

# Germicidal lytic bacteriophages a review of isolation and evaluation methods in E. coli

José Miguel Gonzales Rivasplata<sup>1</sup>, Eduardo Yupanqui Apolinario<sup>2</sup>, Sol Ángel Rodríguez Carrillo<sup>2</sup>, Katia Fernández Tello<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Privada del Norte, Lima, Perú, [miguel.gonzales@upn.pe](mailto:miguel.gonzales@upn.pe)

<sup>2</sup>Departamento de Ciencias, Universidad Privada del Norte, Lima, Perú, [eduardo.yupanqui@upn.edu.pe](mailto:eduardo.yupanqui@upn.edu.pe)

<sup>2</sup>Departamento de Ciencias, Universidad Privada del Norte, Lima, Perú, [sol.rodriguez@upn.edu.pe](mailto:sol.rodriguez@upn.edu.pe)

<sup>3</sup>Facultad de Ciencias Naturales y Matemática, Universidad Nacional Federico Villareal, Lima, Perú, [2015003775@unfv.edu.pe](mailto:2015003775@unfv.edu.pe)

\*Corresponding author: [miguel.gonzalez@upn.pe](mailto:miguel.gonzalez@upn.pe); Av. Guardia Peruana 890, Lima Chorrillos 15054

**Abstract-** *Bacteria are developing resistance to medications due to their excessive and inappropriate use, especially affecting the most vulnerable populations around the world, including Peru. In this context, it is necessary to implement alternative methods for the treatment of these multidrug-resistant (MDR) infections. Based on this, the objective of this research is to collect information regarding the isolation, purification and evaluation methods of germicidal lytic bacteriophages in Escherichia coli (E. coli) developed in the last 5 years (2019-2023). To do this, parameters were analyzed such as: matrix of origin, identification of culture media, sequence of procedures and technical variables that are collected, compared and analyzed, taking into account the approach of different researchers in the world for the study of bacteriophages that interact with the bacteria E. coli. For this, the search for information was carried out in the electronic databases of Scimedirect, Pubmed and Scopus, excluding articles as explained in the methodology and finally selecting twenty-four relevant articles which were classified, ordered, analyzed and compared for evaluation. full text. In conclusion, a general sequence of steps was established for the isolation, purification and evaluation of specific bacteriophages in E. coli strains, taking into account the main physicochemical and microbiological tests used by different researchers around the world in this field. The potential application in various settings, such as the food industry, agriculture and public health, underlines the relevance of this research in the search for effective and safe alternatives to chemical antimicrobials to reduce microbial contamination by E. coli strains.*

**Keywords** — Bacteriophages, isolation, E. Coli.

# Bacteriófagos líticos germicidas una revisión de métodos de aislamiento y evaluación en *E. coli*

José Miguel Gonzales Rivasplata<sup>1</sup>, Eduardo Yupanqui Apolinario<sup>2</sup>, Sol Ángel Rodríguez Carrillo<sup>2</sup>, Katia Fernández Tello<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Salud, Universidad Privada del Norte, Lima, Perú, [miguel.gonzales@upn.pe](mailto:miguel.gonzales@upn.pe)

<sup>2</sup>Departamento de Ciencias, Universidad Privada del Norte, Lima, Perú, [eduardo.yupanqui@upn.edu.pe](mailto:eduardo.yupanqui@upn.edu.pe)

<sup>2</sup>Departamento de Ciencias, Universidad Privada del Norte, Lima, Perú, [sol.rodriguez@upn.edu.pe](mailto:sol.rodriguez@upn.edu.pe)

<sup>3</sup>Facultad de Ciencias Naturales y Matemática, Universidad Nacional Federico Villareal, Lima, Perú, [2015003775@unfv.edu.pe](mailto:2015003775@unfv.edu.pe)

\*Corresponding author: [miguel.gonzalez@upn.pe](mailto:miguel.gonzalez@upn.pe); Av. Guardia Peruana 890, Lima Chorrillos 15054

**Resumen**– Las bacterias están desarrollando resistencia a medicamentos debido a su uso excesivo e inapropiado, especialmente afectando a las poblaciones más vulnerables en todo el mundo, incluyendo Perú. En este contexto, es necesario implementar métodos alternativos para el tratamiento de estas infecciones multidrogaresistentes (MDR). En base a ello, el objetivo de esta investigación es recopilar información referente a los métodos de aislamiento, purificación y evaluación de bacteriófagos líticos germicidas en *Escherichia coli* (*E. coli*) desarrollado en los últimos 5 años (2019-2023). Para ello, se analizó parámetros como: matriz de origen, identificación de medios de cultivo, secuencia de procedimientos y variables técnicas que se recopilan, comparan y analizan, teniendo en cuenta el enfoque de distintos investigadores en el mundo para el estudio de bacteriófagos que interactúan con la bacteria *E. coli*. Para lo cual, se realizó la búsqueda de información en las bases de datos electrónicas de Sciencedirect, Pubmed y Scopus, excluyendo artículos como se explica en la metodología y seleccionando finalmente veinticuatro artículos relevantes los cuales fueron clasificados, ordenados, analizados y comparados para su evaluación de texto completo. En conclusión, se estableció una secuencia general de pasos para el aislamiento, purificación y evaluación de bacteriófagos específicos en cepas de *E. coli*, teniendo en cuenta las principales pruebas de naturaleza fisicoquímica y microbiológica usadas por distintos investigadores del mundo en este campo. La aplicación potencial en diversos entornos, como la industria alimentaria, agrícola y la salud pública, subraya la relevancia de esta investigación en la búsqueda de alternativas efectivas y seguras a los antimicrobianos químicos para reducir la contaminación microbiana por cepas de *E. coli*.

**Palabras Clave** — Bacteriófagos, aislamiento, *E. Coli*.

## I. INTRODUCCIÓN

La resistencia a los antibióticos es un problema de salud pública cada vez más preocupante en todo el mundo. Las bacterias se vuelven resistentes a los medicamentos después de su uso excesivo o inapropiado, lo que les permite sobrevivir y reproducirse incluso en presencia de estos [1]. Esto puede llevar a infecciones difíciles de tratar, prolongando los tiempos de recuperación y aumentando el riesgo de complicaciones graves y la muerte [2]. Además, la resistencia a los antibióticos hace que sea cada vez más difícil tratar las infecciones comunes [3]. La problemática es grave porque el uso

excesivo de antibióticos, la prescripción inapropiada y la falta de control en la distribución y venta de medicamentos son factores que contribuyen a la aparición de bacterias multidrogaresistentes (MDR) [4]. La aparición de bacterias MDR [2], está relacionado también con el uso excesivo e inadecuado de antibióticos [5], tanto en el sector médico como en la agricultura y la producción animal [4]. Debido al creciente número de bacterias resistentes a los medicamentos que se encuentran comúnmente en los hospitales es de vital importancia encontrar terapias alternativas a estos [6]. Los bacteriófagos se pueden utilizar como herramientas eficaces y convenientes en gerontología en las que la manipulación de bacteriófagos mediante ingeniería genética o química simple abre nuevas oportunidades para atacar células senescentes y modular las vías que promueven su eliminación [7]. Los bacteriófagos tienen múltiples propiedades distintivas que los convierten en agentes terapéuticos atractivos, incluida su especificidad por especies bacterianas sin afectar a las células eucariotas [8].

Los bacteriófagos son virus que pueden infectar y matar bacterias específicas, lo que los convierte en una opción prometedora para tratar infecciones por bacterias MDR [9]. Los bacteriófagos son altamente específicos, lo que reduce el riesgo de dañar las células sanas. Además, se pueden seleccionar bacteriófagos específicos para cada tipo de bacteria, lo que significa que se pueden diseñar terapias específicas para combatir las bacterias MDR [10]. Los bacteriófagos son virus que, gracias a la producción de la enzima endolisina, son capaces de matar las células bacterianas huésped [11]. Hasta la fecha se viene realizando estudios clínicos *in vivo* [12] [13], y pruebas *in vitro* [14]. Las pruebas se realizan en diferentes bacterias como *Salmonella* spp [15], o en aquellas bacterias que son responsables de la mayoría de infecciones nosocomiales: ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter* sp.) [16]. Así mismo, M. Shahdadi *et al.* [17] menciona que los bacteriófagos de tipo salvaje (aquellos que se encuentran en la naturaleza) fueron más eficientes que los bacteriófagos de tipo comercial en su estudio de revisión sistemática y modelado del efecto de los bacteriófagos en la reducción de la cepa *Salmonella* spp. en carne de pollo.

