

# UCUENCA

Facultad de Ciencias Agropecuarias  
Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia

## **Efecto de la aplicación de colífangos en el control de *Escherichia coli* en pollos de engorde**

Trabajo de titulación previo a la  
obtención del título de Médico  
Veterinario Zootecnista

### **Autoras:**

Jessica Paola Aguilar Yunga

CI: 0104700059

Correo electrónico: ckiyess-22@hotmail.com

Andrea Paola Peralta Díaz

CI: 0302020946

Correo electrónico: angieppe30@gmail.com

### **Director:**

Fabián Manuel Astudillo Riera

CI: 0102342383

**Cuenca, Ecuador**

**11-enero-2023**

## Resumen:

La avicultura es un sector que permanece en crecimiento además de ser un importante generador de ingresos, razón por la cual el control de enfermedades es fundamental. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la aplicación de un **coctel** de colífagos y tratamiento convencional (antibiótico) en aves afectadas por una cepa patógena de *E. coli* y su resultado sobre parámetros productivos, además de comparar los valores obtenidos con investigaciones previamente publicadas. Se utilizaron 96 pollitos Cobb 500 distribuidos aleatoriamente en seis tratamientos: **T1** Colífagos más *E. coli*, **T2** Colífagos, **T3** Antibiótico más *E. coli*, **T4** Antibiótico, **T5** Control positivo (*E. coli*) y **T6** Control negativo. Esta investigación se llevó a cabo en el mismo lugar en tres momentos distintos. Se evaluó consumo de alimento, peso corporal, conversión alimenticia, ganancia media diaria y mortalidad. A los 10 días de edad, las aves fueron desafiadas con títulos de  $10^5$  CFU de *E. coli* e inmediatamente tratadas con  $10^8$  PFU/ml de bacteriófagos, durante todo el experimento se registró mortalidad, pesos y el alimento sobrante para cada tratamiento, el estudio tuvo una duración de 21 días. La aplicación de un **coctel** de fagos en T1 brindó un peso, ganancia media diaria, consumo e índice de conversión óptimos, aunque no existió diferencia significativa ( $p>0,05$ ) entre los tratamientos, estos resultados fueron mejores a los obtenidos en el T5. En aves tratadas convencionalmente (T3) los parámetros productivos no fueron estadísticamente significativos ( $p>0,05$ ). En cuanto a mortalidad, T1 obtuvo menor porcentaje respecto al T3 y al control positivo. Los datos obtenidos sobre los parámetros productivos fueron comparados con resultados de investigaciones publicadas con anterioridad, en las cuales los autores concuerdan con la eficiencia de aplicar bacteriófagos en el control de colibacilosis aviar. En conclusión, el coctel de colífagos actúa competentemente al reducir la mortalidad en aves hasta los 21 días sin afectar parámetros productivos, además de que pueden considerarse una alternativa al uso de antibióticos.

**Palabras claves:** Bacteriófagos. *E. coli*. Mortalidad. Antibiótico.

## Abstract:

Poultry is a sector that keeps growing, also an important income generator, reason for why disease control is essential. The aim of this study was to evaluate the effect of a coliphage application and conventional treatment (antibiotic) in affected chickens with an *E. coli* pathogen strain and its result over productive parameters, also to compare the obtained results with previously released studies. It was used 96 Cobb 500 chicks randomly distributed in six treatments: **T1** Coliphage and *E. coli*, **T2** Coliphage, **T3** Antibiotic and *E. coli*, **T4** Antibiotic, **T5** Positive control and **T6** Negative control. This investigation was carried out in the same place but, in three different moments. It was evaluated food intake, body weight, food conversion, body weight gain and mortality. The birds were challenged at 10 days of age with titers of  $10^5$  CFU *E. coli* and immediately treated with  $10^8$  PFU bacteriophage, throughout the experiment mortality, weights and leftover food were recorded for every treatment, the study lasted for 21 days. The application of a phage **cocktail** in T1 showed optimal productive parameters, although there was no significant difference ( $p>0,05$ ) between the treatments, these results were better than those obtained in T5. In birds treated with antibiotic (T3), productive parameters were no statistically significant ( $p>0,05$ ). About mortality, T1 excelled compared to T3 and Positive control. The productive parameters data obtained were compared with results of previous investigations, in which the authors agree with the efficiency of the bacteriophage application to control avian colibacillosis. In conclusion, coliphage cocktail acts competently to reduce mortality until 21 days old chickens without affect productive parameters, even this can be considered an alternative to antibiotic use.

**Keywords:** Bacteriophage. *E. coli*. Mortality. Antibiotic.

## Índice

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	18
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	20
<b>a. Objetivo General</b> .....	20
<b>b. Objetivo Especifico</b> .....	20
<b>c. Pregunta de Investigación</b> .....	20
<b>3. REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	21
<b>3.1. Colibacilosis</b> .....	21
<b>3.2. Colífagos</b> .....	22
<b>3.3. Resistencia bacteriana</b> .....	23
<b>3.4. Antecedentes</b> .....	26
<b>3.5. Inóculo de <i>Escherichia coli</i></b> .....	30
<b>3.6. Inóculo de bacteriófago</b> .....	30
3.6.1. Aislamiento .....	31
3.6.2. Purificación .....	31
3.6.3. Titulación .....	31
<b>3.7. Vías de aplicación</b> .....	31
3.7.1. Intramuscular .....	32
3.7.2. Oral.....	32
3.7.3. Aerosol .....	32
3.7.4. Intratraqueal .....	33
3.7.5. Intraperitoneal.....	33
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	33
<b>4.1. Materiales</b> .....	33
4.1.1. Materiales Biológicos .....	33
4.1.2. Materiales Químicos .....	33

# UCUENCA

4.1.3. Materiales de campo.....	34
4.1.4. Materiales de Laboratorio .....	34
<b>4.2. Métodos y técnicas empleadas .....</b>	<b>35</b>
4.2.1. Área de estudio.....	35
4.2.2. Diseño experimental .....	35
4.2.3. Determinación de variables en el experimento .....	36
4.2.4. Análisis estadístico .....	40
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>41</b>
5.1. Peso corporal .....	41
5.2. Consumo e índice de conversión acumulada .....	43
5.3. Mortalidad acumulada.....	44
5.4. Ganancia media diaria de peso .....	46
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>49</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>50</b>
<b>8. ANEXOS .....</b>	<b>57</b>

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Perihepatitis, pericarditis y aerosaculitis en pollo broiler de 20 días.....	22
<b>Figura 2.</b> Ciclos de multiplicación fágica; lítica y lisogénica.....	23
<b>Figura 3.</b> Mapa satelital, ubicación geográfica Granja Experimental “IRQUIS” de la Facultad de Ciencias Aropecuarias de la Universidad de Cuenca.....	34
<b>Figura 4.</b> Box plot peso corporal de las aves en los distintos trtamientos durante las tres semanas de investigación.....	41
<b>Figura 5.</b> Dot plot mortalidad obtenida en los distintos tratamientos durante las tres semanas de investigación.....	45

## Índice de Tablas

<b>Tabla 1.</b> Resultados obtenidos en la investigación realizada acerca de la resistencia antimicrobiana. ....	24
<b>Tabla 2.</b> Resultados obtenidos en una investigación más reciente acerca de la resistencia antimicrobiana. ....	25
<b>Tabla 3.</b> Investigaciones de fagoterapia realizadas en aves para el control de <i>Escherichia coli</i> . ....	26
<b>Tabla 4.</b> Tratamientos a los que fueron sometidas las aves en el estudio. ....	35
<b>Tabla 5.</b> Consumo acumulado (g) de las aves en los distintos tratamientos durante las tres semanas de investigación. ....	42
<b>Tabla 6.</b> Conversión alimenticia acumulada (g) de las aves en los distintos tratamientos durante las tres semanas de investigación. ....	43
<b>Tabla 7.</b> Ganancia media diaria de peso (g) en las aves de los distintos tratamientos durante las tres semanas de la investigación. ....	46
<b>Tabla 8.</b> Medidas resumen de los datos analizados en este estudio. ....	47

## Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

---

Jessica Paola Aguilar Yunga en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "Efecto de la aplicación de colifagos en el control de *Escherichia coli* en pollos de engorde", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 11 de enero de 2023



Jessica Paola Aguilar Yunga

C.I: 0104700059



## Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

---

Andrea Paola Peralta Díaz en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "**Efecto de la aplicación de colifagos en el control de *Escherichia coli* en pollos de engorde**", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 11 de enero de 2023



Andrea Paola Peralta Díaz

C.I: 0302020946

## Cláusula de Propiedad Intelectual

---

Jessica Paola Aguilar Yunga, autora del trabajo de titulación "Efecto de la aplicación de colifagos en el control de *Escherichia coli* en pollos de engorde", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 11 de enero de 2023



Jessica Paola Aguilar Yunga

C.I: 0104700059

## Cláusula de Propiedad Intelectual

---

Andrea Paola Peralta Díaz, autora del trabajo de titulación “Efecto de la aplicación de colifagos en el control de *Escherichia coli* en pollos de engorde”, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de sus autoras.

Cuenca, 11 de enero de 2023



Andrea Paola Peralta Díaz

C.I: 0302020946

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradecemos a Dios, por brindarnos sabiduría y guiarnos en este largo trayecto para culminar nuestros estudios universitarios. A cada miembro de nuestra familia y amigos que siempre estuvieron pendientes y sobretodo apoyándonos para no rendirnos en nuestra carrera y para aquellos que siempre nos escucharon, brindándonos sus consejos para ser mejores personas y profesionales, gracias desde el fondo de nuestro corazón.

Un sincero agradecimiento al Dr. Fabián Astudillo, por haber confiado en nosotras para la realización de este trabajo, guiándonos y siempre apoyándonos para hacer las cosas de la mejor manera. Así también al Dr. Antonio Vallecillo que, con su apoyo incondicional y trabajo en el laboratorio, fueron pilares para poder llevar a cabo esta investigación. Además, un agradecimiento especial al Dr. Guillermo Guevara por toda la guía y ayuda durante este camino.

Finalmente, queremos agradecer a todos nuestros queridos docentes de la carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia, quienes compartieron sus experiencias y conocimientos con nosotras a lo largo de nuestra formación.

**Jessica & Paola**

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a mi Dios, quien me ha guiado en cada paso de mi vida y me ha brindado sabiduría y perseverancia para alcanzar mi anhelada meta, gracias Dios mío por ser la luz de mi vida y por permitirme compartir este bello momento con las personas que amo.

Agradezco infinitamente a mis padres, abuelitos, a mi hijo, tíos, hermanos y amigos que siempre confiaron en mí y me apoyaron durante mi formación, desde el fondo de mi corazón gracias por todo ese apoyo incondicional.

A mi compañera de tesis Paola gracias por la paciencia y la dedicación que pusiste para terminar este proyecto.

De igual manera agradezco a todos los animalitos que de una u otra manera colaboraron durante mi aprendizaje.

A todos mis compañeros de la universidad gracias por la lealtad, la amistad, la paciencia y el cariño que tuvieron conmigo durante estos largos años de estudio.

**Jessica Paola Aguilar Yunga**

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por guiarme no sólo en mi vida académica sino en cada día y por darme fortaleza para poder culminar este trabajo y cumplir una meta. Agradezco también a mis padres por todo el esfuerzo, el cariño y la paciencia que han tenido conmigo, sin importar cuales fueron las circunstancias siempre me apoyaron y me dieron los mejores consejos.

A mis hermanas, por ser el mejor apoyo, con las palabras perfectas para animarme, y con ese abrazo haciéndome saber que siempre estarán para mí; a mi sobrinito Sebastián que me inspira mucha valentía y a mi abuela por siempre estar tan pendiente de mí y por todo el cariño. A mi mejor amiga, Camila, la hermana que la universidad me dio y por la que siempre estaré agradecida.

A mi compañera de tesis y amiga, Jessica, en nuestra carrera pasamos por varias cosas juntas, gracias por la confianza y por ser el motivo de tantas risas y alegrías. A mis amigas y amigos, de quienes aprendí varias cosas y con los que compartí muchos bonitos momentos.

A mi Boris y Kai, la compañía más grande que pude hallar en dos animalitos, aquellas noches de estudio eran menos frías si estaban conmigo, gracias a ellos aprendí a encontrar felicidad en las pequeñas cosas, y a todos los animalitos que han pasado por mi vida.

**Andrea Paola Peralta Díaz**

## DEDICATORIA

Dedico esta tesis de graduación al amor de mi vida, mi hijo Anthony quien es mi fuerza y mi inspiración para no rendirme y continuar con mis metas. A mis queridos padres Mónica y Juan quienes a pesar de la distancia siempre estuvieron para mí, brindándome su amor y su apoyo incondicional en este largo trayecto. A mi mami Julia, quien gracias a sus consejos he podido alcanzar esta tan anhelada meta, gracias por ser una mujer fuerte y por estar presente en cada etapa de mi vida. A mi abuelito Juan, mi tía Olga, mi tío Rolando, mi tío Pablo quienes siempre estuvieron brindándome sus experiencias y por sentirse orgullosos de mí. A mis hermanos Jennifer, Bryan, Johana y Joselyn por su cariño y por ser parte de mi formación.

