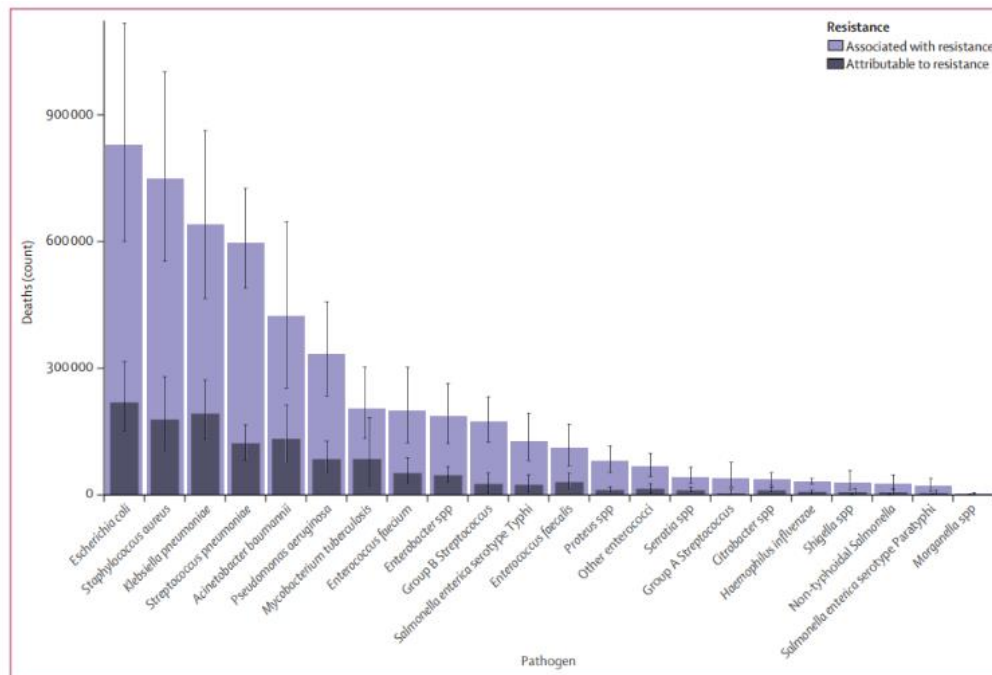


Figura 2. Número de fallecimientos en personas asociados a bacterias MDR (Imagen obtenida de: Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic análisis-The Lancet).

Importancia de *Enterococcus* en avicultura

En el sector avícola las especies más comunes son *E. faecalis* *E. faecium*, asociados a problemas de incubabilidad mortalidad embrionaria temprana, y *E. cecorum*, asociados con problemas locomotores, en broilers las cuales están asociadas con problemas de incubabilidad y mortalidad embrionaria temprana (Oviedo-Rondon, 2024).

E. faecalis y *E. faecium* puede afectar a aves de todas las edades y se transmite a través de heridas en la piel, por vía oral, aerógena, y por contaminación fecal en el cascarón del huevo al momento del nacimiento. El período de incubación variar de 1 a 21 días (Catalá Gregori & Mateo Santamaría, 2014). Los síntomas principales incluyen diarreas, disminución de la puesta de huevos, crestas pálidas, aumento de la mortalidad de los pollitos en la primera semana de vida, disminución del peso corporal, endocarditis, encefalomalacia en pollos jóvenes, artropatía y alteraciones locomotoras (Catalá Gregori & Mateo Santamaría, 2014).

Por otro lado, *E. cecorum* ha emergido como una bacteria patógena en la industria avícola. Anteriormente considerada una bacteria benigna y común en la microbiota intestinal de broilers y ponedoras, *E. cecorum* ha evolucionado, desarrollando cepas patógenas lo que ha resultado en importantes pérdidas económicas para los productores avícolas (Biovet, 2023). En los últimos años, se ha observado un aumento en las infecciones por *E. cecorum* en broilers, particularmente aquellas que afectan el sistema locomotor. Los síntomas observados incluyen cojeras y dificultad para moverse y alimentarse (Canturri et al., 2015). En un estudio publicado por la Red Francesa de Vigilancia Epidemiológica Avícola (RNOEA) registró un total de 12,177 casos de infecciones por *Enterococcus*, con *E. cecorum* representando el 53,1% de estos casos y *E. faecalis* el 24,3%. La incidencia de *Enterococcus* ha aumentado de un 0,4% de todos los patógenos notificados en 2006 a un 12,9% en 2020. En los Países Bajos, *E. cecorum* ha sido predominantemente identificado en pollos broilers, con necropsias revelando fracturas en la cabeza del fémur, infecciones pericárdicas, y la presencia de esta bacteria en reproductoras y huevos no eclosionados (Vicente et al., 2011).

1.2 Resistencia antimicrobiana en *Enterococcus* spp.

Sumando a la creciente aparición de cepas patógenas en avicultura, *Enterococcus* spp. es una bacteria que posee resistencias naturales a varios antibióticos. El uso continuado de antibióticos ha favorecido la evolución de cepas bacterianas con resistencia a un amplio espectro de antibióticos, incluyendo la vancomicina (García Llorens et al., 2023); (Lapierre et al., 2010); (Benaravia et al., 2020).

Los últimos datos publicados por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA; en sus siglas en inglés), observaron una alta resistencia a eritromicina (75-80% *E. faecium*), tetraciclina (50-60% *E. faecalis*), y tetraciclina (70-90% *E. faecium* y 60-80% *E. faecalis*). La resistencia a la vancomicina, un antibiótico de última línea se mantuvo baja, por debajo del 1-2%. La resistencia a ampicilina fue alta en *E. faecium* (40-50%) pero baja en *E. faecalis* (menos del 10%), y la resistencia a ciprofloxacina se situó entre el 10-15%. Estas cifras varían entre países, con tasas más altas en regiones con uso intensivo de antimicrobianos (EFSA, 2021).

Estos datos ponen en evidencia la necesidad de continuar monitoreando y reduciendo el uso de antimicrobianos en la avicultura para frenar la propagación de cepas resistentes, en países que han reducido el uso de antibióticos en humanos y animales, se ha observado una disminución en la resistencia bacteriana. Los resultados del informe JICARA IV (Joint Interagency Antimicrobial Consumption and Resistance Analysis), publicado por el Centro Europeo para la Prevención y el Control de las Enfermedades (ECDC por sus siglas en inglés), Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA por sus siglas en inglés) y Agencia Europea de Medicamentos (EMA por sus siglas en inglés) (EFSA, 2024), sugieren que con esta reducción es posible revertir la resistencia mediante acciones adecuadas. Por ello, se están explorando alternativas para su control, como el uso de bacteriófagos. Estos han demostrado ser efectivos contra *E. faecalis* en pollos de engorde, aunque se requieren más estudios para confirmar su eficacia general (García-Llorens et al., 2022).

1.3 Bacteriófagos

Los bacteriófagos o fagos, son virus que atacan a únicamente a células procariotas, capaces de parasitar bacterias, presentes en todos los ambientes principalmente en el mar (Fuhrman, 1999). Son la forma de vida más abundante, estimándose una concentración de 10^{31} partículas en el planeta Tierra (Fernández et al., 2020). Actualmente se reconocen 873 especies, 204 géneros y 14 subfamilias. El 96% de los bacteriófagos conocidos pertenecen al orden de los *Caudoviricetes*. Son naturales, específicos, autolimitantes y se están estudiando en avicultura como agentes de biocontrol, higienizantes de superficies o preventivos y como alternativa a los antibióticos, terapia fágica o terapéuticos, frente a bacterias como *Salmonella*, *Campylobacter*, *E. coli*, *Clostridium* y *Enterococcus* por motivos de salud pública o sanidad animal (King et al., 2012).

Su estructura se compone principalmente de una cabeza y una cola. La cabeza, de forma icosaédrica, contiene el material genético, mientras que la cola, cuyo tamaño puede variar, se utiliza para insertar el material genético en la bacteria diana (Fernández et al., 2020) (**Figura 3**).

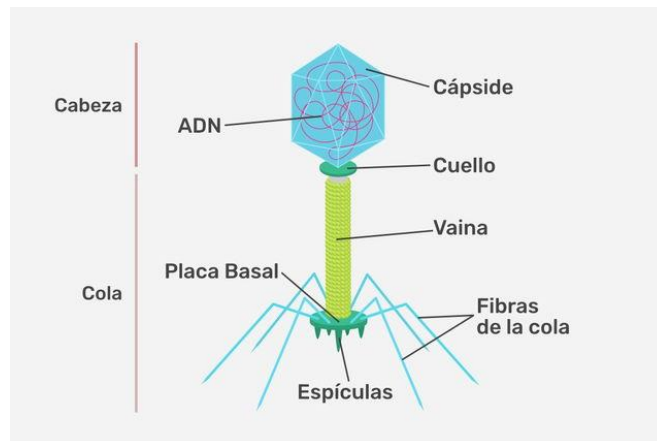


Figura 3. Partes de un Bacteriófago. (imagen obtenida de: https://static.tuasaude.com/media/article/xv/xe/bacteriofago_54058_1.jpg).

Existen varios tipos de fagos según su ciclo de vida, principalmente fagos de ciclo de vida lítico y ciclo de vida lisogénicos (Figura 4) (Mayer, 2020).