Los bacteriófagos también tienen la capacidad de multiplicarse rápidamente en las bacterias blanco, lo que permite una dosis única para combatir una infección [9]. Esto es particularmente útil en situaciones en las que los pacientes tienen infecciones graves y requieren un tratamiento rápido y efectivo [18]. Además, los bacteriófagos son seguros para el medio ambiente y no causan daño a otros organismos vivos (vegetal, animal y humano) porque son virus de bacterias altamente específicos, lo que los convierte en una alternativa prometedora a los antibióticos convencionales [19]. El trabajo con bacteriófagos tiene un gran potencial como alternativa a los antibióticos convencionales, se necesita más investigación para

**Digital Object Identifier:** (only for full papers, inserted by LACCEI).

**ISSN, ISBN:** (to be inserted by LACCEI).

**DO NOT REMOVE**

aislarlos de la naturaleza [20], evaluar su eficacia y utilizarlos para el tratamiento de infecciones MDR en humanos [21]. Los estudios iniciales en animales y humanos han mostrado resultados prometedores [22], lo que sugiere que podrían ser usados para el tratamiento de las infecciones MDR [18].

Durante las últimas décadas, varios estudios clínicos mostraron resultados positivos para el tratamiento con bacteriófagos en casos de infecciones musculoesqueléticas y de tejidos blandos [23]. Por otro lado, se realizaron estudios en donde los bacteriófagos se administraron por vía intravenosa, se inyectaron intraoperatoriamente en la articulación, se aplicaron localmente intraoperatoriamente o se administraron mediante cánulas en combinación con terapia antibiótica [24]. Así como estudios en su conversión en forma de gel *in situ* [25].

La *Escherichia coli* (*E. coli*) ha sido uno de los organismos modelo más estudiados en la historia de las ciencias biológicas. Aunque inicialmente se pensaba que eran bacterias comensales, *E. coli* ha mostrado una amplia diversidad fenotípica, incluidos aislados patógenos de gran relevancia para la salud pública [26]. La detección rápida y sensible de *E. coli* es importante para la seguridad alimentaria. Los métodos existentes están limitados en el tiempo de detección o en la discriminación de bacterias viables o muertas. [27]. La formación de biopelículas en superficies en contacto con alimentos por *Escherichia coli* toxigénica Shiga (STEC) puede plantear un desafío importante para la industria alimentaria, haciendo que los métodos de control convencionales sean insuficientes. El uso específico de bacteriófagos para alterar estas biopelículas podría reducir este problema. [28]. Los bacteriófagos específicos de las cepas de *Escherichia coli* productoras de toxina Shiga (STEC) se aíslan con frecuencia de ambientes asociados con animales principalmente porque los animales rumiantes son el reservorio natural de STEC. Sin embargo, se sabe poco sobre estos bacteriófagos en entornos de cultivo [29].

El USDA-FSIS (Food Safety and Inspection Service (FSIS), an agency of the United States Department of Agriculture) tiene tolerancia cero para *E. coli* O157:H7 en la carne molida cruda. [30]. Por otro lado, la contaminación de verduras para ensalada con *Escherichia coli* productora de toxina Shiga (STEC) O157:H7 ha causado enfermedades graves e importantes pérdidas económicas casi anualmente en los Estados Unidos durante los últimos 10 años. Para frenar el riesgo de infecciones por productos contaminados, recientemente han comenzado a generar interés enfoques basados en virus bacterianos, comúnmente conocidos como bacteriófagos, entre otras estrategias antimicrobianas [31]. La resistencia a los antibióticos es un desafío significativo para la salud pública, y los bacteriófagos se presentan como una alternativa prometedora. Su alta especificidad, multiplicación rápida y ser seguros para el medio ambiente los hace candidatos valiosos para el tratamiento de infecciones bacterianas MDR. Sin embargo, se requiere más investigación clínica y estudios para evaluar su eficacia y aplicaciones específicas, tanto en la salud humana como en la seguridad alimentaria, por este motivo el objetivo de esta revisión es analizar los estudios realizados en los últimos 5 años desde el 2019 a 2023, en la búsqueda de métodos de aislamiento, purificación y evaluación de bacteriófagos para combatir a las cepas de la bacteria *Escherichia Coli* con características Multidrogoresistentes (MDR) como base para estudios posteriores de aplicación de bacteriófagos.

## II. METODOLOGÍA

Los artículos consultados para esta revisión provienen de las bases de datos electrónicas Scencedirect, Pubmed y Scopus. La búsqueda se limitó solo en artículos originales escritos en inglés y publicados en los últimos 5 años (2019-2023) utilizando las palabras clave “Bacteriophages”, “isolation” y “E. Coli”, utilizando la fórmula de búsqueda “Bacteriophages and isolation and E. Coli”, obteniendo un total de 243, 39 y 271 artículos científicos, respectivamente.

### A. CRITERIO DE SELECCIÓN

Los artículos científicos obtenidos luego de realizar la búsqueda en cada base de datos se exportaron a un libro de Microsoft Excel 2010 para el tratamiento de selección, exclusión de duplicados y clasificación. La selección de títulos y resúmenes científicos se realizó manualmente para seleccionar los artículos relevantes y posteriormente se evaluó mediante selección de texto completo. En esta revisión sólo se incluyeron artículos originales publicados en revistas de revisión por pares y que contienen datos sobre el uso *in vitro*, *in vivo* o *acoplamiento a materiales*, para controlar el crecimiento bacteriano de las distintas cepas de *Escherichia coli* ubicadas en una evaluación con bacteriófago (fago) o cócteles de bacteriófagos. Se excluyeron los datos de estudio de otras bacterias diferentes a la cepa de *E. coli*. Estos criterios de selección y exclusión se han utilizado para centrarse específicamente en el estudio de métodos de aislamiento, purificación y evaluaciones de bacteriófagos hallados en diferentes matrices de origen en búsqueda de alternativas para futuros estudios en; fagoterapia como un procedimiento alternativo para el control de *E. coli*, como también para la prevención de contaminación en superficies y alimentos, causado por bacterias multidrogoresistentes.

### B. EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS DE DATOS

Los autores realizaron de forma independiente la recopilación de información de los artículos científicos de cada estudio seleccionado para su inclusión en la revisión sistemática, se recopiló la siguiente información: matriz de aislamiento, metodología de aislamiento y purificación de bacteriófagos (reactivos, equipos y secuencia de pasos), evaluación de bacteriófagos (estabilidad térmica y de pH, medio de crecimiento, técnica de aislamiento en placa, rango de hospedero, familia/morfología, tamaño del genoma, tamaño de ráfaga, período de latencia, análisis genético y multiplicidad de infección (MOI)) y estudios de aplicación en productos (solución utilizada para la aplicación de bacteriófagos y métodos de incrustación). Estos datos se recuperaron directamente del texto completo, se convirtieron a las mismas unidades o, en algunos casos, se infirieron del análisis gráfico.

Los datos extraídos de los artículos científicos se condensaron en una tabla de Microsoft Excel y se resumieron mediante estadística descriptiva, utilizando gráficos y tablas de frecuencia para variables cualitativas.

## III. RESULTADOS

### A. CARACTERÍSTICAS DE ESTUDIOS INCLUIDOS

La búsqueda en línea recuperó 553 estudios. Después de la eliminación de duplicados y clasificación en un libro de Excel, quedaron 86 artículos para el análisis. Según la selección de títulos y resúmenes, se eliminaron 467 estudios porque no cumplían con los criterios de inclusión, dejando 86 para la selección de texto completo. De ellos, 24 estudios aíslan, purifican y evalúan bacteriófagos para una o varias cepas de *E. coli*, el esquema de identificación de estudios vía base de datos se aprecia en la Fig. 1.



Fig. 1. Esquema de identificación de estudios vía base de datos.

Fuente: Elaboración propia

A partir de estos artículos seleccionados, fue posible recuperar datos sobre 50 bacteriófagos aislados y evaluados experimentalmente para controlar una o varias cepas de Escherichia coli.

Los veinticuatro estudios científicos considerados para la presente revisión se encuentran en la Tabla I con los criterios de nombre del artículo, bacteria huésped, bacteriófago aislado y año de publicación.

TABLA I: Estudios de aislamiento, purificación y evaluación de bacteriófagos en cepas de Escherichia coli incluidos en el estudio, se recopiló información de los veinticuatro estudios de aislamiento de bacteriófagos para las cepas de E. coli realizados entre los años 2019-2023.