A mi compañera de tesis Paola con quien he creado un lazo de amistad muy fuerte a lo largo de toda nuestra carrera y por alcanzar esta meta juntas.

A todas mis mascotas que fueron la inspiración para alcanzar esta tan anhelada meta.

**Jessica Paola Aguilar Yunga**

## DEDICATORIA

Dedico esta tesis y todo el esfuerzo puesto en ella a mis padres, Sergio y Eva, quienes han sido el mayor soporte y mis mejores maestros; a mis hermanas Adriana y Alejandra y al apoyo incondicional y cariño que siempre encuentro en ellas. A mi sobrino Sebastián, la estrella más linda; a mi abuela Esthela, mi mejor confidente; a mi mejor amiga Camila, que a pesar de la distancia sé que puedo contar con ella para todo y en todo momento; a mi compañera de tesis y amiga, Jessica, por haber superado muchas adversidades juntas y culminar este camino universitario, y a mis grandes amores, mi Boris y Kai y a todos los animalitos que han pasado por mi vida.

**Andrea Paola Peralta Díaz**



## ACRÓNIMOS

**APEC**= Avian pathogenic *Escherichia coli*

**PIB**= Producto interno bruto

**IM**= Intramuscular

**IP**= Intra peritoneal

**IT**= Intratraqueal

**IV**= Intravenoso

**PFU**= Plaque forming unit

**CFU**= Colony forming unit

**BHI**= Brain heart infusion agar

## 1. INTRODUCCIÓN

El éxito en un sistema de producción avícola depende de la implementación de medidas sanitarias tanto de control y prevención adecuadas para evitar la presencia de distintas patologías, las mismas que pueden generar morbilidad y mortalidad, afectando la producción de carne, huevos, y el desarrollo de las aves; causando grandes pérdidas económicas para el avicultor (Cortes y Llagostera, 2020).

Debido al confinamiento en el que se da la crianza de las aves destinadas a la producción, la transmisión de enfermedades infecciosas es rápida. Al igual que en las distintas especies, las aves están predispuestas a padecer patologías parasitarias, virales o bacterianas; siendo la salmonelosis, chlamydiosis, mycoplasmosis y la colibacilosis las principales de esta última clasificación (Shivaprasad, 2015).

La colibacilosis aviar es una de las patologías que se presenta con mayor frecuencia, es causada por una cepa bacteriana Gram negativa denominada *Escherichia coli* (*E. coli*), este agente etiológico en condiciones normales habita el tracto digestivo de las aves, sin embargo, en animales inmunodeprimidos actúa de forma oportunista. Investigaciones realizadas afirman que de la totalidad de la población colibacilar a nivel intestinal, el 15% presenta alta capacidad patógena (Avinews, 2016; Carranza *et al.*, 2012).

La colibacilosis es producida por cepas patógenas (APEC) que también causan daño a nivel respiratorio pues la afección es ocasionada por contacto directo con materia fecal de aves enfermas o por medio de aerosoles, estos microorganismos ingresan a los sacos aéreos y pulmones debido a la ausencia de células de defensa tales como los macrófagos, posteriormente pasan a nivel sanguíneo atacando diversos órganos. Signos como la aerosaculitis, pericarditis, perihepatitis y peritonitis son característicos de esta patología (Carranza *et al.*, 2012).

Esta enfermedad considerada un síndrome, es una de las principales causas de muerte en lotes de producción, ocasionado posiblemente por la resistencia bacteriana generada frente al organismo etiológico y reduciendo así las opciones terapéuticas disponibles; entre algunas de las causas están: la mala administración del antimicrobiano, el uso sub-terapéutico y el diagnóstico erróneo; lo que ha favorecido la selección de cepas resistentes a ciertos antibióticos (Huff *et al.*, 2002).

Debido a esta situación de resistencia bacteriana, existe la necesidad de encontrar nuevas opciones al uso de antimicrobianos que permitan prevenir y controlar las infecciones por colibacilosis. Una de las alternativas que ha tomado mayor impulso en el ámbito médico es el uso de bacteriófagos, estos adquirieron gran relevancia frente a ciertas patologías debido a su efectividad, sin embargo, con el descubrimiento de los antibióticos estos quedaron en desuso (Oliveira *et al.*, 2009).

En 1986 Ernest Hakin estudió por primera vez sustancias con propiedades antibacterianas a los que denominó bacteriófagos. Estos son virus que infectan específicamente a un hospedador bacteriano, actúan con alta precisión al momento de identificar receptores de la pared celular, a la cual transmiten su ADN o ARN viral, permitiendo su ensamblaje y multiplicación, esto con el fin de producir lisis de las paredes celulares y la liberación de nuevas partículas virales que infectarán a otras bacterias (Prada *et al.*, 2015).

Ante el continuo incremento de casos de patógenos con resistencia a los antibióticos y desde un enfoque general de la aplicación de fagos, se plantea dicha investigación, ya que la aplicación de una terapia fágica tiene considerables ventajas que deben tomarse en cuenta. Entre los beneficios que posee el bacteriófago están el crecimiento exponencial y mayor efecto en el punto de infección, alta capacidad para mutar lo que evitará que la bacteria genere resistencia, carecen de toxicidad, su selección y producción no es onerosa en comparación al antibiótico y su alta especificidad (Prada *et al.*, 2015).

## 2. OBJETIVOS

### a. Objetivo General

Evaluar en aves afectadas por una cepa patógena de *E. coli* el efecto de la aplicación de un coctel de colífagos aislados de sitios de producción avícola.

### b. Objetivo Especifico

- Evaluar parámetros de mortalidad, ganancia de peso, conversión alimenticia y peso promedio en pollos broiler afectados por una cepa patógena de *E. coli* y tratados de manera convencional en contraste con la inoculación de colífagos.
- Comparar los valores obtenidos con la inoculación de los colífagos sobre las variables analizadas respecto a investigaciones previamente publicadas.

### c. Pregunta de Investigación

¿La aplicación de concentraciones elevadas de colífagos líticos reduce la mortalidad, incrementa la ganancia de peso, conversión alimenticia y peso promedio en pollos broiler desafiados con una cepa patógena de *E. coli*?

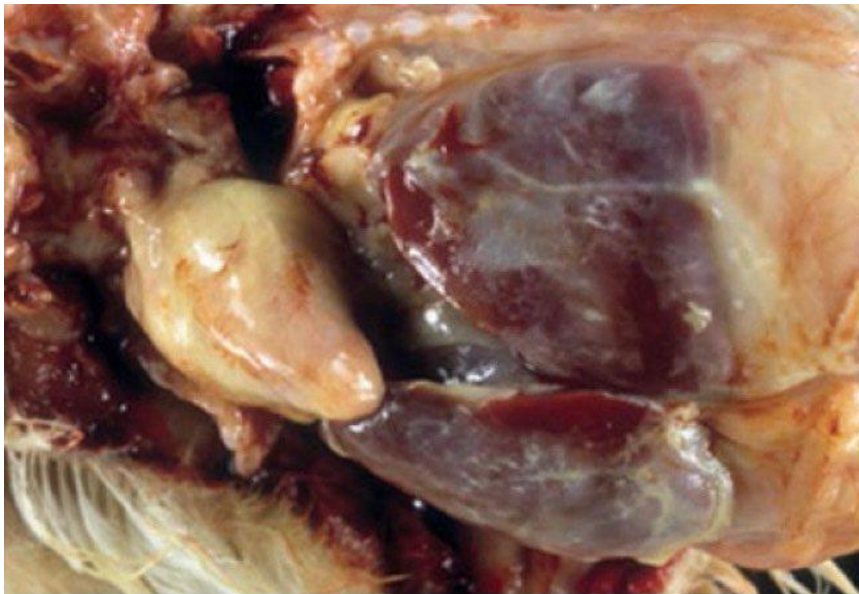
## 3. REVISIÓN DE LITERATURA

### 3.1. Colibacilosis

Es una patología localizada o sistémica producida por la cepa aviar patógena de *Escherichia coli* (*E. coli*), presenta una amplia variedad de lesiones, como pericarditis y aerosaculitis. La alta mortalidad y baja producción de las aves causada por esta enfermedad acarrear grandes pérdidas económicas (Ozaki *et al.*, 2017). Dentro del país, la avicultura aporta al producto interno bruto (PIB) agropecuario con 13 % correspondiente a pollos de engorde; las afecciones respiratorias, consideradas de alta prevalencia ocasionan pérdidas del 20 % en aves de carne (De la Cruz *et al.*, 2018).

El microorganismo etiológico es *E. coli* el cual forma parte de la familia Enterobacteriaceae, Gram negativo y aerobio-anaerobio que crece a temperaturas de 18 a 44 °C (Amasino, 2020). Su período de incubación es de 1 a 3 días y ha mostrado resistencia a diversos metales y desinfectantes. Es un habitante normal de la microbiota intestinal inhibiendo la proliferación bacteriana, sin embargo, en aves normales el 10-15 % de esta población coliforme puede representar serotipos altamente virulentos (Nolan *et al.*, 2020).

La transmisión en las aves puede producirse de forma horizontal al mantener contacto con alimento infectado, heces o la inhalación de partículas; y de forma vertical mediante las reproductoras afectadas con salpingitis (Díaz y González, 2018). La colibacilosis es la patología bacteriana más común en la avicultura, identificándose como una de las principales causas de muerte en pollitos durante la primera semana de vida (Swelum *et al.*, 2021). La manifestación más usual es una infección sistémica incluyendo lesiones como pericarditis, aerosaculitis, peritonitis, salpingitis, sinovitis (Naghizadeh *et al.*, 2019).



**Figura 1.** Perihepatitis, pericarditis y aerosaculitis en pollo broiler de 20 días.

**Fuente:** (Nolan *et al.*, 2020)

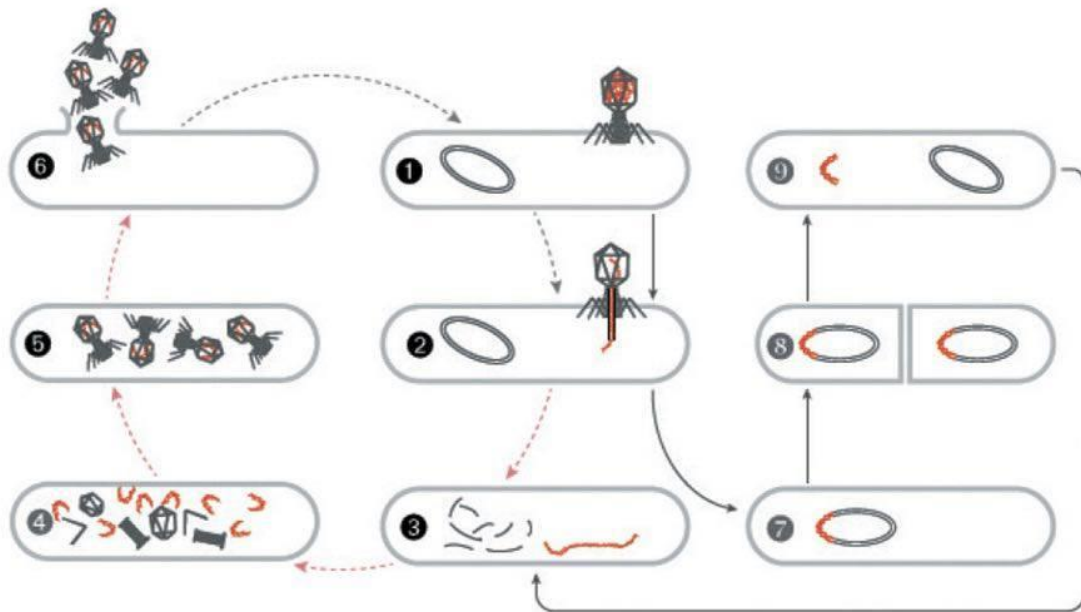
### 3.2. Colífagos

Los bacteriófagos son las entidades biológicas más abundantes de la naturaleza, infectan específicamente a bacterias y no atacan a microorganismos benéficos para el animal (Herrera y Trujillo, 2016). Actúan como parásitos intracelulares en un hospedador bacteriano en el cual desarrollan un ciclo de infección pudiendo ser: lítico, lisogénico, pseudolisogénico y crónico. Estudios recientes de fago-terapia dan relevancia al empleo de fagos líticos, pertenecientes a los Caudovirales que abarca a las familias Myoviridae, Siphoviridae y Podoviridae (Honorio, Vallenas, y Bazán, 2021).

El ciclo de infección lítico empieza con la capacidad que tiene el fago para reconocer los receptores específicos en la membrana de la bacteria, posteriormente se da una adsorción del virus para que este introduzca su material genético y permita su replicación, como último paso se da la liberación de holinas y endolisinas las cuales ocasionarán la formación de poros en la membrana, produciéndose así la despolarización con la consecuente lisis y muerte del hospedador bacteriano, debido a esto es importante emplear solamente fagos líticos en la crianza de aves (producción de carne y huevos) (Honorio *et al.*, 2021).