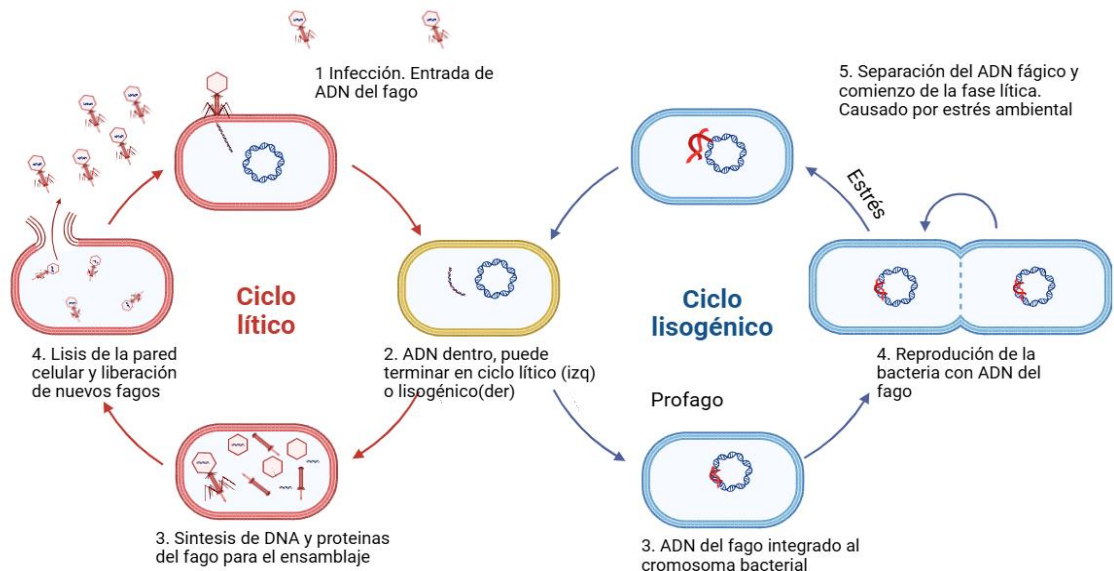


Figura 4. Ciclo lítico y ciclo lisogénico. (Imagen creada con: Biorender).

5r

Los fagos de ciclo de vida **lítico** son aquellos que, al infectar la bacteria, introducen su ADN y toman el control de la biosíntesis utilizando los recursos del hospedador en la producción de proteínas y mRNA, que usara para su propia replicación, destruyendo así la bacteria y liberando gran cantidad de nuevos fagos. Por el contrario los de ciclo de vida **lisogénico**, después de introducir su ADN en el hospedador, en lugar de replicarse, recombinan su ADN con el del huésped y pasa a sobrevivir de forma latente dentro de la bacteria sin dañarla, hasta que en algún momento dado que puede ser por algún tipo de estrés ambiental (deseccación, exposición a UV, químicos tóxicos, competencia, etc.) el ADN del fago se activa y actúa como un fago lítico, es decir utiliza los recursos del hospedador para reproducirse hasta lisis a la bacteria (Mayer, 2020). Desde un punto de vista terapéutico, los fagos seleccionados para la terapia fágica deben ser de ciclo de vida lítico, ya que estos destruyen directamente a la bacteria. Además, al no integrar su ADN con el de la bacteria, se minimiza el riesgo de transferencia de genes de resistencia o virulencia desde los fagos hacia las bacterias (Lu & Collins, 2009); (Pratama & Van Elsas, 2017).

1.4 Terapia fágica frente a *Enterococcus* spp.

El uso de bacteriófagos en explotaciones avícolas frente a *Enterococcus* es aún incipiente, y no hay estudios *in vivo* que demuestren su eficacia. No obstante, sí que hay publicado en la bibliografía la eficacia de los bacteriófagos frente a otras bacterias de interés como es *Salmonella* spp. En este contexto, existen pruebas de campo que emplean fagos como desinfectantes de superficies frente a otros *Salmonella*. Esto se debe a la persistencia de bacterias como *Salmonella* spp., productoras de biopelículas, que limitan la acción de los desinfectantes químicos (Steenackers et al., 2012). Actualmente, se están evaluando cócteles de fagos capaces de destruir estas biopelículas, ya que pueden sintetizar enzimas específicas, como la de polimerasa.

También se ha evaluado la administración oral de bacteriófagos para el control de *S. Typhimurium* en pollos broilers, logrando disminuir la tasa de mortalidad del 56% al 20% en comparación con el grupo de control. Sin embargo, el recuento de *S. Typhimurium* después de 6 horas fue similar al previo al tratamiento. Esto se debe, en parte, a que los fagos no sobrevivieron al pH ácido del proventrículo y la molleja, por ello es indispensable la caracterización de los fagos antes de usarlos en pruebas *in vivo*. Para la administración oral, una posible solución es encapsular los bacteriófagos para protegerlos del ambiente ácido (Bercheri et al., 1991).

El producto comercial de bacteriófagos Biotector S1® (CJ CheilJedang Research Institute of Biotechnology, Seúl, Corea del Sur), utilizado como aditivo en el pienso para el control de *S. enterica* serovar Pullorum y Gallinarum en pollos de engorde y reproductoras, redujo la mortalidad en un 35% en comparación con el grupo de control, además de incrementar la puesta de huevos en un 3% (Clavijo et al., 2019). Asimismo, el uso de fagos en el agua de bebida demostró ser seguro, ya que no afectó el comportamiento ni el rendimiento de los animales. Al final del estudio, los hisopos cloacales mostraron ausencia de *Salmonella*, mientras que en el grupo de control sí hubo conteo (Abd El Wahab et al., 2023).

2. Objetivos

Debido a la creciente aparición de cepas patógenas resistentes a antibióticos en avicultura, el objetivo principal de este trabajo es la caracterización fenotípica de bacteriófagos específicos frente a aislados clínicos en avicultura de *Enterococcus* para después poder emplearlos en estudios *in vivo*. Para ello, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- i. Caracterización de aislados de *E. faecalis* y *E. faecium* de granjas avícolas por perfil de resistencias a antibióticos.
- ii. Determinación del rango de hospedadores de los fagos.
- iii. Estabilidad de los fagos en diferentes condiciones de pH y temperatura.

3. Materiales y métodos

3.1 Selección de las cepas de *Enterococcus*

Las cepas de *Enterococcus* empleadas fueron obtenidas de casos clínicos de campo. Estas cepas forman parte del repositorio de microorganismos del Centro de Calidad Avícola y Alimentación Animal de la Comunidad Valenciana (CECAV) conservadas a -80°C (**Tabla 1**).

Tabla 1. Identificación de las cepas de *Enterococcus* seleccionadas para el estudio.

ESPECIE	CÓDIGO
<i>Faecalis</i>	T26
<i>Faecium</i>	T32
<i>Faecalis</i>	T41
<i>Faecium</i>	T56
<i>Faecium</i>	T98
<i>Faecalis</i>	T104
<i>Faecalis</i>	T105
<i>Faecium</i>	T139
<i>Faecium</i>	T140
<i>Faecalis</i>	T196G
<i>Faecalis</i>	T203
<i>Faecalis</i>	T261G
<i>Faecium</i>	T275
<i>Faecalis</i>	T279
<i>Faecalis</i>	T327
<i>Faecalis</i>	T421
<i>Faecium</i>	T276
<i>Faecalis</i>	T289
<i>Faecium</i>	T345

Se recuperaron 19 cepas utilizando el método de siembra de triple estría en agar sangre (VWR, Lovaina, Bélgica), las cuales fueron incubadas durante 24 ±1 horas a una temperatura de 37,5°C ± 0.5°C. Los aislados se guardaron a 4°C para utilizarlos en los ensayos de resistencias a antibióticos y caracterización fenotípica de los fagos.

3.2 Determinación del perfil de resistencias

Para determinar la o las resistencias a antibióticos (AMR por sus siglas en inglés) por parte de las cepas de *Enterococcus*, se utilizó la técnica de micro dilución en caldo, el que consiste en el uso de placas Sensititre EU Surveillance *Enterococcus* EUVENC Plate. Estas placas han sido diseñadas específicamente para evaluar la resistencia de *Enterococcus* a los siguientes antibióticos de interés: Vancomicina (VAN, 1-128 µg/ml), Teicoplanina (TEI, 0.5-64µg/ml), Quinupristina/Dalfopristina (SYM, 0.5-64µg/ml), Tetraciclina (TET, 1-128µg/ml), Daptomicina (DAP, 0.25-3µg/ml, Ciprofloxacina (CIP, 0.12-16 µg/ml), Eritromicina (ERY, 1-128 µg/ml), Tigeciclinina (TGC, 0.03-4 µg/ml), Linezolid (LZD, 0.5-64 µg/ml), Gentamicina (GEN, 8-1024 µg/ml), Ampicilina (AMP, 0.65-64 µg/ml) y Cloranfenicol (CHL 4-128 µg/ml).

Para la preparación del inóculo se seleccionaron de 3 a 5 colonias aisladas de cada una de las diferentes cepas. Estas colonias se diluyeron en 5 ml de agua destilada hasta obtener una

turbidez de 0.5 en la escala McFarland. A continuación, se transfirieron 10 µl de la suspensión a un tubo de 10 ml de caldo Mueller-Hinton (Thermo Scientific, Santa Fe Drive, EE. UU.). Para la inoculación en las placas multipocillo, se añadieron 100 µl de la suspensión anterior en cada pocillo utilizando una pipeta multicanal. Posteriormente, todas las placas se sellaron con una lámina adhesiva y se incubaron a $37,5 \pm 0,5$ °C durante 24 ± 1 horas. Tras la incubación, se procedió a la lectura visual de las placas. Se interpretó como resistentes aquellos pocillos en los que se observó turbidez o un depósito de células, mientras que en aquellos pocillos en los que se observó ausencia total de crecimiento, se consideraron sensibles (**Figura 5**).