Nº	NOMBRE DE ARTÍCULO	BACTERIA	BACTERIÓFAGO	AÑO	REFERENCIA
1	Isolation and characterization of E. coli O157: H7 novel bacteriophage for controlling this food-borne pathogen	E. coli O157:H7	VaT-2019a	2022	[32]
2	A revisited two-step microtiter plate assay: Optimization of in vitro multiplicity of infection (MOI) for Coliphage and Vibriophage	E. coli	Colifago-φ5	2021	[33]
3	Bacteriophage therapy as an alternative biocontrol against emerging multidrug resistant E. coli in broilers	La E.coli patógena aviar (APEC)	λ1, λ2 y λ3	2022	[34]
4	Investigation of the effect of bacteriophage cocktail on microbial quality in the case of cold chain breakage: A case study on Escherichia coli contamination in milk	E. coli K-12	K12.2b y K12.4a	2023	[35]
5	A novel lytic bacteriophage against colistin-resistant Escherichia coli isolated from different animals	E.Coli (varios serotipos)	FJ63A	2023	[36]
6	Isolation, characterization and genomic analysis of a novel phage IME178 with lytic activity against Escherichia coli	E. coli 1008	IME178	2023	[37]
7	Isolation, Characterization, and Comparative Genomic Analysis of Bacteriophage Ec_MI-02 from Pigeon Feces Infecting Escherichia coli O157:H7	E. coli O157:H7	Ec_MI-02	2023	[38]
8	Isolation, Characterization, and Genome Analysis of a Novel Bacteriophage, Escherichia Phage vB_EcoM-4HA13, Representing a New Phage Genus in the Novel Phage Family Chaseviridae	E. coli O157:H7	4HA13	2022	[39]
9	Identification and characterization of lytic bacteriophages specific to foodborne pathogenic Escherichia coli O157:H7	E.Coli O157:H7 ATCC 3515	vB_EcoM-P12, vB_EcoM-P13, vB_EcoM-P23, vB_EcoM-P34 y vB_EcoS-P24	2021	[40]

10	Isolation of broad-host-range bacteriophages against food- And patient-derived Shiga toxin-producing Escherichia coli	E. Coli O157:H7	Ecol-MHD1, Ecol-MHD2, Ecol-MHD3, Ecol-MHD4, Ecol-MHD5, Ecol-MHD6 y Ecol-MHD7	2020	[41]
11	Whole-Genome Analysis of a Shiga Toxin-Producing Escherichia coli O103:H2 Strain Isolated from Cattle Feces	STEC O103:H2	RM13322	2020	[42]
12	Isolation, characterization and application of a polyvalent phage capable of controlling Salmonella and Escherichia coli O157:H7 in different food matrices	E. coli O157:H7	PS5	2020	[43]
13	Complete genome sequence of a lytic T7-like phage, Escherichia phage VB_ECOP-Ro45LW, isolated from nonfecal compost samples	STEC O45	Ro45lw	2019	[44]
14	Isolation, characterization and application of an alkaline resistant virulent bacteriophage JN01 against Escherichia coli O157:H7 in milk and beef	E. coli O157:H7	JN01	2021	[45]
15	The comparison of lytic activity of isolated phage and commercial Intesti bacteriophage on ESBL producer E. coli and determination of Ec_P6 phage efficacy with in vivo Galleria mellonella larvae model	E. coli ATCC 25922 y cincuenta ESBL-EC	Ec_P1, Ec_P2, Ec_P3, Ec_P4, Ec_P5, Ec_P6, Ec_P7, Ec_P8 y Ec_P9	2022	[46]
16	Comparative genome analysis of Escherichia coli bacteriophages isolated from sewage and chicken meat	E.coli	vTw01 y vTcm05	2022	[47]
17	Controlled-release of free bacteriophage nanoparticles from 3D-plotted hydrogel fibrous structure as potential antibacterial wound dressing	DH5α E. coli	HZJ	2021	[48]
18	Characterization and genome analysis of a broad lytic spectrum bacteriophage P479 against multidrug-resistant Escherichia coli	E. coli177	P479	2022	[49]
19	Dietary D-xylose promotes intestinal health by inducing phage production in Escherichia coli	E. coli O157:H7	Φ1, Φ2 y Φ3	2023	[50]
20	Polycaprolactone film functionalized with bacteriophage T4 promotes antibacterial activity of food packaging toward Escherichia coli	E. coli O157:H7	T4	2021	[51]
21	Characterization of two novel lytic bacteriophages having lysis potential against MDR avian pathogenic Escherichia coli strains of zoonotic potential	E.coli APEC, QZJM25	SKA49 y SKA64	2023	[52]
22	Application of BI-EHEC and BI-EPEC bacteriophages to control enterohemorrhagic and enteropathogenic escherichia coli on various food surfaces	EHEC - EPEC	BI-EHEC y BI-EPEC	2023	[53]
23	Isolation, characterization and whole genome analysis of the novel genus Lederbergvirus, phage vB_EcoP_E212 infecting enterotoxigenic Escherichia coli	E.coli K88	E212	2023	[54]
24	Isolation, Characterization and Whole Genome Analysis of an Avian Pathogenic Escherichia coli Phage vB_EcoS_GN06	E.coli O78	GN06	2022	[55]

Fuente: Elaboración propia

### 1) MATRIZ DE AISLAMIENTO

Las matrices de origen más frecuentes para el aislamiento, purificación y evaluación de los cincuenta bacteriófagos aislados para esta revisión sistemática provienen de la de matriz de; alimentos el cual representa el 42% (21) de los bacteriófagos aislados, agua residual o de ríos 34% (17), laboratorio clínico 18% (9) y de heces animal 6% (3), como se indica en la Fig.2. La cepa más común de estudio para el

aislamiento, purificación y evaluación son los bacteriófagos los cuales infectan al serotipo E. coli enterohemorrágicas (EHEC) siendo la cepa principal O157:H7 y para esta revisión de métodos de aislamiento representa el 58.33% del universo de estudios incluidos en esta revisión.

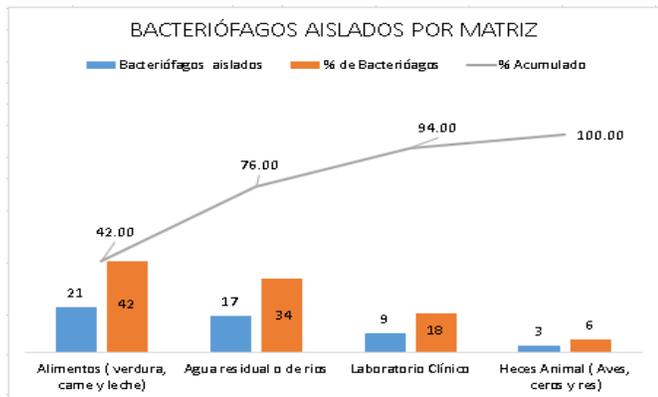


Fig. 2. Gráfico de bacteriófagos aislados según su matriz de origen  
Fuente: Elaboración propia

## 2) MÉTODOS DE AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN

La variable inicial para lograr el aislamiento y purificación de bacteriófagos líticos germicidas silvestres consiste en identificar zonas donde se desarrolle un ecosistema ideal para el crecimiento de bacterias, lo cual aumenta la posibilidad de infección de bacteriófagos en la bacteria huésped de interés Escherichia coli.

### a. MÉTODOS DE AISLAMIENTO

Los métodos de aislamientos de los veinticuatro estudios incluidos en la presente revisión consisten en una secuencia de protocolos, procedimientos y métodos con algunas variaciones entre ellos como: orden de operación o proceso, medios de cultivo, técnicas en placa, velocidades de agitación, soluciones buffer amortiguadoras, tamaño de porosidad de la membrana de filtración, condiciones de incubación y almacenamiento, durante el desarrollo experimental reportado por cada estudio.

De la recopilación de información de los estudios considerados para esta revisión, se logró identificar 823 muestras las cuales contenían como mínimo una cepa de Escherichia coli, las cuales cumplen la función de hospederos para los bacteriófagos de cada estudio según su matriz de origen; alimentos 36.09% (297) de muestras infectadas, agua residual o ríos 34.39% (283), laboratorio clínico 13.85% (114) y heces animal 15.67% (129) en los cuales se aislaron 21, 17, 9 y 3 bacteriófagos respectivamente, según su matriz de origen como se representa en la Fig. 3.

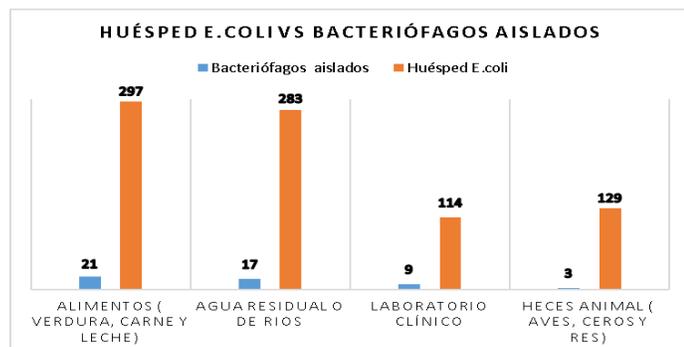


Fig. 3. Gráfico de muestras huésped vs bacteriófagos (fagos) aislados por matriz  
Fuente: Elaboración propia

Los métodos de aislamiento realizados en los estudios se encuentran regidos por variables técnicas como; medio de cultivo, técnica de aislamiento en placa para identificar lisis, centrifugación, filtración, incubación, dilución, mezcla y medio de resuspensión.