# UCUENCA

Los fagos líticos reducen notablemente la mortalidad de las aves desafiadas con dosis elevadas de bacterias patógenas, sin embargo, estos virus no soportan pH muy ácido (menores a 3), siendo el óptimo de 7.0. Debido a su tropismo, hacen que cada bacteriófago sea exclusivo para cada género y especie bacteriana sin afectar la microbiota intestinal del animal (Naghizadeh *et al.*, 2019).



**Figura 2.** Ciclos de multiplicación fágica; lítica y lisogénica.

**Fuente:** (Prada *et al.*, 2015)

### 3.3. Resistencia bacteriana

En avicultura, los antimicrobianos suelen administrarse a todo el lote, se emplean para tratar patologías emergentes, en la prevención de las mismas y como promotores de crecimiento. Los antibióticos con este último propósito se prohibieron en la Unión Europea en 2006 y en Estados Unidos en 2017, sin embargo, siguen permitidos en China, Brasil, entre otros países (Roth *et al.*, 2019). Debido a las pérdidas que produce el desarrollo de enfermedades, se establecen tratamientos profilácticos en los que se suelen usar dosis menores a las sugeridas, de manera que el patógeno puede adaptarse e incrementar su defensa frente al antibiótico (Carvajal *et al.*, 2019).

# UCUENCA

Un microorganismo puede llegar a adquirir y desarrollar mecanismos de protección que inhiben las diferentes acciones de los antibióticos, esta función se denomina resistencia antimicrobiana, la cual puede ser innata o adquirida (Villagran, 2017).

En la resistencia adquirida la bacteria sufre diferentes alteraciones ocasionadas por mutaciones cromosómicas o por mecanismos de transferencia de genes ocasionando que la bacteria neutralice al antibiótico y lo elimine (Guzman, 2018).

En cuanto a *E. coli*, en su constitución genética posee ADN del cromosoma y ADN de los plásmidos, los cuales determinan las características de la bacteria y debido a esto puede generar resistencia de origen cromosómico o extra cromosómico. En la avicultura, el uso indiscriminado de los antibióticos ha generado el incremento de cepas *E. coli* multiresistentes a los antimicrobianos, siendo la transferencia horizontal el primer mecanismo de diseminación. También se han identificado transposones, plásmidos y *cassettes* genéticos involucrados en la transferencia de genes de resistencia (Carvajal *et al.*, 2019).

Además del uso descontrolado del antibiótico y el poco seguimiento en los tratamientos, otro factor a considerar es el alimento almacenado durante un tiempo considerable, convirtiéndose en fuente de transmisión, y empleándose antimicrobianos como medida profiláctica (Arenas y Moreno, 2018). Una investigación realizada por Bhardwaj y *col.* (2021) en India confirmó que los granjeros allí empleaban Tetraciclina como promotor de crecimiento, además de un aditivo en el agua que contenía Levofloxacin, como preventivo contra *E. coli*.

Apolo (2015) en su investigación aisló 204 muestras de *E. coli* de pollos broiler compatibles con colibacilosis con los cuales determinó el comportamiento de la cepa frente a doce antibióticos, demostrando un promedio de 49.5 % de resistencia a dichas sustancias, 38.6 % de sensibilidad y un 11.9 % de cepas con una respuesta intermedia con tendencia a resistencia. En su estudio obtuvo los siguientes porcentajes de resistencia frente a cada fármaco:



**Tabla 1.** Resultados obtenidos en la investigación realizada acerca de la resistencia antimicrobiana.

<b>Antibiótico</b>	<b>Resistencia</b>
Oxitetraciclina	89.5 %
Amoxicilina	78.4 %
Sulfametoxazol mas Trimetoprim	71.1 %
Doxiciclina	68.6 %
Norfloxacina	45.6 %
Fosfomicina	44.6 %
Enrofloxacina	44.1 %
Ciprofloxacina	40.2 %
Florfenicol	34.3 %

**Fuente:** (Apolo, 2015)

En otra investigación realizada con la misma finalidad, Eid y *col.* (2022) encontraron distintos niveles de resistencia antibiótica de *E. coli* en pollos broiler:

**Tabla 2.** Resultados obtenidos en una investigación más reciente acerca de la resistencia antimicrobiana.

<b>Antibiótico</b>	<b>Resistencia</b>
Ampicilina	100 %
Amoxicilina, Tetraciclina y Amikacina	76,9 %
Norfloxacina	73,1 %
Estreptomina	69,2 %
Trimetoprim y Ácido nalidixico	65,4 %
Ciprofloxacina	53,8 %
Doxiciclina y Levofloxacina	50 %

**Fuente:** (Eid *et al.*, 2022)

El implemento de una alternativa al uso de antibióticos es necesario frente a este panorama; se ha señalado a los bacteriófagos como la medida más efectiva de tratar la resistencia bacteriana además de que estos no producen alteraciones en la microbiota intestinal de los animales. (Eid *et al.*, 2022).

### 3.4. Antecedentes

El inicio del uso de los bacteriófagos fue en 1919 donde Felix D'Herelle los administró para curar la disentería en París, sin embargo, se vieron desplazados con el descubrimiento de la Penicilina en 1928 (Blasco *et al.*, 2017). En el ámbito veterinario, Huff y *col.* (2003) buscaron conocer la eficacia de la aplicación del bacteriófago por vía aerosol e inyección intra-muscular (IM) para tratar una infección respiratoria por *E. coli* en pollos broilers, las aves fueron desafiadas por una inyección de *E. coli* en el saco aéreo. El bacteriófago por aerosol redujo la mortalidad del 50 al 20%, mientras que la aplicación IM lo superó disminuyendo del 53 al 17 %.

Huff y *col.* (2003) analizaron la eficacia de la administración de títulos altos de bacteriófagos para la prevención y tratamiento de la colibacilosis aviar. En sus estudios evaluaron las concentraciones que alcanzaron a nivel sanguíneo los fagos aplicados mediante vía IM o aerosol, siendo la primera la más eficiente como medida terapéutica. Durante el mismo año, valoraron la efectividad de los fagos aplicados en dosis múltiples en pollos de engorde con infección respiratoria debido a *E. coli*, para esto plantearon 16 tratamientos que incluyeron: animales no tratados, aves desafiadas con *E. coli* a los 7 días de edad y pollos tratados con bacteriófagos activados e inactivados a base de calor. Para este estudio las aves fueron inicialmente desafiadas y luego tratadas, concluyendo que en los animales a los que se aplicó una única dosis de fagos, la mortalidad se redujo de un 57 % al 13 %; en aquellos que recibieron dosis múltiples vía IM a los 7, 8 y 9 días de edad, lograron reducir la mortalidad de 57 a 10 %.

Sin embargo, en aves que recibieron aplicación de fagos a los 9 y 10 días de edad la mortalidad se redujo de 57 a 27 y 28 % respectivamente. Con este panorama concluyeron que la aplicación de dosis múltiples de bacteriófagos vía IM es efectiva para prevenir y tratar infecciones tempranas, pero si la terapia se retrasa 24 o 48 horas pos infección la eficacia reduce notablemente. Durante el 2004 demostraron que los

bacteriófagos tiene un mecanismo de acción similar al del antibiótico Enrofloxacin frente a la patología en cuestión.

**Tabla 3.** Investigaciones de fagoterapia realizadas en aves para el control de *Escherichia coli*.

Animales	Contaminación	Tratamiento	Efecto (reducción)	Referencia
<i>Escherichia coli</i> (Fagos encapsulados)				
Pollos (1 día)	Tráquea: <i>E. coli</i> 01:K1:H7 (109 cfu/ml)	Oral (107 pfu/ml): fago KAZ14 no encapsulado y encapsulado en quitosano, 2h post infección	Fago encapsulado: 1) Disminución de mortalidad (83,3 % supervivencia) 2) Heces: 6,47 log <sub>10</sub> cfu; p ≤ 0,05) días 7-21 post infección. Pulmón, bazo y sangre: 1,4-2,6 log <sub>10</sub> cfu días 7-28 post infección Fago encapsulado y no encapsulado: Mejora de peso (p ≤ 0.05) a 21 días post infección	35
<i>Escherichia coli</i> (Fagos no encapsulados)				
Pollos (1 día)	i) Espray cama de jaulas: <i>E. coli</i> 2,8 x 10 <sup>8</sup> cfu/ml ii) Oral: <i>E. coli</i> 5,5 x 10 <sup>8</sup> cfu/ml	Espray cama jaulas: Bacteriófago SPR02 (8 x 10 <sup>8</sup> pfu/ml)	Reducción mortalidad hasta final experimento (p ≤ 0,05) Prevención colibacilosis en la primera semana, aumento significativo de peso; i y ii (p ≤ 0,05)	29
Pollos (1 día)	Oral: <i>E. coli</i> APEC-CH2 (078)	Coctel fagos (PhAPEC2, PhAPEC7, y PhAPEC9) 2H post infección: i) Intratraqueal; ii) intra-esofágica y iii) agua de bebida	Tratamiento con fagos no reduce la mortalidad, ni produce mejora en el peso de los animales	32
Codorniz (1 día)	Inyección sacos aéreos torácico (10 <sup>8</sup> cfu; <i>E. coli</i> )	IM (10 <sup>10</sup> pfu), i) fago TM3 o ii) coctel de 4 fagos, 8 horas post infección	ii) Coctel: Mayor eficacia, mejora de peso desde día 14 post infección hasta final estudio (p < 0,05)	31

	(078:K80 y 02:K1)		y reducción mortalidad ( $p < 0,05$ ). Pulmón: 2-3 log <sub>10</sub> cfu/g, días 2 a 10 post infección	
Pollos (1 día)	Tráquea <i>E. coli</i> APEC (078) 10 <sup>8</sup> cfu	Tráquea: fagos (10 <sup>8</sup> pfu) días 1, 5, 8 y 13 de vida	Retraso aparición signos clínicos (6 días post infección) Pulmón: 2-3 log <sub>10</sub> cfu/ml, a los 9 y 15 días post infección ( $p < 0,001$ )	30

**Fuente:** (Cortes y Llagostera, 2020)

En un estudio realizado por Sajjad y *col.* (2004) determinaron el efecto de la aplicación de un bacteriófago para tratar colibacilosis. Constó de 4 grupos, empleando las mismas concentraciones de fago y *E. coli* (10<sup>7</sup>/ml). El grupo A se trató por agua de bebida; al grupo B se le administró una inyección intra-peritoneal (IP) de *E. coli* y fago mediante agua de consumo; al grupo C se le aplicó una inyección IM, a la mitad del grupo D se le administró *E. coli* por agua de bebida y a la otra parte fago por la misma vía. Se obtuvo mortalidad en la primera mitad del grupo D (58 %) y una morbilidad del 100 %, en el grupo C y en la otra parte del grupo D ningún ave se vio afectada; mientras que en el grupo A y B se obtuvo un 12 y 16 % respectivamente de pollos enfermos.

Huff y *col.* (2005) demostraron el efecto de dos bacteriófagos (SPPRO2 y DAF6) administrados vía aerosol, en pollos desafiados con *E. coli* a los 7 días de edad. En su investigación determinaron una mortalidad del 7 % en aves que recibieron los bacteriófagos e inmediatamente fueron desafiadas, obtuvieron también un 27 % de mortalidad en aquellas que su desafío fue un día posterior a la aplicación de los fagos, con esto dedujeron que el efecto de la administración de los mismos vía aerosol otorga protección adecuada, sin embargo, en infecciones sistémicas pierde efectividad. Al siguiente año los mismos autores plantearon un nuevo análisis en el que comprobaron la acción de los bacteriófagos (SPPRO2 y DAF6) administrados en el músculo pectoral izquierdo mediante inyección a dosis decrecientes 4 X 10<sup>8</sup>, 10<sup>6</sup>, 10<sup>4</sup> o 10<sup>2</sup> PFU, observando que con títulos de 10<sup>8</sup> la mortandad se redujo del 48 al 7 %. Para el año 2010, los autores buscaban evidenciar si la exposición tanto anterior y posterior del

# UCUENCA

bacteriófago a la infección con *E. coli* alteraba su eficacia. A partir de esto, encontraron mortalidad del 55 % en aves desafiadas y no tratadas, en pollitos que fueron desafiados e inmediatamente expuestos al bacteriófago la mortalidad fue del 8 %, en aves a las que se administró fago tanto anterior y posterior a la infección se obtuvo un 33 %. Con esto dedujeron que la exposición previa al bacteriófago inhibe la acción del mismo.

Oliviera y *col.* (2009) en sus análisis determinaron el efecto de aplicar mediante vía oral y aerosol un *coctel* de colífagos (*phi F78E*, *phi F258E* y *phi F61E*) con títulos de  $1.5 \times 10^9$  PFU/ml frente a una cepa patógena aviar (APEC) H839, mediante esta aplicación se obtuvo una reducción en morbilidad, lesiones anatomopatológicas características y mortalidad.

Lau y *col.* (2010) analizaron la eficacia de un bacteriófago contra *E. coli* en pollitos de un día de vida, divididos en cuatro grupos: El grupo A recibió PBS; al B se le administró  $10^{10}$  PFU de bacteriófago; el C fue desafiado con  $10^8$  CFU de *E. coli* y tratado luego de dos horas con  $10^{10}$  PFU de fago; en cambio el grupo D fue desafiado con la misma concentración de *E. coli* sin tratamiento; la inoculación fue por vía intra traqueal para los grupos. Al concluir el estudio, no hubo aves afectadas en los grupos A y B, mientras que la mortalidad en el grupo D (83.3 %) fue muy significativa comparada con el grupo C que recibieron bacteriófago (13.3 %).