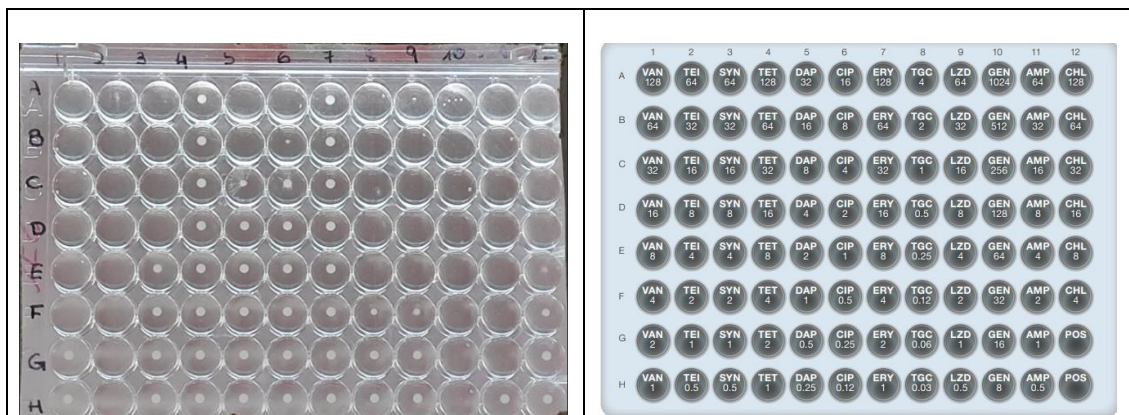


Figura 5. Placa Sensititre con la inoculación de cepa de *Enterococcus* (izq.), antibióticos y dosis (der.).

Los aislados de *Enterococcus* spp. se clasificaron como sensibles (S) o resistentes (R) de acuerdo con los cortes epidemiológicos descritos para la familia *Enterococcaceae* por el Comité Europeo del antibiograma (EUCAST; por sus siglas en inglés) (EUCAST, 2023). Cuando no se dispuso de algún corte en EUCAST, se recurrió a los valores establecidos por el *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (CLSI, 2023). En caso de no estar publicado el valor de corte epidemiológico, se designó como punto de corte al valor de concentración más alto en caso de observar crecimiento. Una cepa se definió como MDR si resultó ser resistente a tres o más familias de antibióticos antimicrobianos (Alós, 2015).

3.3 Aislamiento de bacteriófagos

Para el aislamiento de los fagos, se emplearon un total de 2,430 muestras entre heces, calzas, paños y fondos de cajas de diferentes orígenes avícolas. Para optimizar el aislamiento las muestras se agruparon un pool de 10 muestras resultando finalmente un total de 243 muestras. Por cada muestra se realizó una dilución 1:10 (p/v) en Luria Bertani (LB, VWR, Barcelona, España). A continuación, la muestra se homogenizó y se filtró primero, empleando filtros de jeringa con un diámetro de poro de 0.45 µM (VWR INTERNATIONAL, North América) seguido de una segunda filtración a 0.22 µM (VWR INTERNATIONAL, North América) (Gibson et al., 2019).

A continuación, la muestra se enfrentó a cada una de las cepas de *Enterococcus* descritas en el apartado 3.1 mediante la técnica de gota en placa (Ahmadi et al., 2016); (Navarra et al., 2020). Para ello, en una placa de LB Agar se sembró un césped bacteriano. Este césped bacteriano estaba compuesto por 200 µl de un inóculo bacteriano ($DO_{600} = 0.4$) inoculado en 5 µl de LB al 0.6% de agar. A continuación, se sembró 10 µl de cada una las muestras a testar y se incubó a 37.5°C durante 24 horas. Tras la incubación, se evaluó la presencia de posibles fagos. Para ello se observó si había actividad lítica (ausencia de bacteria donde se había depositado los 10 µl) y se caracterizó en función de su capacidad lítica de la siguiente manera **C+** (lisis completa con halo), **C** (lisis completa), **T** (lisis turbia), **P** (poca acción y opaca) y **N** (ausencia de actividad) (**Figura 6**).

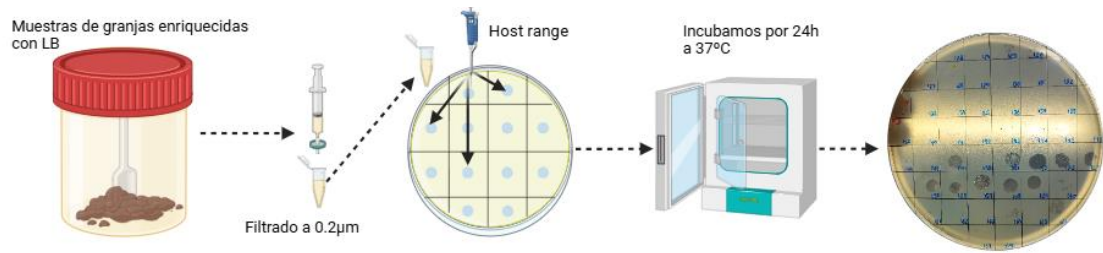


Figura 6. Esquema del método de aislamiento de bacteriófagos.

3.4 Purificación de bacteriófagos

Para la purificación de los bacteriófagos, se realizó una dilución 1:10 en placas multipocillo (Greiner Bio-One, Alemania) hasta la dilución 10^{-8} . Cada una de las diluciones se sembró en placas de LB agar mediante la técnica de doble agar. Para ello, 10 µl de la dilución se inoculó junto con 200 µl del inóculo bacteriano correspondiente y se dejó 10 min a temperatura ambiente para que se produjera la adhesión del fago a la bacteria. A continuación, se vertieron en 5 ml de LBA 0.6% y se sembró en una placa de LBA. La placa se incubó a 37.5°C durante 24 horas. Tras la incubación, se seleccionó una unidad formadora de placas (UFP) aislada con una punta de pipeta para extraer el medio que contenía el fago deseado. La calva de lisis se diluyó en 50 µl de LB en un tubo Eppendorf, se re-suspendió y se dejó en una estufa a 37.5°C durante 15-20 minutos para liberar los fagos del medio. A continuación, 10 µl de esta solución se sembró con 200 µl de la bacteria asignada. A continuación, se añadieron 5 ml de LB agar y se vertió la mezcla sobre una placa de LB agar. Este proceso se repitió tres veces, realizando un recuento en cada caso y aislando el fago en cada etapa (Figura 7).

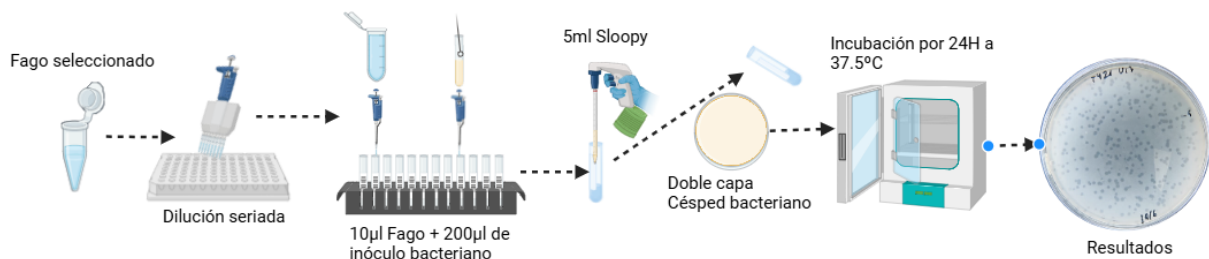


Figura 7. Esquema del método de purificación de bacteriófagos.

3.5 Multiplicación de bacteriófagos

Una vez purificado un único bacteriófago, se seleccionó una calva aislada del tercer aislamiento y diluyó en 200 µl de la bacteria correspondiente a una OD de 0.4 dentro de un eppendorf. Se incubó durante 20 minutos a 37.5°C. A continuación, se vertió el contenido a un tubo con 5ml de LB y se incubó 4 horas en agitación con la finalidad del que el fago se multiplique. Finalmente, se filtró a 0.22µm con la finalidad de eliminar cualquier impureza o bacteria y se conservó a 4°C hasta su uso.

3.6 Estabilidad térmica y pH de los fagos

Las pruebas de estabilidad térmica se realizaron según lo descrito por Ahmadi et al. (2016) con algunas modificaciones. Para ello, se tomaron 100 μl de los stocks originales de cada fago ($\geq 10^8$ UFP/ml) y se pipetearon en Eppendorfs con 900 μl de caldo LB estéril (dilución 1:10), calentándolos posteriormente en termobloques a seis temperaturas (30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C y 80°C) durante 30 y 60 minutos. Por otro lado, también se evaluó la estabilidad a -20°C en un refrigerador estándar y a -80°C en un congelador de temperatura ultra baja durante el mismo tiempo (Krasowska et al., 2015). El valor del título viral obtenido a partir del ensayo a una temperatura de 4°C, se tomó como control para la estimación de la supervivencia a los diferentes tratamientos térmicos. Esta temperatura corresponde a la que se encuentran los stocks de los fagos conservados.