Para realizar los aislamientos se utilizaron el Agar Luria Bertani 54.17% (13) de los estudios, agar BHI 8.33%, agar TSB 20.83% (5), caldo CASO 4.17% (1), agar TSA 4.17% (1) y agar sangre 8.33% (2), en donde se utilizó la técnica de agar de doble capa en el 91.67% (22) de los estudios y por otro lado el 8.33% (2) se realizó utilizando la técnica de enriquecimiento de un solo huésped en cual consiste en la identificación de la zona de lisis posterior a la incubación entre la bacteria huésped y el bacteriófago.

En el análisis de las variables a tener en consideración para el aislamiento de bacteriófagos realizados en los veinticuatro estudios analizados no coinciden en todos los procedimientos que influyen en el aislamiento de bacteriófagos como; primera centrifugación, primera filtración, primera incubación, segunda centrifugación, segunda filtración, segunda incubación, dilución, mezcla, resuspensión y almacenamiento, esta consideración de los procedimientos se encuentran interpretados en la Fig.4.

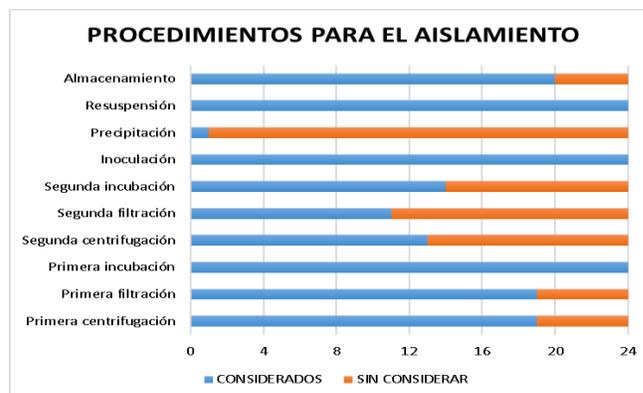


Fig. 4. Gráfico de procedimientos considerados en los métodos de aislamientos de los estudios.  
Fuente: Elaboración propia

En los casos de la segunda centrifugación, filtración e incubación, la poca recurrencia de esta segunda etapa está regido por criterios según su procedimiento de aislamiento, debido a variables como la dilución con tapón de solución salina de magnesio (SM), mezclas de cloruro de calcio, adición de polietilenglicol al 10% (PEG), resuspensión con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y la matriz de origen.

Las variables operativas desarrolladas durante el aislamiento se encuentran regidas con la siguientes operaciones o procesos en los métodos de aislamiento de los estudios seleccionados identificados en la Tabla I:

- i. Primera centrifugación, ocho estudios [32], [33], [34], [36], [43], [50], [51], [55] consideraron realizar la operación con parámetros de temperatura a 4°C durante un periodo de tiempo de 5 a 30 minutos en un rango de centrifugación de 5000g a 15000g, la relación entre el tiempo y la fuerza g es inversamente proporcional, en otros once estudios [35], [37], [38], [39], [41], [45], [46], [47], [49], [52], [54] se realizó la centrifugación a temperatura ambiente en un periodo de tiempo de 5 a 10 minutos en un rango de 5000g a 10000g y cinco estudios [40], [42], [44], [48], [53] no consideran la operación de centrifugación.
- ii. Primera filtración, doce de los estudios [36], [37], [38], [41], [45], [46], [48], [49], [50], [52], [53], [55] consideraron el uso de filtros membrana con porosidad de 0.22 µm, por otro lado, tres estudios [43], [47], [54] usaron filtros membrana de tamaño de

- poro de 0.45  $\mu\text{m}$ , dos estudios [32], [51] realizaron la filtración con filtros de jeringa estériles de 0.22  $\mu\text{m}$ , dos estudios [2], [8] realizaron la filtración con filtros de jeringa estériles de 0.45  $\mu\text{m}$  y cinco estudios [34], [35], [40], [42], [44] no considero la operación de filtración en el sobrenadante para eliminar células bacterianas o residuos celulares grandes.
- iii. Primera incubación, ocho estudios [32], [36], [43], [45], [48], [51], [53], [55] consideran una incubación durante la noche con agitación en un rango de 120 a 220 rpm a 37°C en medio nutricio blando (0.4%/p/v), dos estudios [39], [50] consideran la incubación con caldo nutricio blando (0.4% p/v) a 25°C con agitación de 180 rpm durante el periodo de tiempo de 18 a 20 horas, tres estudios [41], [46], [52] consideran incubación con caldo nutricio blando (0.4% p/v) con SM en pH 7.2 y  $\text{CaCl}_2$  10 mM a 37°C con agitación de 140 rpm durante la noche y once estudios [33], [34], [35], [37], [38], [40], [42], [44], [47], [49], [54], se incubaron a 37°C en un rango de tiempo desde 6 hasta 24 horas sin agitación en medio nutricio blando.
  - iv. Segunda centrifugación, cinco estudios [32], [36], [50], [51], [54] consideraron centrifugar por segunda vez a 4°C en un tiempo de 10 a 120 minutos en un rango de centrifugación de 5000g a 11000g, ocho estudios [35], [37], [41], [45], [46], [47], [52], [55] centrifugaron a temperatura ambiente en un periodo de tiempo de 2 a 20 minutos en un rango de centrifugación de 5000g a 13000g y once estudios [33], [34], [38], [39], [40], [42], [43], [44], [48], [49], [53] no consideraron realizarlo por segunda ocasión.
  - v. Segunda filtración, ocho estudios [34], [36], [37], [45], [47], [48], [52], [55] consideran una segunda filtración por membrana de porosidad de 0.22  $\mu\text{m}$ , un estudio [54] realizó filtración por membrana de 0.45  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro, un estudio [32] realizó la filtración con jeringa estéril con filtro de 0.22  $\mu\text{m}$  de porosidad, un estudio [33] realizó la filtración con jeringa estéril con filtro de 0.45  $\mu\text{m}$  de porosidad y trece estudios [35], [38], [39], [40], [41], [42], [43], [44], [46], [49], [50], [51], [53] no realizaron una segunda filtración.
  - vi. Segunda incubación, diez estudios [34], [35], [36], [37], [38], [43], [46], [48], [52], [53] consideran una incubación con caldo nutricio blando (0.4% p/v) sobre medio nutricio sólido (1.5% p/v) a 37°C por un periodo de tiempo de 18 a 24 horas, sin embargo un estudio [45] considero realizarlo por un tiempo de 15 minutos y otro estudio [54] realizarlo en 6 horas, así mismo, otro estudio [39] considero realizar la incubación durante la noche a 25 °C, por otro lado, un estudio [32] realizó la incubación con caldo nutricio blando (0.4% p/v) con SM sobre medio nutricio sólido y diez estudios [33], [40], [41], [42], [44], [47], [49], [50], [51], [55] no consideran una segunda incubación.
  - vii. Método de identificación de lisis, dos estudios [33], [34] consideró utilizar prueba de lisis de una placa y los veintidós estudios restantes de la tabla I realizaron la técnica de agar de doble capa.
  - viii. Inoculación, los veinticuatro estudios de la Tabla I agregaron en cantidades proporcionales en microlitros ( $\mu\text{l}$ ) de cepas de *E. coli* (huésped) y microlitros ( $\mu\text{l}$ ) del sobrenadante (bacteriófagos) en relación 20:1, 10:1, 6:1 o 1:1 en caldo nutricio, PBS en pH 7.2 o SM en pH 7.2, según sus criterios de resuspensión en uso de medios nutricios o soluciones amortiguadoras, adicional a esta preparación siete estudios [39], [43], [44], [45], [50], [52], [53] consideraron la adición de 50  $\mu\text{l}$  de  $\text{CaCl}_2$  10 mM y en dos estudios [33], [35] consideraron agregar cloroformo al 10% (v/v).

- ix. Precipitación, un estudio [50] consideró la técnica de precipitación con polietilenglicol (PEG) 8000 (10%) con el sobrenadante, posteriormente se realizó una centrifugación a 10000g por 10 minutos, el precipitado se resuspende con SM y cloroformo al 10% en relación 1:1 con PEG realizándose una centrifugación a 3000g por 30 segundos los bacteriófagos se recogieron de la fase acuosa superior para posterior almacenamiento o purificación.
- x. Resuspensión, nueve estudios [36], [37], [41], [43], [45], [47], [49], [50], [53] utilizaron SM en pH 7.2, un estudio [51], utilizó PBS en 7.2 pH, un estudio [38], utilizó tampón lambda en 7.6 pH con cloroformo al 10% y los trece estudios restantes de la tabla I consideran realizarlo con su caldo nutricio.
- xi. Almacenamiento, nueve estudios [32], [35], [38], [46], [48], [51], [52], [54], [55] consideran almacenar los bacteriófago a 4°C, un estudio [53] almacena a 4°C con solución Ringer (RS), ocho estudios [36], [37], [41], [43], [45], [47], [49], [50] consideran las condiciones de 4°C con SM, un estudio [40] almacena a 4°C con cloroformo al 10%, un estudio [33] considera el almacenamiento a -20°C y cuatro estudios [34], [39], [42], [44] no mencionan condiciones de almacenamiento de bacteriófagos.