Huff y *col.* (2013) en su trabajo de investigación valoraron el mecanismo de acción de bacteriófagos suministrados (IT) intra-traqueal y pulverizado, de manera que obtuvieron que mediante pulverización sea fina o gruesa, las aves no alcanzaron una protección completa con una mortalidad del 40 %, por el contrario, mediante aplicación IT la mortalidad fue del 3 % alcanzando una defensa completa.

El- Gohary y *col.* (2014) en sus estudios evaluaron el efecto de la utilización de un colífago en el medio ambiente de las aves. Aplicaron 200 ml de fagos mediante rocío sobre la superficie de las camas ( $3.9 \text{ m}^2$ ), consiguiendo resultados positivos en un grupo de aves, esto se evaluó en el peso y mortalidad reducida deduciendo que la severidad de la colibacilosis aviar puede disminuir mediante un incremento ambiental del colífago.

Wernicki y col. (2017) investigaron la acción de los fagos frente a una infección producida por *E. coli*, en donde suspensiones de bacteriófagos fueron aplicadas en los sacos aéreos de pollitos de tres días de vida a concentraciones de  $10^3$  y  $10^6$  PFU, reduciendo la mortalidad a un 25 y 5 % respectivamente. La administración de concentraciones bajas de fagos ( $10^4$  PFU) posteriores al desafío con *E. coli* confieren protección, lo cual indica que el bacteriófago se multiplica en el organismo; por otro lado, las concentraciones más bajas ( $10^2$  PFU) no proveen defensa significativa contra *E. coli*.

Tawakol y col. (2019) evaluaron la eficacia de los bacteriófagos frente a una infección por *E. coli* donde emplearon pollitos de un día de vida divididos en distintos grupos; la mitad de las aves fueron tratadas con bacteriófago, inoculándoles  $10^8$  PFU por vía IT, la otra mitad no recibió tratamiento y una cantidad de aves de ambas partes fue inoculada por vía IT con  $10^8$  CFU de *E. coli*. El fago retrasó la aparición de los signos clínicos y redujo la severidad de los mismos en las aves expuestas, mientras que se produjo un 16 % de mortalidad en las aves que no fueron inoculadas con bacteriófago.

### 3.5. Inóculo de *Escherichia coli*

La *E. coli* es el género bacteriano más abundante del aparato digestivo de las aves, del hombre y otros animales, por sus siglas en inglés (Avian pathogenic *Escherichia coli*), APEC son las cepas responsables de ocasionar colibacilosis debido a los factores de virulencia específicos que poseen (Cejudo, 2017). En cuanto a sus características, *E. coli* puede alcanzar  $1-1.5 \times 2-6 \mu\text{m}$ , son móviles con flagelos periféricos o inmóviles; en cuanto a su estructura poseen una pared bacteriana, membrana externa, pili y flagelos (Egas, 2018).

Entre los factores de virulencia expresados por los patotipos APEC, están las adhesinas, colicinas, aerobactina, resistencia al efecto bactericida del suero y antígeno capsular K1, lo que potencia su patogenicidad (Cejudo, 2017). Para aislar e identificar las cepas patógenas de *E. coli* se emplean medios de cultivo como: Agar Columbia con 5 % de sangre de cordero, Agar BHI (Brain heart infusion agar) y Agar McConkey, para la identificación se emplea el método IMVIC “Indol, Rojo de metilo, Vogues Proskauer y Citrato” (Gibert, 2009).

### 3.6. Inóculo de bacteriófago

Para el desarrollo del inóculo de bacteriófago ciertos procedimientos deben ser llevados a cabo, entre ellos tenemos:

### 3.6.1. Aislamiento

Este es un paso fundamental para la fagoterapia exitosa. Los colífagos pueden aislarse de diversas fuentes tales como ríos contaminados, aguas residuales de hospital o de explotaciones avícolas, entre otros (Saleem *et al.*, 2016). En estos sitios existe amplia variedad de bacterias, y de igual forma fagos que atacan a las mismas, estableciéndose un control biológico (Gaviria *et al.*, 2012). Los ensayos de placa son empleados para hallarlos, donde la muestra es diluida y colocada sobre un campo con la bacteria compatible, y posteriormente se observan zonas de lisis (Luong *et al.*, 2020).

### 3.6.2. Purificación

Los bacteriófagos previamente a su aplicación deben ser separados de materiales no deseados del cultivo los cuales pueden ser células bacterianas, endotoxinas y otros (Bretaudeau *et al.*, 2020). Tiempo atrás se sugirió a los restos bacterianos como responsables de fagoterapias fallidas, desarrollando protocolos de purificación, la cual está basada en la filtración y centrifugación (Azeredo y Sillankorva, 2016). Este procedimiento también asegura la viabilidad y pureza del compuesto final (Gelman *et al.*, 2021).

### 3.6.3. Titulación

Para la cuantificación de bacteriófagos, el método establecido es el ensayo de placas, el cual consiste en la colocación de los fagos sobre cultivos bacterianos por medio de agar de doble capa (Gelman *et al.*, 2021). Posterior a la incubación se observan zonas claras y circulares de lisis conocidas como placas, las mismas que son enumeradas y manifestadas como unidades formadoras de placas líticas por mililitro (PFU/ml) (Thung *et al.*, 2017).

## 3.7. Vías de aplicación

Los bacteriófagos necesitan de una vía de administración para alcanzar una adecuada biodistribución en el organismo, sin embargo, pueden perder eficacia al ser reconocidos por el sistema innato como invasores, esto puede deberse a aplicaciones prolongadas y consecutivas (Azeredo y Sillankorva, 2016; Reina y Reina, 2017). Entre las vías de aplicación usadas están: la oral, IP, tópica y rectal (Barriosnuevo, 2020). También se mencionan rutas como aerosol, IM e intra-venosa (IV) (Fuentes *et al.*, 2021). El éxito de la terapia fágica dependerá de factores como: la elección del bacteriófago, el momento de aplicación, la vía y la cantidad a administrar (Gauthier, n.d.).

### 3.7.1. Intramuscular

La aplicación de bacteriófagos vía IM es muy eficiente ya que se han observado que los títulos de fagos pueden mantenerse en niveles altos en los sitios de infección hasta seis horas *post* aplicación (Albala, 2007). Sin embargo, se considera poco viable pues en la avicultura se cuenta con numerosos animales por área, a pesar que hay evidencia que demuestra que la concentración de fagos iniciales es proporcional a la cantidad de bacteriófagos encontrados en los órganos con infección (Oliveira *et al.*, 2009).

### 3.7.2. Oral

En el caso de la vía oral debe tomarse en consideración factores fisicoquímicos como el pH y la temperatura. Los fagos pueden soportar un pH de 5 a 8, pudiendo abarcar un rango de 4 a 10. El pH estomacal de las aves es muy ácido (2.8) por esta razón se debe protegerlos con sustancias buffer o Bicarbonato para evitar pérdidas del fago (Albala, 2007). Es una de las rutas más práctica, ya que se puede administrar mediante el agua o el alimento a grandes masas, disminuyendo el estrés a los animales. Se demostró que el suministro de fagos vía oral si llega a los órganos afectados por las células bacterianas, el éxito de esta aplicación dependerá de la concentración, cantidad de dosis y duración del tratamiento (Honorio *et al.*, 2021).

### 3.7.3. Aerosol



La aplicación por aerosol es una vía cuestionable debido a que las concentraciones administradas pueden llegar a ser menores a las supuestas (Dabrowska, 2019). Sin embargo, los fagos suministrados directamente a los pulmones mediante inhalación han mostrado ser capaces de combatir satisfactoriamente infecciones bacterianas (Dabrowska y Abedon, 2019).

#### 3.7.4. Intratraqueal

Las vías de aplicación a través del tracto respiratorio, aerosol y traqueal, presentan menor eficacia comparadas con las inyecciones, ya sean estas IM o IP debido a que la distribución de fagos podría ser insuficiente.

Por otro lado, con el inóculo IT se evidencia un título de fagos en sangre más alto que los obtenidos con la administración oral (Dabrowska, 2019).

#### 3.7.5. Intraperitoneal

La aplicación por esta vía y las inyecciones en general superan con facilidad las barreras corporales, depositando así los fagos rápidamente a la sangre (Dabrowska y Abedon, 2019). La vía IP permite también la circulación de los bacteriófagos durante mayor tiempo además del acceso directo a distintos órganos como los pulmones, riñones y bazo (Malik *et al.*, 2017).

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. Materiales

#### 4.1.1. Materiales Biológicos

- Pollitos bebe Cobb 500
- Cepa patógena de *Escherichia coli*
- Colífagos

#### 4.1.2. Materiales Químicos

- Agar Luria Bertani (LB)
- Solución salina Buferada de fosfato (PBS)
- Medios de cultivo (caldo y agar)

- Buffer SM
- Triptona
- Extracto de Levadura
- Cloruro de sodio
- Glutaraldehído
- Vitaminas
- Electrolitos
- Vacunas

#### 4.1.3. Materiales de campo

- Balanzas
- Registros
- Termómetro

#### 4.1.4. Materiales de Laboratorio

- Cajas Petri
- Centrifuga
- Incubadora
- Pipetas
- Tubos Eppendorf
- Asas para cultivo
- Puntas de pipetas
- Cooler
- Fotómetro
- Micropipetas de diferentes tamaños y sus puntas
- Tubos plásticos de diferentes volúmenes
- Microcentrífuga
- Incubadora bacteriológica
- Vórtex
- Cabina de seguridad biológica

## 4.2. Métodos y técnicas empleadas

### 4.2.1. Área de estudio

Este estudio se llevó a cabo en la granja Irquis perteneciente a la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca ubicada en el km 23 de la vía Cuenca-Girón, a la altura de la parroquia Victoria del Portete a 2663 msnm. La precipitación anual corresponde a 1078,05 mm y con una temperatura mínima de 7 °C y máxima de 12 °C.



**Figura 3.** Mapa satelital, ubicación geográfica Granja Experimental "IRQUIS" de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca

**Fuente:** Google Maps, 2022

### 4.2.2. Diseño experimental

Para el estudio fueron empleados en total 288 pollitos Cobb 500 de un día de edad, con un peso promedio de 49.4 gr, las aves se encontraban en óptimo estado sanitario y físico. Esta investigación se llevó a cabo en el mismo lugar en tres momentos distintos (tres repeticiones con 96 pollitos). Todos los pollitos recibieron alimento y agua *ad libitum* durante la primera semana, además se les suministró vacunas y vitaminas. Este estudio tuvo una duración de 21 días.

A la llegada de los pollitos, fueron distribuidos aleatoriamente en seis unidades experimentales con 16 aves cada una, siendo el primer tratamiento (T1) Colifagos más *E. coli*, tratamiento 2 (T2) Colifagos, tratamiento 3 (T3) Antibiótico más *E. coli*, tratamiento 4 (T4) Antibiótico, tratamiento 5 (T5) *E. coli* y tratamiento 6 (T6) Control negativo.

**Tabla 4.** Tratamientos a los que fueron sometidas las aves en el estudio.

Tratamientos	Infectados con <i>E. coli</i>	No Infectados con <i>E. coli</i>
Colifagos	T1	T2
Antibiótico	T3	T4
Control	T5	T6

#### 4.2.3. Determinación de variables en el experimento

##### Peso corporal

Los pollitos fueron pesados desde su llegada al día 1 y semanalmente hasta el día 21 cuando concluyó la investigación, el peso se registró en gramos/animal.

##### Mortalidad

Se registró el número de aves muertas en cada tratamiento durante las tres semanas de la investigación, la cantidad obtenida se transformó a porcentaje:

$$Mortalidad\ acumulada = \frac{\# \text{ Total aves muertas}}{\# \text{ Total de aves iniciales}} \times 100$$

##### Ganancia de peso

Se registró el peso de las aves tanto al inicio del estudio, así como semanal y se obtuvo el incremento de peso de las mismas mediante la siguiente fórmula:

$$Ganancia\ media\ diaria = \frac{\text{Peso final (g)} - \text{Peso inicial(g)}}{\# \text{ de días de crianza}}$$

## Índice de conversión

Se cuantificó el consumo de alimento de las aves y fue dividido para el peso final de las mismas, se procedió al cálculo de la siguiente manera:

$$\text{Conversion alimenticia} = \frac{\text{Consumo de alimento por ave (g)}}{\text{Peso vivo (g)}}$$

## Peso promedio

Los pesos registrados en cada tratamiento fueron sumados y divididos para el total de animales presentes en ese momento, se procedió al cálculo mediante la fórmula:

$$\text{Peso promedio} = \frac{\text{Suma del peso de todos los animales}}{\# \text{ Total de animales}}$$

## Preparación del inóculo bacteriano

Para la elaboración del inóculo se empleó bacterias del genero *E. coli* obtenidas de un banco biológico del laboratorio de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca (Astudillo, 2020), para lo cual se preparó un agar (6 g de NaCl, 6 g de Triptona, 3 g de extracto de levadura y 9 g de Agar) y caldo nutritivo (2.5 g de NaCl, 2.5 g de Triptona y 1.25 g de extracto de levadura). El agar fue colocado dentro de las cajas Petri, posteriormente se sembró la *E. coli* y se incubó por 24 horas a 37 grados centígrados, transcurrido este tiempo se tomaron de 3-5 colonias para inocularlas en 5ml de caldo. De esta cantidad se tomó 1 ml para diluirla en 100 ml de caldo, y este se cultivó por 4 horas.