En relación con las pruebas de estabilidad de pH, se tomaron 100 μl de los stocks originales de cada fago ($\geq 10^8$ UFP/ml) y se pipetearon en Eppendorfs con 900 μl de caldo LB estéril (dilución 1:10) ajustado con NaOH y HCl a distintos valores de pH (2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11 y 12). A continuación, las muestras se incubaron durante 2 horas a una temperatura de 37 °C, siguiendo los procedimientos descritos por Ahmadi et al. (2016) y Huang et al. (2018). El valor del título viral obtenido a partir del ensayo a pH 7, se tomó como valor control para la estimación de la supervivencia a los diferentes tratamientos de pH. Este pH coincide con el de los stocks de los fagos conservados. Para evaluar la viabilidad de los fagos a las diferentes condiciones de temperatura y pH, se realizaron diluciones seriadas (1:10) de las muestras hasta alcanzar la dilución de 10^{-8} . A continuación, se sembraron mediante la técnica de gota en placa descrita anteriormente en el apartado 3.3. Todos los ensayos se realizaron por triplicado (**Figura 8**). La estabilidad del fago en las diferentes condiciones se determinó con la fórmula: Tasa de estabilidad (%) = concentración del fago (UFP/ml) bajo una condición dada/concentración del fago control/inicial (UFP/ml) \times 100 (Huang et al., 2018).

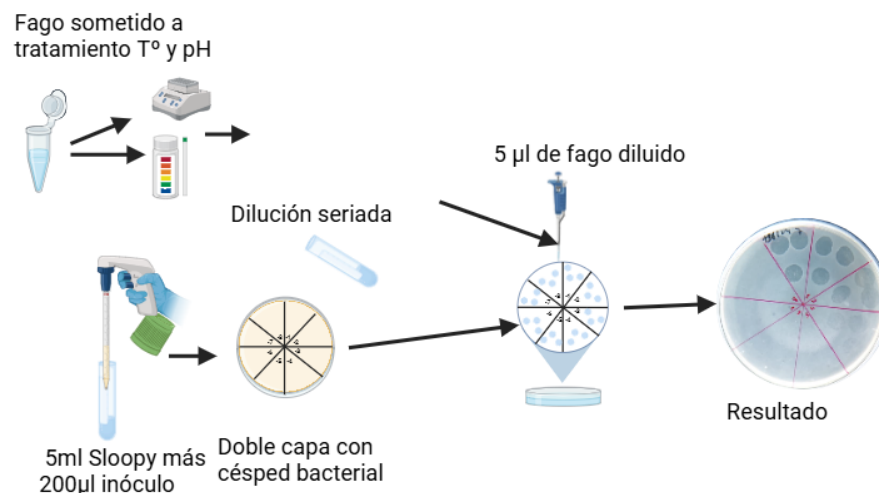


Figura 8. Caracterización de los fagos en sus cepas de propagación. Tratamiento térmico y de pH.

3.7 Análisis estadístico

Se utilizó un modelo lineal generalizado (MLG) para comparar las tasas de multirresistencia a los antibióticos AMR de cada fármaco en las cepas de *Enterococcus* spp. El error se designó con una distribución binomial y se utilizó la función de enlace probit. Se consideró que un valor $P < 0,05$ indicaba una diferencia estadísticamente significativa. Los análisis se llevaron a cabo utilizando un programa informático disponible en el mercado (paquete informático SPSS 29.0; SPSS Inc.,

Chicago, IL, 2002). En cuanto a la lisis y estabilidad de los fagos se realizó un análisis descriptivo de los datos (GraphPad Prism 8).

4. Resultados

4.1 Determinación del perfil de resistencias

De las 19 cepas de *Enterococcus* analizadas, el 95% (18/19) fueron multirresistentes, de las cuales el 100% de las cepas de *E. faecium* y el 90.9% de las cepas de *E. faecalis* fueron MDR. Por lo que a las especies de *E. faecalis* y *E. faecium*, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los porcentajes de resistencias por cada antibiótico, a excepción del CHL, donde el 27.27% de las cepas de *E. faecalis* fueron resistentes vs. el 0% de *E. faecium* ($P=0.042$) (Tabla 2).

Tabla 2. Porcentajes de resistencias de cada cepa.

Especie	Antibiótico (%)											
	VAN	TEI	SYN	TET	DAP	CIP	ERY	TGC	LZD	GEN	AMP	CHL
<i>E. faecalis</i>	0	0	100	90.9	100	54.5	90.9	90.9	0	9.1	0	27.3
<i>E. faecium</i>	12.5	0	100	87.5	100	87.5	87.5	75	0	12.5	12.5	0
Total	5.3	0	100	89.5	100	68.4	89.5	84.2	0	10.5	5.3	15.8

VAN: Vancomicina; TEI: Teicoplanin, SYN: Quinupristin, TET: Tetraciclina, DAP: Daptomicina, CIP: Ciprofloxacina, ERY: Eritromicina, TGC: Tigeciclina, LZD: Linezolina, GEN: Gentamicina, AMP: Ampicilina, CHL: Cloranfenicol.

Por lo que respecta a cada antibiótico, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los porcentajes de resistencia dentro de cada especie de *Enterococcus* (Figura 9). De las cepas analizadas, se encontró que el 100% de las cepas presentaron resistencia a SYN y a DAP. Asimismo, el 89.50% mostró resistencia a TET, y el 89.47% a ERY. La resistencia a TGC se observó en el 84.21% de las cepas, mientras que el 68.42% presentaron resistencia a CIP. El 15.79% mostró resistencia a CHL, y el 10.53% a GEN. Solo el 5.26% de las cepas presentaron resistencia a AMP y a VAN, mientras que ninguna cepa mostró resistencia TEI o a LZD.

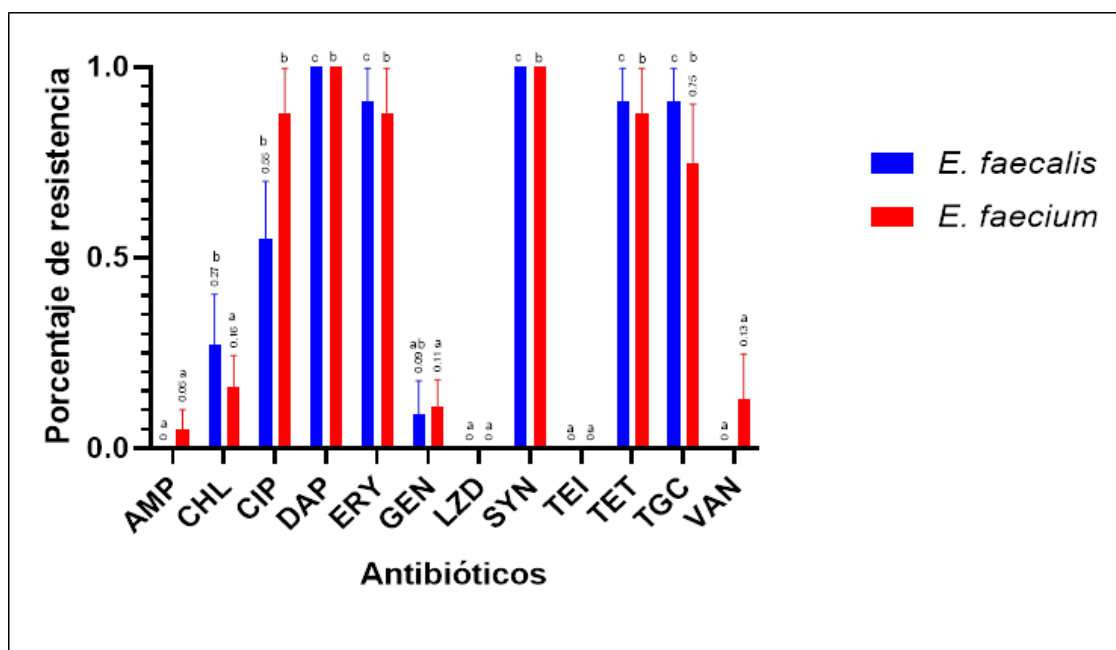


Figura 9. Porcentaje de resistencia por antibiótico de las cepas *E. faecalis* y *E. faecium*. ^{a,b,c}: Los superíndices muestran diferencias estadísticamente significativas entre los antibióticos ($p<0.05$). VAN: Vancomicina; TEI Teicoplanin, SYN Quinupristin, TET Tetraciclina, DAP Daptomicina, CIP Ciprofloxacina, ERY Eritromicina, TGC Tigeciclina, LZD Linezolina, Gen Gentamicina, AMP Ampicilina, CHL Cloranfenicol.

4.2 Aislamiento de bacteriófagos

Del total de muestras analizadas (n=243), se aislaron, purificaron y multiplicaron un total de 17 bacteriófagos frente a *Enterococcus* spp. En la tabla 3 se detallan los *pools*, el tipo de muestra y la orientación productiva de se obtuvieron las muestras, así como el código de interno del CECAV.

Tabla 3. Fagos obtenidos con sus orígenes detallados.