#### b. MÉTODOS DE PURIFICACIÓN

La purificación de bacteriófagos consiste en la infección recurrente y controlada de bacteriófagos con respecto a las cepas de *Escherichia coli* utilizando la técnica de agar de doble capa, reconfirmando la zona de lisis en placa o en función a su densidad óptica a 600 nm ( $\text{OD}_{600}$ ) utilizando un espectrofotómetro teniendo como referencia un control [33], [35], [36], [37], [38], [39], [40], [41], [43], [45], [46], [47], [49], [50], [52], [53], [54], [55].

La mayor cantidad de estudios consideran las operaciones y procesos de purificación de bacteriófagos teniendo entre ellos similitudes, sin embargo, la minoría no detalla dentro de sus estudios metodologías de la purificación de sus bacteriófagos aislados, como se explica en la Fig.5.

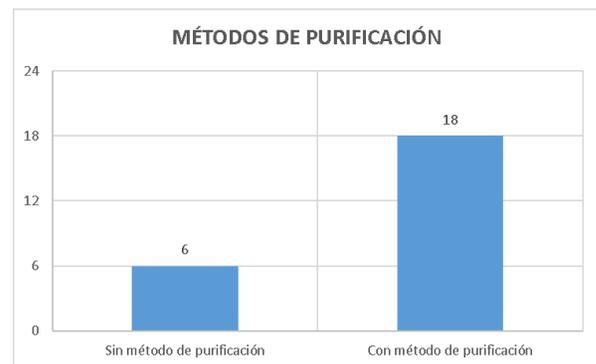


Fig. 5. Estudios que desarrollan metodología de purificación.

Fuente: Elaboración propia

Las operaciones o procesos desarrollados durante la purificación de bacteriófagos de los dieciocho estudios detallan su metodología de purificación de bacteriófagos posterior a su aislamiento, representado en un diagrama de flujo en la Fig.6. También se consideró dentro de los estudios la posibilidad de su almacenamiento para su posterior purificación, en este último caso se debe acondicionar la incubación por toda la noche a 37°C para la activación de los bacteriófagos suspendidos en la solución de almacenamiento el cual puede ser el agar de aislamiento, solución salina tamponada de fosfato (PBS) en pH 7.2 o solución salina de magnesio (SM) en pH 7.2.

Los estudios consideraron realizar la secuencia de purificación posterior a la formación de lisis en placa, utilizando la técnica de agar de doble capa con su medio de cultivo blando o fundido en su mayoría con la siguiente secuencia de operación de aislamiento:

- i. Resuspensión, en los estudios extrajeron un área de lisis y suspendieron en 1 ml de agar fundido, solución PBS o SM, posteriormente se agitó suavemente durante 1 h.
- ii. Centrifugación, los estudios acondicionaron los parámetros de 4°C en un periodo de tiempo de 5 a 30 minutos con una velocidad de centrifugación de 5000g a 15000g.
- iii. Filtración, en la mayoría de los estudios se utilizaron un equipo de vacío para realizar la filtración por membrana de porosidad 0.22 µm, sin embargo, se puede utilizar una jeringa estéril con filtro de 0.22 µm cómo se realizó en la técnica de aislamiento.
- iv. Inoculación, se agregaron en cantidades proporcionales en microlitros (µl) de cepas de E. coli (huésped) y microlitros (µl) del filtrado (bacteriófagos) en relación 1:1, 3:1 o 10:1 en 5 ml agar blando, solución PBS o SM y se añadió sobre agar nutritivo sólido en placa.
- v. Incubación, posterior a la etapa de inoculación los estudios acondicionaron a 37°C con agitación de 120 a 220 rpm por un tiempo de 6 a 24 horas.

Los estudios consideraron realizar esta secuencia de pasos tres veces hasta conseguir una titulación de bacteriófagos  $\geq 10^9$  UFP /ml.

- vi. Precipitación, en dos estudios [35], [54] desarrollaron la metodología de purificación por precipitación, el cual consiste en realizar la resuspensión con el medio de aislamiento en la zona de lisis y centrifugar a 12500g durante 6 minutos, posteriormente se filtró por filtro de jeringa estéril o filtro membrana de 0.22 µm, después se añadió la cantidad necesaria de cloruro de sodio sólido hasta 1 M de concentración final, posteriormente se realizó un baño de agua con hielo por un periodo de tiempo de 1 hora. La solución que contiene el bacteriófago se centrifugó por segunda ocasión a 11000g por un tiempo de 10 minutos, se agregó polietilenglicol 8000 (PEG8000) al sobrenadante hasta 10 % (p/v) en agitación lenta a temperatura ambiente. Transfiriéndose a un tubo de centrifuga de polipropileno en un baño de agua con hielo por 1 hora, para precipitar las partículas de bacteriófagos y se realizó una tercera centrifugación a 11000g por un periodo de tiempo de 10 minutos a una temperatura de 4 °C, se agregaron 5 ml de SM y 5 ml de cloroformo al 10% para separar las partículas de bacteriófago del PEG8000, se realizó la cuarta centrifugación a 3000g por un tiempo de 10 minutos y la segunda filtración con membrana de porosidad de 0,22 µm.
- vii. Almacenamiento, nueve estudios [32], [35], [38], [46], [48], [51], [52], [54], [55] consideran almacenar los bacteriófago a 4°C, un estudio [53] almacena a 4°C con solución Ringer (RS), ocho estudios [36], [37], [41], [43], [45], [47], [49], [50] consideran las condiciones de 4°C con SM en pH 7.2, un estudio [40] almacena a 4°C con cloroformo al 10%, un estudio [33] considera el almacenamiento a -20°C y cuatro estudios [34], [39], [42], [44] no mencionan condiciones específicas de almacenamiento para bacteriófagos, la temperatura de almacenamiento (4°C a -20°C), el pH de la solución amortiguadora (7.2 de pH) y la presencia de sales y estabilizadores (fosfato de sodio o cloruro de sodio) promueven la estabilidad y viabilidad de estos virus.

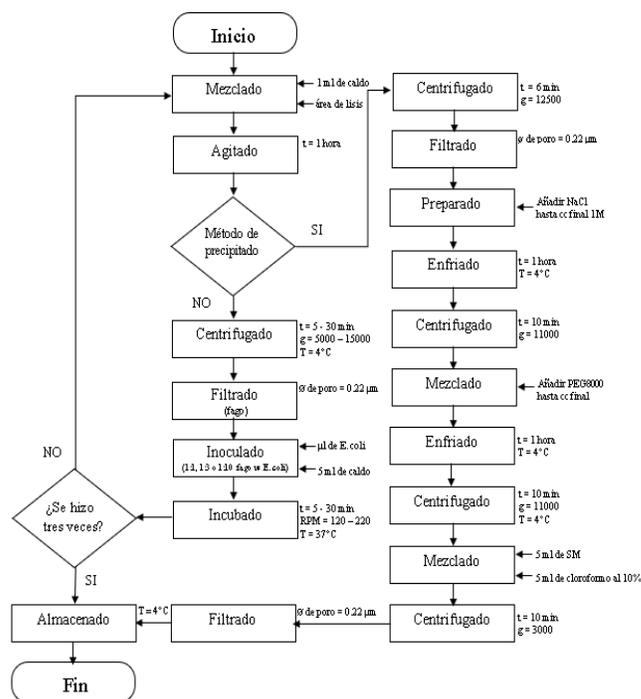


Fig. 6. Diagrama de flujo de los métodos de filtración estéril y precipitación. Fuente: Elaboración propia

### 3) EVALUACIÓN DE BACTERIÓFAGOS

Los artículos seleccionados para este estudio tuvieron en cuenta el análisis que hacían los distintos autores para obtener información detallada sobre las características y propiedades de los bacteriófagos bacterianos aislados, lo que facilitó la comparación y análisis de los resultados obtenidos.

TABLA II: Principales características y propiedades analizadas por los distintos autores para el estudio de los bacteriófagos.