El caldo fue colocado en tubos Falcon para ser centrifugado a 4 000 x g, se realizaron dos lavados del sedimento con solución salina para eliminar los residuos del medio; luego se adicionó Buffer de fosfatos con 10 % de Glicerol y se distribuyó en tubos Eppendorf para congelarlos inmediatamente. De estos viales se descongelaron dos (el primero y el último), se prepararon diluciones 1:10 y se estimó el número de CFU por ml ( $10^5$ ).

## **Preparación del inóculo de colífago**

Para la elaboración del inóculo se empleó fagos obtenidos de un banco biológico del laboratorio de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca (Paccha, 2020), para lo cual se preparó un medio LB, agar (6 g de NaCl, 6 g de Triptona, 3 g de extracto de levadura y 9 g de Agar) y caldo nutritivo (2.5 g de NaCl, 2.5 g de Triptona y 1.25 g de extracto de levadura). En la placa LB se sembró la cepa de *E. coli* TOP10F' con el agar de cubierta, y se estrió con fagos, con la consiguiente aparición de placas líticas.

Del pre-cultivo se tomaron 3 placas líticas y se inocularon en un cultivo bacteriano el cual nuevamente se inoculó en un matraz con 200 ml de caldo nutritivo, se dejó incubar por 6 horas para luego centrifugarse a 4 500 x g por 15 minutos. Se colectó el sobrenadante y se precipitó con el PEG 6000/NaCl (Composición), se dejó toda la noche para una posterior centrifugación. El sobrenadante se re-suspendió en solución Buffer SM (Composición), se volvió a precipitar con 62.5 ml de PEG 6000/NaCl, se dejó toda la noche y se centrifugó y refrigeró, transcurridas 12 horas se tomó el congelado para titular, una vez determinadas las PFU se mezclaron los 3 fagos.

## **Preparación del galpón**

Quince días previos a la llegada de los pollitos a la granja, se procedió a limpiar y acondicionar el galpón. Se barrió toda el área y se aplicó detergente para remover las impurezas y evitar la proliferación de patógenos. Posteriormente, se realizó la desinfección con soplete lanza llamas y desinfectante a base de Glutaraldehído. Una vez seco el piso, se esparció Cal sobre el mismo. Se debió acoplar el galpón con las cortinas tanto internas como externas, además se armaron las unidades experimentales con las mallas metálicas en las cuales se distribuyó el tamo de arroz, el cual tuvo que ser fumigado con Glutaraldehído para prevenir bacterias y hongos. Se inspeccionó el correcto funcionamiento de las campanas criadoras, de los bebederos y comederos. Este proceso se repitió en 2 ocasiones más con el mismo mecanismo, respetando los quince días respectivos al vacío sanitario.

## Recepción de los pollitos bebés

Tras la llegada de los pollitos, se analizó su estado físico basado en el Test de Pasgar. Los animales dispusieron de agua y alimento *ad libitum* hasta los 8 días, se controló la iluminación, temperatura, ventilación y humedad para evitar estrés en las aves. Se estableció el programa de vacunación en el cual se les administró en el séptimo día la vacuna de Newcastle más Gumboro, también se les aplicó electrolitos y vitaminas los tres primeros días.

Se realizó el pesaje de las aves una vez por semana para establecer parámetros zootécnicos como ganancia diaria de peso, conversión alimenticia, peso promedio y registro de mortalidad. Este proceso se repitió en 2 ocasiones más con el mismo mecanismo en diferente momento.

## Inoculación de *E. coli* y de los colífagos a los 10 días de edad

Transcurridos diez días de crianza, se procedió a la inoculación de la *E. coli* y del *coctel* de colífagos, los mismos que fueron transportados según las respectivas medidas de bioseguridad, se aplicó vía IM. en los músculos pectorales, para esto las aves fueron repartidas desde su llegada en seis tratamientos de manera aleatoria; el T1, T3 y T5 estarán sometidos a desafío con inóculo de *E. coli* en el músculo pectoral izquierdo a una concentración de  $10^5$  CFU, de estos, al tratamiento T1 se le aplicó una inyección de colífagos a una concentración de  $10^8$  PFU vía IM. en el músculo pectoral derecho; el T3 fue tratado con antibiótico resultante sensible al antibiograma previo al desafío, empleando la dosis terapéutica por vía oral y por un lapso de 4 días; mientras que el T5 no fue tratado de ninguna forma.

Por otro lado, los tratamientos restantes, T2, T4 y T6, no fueron desafiados con el inóculo de *E. coli*, al tratamiento T2 se le aplicó una inyección de colífagos a una concentración de  $10^8$  PFU IM en el músculo pectoral derecho; el T4 fue tratado con antibiótico resultante sensible al antibiograma previo al desafío, empleando la dosis terapéutica por vía oral y por un lapso de 4 días; mientras que el T6 no fue tratado de ninguna forma.

## 4.2.4. Análisis estadístico

Los datos fueron tabulados en el programa Excel y el análisis estadístico se llevó a cabo mediante el programa Infostat. La normalidad de los datos se evaluó mediante la prueba de Shapiro-Wilk. Los tratamientos 1 (*E. coli* más Colífagos), 2 (Colífagos), 3 (*E. coli* más Antibiótico), 4 (Antibiótico), 5 (*E. coli*) y 6 (Control Negativo), fueron evaluados mediante un análisis de la varianza (ANOVA) y para corroborar diferencias significativas con respecto a la variable independiente (tratamientos) sobre la variable dependiente (ganancia media diaria, peso, consumo, conversión alimenticia y mortalidad).



## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1. Peso corporal

De acuerdo a los datos analizados, no existió diferencia estadística ( $p > 0,05$ ) en ninguna de las tres semanas para los distintos tratamientos, sin embargo; se observa una mejora en la primera y segunda semana (Figura 4) donde el T1 (*E. coli* más el coctel de colífagos) obtuvo un peso ligeramente mayor debido a que los bacteriófagos no afectan la microbiota y no son tóxicos para el animal. Como evidencia que la administración de la cepa patógena de *E. coli* fue efectiva en nuestro estudio, se observa que para la semana 2 y 3 el T5 (Control positivo) obtuvo pesos bajos debido a la sintomatología de la enfermedad (diarrea, decaimiento, peritonitis). Huff y *col.* (2003) obtuvieron resultados similares al desafiar aves de 7 días de edad con *E. coli* y la aplicación de bacteriófagos IM inmediatamente, 24 y 48 horas **post** infección, demostrando que a la segunda semana de edad el peso de las aves desafiadas fue significativamente reducido con respecto al grupo control, excepto los animales desafiados que fueron tratados al mismo tiempo; lo cual concuerda con nuestra investigación.

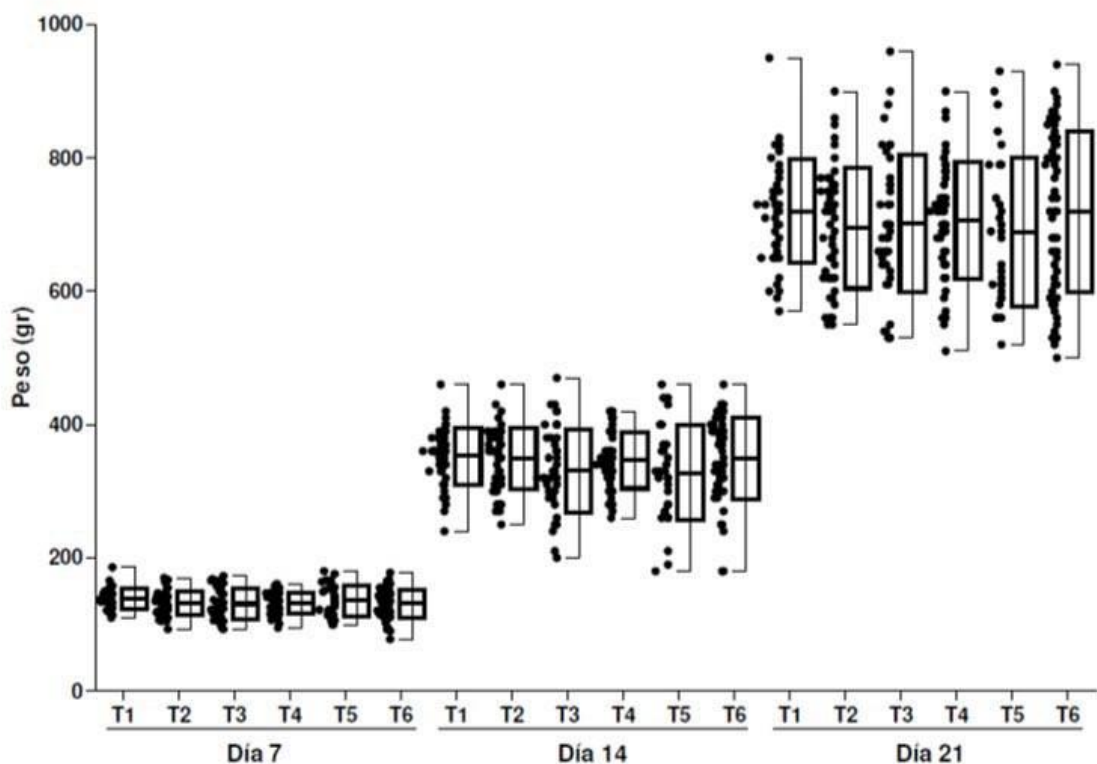
De la misma forma Ortiz y Barrios, (2017) demostraron en su investigación, la efectividad de dos vías de administración (oral e IM) a una cantidad de  $10^9$  PFU/ave, en animales desafiados a títulos de  $10^4$  CFU/ave, en la cual no observaron diferencias significativas en cuanto a pesos entre ninguno de los tratamientos con respecto al grupo testigo, confirmando que la aplicación del bacteriófago no influye negativamente en el crecimiento y desarrollo de las pollitas, esto concuerda con nuestros resultados ya que no encontramos diferencia estadística en cuanto a este parámetro.

Honorio, Vallenas, y Bazán, (2021) difieren con los resultados obtenidos en nuestra investigación ya que menciona que la administración de un coctel de fagos produce efectos positivos sobre parámetros productivos pues actúan indirectamente al reducir la carga bacteriana patógena favoreciendo a que las aves aprovechen mejor los nutrientes.

# UCUENCA

Anh y col. (2022) en su investigación obtuvieron pesos corporales de 1,266 g para el grupo de aves desafiadas y tratadas con fago, estos valores fueron menores en comparación con el control negativo (1,313 g) pero a la vez elevados y estadísticamente significativos frente al control positivo (1,172 g). Estos resultados concuerdan con los obtenidos en nuestro estudio en donde se destacan los siguientes pesos, para el T1 (*E. coli* más *coctel* de bacteriófagos) (717,68 g), para el Control negativo (723,93), y para el Control positivo (676,51 g).

Por otro lado Huff y col. (2004) difieren con nuestros resultados ya que en su investigación “Therapeutic efficacy of bacteriophage and Baytril (Enrofloxacin) individually and in combination to treat colibacillosis in broilers” los pesos corporales de las aves que fueron tratadas con antibiótico (Enrofloxacin) fueron elevados pero no significativos con respecto a los tratamientos control; en nuestro estudio los pesos del T3 (*E. coli* más antibiótico) no fueron superiores en relación a los demás tratamientos, pudo haber influido la duración del tratamiento en ambos experimentos así como el principio activo usado.



Activ  
Ver a Cr

**Figura 4.** Box plot peso corporal de las aves en los distintos tratamientos durante las tres semanas de investigación.

## 5.2. Consumo e índice de conversión acumulada

El análisis estadístico de los resultados en cuanto al consumo de alimento (Tabla 5) reveló que no existe diferencia significativa ( $p>0,05$ ) entre los diferentes grupos. Sin embargo, se destaca el T1 (*E. coli* más coctel de colífagos) ya que presentó un consumo de 950 g con un índice de conversión (Tabla 6) de 1,44 en comparación con el T5 (Control positivo) y T3 (*E. coli* más antibiótico) que mostraron consumo de 890 y 916 g, además de una conversión alimenticia de 1.44 y 1.43 respectivamente, esto se debió a la mortalidad de los pollitos **post** infección. Estos resultados concuerdan con Li y col., (2012) quienes no encontraron diferencia significativa en cuanto al consumo, obtuvieron para el grupo control y para el grupo experimental 318.8 y 324.7 g respectivamente; con un índice de conversión de 2.33 y 2.11 para cada uno, siendo mayor para el caso del grupo control. Por el contrario, los datos obtenidos por Anh y col., (2022) difieren significativamente con los de este estudio, ya que el grupo desafiado + bacteriófago mostraron el menor consumo (768 g) con una conversión alimenticia de 2.84 en un rango de 1 a 35 días, cabe mencionar también que el consumo de alimento para el control positivo fue 871 g con una conversión de 3.37.