Unificado	Tipo de muestra	Orientación Productiva	Código interno
U1	Heces	Broilers	FGCECC016
U4	Heces	Broilers	FGCECC0014
U8	Heces	Ponedoras	FGCECC007
U9	Heces	Broilers	FGCECC015
U11	Heces	Broilers	FGCECC005
U12	Heces	Ponedoras/broilers	FGCECC008
U13	Heces	Reproductoras/Broilers	FGCECC013
U14	Heces	Ponedora	FGCECC019
U27	Heces	Ponedoras/Recría ponedoras/Codornices puesta	FGCECC022
U28	Heces	Ponedoras/Recría ponedoras/Reproductoras	FGCECC023
U36	Heces	Ponedoras	FGCECC018
U40	Calzas/Fondos de caja/Paños	Broilers	FGCECC006
U44	Heces/Calzas	Ponedoras/Reproductoras	FGCECC024
U45	Calzas/Paños	Broilers/Recría ponedoras	FGCECC012
U47	Heces	Ponedoras/Recría ponedoras/Codornices puesta	FGCECC009
U62	Heces/Calzas	Ponedoras/Broilers	FGCECC014
U63	Calzas/Paños	Ponedoras/Broilers	FGCECC017

Los bacteriófagos aislados fueron capaces de lisar el 79% (n=15/19) de las cepas de *Enterococcus* testadas. En la **figura 10** se muestra la capacidad lítica de cada uno de los fagos aislados frente a las 19 cepas de *Enterococcus* spp. Al menos se aisló un fago capaz de infectar cada una de las cepas de *Enterococcus*, a excepción de las cepas T104, T105, T196 y T275, donde no se encontró ningún fago lítico. No todos los fagos actúan frente a todas las cepas con la misma intensidad de lisis. Sin embargo, destaca el fago U45, que es capaz de lisar 9 de las cepas analizadas, de las cuales 6 presentan lisis completa y una muestra actividad depolimerasa. La cepa *E. faecalis* (T279) presenta la mayor capacidad como hospedera, ya que 9 de los fagos utilizados muestran

actividad lítica completa frente a ella. En total, 15 fagos (88.23%) presentan actividad lítica (C), de los cuales 3 también exhiben halos de polimerasa.

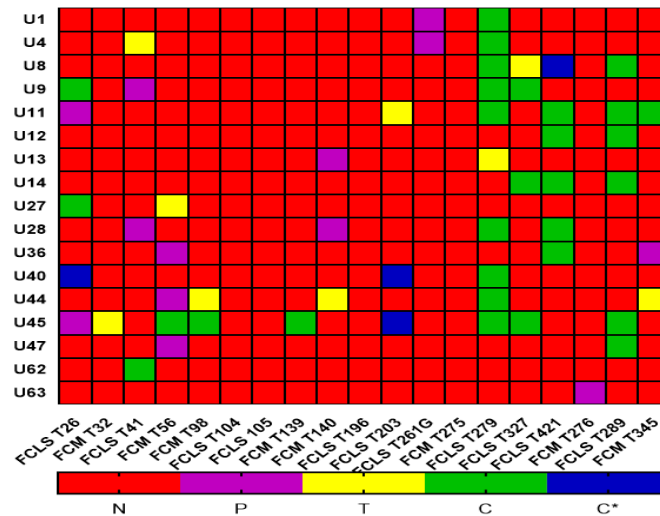


Figura 10. Rango de hospedadores de 17 fagos aislados a partir de muestras avícolas frente a cepas *Enterococcus* spp. El color azul indica actividad depolimerasa y elevada actividad lítica (C*), color verde: elevada actividad lítica (C), color amarillo: actividad lítica intermedia (T), color naranja: actividad lítica baja (P), color rojo: actividad lítica no detectada (N).

4.3 Estabilidad térmica y de pH

Las pruebas de estabilidad térmica a 30 minutos indicaron que todos los fagos (n = 17) fueron viables tras la exposición a temperaturas comprendidas entre los 30°C y 60°C. Sin embargo, a partir de los 70°C la mayoría de los fagos redujeron su estabilidad, a excepción del fago U28 que mantuvo una estabilidad del 43.75% a 80°C durante 30 minutos (Figura 11).

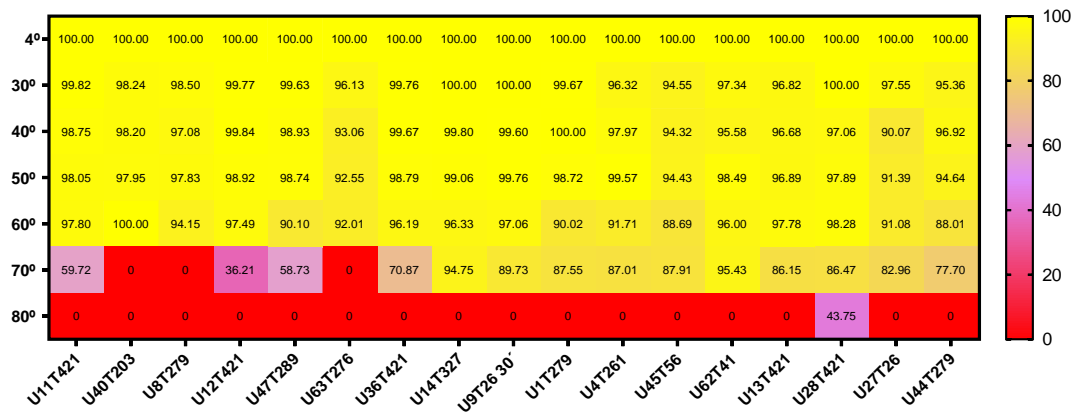


Figura 11. Porcentaje de estabilidad de temperatura tras 30 minutos de los 17 bacteriófagos con su cepa de propagación. U: referencia de fago, T: referencia de bacteria.

Por lo que respecta a la estabilidad térmica durante 60 minutos, se pudo observar una gran estabilidad desde 30°C los 60°C en la mayoría de los fagos. Trascorrido este tiempo, el fago U28 no fue estable a 80°C. Por otro lado, la congelación a -20 y -80 °C durante 60 minutos mantuvo estables a la mayoría de los fagos, pero redujo la estabilidad del fago U62 en ambas temperaturas (Figura 12).

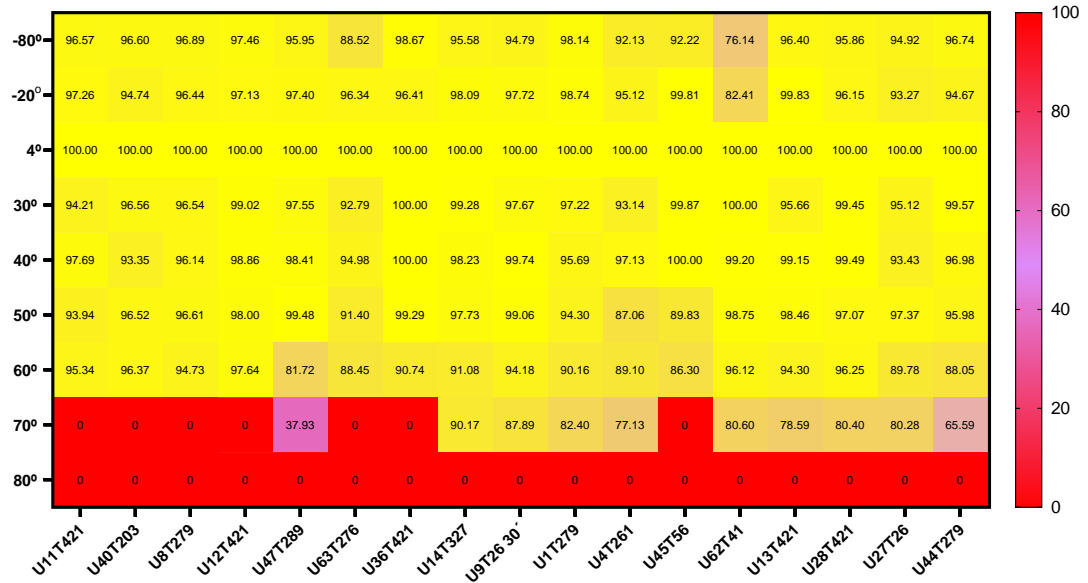


Figura 12. Porcentaje de estabilidad de temperatura tras 60 minutos de los 16 bacteriófagos con su cepa de propagación. U: referencia de fago, T: referencia de bacteria.

Las pruebas de estabilidad del pH mostraron como la mayoría de los fagos se mantuvieron estables en un intervalo de pH 4 y pH 10, con excepción del fago U40 el cual se vio reducida su estabilidad excepto a pH de 6 y 7, y los fagos U62, U13, U28, U27 y U44, los cuales presentaron un rango de estabilidad más amplio de 3 a 11 (Figura 13).

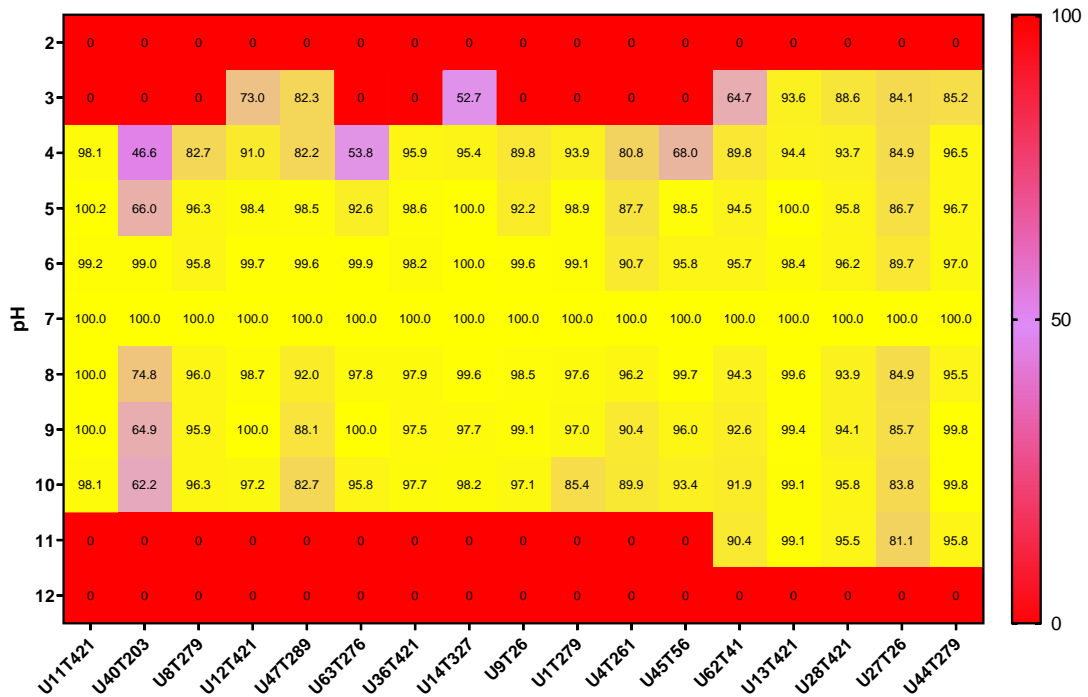


Figura 13. Porcentaje de estabilidad de pH tras 60 minutos de los 17 bacteriófagos con su cepa de propagación. U: referencia de fago, T: referencia de bacteria.