PARÁMETROS Y VARIABLES ANALIZADOS EN LOS ARTÍCULOS	
Matriz de aislamiento	El tipo de muestra o la matriz de la que se aíslan los bacteriófagos bacterianos.
Bacterias	La especie bacteriana que se utiliza para el aislamiento de los bacteriófagos.
Bacteriófago	El nombre o código del bacteriófago aislado.
Cantidad de bacteriófagos aislados	El número de bacteriófagos aislados en el estudio.
Condiciones de crecimiento	Las condiciones de crecimiento de la bacteria y los bacteriófagos, como la temperatura, el pH y el medio de cultivo utilizado.
Características del bacteriófago	Las características del bacteriófago, como su morfología, resistencia a los antibióticos, familia a la que pertenece, análisis de genoma, actividad lítica, entre otras.
Tratamiento	El tratamiento al que se sometieron los bacteriófagos o las bacterias durante el estudio.
Rango de hospedero	El rango de especies bacterianas que pueden ser infectadas por el bacteriófago.
Estabilidad a pH	La estabilidad del fago a diferentes valores de pH.
Estabilidad térmica	La estabilidad del fago a diferentes temperaturas.
Diámetro de Lisis	El diámetro de la zona de lisis producida por el bacteriófago en el agar.
Morfología	La morfología del bacteriófago, como su forma y tamaño.

Resistencia a Antibióticos	La resistencia del bacteriófago a diferentes antibióticos.
Familia	La familia a la que pertenece el bacteriófago.
Multiplicidad de infección (MOI)	La relación entre el número de bacteriófagos y el número de bacterias en el medio de cultivo.
Análisis de Genoma	El análisis del genoma del bacteriófago.
OD-Bacteriana (densidad óptica)	La densidad óptica de la bacteria en el medio de cultivo.
Período de latencia	El tiempo que transcurre desde la infección de la bacteria hasta el inicio de la lisis.
Resistencia a desinfectantes	La resistencia del bacteriófago a diferentes desinfectantes.
Actividad lítica	La capacidad del bacteriófago para lisar las células bacterianas.
Tiempo de infección	El tiempo de infección de las bacterias con los bacteriófagos.
Ruptura de cadena de frío	Si se mantiene o no la cadena de frío durante el transporte y almacenamiento de los bacteriófagos.
Aplicación	La aplicación potencial de los bacteriófagos en diferentes campos, como la biotecnología y la terapia.

Fuente: Elaboración propia

#### a. CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS

Los artículos seleccionados fueron analizados teniendo en cuenta el uso de metodologías y técnicas novedosas para el estudio de los bacteriófagos, en este apartado se tuvo en cuenta las características fisicoquímicas, esquematizado en la Fig.7.

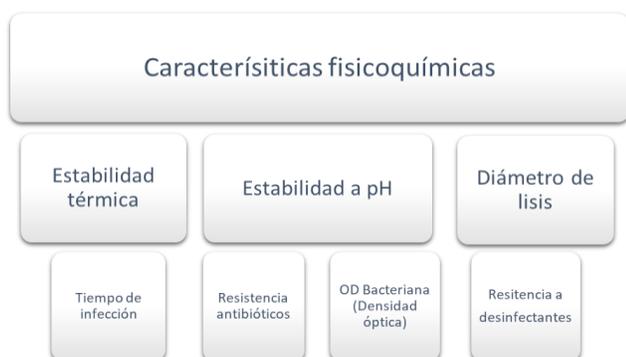


Fig. 7. Esquema de características fisicoquímicas investigadas en los estudios.  
Fuente: Elaboración propia

TABLA III: Porcentaje de artículos que analizan parámetros fisicoquímicos asociados al estudio de los bacteriófagos en los artículos analizados.

Parámetros fisicoquímicos				
Resistencia a Antibióticos	Estabilidad térmica	Estabilidad de pH	Diámetro de lisis	Tiempo de infección
29%	67%	63%	38%	13%

Fuente: Elaboración propia

#### b. CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS

También se tuvo en cuenta el porcentaje de artículos que incorporan un análisis microbiológico extendido sobre los bacteriófagos que infectan a E. coli, realizando un esquema en la Fig.8 de los parámetros microbiológicos estudiados en los artículos de inclusión en la presente revisión.



Fig. 8. Esquema de características microbiológicas investigada en los estudios.  
Fuente: Elaboración propia

TABLA IV: Porcentaje de artículos que analizan parámetros microbiológicos en los artículos analizados.

Parámetros microbiológicos				
Rango de hospedero	Período de latencia	Resistencia a desinfectantes	MOI (Multiplicidad de infección)	OD-Bacteriana (densidad óptica)
100%	79%	8%	54%	50%

Fuente: Elaboración propia

Para completar el análisis de los artículos en cuestión también se tuvo en cuenta la proporción de artículos que ofrecían un análisis fenotípico y genético de los bacteriófagos estudiados por los distintos autores.

TABLA V: Porcentaje de artículos que ofrecen una caracterización fenotípica y genética de los bacteriófagos en los artículos analizados.

Caracterización de bacteriófagos				
Cantidad de bacteriófagos aislados	Morfología	Familia	Análisis de Genoma	Aplicación
100%	71%	67%	63%	25%

Fuente: Elaboración propia

#### 4) ESTUDIOS DE APLICACIÓN EN PRODUCTOS

En la base de datos se presentan veinticuatro estudios que abordan el aislamiento, purificación y evaluación de bacteriófagos para una o varias cepas de E. coli. Se observa que solo seis de los veinticuatro estudios lograron aplicaciones satisfactorias en diversos campos de estudio. Las matrices de aislamiento empleadas con frecuencia dentro de esta revisión sistemática son; la matriz de alimentos el cual representa el 12.5% (3), agua residual o de ríos 8.33% (2), laboratorio clínico 4.16% (1) tal como se indica en la Tabla VI.

TABLA VI. Porcentaje de artículos que ofrecen una aplicación de los bacteriófagos según los artículos analizados.

Aplicación de bacteriófagos		
Matriz de alimentos	Matriz de agua residual o ríos	Matriz de laboratorio clínico
12,50%	8,33%	4,16%

Fuente: Elaboración propia

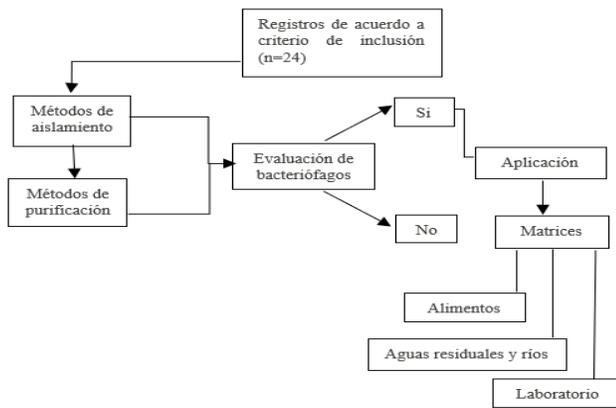


Fig. 9. Esquema de matrices de aplicación de bacteriófagos aislados.  
Fuente: Elaboración propia

Esta revisión sistemática destaca diferentes aplicaciones exitosas, entre las cuales se incluyen los estudios realizados por L. Wang et al. [55] en el uso del bacteriófago para *E. coli* O78 en pollos de engorde de un día. La mayor proporción de aplicaciones está relacionada con la matriz de alimentos. Además, se aborda la aplicación de un cóctel de bacteriófagos en leche para su conservación en cadena de frío, revelando variaciones en la eficacia de los bacteriófagos a diferentes temperaturas [35]. En este contexto, se consideran estos bacteriófagos como herramientas de control biológico y se demuestra su utilidad en la reducción de células viables de *E. coli* O157:H7 en alimentos. Las aplicaciones de biotecnología de incrustación de bacteriófagos fueron reportadas por, H.-Y. Shen et al. [48] y I. Choi et al [51] ambos estudios publicados en el año 2021, reportan con éxito un apósito de hidrogel 3D a base de bacteriófagos líticos HZJ activos y un método para inmovilizar bacteriófagos en superficies poliméricas utilizando el acoplamiento de clorhidrato de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida (EDC)/ N -(sulfo-NHS), utilizando como polímero la policaprolactona (PCL) respectivamente, por otro lado, Y.-K. Li et al [45] también en el año 2021 aisló y caracterizó un bacteriófago lítico resistente a los alcalinos JN01 de *E. coli* O157:H7 a partir de aguas residuales el cual redujo significativamente *E. coli* O157:H7 en muestras de leche y carne de res con potencial de ser un nuevo agente de biocontrol natural para *E. coli* O157:H7 en productos alimenticios. En las aplicaciones terapéuticas con bacteriófagos se desarrollaron estudios de evaluación de la eficacia de los bacteriófagos contra *E. coli* productores de ESBP utilizando un modelo de larvas de *Galleria mellonella* [46].