De la misma forma, De Almeida y col. (2022) en su estudio no encontraron diferencia estadística para el consumo de alimento para el grupo sometido al fago M13 con 46,20 g/día con una conversión de 1,45 en un rango de 8-35 días, deduciendo que la acción del bacteriófago no produce cambios en los parámetros productivos, ni causa daños en las aves, lo que concuerda con nuestra investigación ya que no existió diferencia estadística en cuanto al consumo e índice de conversión.

**Tabla 5.** Consumo acumulado (g) de las aves en los distintos tratamientos durante las tres semanas de investigación.

<i>Consumo</i>				
<i>Trat</i>	Medias	n	E.E.	
1	950.00	3	33.99	A
2	920.00	3	33.99	A
3	916.67	3	33.99	A
4	933.33	3	33.99	A
5	890.00	3	33.99	A
6	936.67	3	33.99	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p>0.05$ )

**Tabla 6.** Conversión alimenticia acumulada (g) de las aves en los distintos tratamientos durante las tres semanas de investigación.

<i>Conversión Alimenticia Acumulada</i>				
<i>Trat</i>	Medias	n	E.E.	
1	1.44	3	0.02	A
2	1.45	3	0.02	A
3	1.43	3	0.02	A
4	1.44	3	0.02	A
5	1.44	3	0.02	A
6	1.41	3	0.02	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p>0.05$ )

### 5.3. Mortalidad acumulada

Con respecto a la mortalidad acumulada, se evidenció que la cepa patógena administrada en las aves a los 10 días de edad produjo alta mortalidad con relación a los demás grupos (Figura 5), según los datos analizados post inoculación se obtuvo un valor de 29,17 % para el control positivo. Cabe mencionar que la aplicación de los colífagos tuvo un efecto positivo ya que en el T1 (*E. coli* más coctel de colífago) se mostró una mortalidad del 4.17 % en comparación con el T3 (*E. coli* más antibiótico) que alcanzó una mortandad del 8.33 %, debido a la actividad lítica de los bacteriófagos sobre el agente patógeno debido a las holinas y endolisinas que estos liberan para la destrucción del microorganismo.

Estos resultados concuerdan con Wernicki, Nowaczek, y Urban, (2017) quienes demostraron que la aplicación IM de bacteriófago con títulos de  $10^4$  y  $10^6$  redujeron la mortalidad en las aves desafiadas a las tres semanas de edad.

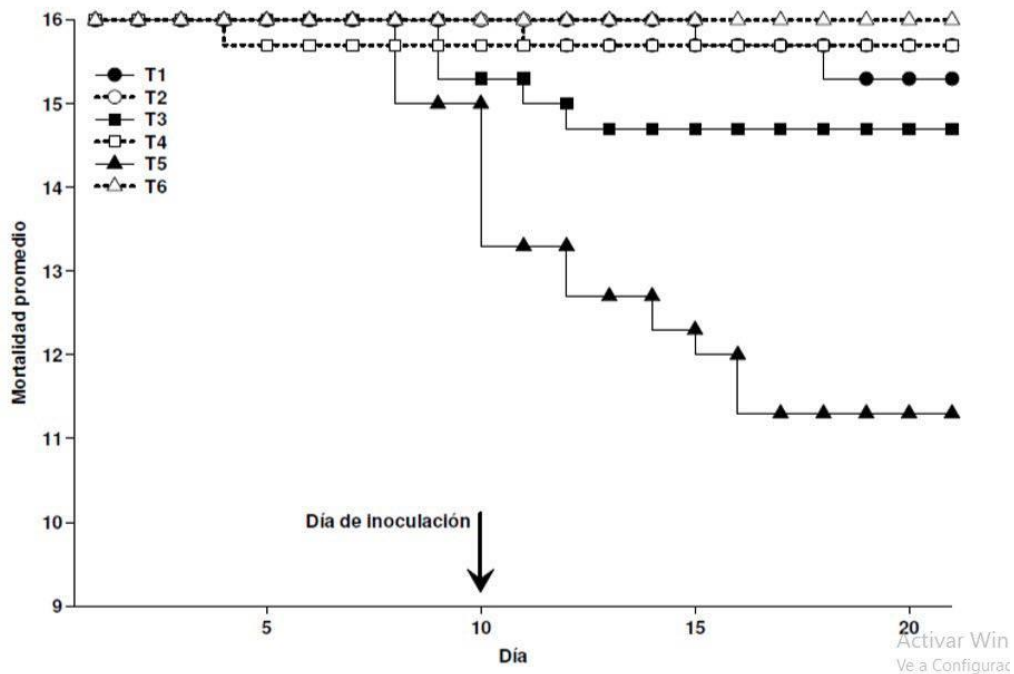
De la misma forma, los resultados según Sajjad y col., (2004) los cuales administraron los mismos títulos de fago y bacteria ( $10^7$  PFU y  $10^7$  CFU) en los músculos gastrocnemio de las aves obtuvieron una mortalidad del 0 % demostrando la efectividad de los bacteriófagos al igual que en nuestra investigación, en la cual la aplicación de fagos con títulos  $10^8$  redujeron la mortalidad en un 25 %.

Por otra parte, Anh y col., (2022) señalan que las aves que únicamente fueron expuestas a bacteriófagos no expresaron mortalidad, sin embargo, en nuestra investigación se obtuvo para el T2 (Colífago) mortalidad que no se pudo atribuir solamente a los fagos, ya que pudieron intervenir factores externos. Los mismos autores determinaron que aves a las que se aplicó únicamente *E. coli*, alcanzaron 58.3 % de mortandad, lo que concuerda con nuestro estudio.

Así mismo Huff y col. (2003) en su análisis sobre la aplicación de bacteriófagos IM en aves desafiadas con *E. coli* a los 7 días de edad y tratadas inmediatamente, la mortalidad se redujo del 53 al 17 % en este grupo; en las aves tratadas 24 horas después, el valor disminuyó del 46 al 10 %; mientras que en las aves tratadas luego de 48 horas, la mortalidad fue del 44 al 20 %. Se obtuvo valores similares en nuestro experimento en donde el porcentaje de aves muertas fue del 4.17 en aquellas tratadas inmediatamente, mientras que en aquellas que no recibieron fago hubo un incremento del 25 %.

Huff y col. (2004) en su estudio compararon la eficacia del bacteriófago frente a una terapia convencional (Enrofloxacina) en aves desafiadas ( $10^4$  CFU) a los 7 días de edad, en las cuales la mortalidad de la aves no tratadas fue del 68 %, el bacteriófago ( $10^9$  PFU) redujo a un 15 %, y el antibiótico a un 3 %, dedujeron que el descenso de la mortalidad con el antibiótico fue significativamente mejor comparado con el bacteriófago; por otro lado los resultados obtenidos en este experimento difieren con los autores mencionados ya que la mortalidad obtenida con el antibiótico fue del 8,33 % frente al fago, siendo optimo el empleo del bacteriófago frente al antibiótico, esta diferencia se puede atribuir al intervalo de duración del tratamiento y al antibiótico empleado.

Nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por Huff y *col.* (2006) quienes evaluaron la aplicación IM en dosis decrecientes ( $10^8$ ,  $10^6$ ,  $10^4$  y  $10^2$  PFU) del bacteriófago SPR02 en aves desafiadas a los 7 días de edad ( $6 \times 10^4$  CFU) consiguiendo una reducción en la mortalidad del 47 % al 7 % en aves a las que se les aplicó  $10^8$  PFU de fagos. Deduciendo que la administración de títulos elevados de bacteriófagos pueden ser una alternativa viable de biocontrol.



**Figura 5.** Dot plot mortalidad obtenida en los distintos tratamientos durante las tres semanas de investigación.

#### 5.4. Ganancia media diaria de peso

Mediante el análisis realizado de los datos (Tabla 7), no se observó diferencia estadística ( $p > 0,05$ ) entre los distintos tratamientos, pero se observa una mejora en los valores del T1 (*E. coli* más coctel de colífago) y el T6 (Control negativo) ya que no variaron en gran medida. Por otro lado, para el T5 (Control positivo) debido a la sepsis producida por la cepa patógena, se evidenció pollitos de bajo peso. Para los tratamientos T1 y T3, tanto los bacteriófagos como el antibiótico, no influyeron sobre la ganancia de peso. Li y *col.*, (2012) difieren con nuestros resultados, obtuvieron en su investigación una ganancia de peso total de 153.6 g. en las aves tratadas con

bacteriófago, frente al grupo control con 137 g, estableciendo que el fago promovió la ganancia de peso.

Eid y *col.*, (2022) difieren con los resultados logrados en nuestro estudio, ya que encontraron una disminución significativa en la ganancia de peso del grupo control positivo frente a los tratamientos expuestos a fagos, ya que en nuestra investigación no se encontró diferencia estadística en ninguno de los tratamientos. De igual manera, encontraron una mejora significativa en los grupos tratados intra traquealmente con bacteriófagos y en los grupos que fueron desafiados con *E. coli* y tratados con antibiótico. Por otra parte, Tsonos y *col.*, (2014) en su investigación no encontraron diferencia estadística para los grupos tratados intra traqueal, intra esofágica y por agua de bebida, indicando que el bacteriófago no influyó significativamente sobre la ganancia de peso de las aves, a excepción del control positivo que dio resultados significativos ( $p < 0.001$ ).

De acuerdo a Wójcik y *col.* (2020) en su estudio evaluaron la administración de un coctel de bacteriófagos (Bafasal®) a títulos de  $2 \times 10^8$  PFU/ave/día por vía intra esofágica en aves hembras, en las cuales se evidenció una disminución significativa en cuanto a ganancia media diaria de peso corporal en comparación con el grupo control, pero esta disminución fue temporal y desapareció posterior a los 21 días. Esto concuerda con nuestros datos, en donde no existe diferencia estadística en cuanto a los distintos tratamientos, sin embargo, se destaca que el tratamiento únicamente administrado Colífago es menor con respecto al T6 (Control negativo) hasta los 21 días que duró la investigación, demostrando que el bacteriófago no influye ni positiva ni negativamente sobre el parámetro en cuestión.

**Tabla 7.** Ganancia media diaria de peso (g) en las aves de los distintos tratamientos durante las tres semanas de la investigación.

<i>Ganancia Media Diaria de Peso</i>				
<i>Trat</i>	Medias	n	E.E.	
1	31.82	3	1.14	A
2	30.64	3	1.14	A
3	30.91	3	1.14	A
4	31.25	3	1.14	A
5	29.86	3	1.14	A
6	32.12	3	1.14	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

**Tabla 8.** Medidas resumen de los datos analizados en este estudio.

<i>Medidas resumen</i>								
<i>VARIABLE</i>	n	Media	D.E.	E.E.	CV	Mín	Máx	Mediana
<i>Consumo</i>	18	924.44	70.14	16.53	7.59	800.00	1040.00	935.00
<i>Peso 7 días</i>	18	132.55	15.49	3.65	11.68	109.35	159.25	131.64
<i>Peso 14 días</i>	18	340.50	42.44	10.00	12.46	267.14	395.00	349.65
<i>Peso 21 días</i>	18	702.52	75.95	17.90	10.81	586.00	820.00	704.38
<i>Gmdp</i>	18	31.10	3.47	0.82	11.17	25.74	36.49	31.21
<i>Conversión acumulada</i>	18	1.44	0.08	0.02	5.31	1.32	1.54	1.41

Tanto para la prueba de Shapiro-Wilks como la prueba de Kruskal Wallis no existe significancia en ninguno de los parámetros zootécnicos.



## 6. CONCLUSIONES

En conclusión, la aplicación de un coctel de colífagos a títulos de  $10^8$  en aves desafiadas a los 10 días de edad con una cepa patógena de *E. coli* demostró ser eficiente en cuanto a mortalidad ya que redujo notablemente de un 29.17 % (Control positivo) a 4,17% (T1 *E. coli* más coctel de colífagos) hasta los 21 días de edad, asumiendo que el fago aplicado vía IM alcanzó el sitio de infección y controló la misma sin afectar los parámetros productivos.