5. Discusión

El sector avícola europeo, principal fuente de proteína animal, proyecta un crecimiento del 1.5% al 2% para 2024, impulsado por la reducción de costos de insumos, lo que hará el pollo más accesible para los consumidores. Además, la producción avícola es clave para la seguridad

alimentaria en Europa debido a su eficiencia y sostenibilidad, con el pollo de engorde destacando por su bajo índice de conversión en comparación con el ganado vacuno y porcino. La producción de carne de origen avícola en la Unión Europea ronda los 8.5 millones de toneladas anuales, liderando Francia (15.8%), Reino Unido (13.2%), Alemania (12%), España (10%) e Italia (9.4%). Con un crecimiento impulsado principalmente por países como Francia y Polonia en la última década (Avicultura, 2020). En España, la avicultura es una de las principales actividades ganaderas. La carne de ave representa el 24% del total de carnes producidas, situándose por detrás de la carne de cerdo. A pesar de esto, es el tipo de carne de mayor consumo entre los españoles, con un 37,4% (Avicultura, 2020). Por ello, es de vital importancia el control sanitario, no solo desde el punto de vista zoonótico, sino también de salud animal y de transmisión de resistencias antimicrobianas.

La creciente aparición de cepas MDR de *Enterococcus* en avicultura constituye en la actualidad un problema de suma importancia. En los últimos años, se ha evidenciado con mayor frecuencia problemas causados por *Enterococcus* MDR, principalmente las especies *E. faecium* y *E. faecalis*. Estas resistencias representan un gran problema tanto para la salud pública como para la producción de aves de consumo, ya que provocan grandes pérdidas en la producción avícola (Mosichita, 2019). Los *Enterococcus* agravan aún más el problema debido a su gran tolerancia a diferentes rangos de temperaturas y pH, lo que les permite sobrevivir en condiciones adversas, además de su capacidad para transmitir genes de resistencia entre sí y a otros microorganismos del entorno (Doming et al., 2003).

Por lo que respecta a los resultados de resistencias este estudio, son similares a los reportados por otros autores como García Mwikuma et al. (2023) y Oteo et al. (2017) los cuales observaron que el 90.5% de cepas y 67% de cepas analizadas de *E. faecium* y *E. faecalis* eran MDR, respectivamente. Así mismo, observaron altas tasas de resistencia a la TET (97.3%) y ERY (94.6%). Sin embargo, por lo que respecta a la VAN encontraron que el 20% de las cepas eran resistentes, a diferencia del 12.5% observado en nuestro estudio. Los resultados obtenidos en este estudio también van en consonancia con lo observado por Boccella et al. (2021), ya que en un estudio realizado en Italia observó altas tasas de sensibilidad a la AMP (96.7%), LZD (99.4%), TEI (98.5%) y VAN (98.2%). Los elevados porcentajes de resistencia frente a TET y ERY son importantes ya que se trata de antibióticos que se emplean en humanos para inhibir la multiplicación y propagación de un gran número de bacterias por su amplio espectro de acción (Jara, 2007), tales como las responsables de infecciones del tracto digestivo, tracto respiratorio, urinario, infecciones de transmisión sexual entre otras, además de ser útil también para infecciones bacterianas en veterinaria. Estas resistencias bacterianas se transmiten de manera horizontal facilitando su diseminación entre diferentes especies bacterianas (Marti, et al., 2006), este mecanismo de propagación es especialmente peligroso, ya que acelera la aparición de cepas MDR circulantes. En el caso de la VAN su importancia radica en que es un antibiótico de último recurso, usado cuando las infecciones son resistentes a otros antibióticos o hay alguna alergia a ellos. Es principalmente usado contra *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina, y contra *Enterococcus* spp. resistentes a ampicilina y penicilina que afectan principalmente a pacientes de larga estancia en hospitales o inmunodeprimidos (Wolf, 2019).

En cuanto a los resultados obtenidos en los ensayos con fagos, se evidenció la dificultad de encontrar fagos efectivos para todas las cepas estudiadas. De 243 aislados obtenidos (n=2,430 muestras individuales), solo se aislaron 17 fagos (6.99%). Pero fueron capaces de lisar el 79% de cepas de *Enterococcus* spp. (n=19), quedando 4 cepas (*E. faecalis* n=3, *E. faecium* n=1) sin fago capaz de lisar completamente dichas bacterias. Se observaron diferencias en cuanto a la sensibilidad de las cepas a ser lisadas, ya que la cepa T279 de *E. faecalis* fue lisada por 10 de los fagos aislados, mientras que las cepas T104, T105, T261G de la cepa *E. faecalis* y la T275 de la cepa *E. faecium* no fueron lisadas por ninguno de los fagos probados, esto se puede deber a

factores como la alta especificidad por parte de los fagos hacia los receptores en la membrana de las bacterias que cambia de cepa a cepa, la rápida adaptabilidad mediante mutación de los fagos a estos receptores (Payne et al., 2000), así como también, existen bacterias que han desarrollado mecanismos de defensa como el sistema CRISPR-Cas que producen enzimas de restricción capaces de cortar el material genético del fago (Doudna, 2022).

Además, algunos fagos mostraron capacidad para lisar más de una cepa y tres fagos presentaron actividad de depolimerasa. La actividad depolimerasa, confiere a los fagos la capacidad para eliminar biopolímeros que en algunas bacterias sirven de protección extra contra agentes desinfectantes (Liu et al., 2022). Por lo que estos bacteriófagos, podrían ser herramientas muy prometedoras para eliminar el biofilms que se genera en las superficies de granjas o mataderos. La caracterización realizada en este estudio se llevó a cabo con la previsión de una futura aplicabilidad de la terapia fágica en la avicultura. Respondiendo a esta posible demanda, nos enfocamos en entender la estabilidad de los fagos de *Enterococcus* frente a condiciones fisicoquímicas a las que podrían ser sometidos, tanto como agentes desinfectantes externos de las instalaciones como agentes curativos o preventivos dentro de los animales. (Duc, y otros, 2020). Los fagos sometidos a pruebas de estabilidad térmica presentaron gran estabilidad a rangos de temperatura entre 30 y 60°C durante 60 minutos, lo cual, si lo comparamos con la temperatura interna de los pollos (40-42°C) nos estaría abriendo las puertas a un posible uso de terapia fágica oral con estos fagos, y en cuanto a la estabilidad del pH son muy estables en el rango de 4 a 10, lo cual nos da una pequeña limitación en cuanto al uso de fagos en administraciones orales ya sean vía alimento o bebida debido al pH bajo del proventrículo y molleja que rondan entre 2 y 3.5 (Svius, 2011). En este contexto se está probando técnicas de encapsulación de fagos, que usan alginato o empelo de polímeros, lo que permitió dar vía oral un coctel de tres fagos a pollos de engorde infectados con *Salmonella* aumentando la concentración y tiempo de los fagos en el intestino frente a administrar el mismo coctel sin encapsulación (Colom et al., 2017).

Los resultados obtenidos en este estudio ponen en evidencia la eficacia *in vitro* de los fagos frente a cepas de *Enterococcus* MDR, presentándose como una medida complementaria a las actuales y/o alternativa a los antibióticos. A partir, de este trabajo se realizarán estudios complementarios de caracterización morfológica por microscopio electrónico, así como secuenciación del genoma. De esta manera, podremos asegurar que los fagos son líticos y no codifican ningún gen de resistencia o virulencia, y por tanto aptos para continuar con los ensayos *in vivo* en animales.

6. Conclusiones

Las conclusiones obtenidas en este trabajo son:

1. A nivel *in vitro* los bacteriófagos son capaces de lisar cepas MDR de *Enterococcus* spp.
2. El 94.12% de las cepas de aislados clínicos fueron multirresistentes frente a los principales antibióticos de uso en sanidad animal y humana, suponiendo un riesgo significativo para la salud pública y veterinaria, ya que limita las opciones de tratamiento disponibles y aumenta la probabilidad de brotes de infecciones difíciles de controlar.
3. Los bacteriófagos aislados, fueron capaces de lisar el 79% de las cepas de *Enterococcus* spp. La mayoría de los fagos aislados fueron capaces de lisar una única cepa, a excepción de los fagos U8, U9, U 11, U12, U14, U28 y U45 que lisaron a más de una cepa. Esto evidencia la especificidad de los bacteriófagos y el enfoque de la terapia dirigida para cada caso.