#### IV. DISCUSIÓN

Los métodos empleados por los investigadores para aislar, purificar y evaluar los bacteriófagos en los distintos estudios analizados reflejan un enfoque integral y detallado para comprender la diversidad y las propiedades de estos virus. La combinación de técnicas de aislamiento y evaluación de características fisicoquímicas y microbiológicas han permitido obtener información valiosa sobre la actividad antimicrobiana de los bacteriófagos, y sus características de morfología, composición genómica y su potencial aplicación en la salud pública, industria alimentaria y agricultura.

1) Matrices de aislamiento: Los ecosistemas ideales, en donde se encuentran los bacteriófagos silvestres son aquellos donde se encuentra una alta concentración de carga bacteriana, estos son la principal fuente de búsqueda de estos virus altamente específicos. Así mismo, Y. Liao et al. [29] menciona que las cepas de *Escherichia coli* productoras de toxina Shiga (STEC) son aisladas con frecuencia de ambientes asociados con animales rumiantes principalmente porque son el reservorio natural de STEC. Existen

diversos factores que influyen en la frecuencia de aislamiento de bacteriófagos en diferentes matrices como los factores ambientales, temperatura, pH, la presencia de bacterias hospederas, la humedad y la presencia de otros microorganismos. En esta revisión la mayor cantidad de bacteriófagos aislados provienen de la matriz de alimentos [23] [35] [28], agua residual o de ríos [19], laboratorio clínico [14] y de heces animal.

2) Métodos de Aislamiento y purificación: En general los artículos describen el aislamiento de bacteriófagos a partir de diversas fuentes como indica en la Tabla I y sus matrices de origen representado gráficamente en la Fig.2. Se utilizaron diferentes cepas de *E. coli* resistentes a antibióticos específicos y aislados clínicos de *E. coli* productores de ESBP [46]. En los 24 estudios incluidos en la revisión de metodologías de aislamiento, solo un estudio [50] empleó el método de precipitación y veintitrés estudios utilizaron el método de filtración estéril [32], [33], [34], [35], [36], [37], [38], [39], [40], [41], [42], [43], [44], [45], [46], [47], [48], [49], [51], [52], [53], [54], [55]. En cada una de las etapas del aislamiento los parámetros utilizados con mayor frecuencia fueron: En la primera etapa de centrifugación, once estudios realizaron el proceso a temperatura ambiente durante 5 a 10 minutos, con una fuerza centrífuga entre 5000g a 10000g [35], [37], [38], [39], [41], [45], [46], [47], [49], [52], [54]. En cuanto a la primera filtración, doce estudios utilizaron filtros de membrana con poros de 0.22  $\mu\text{m}$  [36], [37], [38], [41], [45], [46], [48], [49], [50], [52], [53], [55]. Respecto a la primera incubación, once estudios optaron por incubar a 37°C [33], [34], [35], [37], [38], [40], [42], [44], [47], [49], [54]. Sin embargo, en la segunda etapa de centrifugación, once estudios no llevaron a cabo una segunda centrifugación [33], [34], [38], [39], [40], [42], [43], [44], [48], [49], [53]. Por otro lado, ocho estudios [35], [37], [41], [45], [46], [47], [52], [55] centrifugaron a temperatura ambiente en un periodo de tiempo de 2 a 20 minutos en un rango de centrifugación de 5000g a 13000g. De manera similar, trece estudios no realizaron una segunda filtración [35], [38], [39], [40], [41], [42], [43], [44], [46], [49], [50], [51], [53]. Sin embargo, ocho estudios [34], [36], [37], [45], [47], [48], [52], [55] realizaron una segunda filtración por membrana de porosidad de 0.22  $\mu\text{m}$ . En cuanto a la segunda incubación, diez estudios consideraron incubar con un caldo nutriente blando (0.4% p/v) sobre medio sólido nutriente (1.5% p/v) a 37°C [34], [35], [36], [37], [38], [43], [46], [48], [52], [53]. En cuanto al método de identificación de lisis, los veintidós estudios utilizaron la técnica de agar de doble capa y dos estudios utilizaron la técnica de placas de lisis. Para la inoculación, se agregaron cantidades proporcionales en microlitros de cepas de *E. coli* y microlitros de la suspensión de bacteriófagos en los veinticuatro estudios estas proporciones fluctuaron entre 20:1, 10:1, 6:1 y 1:1. Y para el almacenamiento, nueve estudios consideraron almacenar los bacteriófagos a 4°C [32], [35], [38], [46], [48], [51], [52], [54], [55]. En los 24 estudios incluidos en la revisión de metodologías de purificación de bacteriófagos, dos estudios [35], [54] emplearon el método de precipitación y veintidós utilizaron el método de filtración estéril [32], [33], [34], [36], [37], [38], [39], [40], [41], [42], [43], [44], [45], [46], [47], [48], [49], [50], [51], [52], [53], [55]. Estos últimos están detallados en el diagrama de flujo presentado en la Figura 6, comenzando con la mezcla (resuspensión), agitación, centrifugación, filtración, inoculación e incubación. Los estudios contemplaron repetir esta secuencia tres veces hasta alcanzar una titulación de bacteriófagos  $\geq 10^9$  UFP/ml para su posterior almacenamiento en nueve estudios [32], [35], [38], [46], [48], [51], [52], [54], [55] consideran almacenar los bacteriófago a 4°C.

- 3) Métodos de evaluación: En los artículos analizados, los bacteriófagos aislados involucraron diversas técnicas y criterios para su evaluación fisicoquímica y microbiológica, lo que ha permitido identificar nuevas cepas y comprender su potencial de aplicación en el control de bacterias patógenas. Además, la evaluación de la actividad antimicrobiana de los bacteriófagos contra cepas específicas de bacterias, como *Escherichia coli* productora de toxina Shiga (STEC), ha proporcionado información crucial sobre su eficacia y especificidad [41] [43-44]. Así mismo, se han mostrado recientemente resultados prometedores en el año 2021 para tratar enfermedades en aves de corral, reducir la contaminación de los canales y mejorar la seguridad de los productos avícolas [56].
- 4) Aplicaciones de bacteriófagos: En esta revisión se exploró las aplicaciones de bacteriófagos en materias de terapia con bacteriófagos con modelo de larvas de *Galleria mellonella* [46], y la técnica de incrustación de bacteriófagos en hidrogel 3D [48], así como inmovilización por acoplamiento [51] y aplicaciones para el biocontrol en la contaminación alimentaria [35] [45] [55]. Esto demuestra la diversidad de las aplicaciones de los bacteriófagos más allá del simple aislamiento y caracterización. Por otra parte, A. M. Al-Anany et al [57] en su estudio de revisión sistemática de eficacia, respalda el potencial de la terapia con bacteriófagos como una opción segura y viable para el tratamiento de las infecciones de tracto urinario (UTIs).

Los investigadores destacan la valiosa información de los bacteriófagos sobre su diversidad, propiedades y aplicaciones de enfoques novedosos para combatir la *E. coli* resistente a los medicamentos debido a su especificidad, eficacia y seguridad de los bacteriófagos, convirtiéndolos en candidatos prometedores para el control de bacterias patógenas *E. coli* en diversos campos, desde la salud pública hasta la industria alimentaria y la agricultura.

V. CONCLUSIÓN

Este artículo resume de manera general una secuencia de pasos para el aislamiento, purificación y evaluación de bacteriófagos contra cepas específicas de *E. coli*, teniendo en cuenta las principales pruebas de naturaleza fisicoquímica y microbiológica usadas por distintos investigadores del mundo en este campo. De manera general los investigadores aíslan bacteriófagos ambientales utilizando los métodos de filtración estéril en la etapa de aislamiento y purificación, para su posterior almacenamiento.

Las metodologías para aislar y purificar bacteriófagos, así como las características de los bacteriófagos para *E. coli*, abarcan una variedad de técnicas, desde métodos microbiológicos tradicionales hasta análisis moleculares y genómicos avanzados en bacteriófagos contra cepas específicas de *E. coli* reflejando el enfoque multifacético adoptado por los investigadores en este campo.

El 76% de los bacteriófagos en la presente revisión fueron aislados en las matrices de alimentos 42% (21) y agua residual o de ríos 34% (17), siendo estas matrices en donde se aislaron la mayor cantidad de estos virus ubicuos.

Los hallazgos presentados subrayan el potencial de los bacteriófagos como un camino prometedor para abordar los desafíos planteados por la *Escherichia coli* multidrogaresistente (MDR).

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Universidad Privada del Norte por el apoyo financiero.

[1] X. Yang *et al.*, “Retrospective analysis of drug resistance characteristics and infection related risk factors of multidrug-resistant organisms (MDROs) isolated from the orthopedics department of a tertiary hospital,” *Scientific Reports*, vol. 13, no. 1, Feb. 2023, doi: 10.1038/s41598-023-28270-3.