Para finalizar, con base a los estudios analizados anteriormente, podemos afirmar que la aplicación de un coctel de colífagos vía IM constituye una buena alternativa frente al uso de antibióticos y pueden ser usados en la industria avícola.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Albala, I. (2007). Biocontrol de Salmonella enteritidis en aves mediante el uso de bacteriófagos.
- Amasino, C. F. (2020). Enfermedades infecciosas de los animales y zoonosis. Enfermedades infecciosas de los animales y zoonosis. <https://doi.org/10.35537/10915/63694>
- Anh, L., Loc, H., Xuan, N., Thanh, L., Mo, T., Lan, L., & Ngu, N. (2022). Application of phages to control Escherichia coli infections in native noi chickens. Archives of anesthesiology and critical care, 4(4), 527–534.
- Apolo, J. (2015). Aislamiento de Escherichia coli en pollos de engorde con afección respiratoria y determinación de la sensibilidad frente a los antibióticos utilizados en el cantón Balsas, provincia de El Oro (Vol. 1). Retrieved from [http://dspace.unl.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/17025/1/Tesis Wilson Fernando.pdf](http://dspace.unl.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/17025/1/Tesis%20Wilson%20Fernando.pdf)
- Arenas, N., & Moreno, V. (2018). Producción pecuaria y emergencia de antibiótico resistencia en Colombia: Revisión Sistemática. Infectio, 22(2), 110–119. <https://doi.org/10.22354/in.v22i2.717>
- Avinews. (2016). Colibacilosis en Aves. Avinews, 103–109.
- Azeredo, J., & Sillankorva, S. (2016). Bacteriophage therapy. In Humana Press (Vol. 44). <https://doi.org/10.1071/ma13009>
- Barriosnuevo, K. (2020). Bacteriófagos como alternativa antimicrobiana y su aplicación en la medicina veterinaria y zootecnia (Vol. 21). Retrieved from <http://mpoc.org.my/malaysian-palm-oil-industry/>
- Bhardwaj, K., Shenoy, S., Baliga, S., B, U., Baliga, S., & Shetty, V. (2021). Characterization of antibiotic resistant phenotypes and linked genes of Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae from healthy broiler chickens, Karnataka, India. Poultry Science, 100(6). <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101094>

- Blasco Otero, L., García, L. F., Díaz, M. L., Bou Arevalo, G., & Tomás Carmona, M. (2017). Aplicación de los bacteriófagos en la terapia de infecciones. *Proyecto Lumbre*, 48–57.
- Bretaudeau, L., Tremblais, K., Aubrit, F., Meichenin, M., & Arnaud, I. (2020). Good manufacturing practice (GMP) compliance for phage therapy medicinal products. *Frontiers in Microbiology*, 11(June). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01161>
- Carranza, C., León, R., Falcón, N., Neumann, A., & Kromm, C. (2012). Characterization and distribution of potentially avian pathogenic escherichia coli isolates from broilers in Peru. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Peru*, 23(2), 209–219. <https://doi.org/10.15381/rivep.v23i2.901>
- Carvajal, E., Hernández, W., Torres, M., López, D., Rueda, E., & Vásquez, M. (2019). Resistencia antimicrobiana de cepas de Escherichia coli aisladas de contenidos de bursa de Fabricio de aves para engorde. *Revista de investigaciones veterinarias del Peru*, 30(1), 430–437. <https://doi.org/10.15381/rivep.v30i1.14648>
- Cejudo, M. (2017). Caracterización patogénica de aislados de Escherichia coli rojo congo positivos obtenidos de aves ligeras.
- Cortes, P., & Llagostera, M. (2020). Visión actual de la terapia fagica en produccion avicola. *AviNews*, 127–133.
- Dabrowska, K. (2019). Phage therapy: What factors shape phage pharmacokinetics and bioavailability? Systematic and critical review. *Medicinal Research Reviews*, 39(5), 2000–2025. <https://doi.org/10.1002/med.21572>
- Dabrowska, K., & Abedon, S. (2019). Pharmacologically aware phage therapy: pharmacodynamic and pharmacokinetic obstacles to phage antibacterial action in animal and human bodies. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 83(4), 1–25. <https://doi.org/10.1128/mnbr.00012-19>
- De Almeida, F., Valadares, E., Goulart, L., Figueiredo, P., Pereira, E., Carneiro, L., ... Fonseca, B. (2022). Alternative use of phage display: phage M13 can remain viable in the intestines of poultry without causing damage. *AMB Express*, 12(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s13568-022-01407-9>
- De la Cruz, L., Espinosa, I., Baez, M., & Lobo, E. (2018). Bordetella avium y Escherichia coli en pollos de engorde de la provincia Manabí, Ecuador. *Revista*

- Díaz, M., & González, G. (2018). Colibacilosis en gallinas reproductoras. *Rev Sist Prod Agroecol*, 97–125.
- Egas, R. (2018). Aislamiento e identificación de *Salmonella* y *Escherichia coli* productor de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) en granjas avícolas de reproductoras pesadas en las provincias de Napo y Pastaza, Ecuador.
- Eid, S., Tolba, H., Hamed, R., & Al-Atfeehy, N. (2022). Bacteriophage therapy as an alternative biocontrol against emerging multidrug resistant *E. coli* in broilers. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 29(5), 3380–3389. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2022.02.015>
- El-Gohary, F. A., Huff, W. E., Huff, G. R., Rath, N. C., Zhou, Z. Y., & Donoghue, A. M. (2014). Environmental augmentation with bacteriophage prevents colibacillosis in broiler chickens. *Poultry Science*, 93(11), 2788–2792. <https://doi.org/10.3382/ps.2014-04282>
- Fuentes, M., Gil, A., Martínez, C., Baizabal, V., & Valdez, J. (2021). El enemigo de mi enemigo es... Un virus que ataca a las bacterias: los bacteriófagos. *Revista Digital Universitaria*, 22(4). <https://doi.org/10.22201/cuaieed.16076079e.2021.22.4.1>
- Gauthier, R. (n.d.). Nuevas alternativas en terapéutica aviar. *Jefo Nutrition*.
- Gaviria, G., González, M., & Castaño, J. (2012). Técnica para aislamiento de bacteriófagos específicos para *E.coli* DH5 $\alpha$  a partir de aguas residuales. *Revista MVZ Cordoba*, 17(1), 2852–2860. <https://doi.org/10.21897/rmvz.253>
- Gelman, D., Yerushalmy, O., Alkalay, S., Rakov, C., Ben, S., Khalifa, L., ... Hazan, R. (2021). Clinical phage microbiology: a suggested framework and recommendations for the in-vitro matching steps of phage therapy. *The Lancet Microbe*, 2(10), e555–e563. [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(21\)00127-0](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(21)00127-0)
- Gibert, M. (2009). Detección y caracterización de aislados de *Escherichia coli* de origen clínico y fecal en gallinas ponedoras. Retrieved from <https://www.visavet.es/data/tesis/deteccion-y-caracterizacion-de-aislados-de-Escherichia-coli-de-origen-clinico-y-fecal-en-gallinas-ponedoras.pdf>
- Guzman, M. (2018). Resistencia bacteriana de la *Escherichia coli* en aves tipo

parrillero en el departamento de Cochabamba durante el período de Enero a Septiembre del 2018.

- Herrera, M., & Trujillo, M. (2016). Aislamiento y caracterización biológica de bacteriófagos con actividad lítica sobre las bacterias *Escherichia coli* y *Salmonella* spp.
- Honorio, C., Vallenas, Y., & Bazán, J. (2021). Coctel de bacteriófagos como sustituto de promotores de crecimiento tipo antibiótico en avicultura. *Scientia Agropecuaria*, 12(4), 499–508. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2021.054>
- Huff, W. E., Huff, G. R., Rath, N. C., Balog, J. M., & Donoghue, A. M. (2003). Evaluation of aerosol spray and intramuscular injection of bacteriophage to treat an *Escherichia coli* respiratory infection. *Poultry Science*, 82(7), 1108–1112. <https://doi.org/10.1093/ps/82.7.1108>
- Huff, W. E., Huff, G. R., Rath, N. C., Balog, J. M., & Donoghue, A. M. (2004). Therapeutic efficacy of bacteriophage and baytril (enrofloxacin) individually and in combination to treat colibacillosis in broilers. *Poultry Science*, 83(12), 1944–1947. <https://doi.org/10.1093/ps/83.12.1944>
- Huff, W. E., Huff, G. R., Rath, N. C., Balog, J. M., & Donoghue, A. M. (2005). Alternatives to antibiotics: Utilization of bacteriophage to treat colibacillosis and prevent foodborne pathogens. *Poultry Science*, 84(4), 655–659. <https://doi.org/10.1093/ps/84.4.655>
- Huff, W. E., Huff, G. R., Rath, N. C., & Donoghue, A. M. (2006). Evaluation of the influence of bacteriophage titer on the treatment of colibacillosis in broiler chickens. *Poultry Science*, 85(8), 1373–1377. <https://doi.org/10.1093/ps/85.8.1373>
- Huff, W., Huff, G., Rath, N., Balog, J., & Donoghue, A. (2003). Bacteriophage treatment of a severe *Escherichia coli* respiratory infection in broiler chickens. *Avian Diseases*, 47(4), 1399–1405. <https://doi.org/10.1637/7041>
- Huff, W., Huff, G., Rath, N., Balog, J., Xie, H., Moore, P., & Donoghue, A. (2002). Prevention of *Escherichia coli* respiratory infection in broiler chickens with bacteriophage (SPR02). *Poultry Science Association*, 81(10), 437–441. <https://doi.org/10.1093/ps/81.10.1486>

- Huff, W., Huff, G., Rath, N., & Donoghue, A. (2013). El método de administración afecta la capacidad del bacteriófago para prevenir colibacilosis en pollos de engorde de 1 día de edad. *Poultry Science*, 930–934.
- Lau, G., Sieo, C., Tan, W., Hair-Bejo, M., Jalila, A., & Ho, Y. (2010). Immunology, health, and disease: Efficacy of a bacteriophage isolated from chickens as a therapeutic agent for colibacillosis in broiler chickens. *Poultry Science*, 89(12), 2589–2596. <https://doi.org/10.3382/ps.2010-00904>
- Li, H., Ma, M. L., Xie, H. J., & Kong, J. (2012). Biosafety evaluation of bacteriophages for treatment of diarrhea due to intestinal pathogen *Escherichia coli* 3-2 infection of chickens. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(1), 1–6. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0784-5>
- Luong, T., Salabarria, A., Edwards, R., & Roach, D. (2020). Standardized bacteriophage purification for personalized phage therapy. *Nature Protocols*, 15(9), 2867–2890. <https://doi.org/10.1038/s41596-020-0346-0>
- Malik, D., Sokolov, I., Vinner, G., Mancuso, F., Cinquerrui, S., Vladisavljevic, G., ... Kirpichnikova, A. (2017). Formulation, stabilisation and encapsulation of bacteriophage for phage therapy. *Advances in Colloid and Interface Science*, 249(May), 100–133. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.05.014>
- Naghizadeh, M., Torshizi, M., Rahimi, S., & Dalgaard, T. (2019). Synergistic effect of phage therapy using a cocktail rather than a single phage in the control of severe colibacillosis in quails. *Poultry Science*, 98(2), 653–663. <https://doi.org/10.3382/ps/pey414>
- Nolan, L. K., Vaillancourt, J. P., Barbieri, N. L., & Logue, C. M. (2020). Colibacillosis. *Diseases of Poultry*.
- Oliveira, A., Sereno, R., Nicolau, A., & Azeredo, J. (2009). The influence of the mode of administration in the dissemination of three coliphages in chickens. *Poultry Science*, 88(4), 728–733. <https://doi.org/10.3382/ps.2008-00378>
- Ortiz, X., & Barrios, H. (2017). Evaluación de diferentes vías de administración de un fago lítico en gallinas comerciales infectadas experimentalmente con salmonella gallinarum. Universidad Nacional de Luján.
- Ozaki, H., Matsuoka, Y., Nakagawa, E., & Murase, T. (2017). Characteristics of

escherichia coli isolated from broiler chickens with colibacillosis in commercial farms from a common hatchery. *Poultry Science*, 96(10), 3717–3724. <https://doi.org/10.3382/ps/pex167>

Prada, C., Holguin, A., Gonzalez, A., & Vives, M. (2015). Fagoterapia, alternativa para el control de las infecciones bacterianas. *Perspectivas en Colombia. Universitas Scientiarum*, 20(1), 43–59. <https://doi.org/10.11144/Javeriana.SC20-1.faci>

Reina, J., & Reina, N. (2017). Fagoterapia ¿una alternativa a la antibioticoterapia? *Rev Esp Quimioter.* [https://doi.org/10.1007/978-3-030-45885-0\\_16](https://doi.org/10.1007/978-3-030-45885-0_16)

Roth, N., Käsbohrer, A., Mayrhofer, S., Zitz, U., Hofacre, C., & Domig, K. (2019). The application of antibiotics in broiler production and the resulting antibiotic resistance in *Escherichia coli*: A global overview. *Poultry Science*, 98(4), 1791–1804. <https://doi.org/10.3382/ps/pey539>

Sajjad, M., Rahman, S. U., Hussain, I., & Rasool, M. H. (2004). Application of coliphage lysate: A preliminary trial to treat an experimental *Escherichia coli* infection in broiler chicken. *International Journal of Poultry Science*, 3(8), 538–542. <https://doi.org/10.3923/ijps.2004.538.542>

Saleem, U., Chudary, Z., & Ahmad, B. (2016). A Unique Approach To Treat Resistant Bacterial Strains With Cost Effective Coliphages. 2, 56–62.