4. Los fagos de *Enterococcus* parecen ser estables a temperaturas De -80°C a 60°C , lo que muestra la estabilidad dentro del TGI del ave (42°C), así como su estabilidad a temperaturas de refrigeración lo que facilita la conservación. En cuanto al pH tienen un amplio rango de estabilidad, sin embargo, no son estables a pH menores de 3 y mayores de 11, lo que supone una limitación dado el pH ácido del TGI de las aves.

7. Bibliografía

- Abd El Wahab, A., Basiouni, S., El Seedi, H., Ahmed, M., Bielke, L., Hargis, B., et al. (2023). An overview of the use of bacteriophages in the poultry industry: Successes, challenges, and possibilities for overcoming breakdowns. *Frontier in Microbiology*, 14. doi:10.3389/fmicb.2023.1136638.
- Abedon, S. (2019). Uso de la terapia con fagos para tratar infecciones bacterianas crónicas, persistentes o de larga duración. *Revista de Microbiología Aplicada*, 145, 18-39. <https://genotipia.com/revista-genetica-medica/>.
- Ahmadi, M., Amir Karimi Torshizi, Rahimi, M., & Dennehy, J. (2016). Prophylactic Bacteriophage Administration More Effective than Post-infection Administration in Reducing *Salmonella* enterica serovar Enteritidis Shedding in Quail. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1253- <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01253>.
- Alós, J. I. (2015) Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 33(10), 692-699. DOI: 10.106/j.eimc.2014.10.004
- Avicultura, R. E. (2020). Perspectivas de mercado en avicultura y sector de puesta según la Unión Europea (II). Panorámica de la avicultura de carne y sector de puesta en la Unión Europea. *Avicultura.com*.
- Avicultura, R. E. (2021). España, tercer productor de carne de ave en UE. Obtenido de <https://avicultura.com/espana-tercer-productor-de-carne-de-ave-en-la-ue/>.
- Benaravia, I., Hamdi, T., Shehata, A., Neubauer, H., & Wareth, G. (2020). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in poultry species in Algeria: Long-term study on prevalence and antimicrobial resistance. *Veterinary Science*, 7(2), 54 <https://doi.org/10.3390/vetsci7020054>.
- Bercheri, A., Lovell, M., & Barrow, P. (1991). The activity in the chicken alimentary tract of bacteriophages lytic for *Salmonella typhimurium*. *Research in Microbiology*, 142(5), 541-549. [https://doi.org/10.1016/0923-2508\(91\)90187-F](https://doi.org/10.1016/0923-2508(91)90187-F).
- Biovet, S. (2023). Control de *Enterococcus cecorum* en pollos de engorde. *Veterinaria Digital*. Obtenido de <https://www.veterinariadigital.com/articulos/control-de-enterococcus-cecorum-en-pollos-de-engorde/>.
- Boccella, M., Santella, B., Pagliano, P., De Filippis, A., Casolaro, V., Galdiero, M., Franci, G. (2021). Prevalencia y resistencia a los antimicrobianos de las especies de *Enterococcus*: un estudio de cohorte retrospectivo en Italia. *Antibiotics*, 10(12), 1552. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10121552>.
- Bush, L. M., & Vazquez-Pertejo, M. (2023). *Manual MSD*. Obtenido de [Manual MSD: www.msmanuals.com/es-ec/professional/enfermedades-infectocontagiosas/cocos-grampositivos/infecciones-por-enterococos](http://www.msmanuals.com/es-ec/professional/enfermedades-infectocontagiosas/cocos-grampositivos/infecciones-por-enterococos).
- Bush, L., & Vazquez-Pertejo, M. (2023). *Manual MSD Versión para profesionales*. Obtenido de <https://www.msmanuals.com/es/professional/enfermedades-infecciosas/cocos-grampositivos/infecciones-por-enterococos>.
- Butaye, P., Devriese, L., & Haesebrouck, F. (2003). Promotores de crecimiento antimicrobianos utilizados en la alimentación animal: efectos de antibióticos menos conocidos en bacterias Gram-positivas. *Clinical Microbiology Reviews*, 16(2), 175-188. <https://doi.org/10.1128/CMR.16.2.175-188.2003>.
- Canturri, A., Doria-Torra, G., Casanova, I., Martínez, J., Domingo, M., & Majó, N. (2015). Asociación Española de Ciencia Avícola. Obtenido de https://www.wpsa-aeca.es/aeca_imgs_docs/3335_com-05.pdf.
- Catalá Gregori, P., & Mateo Santamaría, D. (2014). Patología Básica del Broiler. Valencia, Valencia, España: CECAV. Obtenido de <http://www.asav.es/wp-content/uploads/2016/05/Curso-Patologia-Basica-Broiler-CECAV.pdf>.

- Cauwerts, K. D. (2010). Alta prevalencia de resistencia a tetraciclina en aislados de *Enterococcus* de pollos de engorde portadores del gen erm(B). *Revista de Microbiología Aplicada*, 24(2), 77-80. <https://doi.org/10.1157/13085012>.
- CIPARS. (2016). Canadian Integrated Program for Antimicrobial Resistance Surveillance (CIPARS). <https://canada.ca/en/public-health/services/surveillance/canadian-integrated-program-antimicrobial-resistance-surveillance-cipars.html>.
- Clavijo, V., Baquero, D., Hernandez, S., Farfan, J., Arévalo, A., & et al. (2019). Phage cocktail SalmoFREE® reduces *Salmonella* on a commercial broiler farm. *Poultry Science*, 98(10), 5054-5063. <https://doi.org/10.3382/ps/pez251>.
- Colom J, Cano-Sarabia M, Otero J, Ariñez-Soriano J, Cortés P, Maspoch D & Llagostera M. (2017). Microencapsulation with alginate/CaCO₃: A strategy for improved phage therapy. *Scientific Reports* 7:41441 | DOI: 10.1038/srep41441.
- Devriese, L. A., Baele, M., & Butaye, P. (2006). The genus *Enterococcus*. En M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, & E. Stackebrandt (Eds.), *The Prokaryotes* (págs 163-174). New York, NY: Springer. https://doi.org/10.1007/0-387-30744-3_5.
- Doudna, JA (2022) CRISPR en la naturaleza. En ML Hochstrasser et al. (Eds.) CRISPRpedia. Berkeley: Insitituo de Genómica Innovadora, Universidad de California, Berkeley. <https://innovativegenomics.org/crisprpedia/crispr-in-nature/>.
- Doming, K.J., Mayer H.K.& Kneifel, W. (2003) Métodos utilizados para el aislamiento, enumeración, caracterización e indentificación de *Enterococcus* spp.: 1. Medios para el aislamiento y la enumeración. *International Journal of Food Microbiology*, 88(2-3), 147-164. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00177-6](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00177-6).
- Duc, H., Son , H., Yi, H., Sato, J., Ngan, P., Masuda, Y., Miyamoto, T. (2020). Isolation, characterization, and application of a polyvalent phage capable of controlling *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 in different food matrices. *Food Research International*, 131,108977. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.108977>.
- EFSA. (2021). Los casos de *Campylobacter* y *Salmonella* se estabilizan en la UE. Obtenido de <https://www.efsa.europa.eu/es/news/campylobacter-and-salmonella-cases-stable-eu>.
- EFSA. (2024). Multi-agency report highlights importance of reducing antibiotic use. Obtenido de <https://www.efsa.europa.eu/es/news/multi-agency-report-highlights-importance-reducing-antibiotic-use>.
- EFSA, EFSA, ECDC, & European Medicines Agency. (2024). Antimicrobial consumption and resistance in bacteria from humans and food-producing animals. *EFSA Journal*, 22(3), 8589. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2024.8589>.
- Fariñas, C., & Torres, C. (2007). Enterococo ¿un patógeno emergente en nuestros hospitales? *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 25(8), 500-502. <https://doi.org/10.1157/13109985>.
- Fenández, L., Guitiérrez, D., Rodríguez , A., & García, P. (2020). *Los bacteriófagos. Los virus que combaten infecciones*. Madrid España: Los libros de la Catarata.
- Ferreira Araujo, T., & de Luces Fortes Ferreira, C. (2013). The genus *Enterococcus* as probiotic: safety concerns. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 56(3), 327-334. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132013000300014>.
- Fuhrman, J. (1999). Los virus marinos y sus efectos biogeoquímicos y ecológicos. *Nature*, 399(6736), 541-548. <https://doi.org/10.1038/21119>.
- García Llorens, J., Torres Boncompite, J., Catalá Gregori, P., Soriano del Castillo, J., & Sevilla Navarro, S. (2023). Estudio de la resistencia a antimicrobianos en cepas de *Enterococcus* spp, aislada de aves y cerdos de producción. *LVIII Symposium Científico de Avicultura*, (págs. 28-36). Avila.
- García Solache, M., & Arroz, L. (2019). The *Enterococcus*: a model of adaptability to its environment. *Clinical Microbiology Reviews*, 32(2), e00058-18. <https://doi.org/10.1128/cmr.00058-18>.