Shivaprasad, L. (2015). *Patologia de las Aves*. University of California (Vol. 10). <https://doi.org/10.18359/reds.1497>

Swelum, A., Elbestawy, A., El-Saadony, M., Hussein, E., Alhotan, R., Suliman, G., ... Abd El-Hack, M. (2021). Ways to minimize bacterial infections, with special reference to *Escherichia coli*, to cope with the first-week mortality in chicks: an updated overview. *Poultry Science*, 100(5). <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101039>

Tawakol, M., Nabil, N., & Samy, A. (2019). Evaluation of bacteriophage efficacy in reducing the impact of single and mixed infections with *Escherichia coli* and infectious bronchitis in chickens. *Infection Ecology and Epidemiology*, 9(1). <https://doi.org/10.1080/20008686.2019.1686822>

Thung, T., Siti, B., Premarathne, J., Chang, W., Loo, Y., Kuan, C., ... Son, R. (2017). Isolation of food-borne pathogen bacteriophages from retail food and

environmental sewage. *International Food Research Journal*, 24(1), 450–454.

Tsonos, J., Oosterik, L., Tuntufye, H., Klumpp, J., Butaye, P., De Greve, H., ... Goddeeris, B. (2014). A cocktail of in vitro efficient phages is not a guarantee for in vivo therapeutic results against avian colibacillosis. *Veterinary Microbiology*, 171(3–4), 470–479. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.10.021>

Villagran, S. (2017). Prevalencia de la resistencia a antibióticos a través de la susceptibilidad de *Escherichia coli* en aves de combate en el norte del estado de México.

Wernicki, A., Nowaczek, A., & Urban, R. (2017). Bacteriophage therapy to combat bacterial infections in poultry. *Virology Journal*, 14(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12985-017-0849-7>

Wójcik, E., Stanczyk, M., Wojtasik, A., Kowalska, J., Nowakowska, M., Lukasiak, M., ... Dastyk, J. (2020). Comprehensive evaluation of the safety and efficacy of BAFASAL® bacteriophage preparation for the reduction of salmonella in the food chain. *Viruses*, 12(7). <https://doi.org/10.3390/v12070742>



### Anexo 1. Antibiograma realizado con muestras infectadas con *E. coli*



**BIOMICROVET**  
DIAGNÓSTICO Y SALUD ANIMAL

Fecha: 05 de febrero de 2022

Especie: Aviar

Propietario:

A petición de: Srta. Paola Peralta

LABORATORIO VETERINARIO  
MALDONADO Y ASOCIADOS BIOMICROVET CIA. LTDA.

BACTERIOLOGICO

Orden N°: 7854

Muestra: Cepa en dilución. Tinción de Gram: Bacilos Gram - Germen aislado: *Escherichia coli*

#### PRUEBA DE SENSIBILIDAD

Sulfa + Trimetoprim	Sensible
Amoxicilina	Sensible
Norfloxacin	Sensible
Ciprofloxacina	Sensible
Doxiciclina	Sensible
Fosfomicina	Sensible
Tetraciclina	Sensible
Gentamicina	Sensible
Azitromicina	Sensible
Amoxicilina + Clav	Sensible
Florfenicol	S. Intermedia S.
Tianfenicol	Intermedia
Tilosina	Resistente

Estos resultados son válidos solo para las muestras analizadas y deben ser evaluados en su contexto clínico por un médico veterinario.

**IMPORTANTE:** La administración previa de antibióticos altera significativamente los resultados.

Dr. Jaime Maldonado R.

# UCUENCA

## Anexo 2. Preparación del galpón para la recepción de los pollitos

Se preparó el galpón y se dividió en seis unidades experimentales.



## Anexo 3. Recepción de los pollitos

Los pollitos fueron pesados a su llegada para poder llevar un control de la ganancia de peso.



# UCUENCA

## Anexo 4. Pollitos de una semana de vida

Los pollitos usaron comederos en bandeja hasta los 10 días de edad.



## Anexo 5. Primer pesaje de los pollitos

El pesaje semanal de las aves y del alimento sobrante permitió el control de los distintos parámetros zootécnicos.



# UCUENCA

## Anexo 6. Inoculación de la *E. coli* y los bacteriófagos

La inoculación fue realizada a los 10 días de edad.



## Anexo 7. Primer día post inoculación

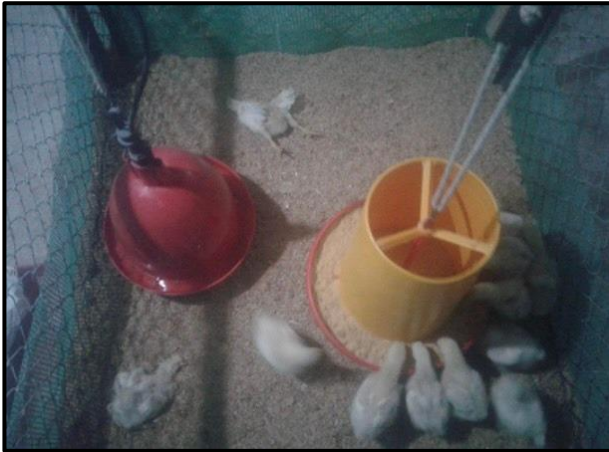
Uno de los primeros síntomas que presentaban los pollitos era el decaimiento.



# UCUENCA

## Anexo 8. Tercer día post inoculación

Después de algunos días de decaimiento las aves morían.



## Anexo 9. Sintomatología observada

La diarrea fue uno de los primeros síntomas observados.



# UCUENCA

Algunas aves fueron incapaces de mantenerse en pie.



## Anexo 10. Proceso de vaciado sanitario del galpón

El galpón fue barrido y baldeado con detergente.



Además del galpón, cortinas y jaulas también fueron desinfectadas.



## Anexo 11. Necropsia realizada de las aves muertas

Perihepatitis, lesión común que presentaban las aves muertas.



# UCUENCA

Pericarditis, lesión común que presentaban las aves muertas.





## Anexo 12. Tablas estadísticas

### Análisis de la varianza

#### Consumo

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Consumo	18	0.59	0.30	6.37

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	48988.89	7	6998.41	2.02	0.1513
Repet	42544.44	2	21272.22	6.14	0.0182
Trat	6444.44	5	1288.89	0.37	0.8567
Error	34655.56	10	3465.56		
Total	83644.44	17			

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=166.94967

Error: 3465.5556		gl: 10		
Trat	Medias	n	E.E.	
5	890.00	3	33.99	A
3	916.67	3	33.99	A
2	920.00	3	33.99	A
4	933.33	3	33.99	A
6	936.67	3	33.99	A
1	950.00	3	33.99	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

#### Peso 7 días

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Peso 7	18	0.89	0.81	5.03

## Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	3632.00	7	518.86	11.66	0.0004
Repet	3516.05	2	1758.03	39.52	<0.0001
Trat	115.95	5	23.19	0.52	0.7554
Error	444.84	10	44.48		
Total	4076.84	17			

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=18.91486

Error: 44.4844

gl: 10

Trat	Medias	n	E.E.	
3	129.82	3	3.85	A
4	131.79	3	3.85	A
6	131.87	3	3.85	A
2	131.89	3	3.85	A
5	131.97	3	3.85	A
1	137.97	3	3.85	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

### Peso 14 días

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Peso 14	18	0.82	0.70	6.83

## Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	25222.46	7	3603.21	6.67	0.0040
Repet	22390.53	2	11195.26	20.73	0.0003
Trat	2831.93	5	566.39	1.05	0.4417
Error	5401.76	10	540.18		
Total	30624.22	17			

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=65.91237

Error: 540.1764

gl: 10

Trat	Medias	n	E.E.	
5	318.59	3	13.42	A
3	328.16	3	13.42	A
4	346.16	3	13.42	A
2	347.92	3	13.42	A
6	350.83	3	13.42	A
1	351.37	3	13.42	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

## Peso 21 días

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Peso 21	18	0.82	0.70	5.93

## Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	80714.55	7	11530.65	6.65	0.0041
Repet	76259.51	2	38129.75	21.99	0.0002
Trat	4455.04	5	891.01	0.51	0.7605
Error	17340.45	10	1734.04		
Total	98054.99	17			

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=118.09439

Error: 1734.0447

gl: 10

Trat	Medias	n	E.E.	
5	676.51	3	24.04	A
2	692.83	3	24.04	A
3	698.46	3	24.04	A
4	705.70	3	24.04	A
1	717.68	3	24.04	A
6	723.93	3	24.04	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

## GMDP

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
GMDP	18	0.81	0.67	6.37

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	165.73	7	23.68	6.03	0.0059
Repet	155.64	2	77.82	19.81	0.0003
Trat	10.09	5	2.02	0.51	0.7606
Error	39.28	10	3.93		
Total	205.01	17			

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=5.62065

Error: 3.9280		gl: 10		
Trat	Medias	n	E.E.	
5	29.86	3	1.14	A
2	30.64	3	1.14	A
3	30.91	3	1.14	A
4	31.25	3	1.14	A
1	31.82	3	1.14	A
6	32.12	3	1.14	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

## Conversión

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Conversión	18	0.87	0.78	2.47

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0.09	7	0.01	9.82	0.0009
Repet	0.08	2	0.04	33.19	<0.0001
Trat	2.9E-03	5	5.8E-04	0.47	0.7938
Error	0.01	10	1.3E-03		
Total	0.10	17			

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=0.10040

Error: 0.0013		gl: 10		
Trat	Medias	n	E.E.	
6	1.41	3	0.02	A
3	1.43	3	0.02	A
1	1.44	3	0.02	A
5	1.44	3	0.02	A
4	1.44	3	0.02	A
2	1.45	3	0.02	A

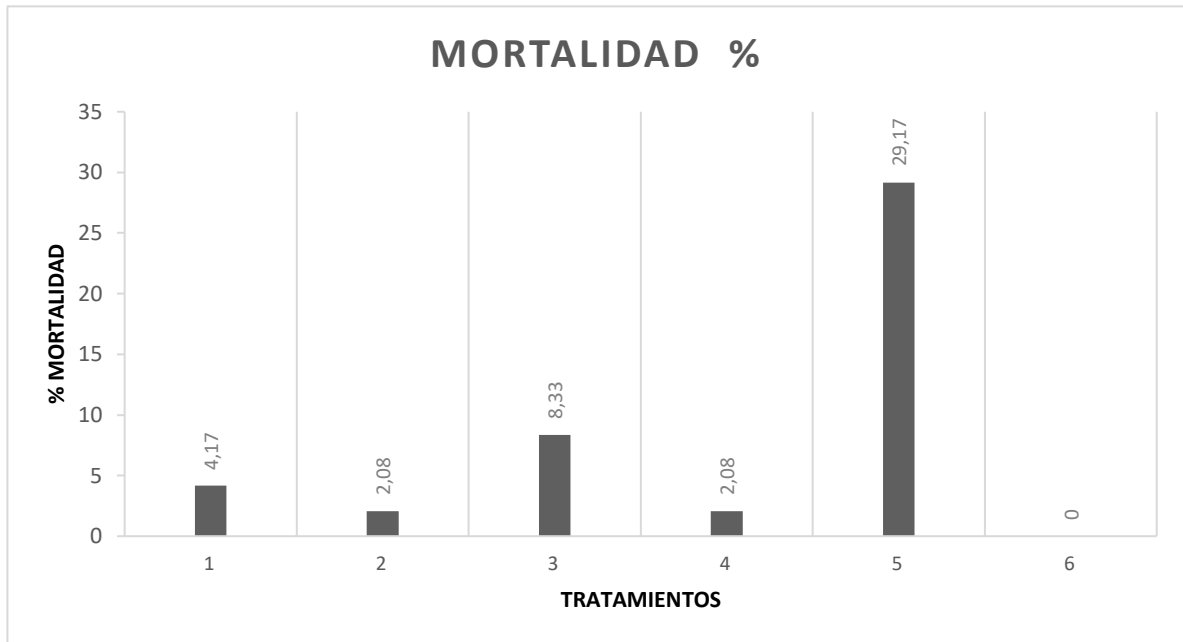
Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

Peso corporal (g) de las aves en los distintos tratamientos, durante las tres semanas de duración del estudio.

<i>Peso Corporal</i>				
<i>Peso 7 días</i>				
Tratamiento	Medias	n	E.E.	
1	137.97	3	3.85	A
2	131.89	3	3.85	A
3	129.82	3	3.85	A
4	131.79	3	3.85	A
5	131.97	3	3.85	A
6	131.87	3	3.85	A
<i>Peso 14 días</i>				
1	351.37	3	13.42	A
2	347.92	3	13.42	A
3	328.16	3	13.42	A
4	346.16	3	13.42	A
5	318.59	3	13.42	A
6	350.83	3	13.42	A
<i>Peso 21 días</i>				
1	717.68	3	24.04	A
2	692.83	3	24.04	A
3	698.46	3	24.04	A
4	705.70	3	24.04	A
5	676.51	3	24.04	A
6	723.93	3	24.04	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

Mortalidad registrada en las aves de los distintos tratamientos durante las tres semanas de duración de la investigación.



Diferencia de proporciones entre la mortalidad obtenida con el T1 y con el T5.

InfoStat/L

Archivo Edición Datos Resultados Estadísticas Gráficos Ventanas Aplicaciones Ayuda

Diferencia de proporciones

Diferencia de proporciones: 0,750000

Tamaños muestrales: 16, 16

P(diferencia=0): 0,000025

Éxitos observados: 2, 14

Calcular Cancelar Ayuda

Diferencia de proporciones entre la mortalidad obtenida con el T1 y con el T3.