- García-Llorens, J., Torres-Boncompte, J., Catalá-Gregori, P., Soriano del Castillo, J., & Sevilla-Navarro, S. (2022). Bacteriófagos como alternativa terapéutica frente a *Enterococcus* spp. en avicultura WPSA-AECA.
- Gibson, S., Green, S., Liu, C., Salazar, K., Clark, J., Terwiliger, A., Kaplan, H. B., Maresso, A. W., Trautner, B. W., & Ramig, R. (2019). Construction and Characterizing Bacteriophage Libraries for Phage Therapy of Human Infections. *Frontiers in Microbiology*, *10*, 25537. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02537>.
- Mwikuma, G., Kainga, H., Kallu, S.S., Nakajima, C., Suzuki, Y., & Hang`ombe, B.M. (2023). Determination of the Prevalence and Antimicrobial Resistance of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* Associated with Poultry in Four Districts in Zambia. *Antibiotics*, *12*(4), 657. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12040657>.
- Hagens, S., & Loessner, M. (2010). Bacteriófago para el biocontrol de patógenos transmitidos por alimentos: cálculos y consideraciones. *Revista de Microbiología*, *11*, 58-68.
- Hidron, I., Edwards, J., Patel, J., Horan, T., Sievert, D., Pollock, D., & Fridkin, S. (2008). Patógenos resistentes a los antimicrobianos asociados con infecciones asociadas a la atención sanitaria: resumen anual de los datos notificados a la Red Nacional de Seguridad Sanitaria de los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades. *Informe Anual de Salud Pública*.
- Hurley, A., Maurer, J., & Lee, M. (2008). Using bacteriophages to modulate *Salmonella* colonization of the chicken's gastrointestinal tract: lessons learned from in silico and in vivo modeling. *Avian Diseases*, *52*(3), 427-434. <https://doi.org/10.1637/8288-031808-Reg.1>.
- Jamal, M., Bukhari, S., Andleeb, S., Ali, M., Raza, S., & Nawas, M. (2019). Bacteriophages: an overview of the control strategies against multiple bacterial infections in different fields. *Journal of Basic Microbiology*, *59*(1), 1-10.
- Jara, M. (2007). Tetraciclinas: un modelo de resistencia antimicrobiana. *Avances en Ciencias Veterinarias*, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias. *22*(1-2), 1-10.
- Jung, A., Chen, L., Suyemoto, L., Barnes, H., & Borst, L. (2018). A Review of *Enterococcus cecorum* Infection in Poultry. *Avian diseases*, *62*(3), 261-271.
- King, A., Elliot, L., Michael, J., & Eric, B. (2012). Taxonomía de virus. Amsterdam: Elsevier.
- Kutateladze, M., & Adamia, R. (2010). Bacteriophages as potential new therapeutics to replace or supplement antibiotics. *Trends in Biotechnology*: [https://www.cell.com/trends/biotechnology/abstract/S0167-7799\(10\)00137-X?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS01677991000137X%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/trends/biotechnology/abstract/S0167-7799(10)00137-X?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS01677991000137X%3Fshowall%3Dtrue).
- Lewis, R., & Hill, C. (2020). Overcoming barriers to phage application in food and feed. *Current Opinion in Biotechnology*, *61*, 38-44.
- Lisette, L., San Martín, B., & Toro, C. (2010). Estudio de la resistencia a antimicrobianos en cepas de *Enterococcus* spp., aisladas de aves y cerdos de producción. *Repositorio académico de la Universidad de Chile*. <http://doi.org/10.5354/0719-5273.2010.18284>.
- Liu, S., Lu, H., Zhang, S., Shi, Y., & Chen, Q. (2022). Phages against Pathogenic Bacterial Biofilms and Biofilm-Based Infections: A Review. *Pharmaceutics*, *14*(2), 427.
- Lobocka, M., & Adamia, R. (2012). Advances in Virus Research. *Academic Press*, *83*, 143-216.
- López, V., Guerriero, L., Elorza, V., Krüger, A., Colello, R., Medici, S., Keller, L. (2021). Resistencia a antimicrobianos en bacterias aisladas en la cadena de producción avícola. *InVet*, *23*(2), 01-08. Facultad de Ciencias Veterinarias, UNCPBA, Tandil. Fares Taie Instituto de Análisis, Mar del Plata. Centro de Investigación Veterinaria de Tandil (CIVETAN) (CONICET-CICPBA-UNCPBA), Tandil. Centro de Alimentos y Medio Ambiente Fares Taie Instituto de Análisis, Mar del Plata. <https://www.fvet.uba.ar/archivos/publicaciones/invet/vol23-2-2021/art-7-vol23-2-2021.pdf>.

- Lu, T., & Collins, J. (2009). Bacteriófago diseñado para dirigirse a redes de genes como adyuvantes para la terapia con antibióticos. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(12), 4629-4634. <https://doi.org/10.1073/pnas.0900191106>.
- Mayer, G. (2020). *Microbiología e Inmunología*. Obtenido de <https://www.microbiologybook.org/Spanish/chapter7.htm>.
- Martí, S., Fernández-Cuenca, F., Pascual, Á., Ribera, A., Rodríguez-Baño, J., Bou, G., Cisneros, J. M., Pachón, J., Martínez-Martínez, L., & Vila, J. (2006). Prevalencia de los genes *tetA* y *tetB* como mecanismo de resistencia a tetraciclina y minociclina en aislamientos clínicos de *Acinetobacter baumannii*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 24(2), 77-80. <https://doi.org/10.1157/13085012>.
- Medell, M., Hart, M., & Batista, M. (2014). Sensibilidad antimicrobiana in vitro en aislamientos de *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* obtenidos de pacientes hospitalizados. *Biomedica*, 34, 1-10. <https://revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/2122>.
- Morishita, T. (2019). *Manual de MSD*. Obtenido de <https://www.msddvetmanual.com/es/avicultura/enterococosis/enterococosis-en-aves-de-producci%C3%B3n>.
- Naghavi, M. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*, 399(10325), 629-655. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0).
- Oromí Durich, J. (2002). Bioterrorismo y contaminación del agua. *Medicina Integral*, 40(7), 283-286. <https://www.elsevier.es/es-revista-medicina-integral-63-pdf-13033379>.
- Oteo, J., Bou, G., Chaves, F., & Oliver, A. (2017). Métodos microbiológicos para la vigilancia del estado de portador de bacterias multirresistentes. *ELSEVIER*: <http://doi.org/10.1016/j.eimc.2015.12.013>.
- Oviedo-Rondón, E. (2024). Las infecciones por *Enterococcus* reducen la incubabilidad y aumentan la mortalidad temprana. *aviNews*. <https://avinews.com/infecciones-por-enterococcus-reducen-la-incubabilidad-y-aumentan-la-mortalidad-temprana/>.
- Pang, H., Lambertini, E., Buchanan, R., Schaffner, D., & Pradhan, A. (2017). Evaluación cuantitativa del riesgo microbiano para *Escherichia coli* O157: H7 en lechuga recién cortada. *Journal of Food Protection*, 80, 302-311.
- Pratama, A., & Van Elsas, J. (2017). Un nuevo profago inducible del habitante de la microsfera *Paraburkholderia terrae*. *Frontiers in Microbiology*. <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2021.793135/full#B111>.
- Payne, R. J. H., & Jansen, V. A. A. (2000). Terapia con fagos: la cinética peculiar de los productos farmacéuticos autorreplicantes. *Journal of Clinical Pharmacology*, 40(8), 1-10. <https://doi.org/10.1067/mcp.2000.109520>.
- Salmond, G., & Fineran, P. (2015). A century of the phage: past, present and future. *Nature Reviews Microbiology*, 13(12), 777-786. <https://doi-org/10.1038/nrmicro3564>.
- Sevilla Navarro, S., Catalá Gregori, P., & Marin, C. (2020). *Salmonella* bacteriophage diversity according to most prevalent *Salmonella* serovars in layer and broiler poultry farms from eastern Spain. *Animals*, 10(9), <https://doi.org/10.3390/ani10091456>.
- Sparo, M., Delpéch, G., Pourcel, G., Schell, C., de Luca, M., Bernstein, J., & Basualdo, J. (2013). Citolisina y alto nivel de resistencia a gentamicina en *Enterococcus faecalis* de distinto origen. *Foodborne Pathogens and Disease*, 10(10), 939-944. <https://doi.org/10.1089/fpd.2012.1312>.
- Steenackers, H., Hermans, k., Vanderleyden, J., & Keersmaecker, S. (2012). *Salmonella* biofilms: an overview on occurrence, structure, regulation and eradication. *Food Research International*, 45(2), 1-10. doi:10.1016/J.FOODRES.2011.01.038.

- Svihus, B. (2011). The gizzard: function, influence of diet structure and effects on nutrient availability. *World's Poultry Science Journal*, 67(2), 207-224. <https://doi.org/10.1017/S0043933911000249>.
- Torres-Boncompte, J., Catalá-Gregori, P., Garcia-Llorens, J., Soriano, J., & Sevilla-Navarro, S. (2023). Aislamiento simultáneo de *Salmonella* y bacteriófagos en medios semisólidos modificados de Rappaport Vassiliadis. *Frontiers in Microbiology*, 15, 1401479.
- Vicente, A., Salvador, I., Sagarra, N., & Riera, S. (2011). Elevada presencia de *Enterococcus cecorum* en broilers en Holanda. *Portal Veterinaria*. <https://www.portalveterinaria.com/avicultura/articulos/6500/elevada-presencia-de-enterococcus-cecorum-en-broilers-en-holanda.html>.
- Wolff, M., Quitanilla, R., Carrasco, J., Cifuentes & Cifuentes, M. (2019). Análisis crítico de un antimicrobiano sub-óptimo, de frecuente sobre utilización e inadecuada dosificación: Vancomicina. *Revista chilena de infectología*, 36(6), 687/697. doi:10.4067/S0716-10182019000600687.