[2] N. J. E. Waller, C.-Y. Cheung, G. M. Cook, and M. B. McNeil, “The evolution of antibiotic resistance is associated with collateral drug phenotypes in *Mycobacterium tuberculosis*,” *Nature Communications*, vol. 14, no. 1, Mar. 2023, doi: 10.1038/s41467-023-37184-7.

[3] F. Berglund, S. Ebmeyer, E. Kristiansson, and D. G. J. Larsson, “Evidence for wastewaters as environments where mobile antibiotic resistance genes emerge,” *Communications Biology*, vol. 6, no. 1, Mar. 2023, doi: 10.1038/s42003-023-04676-7.

[4] S. M. Hartinger *et al.*, “Antimicrobial Resistance in Humans, Animals, Water and Household Environs in Rural Andean Peru: Exploring Dissemination Pathways through the One Health Lens,” *International Journal of Environmental Research and Public Health*, vol. 18, no. 9, p. 4604, Apr. 2021, doi: 10.3390/ijerph18094604.

[5] W. Flores-Paredes *et al.*, “Evolution of Antimicrobial Resistance Levels of ESKAPE Microorganisms in a Peruvian IV-Level Hospital,” *Infection & Chemotherapy*, vol. 53, no. 3, p. 449, 2021, doi: 10.3947/ic.2021.0015.

[6] M. O. Sommer and G. Dantas, “Antibiotics and the resistant microbiome,” *Current Opinion in Microbiology*, vol. 14, no. 5, pp. 556–563, Oct. 2011, doi: 10.1016/j.mib.2011.07.005.

[7] I. Gierlicka, S. I. S. Rattan, and M. Wnuk, “Perspectives on using bacteriophages in biogerontology research and interventions,” *Chemo-Biological Interactions*, vol. 366, p. 110098, Oct. 2022, doi: 10.1016/j.cbi.2022.110098.

[8] N. M. Alharbi and M. M. Ziad, “Wastewater as a fertility source for novel bacteriophages against multi-drug resistant bacteria,” *Saudi Journal of Biological Sciences*, vol. 28, no. 8, pp. 4358–4364, Apr. 2021, doi: 10.1016/j.sjbs.2021.04.025.

[9] P. Domingo-Calap, P. Georgel, and S. Bahram, “Back to the future: bacteriophages as promising therapeutic tools,” *HLA*, vol. 87, no. 3, pp. 133–140, Feb. 2016, doi: 10.1111/tan.12742.

[10] P. Hyman, “Phages for Phage Therapy: Isolation, Characterization, and Host Range Breadth,” *Pharmaceuticals*, vol. 12, no. 1, p. 35, Mar. 2019, doi: 10.3390/ph12010035.

[11] D. Ózal, A. Arndt, and M. Thomé, “Bacteriophages and related endolysins for reduction of microorganisms in the human body - a systematic review,” *GMS Hygiene Infection Control*, Jan. 17, 2022, <https://www.egms.de/en/journals/dgkh/2022-17/dgkh000404.shtml>

[12] S. Uytendaele *et al.*, “Safety and efficacy of phage therapy in difficult-to-treat infections: a systematic review,” *The Lancet Infectious Diseases*, vol. 22, no. 8, pp. 208–220, Aug. 2022, doi: 10.1016/s1473-3099(21)00612-5.

[13] C. Aranaga, L. D. Pantoja, E. A. Martínez, and A. Falco, “Phage Therapy in the Era of Multidrug Resistance in Bacteria: A Systematic Review,” *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 23, no. 9, p. 4577, Apr. 2022, doi: 10.3390/ijms23094577.

[14] L. Meneses, A. C. Brandão, T. Coenye, A. C. Braga, D. P. Pires, and J. Azeredo, “A systematic review of the use of bacteriophages for in vitro biofilm control,” *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, vol. 42, no. 8, pp. 919–928, Jul. 2023, doi: 10.1007/s10096-023-04638-1.

[15] D. X. Romero-Calle, V. P. de Santana, R. G. Benevides, M. T. A. Aliaga, C. Billington, and A. Góes-Neto, “Systematic review and meta-analysis: the efficiency of bacteriophages previously patented against pathogenic bacteria on food,” *Systematic Reviews*, vol. 12, no. 1, Oct. 2023, doi: 10.1186/s13643-023-02352-9.

[16] L. El Haddad, C. P. Harb, M. A. Gebara, M. A. Stibich, and R. F. Chemaly, “A Systematic and Critical Review of Bacteriophage Therapy Against Multidrug-resistant ESKAPE Organisms in Humans,” *Clinical Infectious Diseases*, vol. 69, no. 1, pp. 167–178, Jun. 2019, doi: 10.1093/cid/ciy947.

[17] M. Shahdadi *et al.*, “A systematic review and modeling of the effect of bacteriophages on *Salmonella* spp. Reduction in chicken meat,” *Heliyon*, vol. 9, no. 4, Apr. 2023, doi: 10.1016/j.heliyon.2023.e14870.

[18] S. Sillankorva, “Isolation of Bacteriophages for Clinically Relevant Bacteria,” in *Methods in Molecular Biology*, New York, NY: Springer New York, 2018, pp. 23–30. [Online]. Available: [http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-7395-8\\_3](http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-7395-8_3)

[19] K. M. Poluri and R. Czajkowski, “Editorial: Bacteriophages Isolation From the Environment and Their Antimicrobial Therapeutic Potential, Volume 2,” *Frontiers in Microbiology*, vol. 13, no. 15, Jan. 2022, doi: 10.3389/fmicb.2022.847176.

- [20] D. L. Peters, G. Harris, C. M. Davis, J. J. Dennis, and W. Chen, "Bacteriophage Isolation, Purification, and Characterization Techniques Against Ubiquitous Opportunistic Pathogens," *Current Protocols*, vol. 2, no. 11, p. 594, Nov. 2022, doi: 10.1002/cpz1.594.
- [21] Z. Golkar, O. Bagasra, and D. G. Pace, "Bacteriophage therapy: a potential solution for the antibiotic resistance crisis," *The Journal of Infection in Developing Countries*, vol. 8, no. 02, pp. 129–136, Feb. 2014, doi: 10.3855/jidc.3573.
- [22] H. M. Mkwata, A. I. Omoregie, and P. M. Nissom, "Lytic bacteriophages isolated from limestone caves for biocontrol of *Pseudomonas aeruginosa*," *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, vol. 34, p. 102011, Jul. 2021, doi: 10.1016/j.bcab.2021.102011.
- [23] W.-J. Metsemakers *et al.*, "Bacteriophage therapy for human musculoskeletal and skin/soft tissue infections," *Clinical Microbiology and Infection*, vol. 29, no. 6, pp. 695–701, Jun. 2023, doi: 10.1016/j.cmi.2023.01.011.
- [24] N. Walter, L. Deng, C. Brochhausen, V. Alt, and M. Rupp, "Treatment of bone and periprosthetic infections with bacteriophages: A systematic review," *Der Orthopäde*, vol. 51, no. 2, pp. 138–145, Feb. 2022, doi: 10.1007/s00132-021-04148-y.
- [25] R. Patil *et al.*, "Recent advancements in nanotechnology-based bacteriophage delivery strategies against bacterial ocular infections," *Microbiological Research*, vol. 273, p. 127413, Aug. 2023, doi: 10.1016/j.micres.2023.127413.
- [26] E. Tantoso, B. Eisenhaber, M. Kirsch, V. Shitov, Z. Zhao, and F. Eisenhaber, "To kill or to be killed: pangenome analysis of *Escherichia coli* strains reveals a tailocin specific for pandemic ST131," *BMC Biology*, vol. 20, no. 1, Jun. 2022, doi: 10.1186/s12915-022-01347-7.
- [27] M. Meng *et al.*, "Bio-modification of M13 bacteriophage as signal amplification container for the highly sensitive detection of live *E. Coli*," *Microchemical Journal*, vol. 195, p. 109492, Dec. 2023, doi: 10.1016/j.microc.2023.109492.
- [28] D. Jaroni, P. K. Litt, P. Bule, and K. Rumbaugh, "Effectiveness of Bacteriophages against Biofilm-Forming Shiga-Toxigenic *Escherichia coli* In Vitro and on Food-Contact Surfaces," *Foods*, vol. 12, no. 14, p. 2787, Jul. 2023, doi: 10.3390/foods12142787.
- [29] Y. Liao, V. M. Lavenburg, M. Lennon, A. Salvador, A. L. Hsu, and V. C. H. Wu, "The effects of environmental factors on the prevalence and diversity of bacteriophages lytic against the top six non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* on an organic farm," *Journal of Food Safety*, vol. 43, no. 2, Oct. 2020, doi: 10.1111/jfs.12865.
- [30] C. Chen, C. P. Coronel-Aguilera, B. M. Applegate, A. G. Gehring, A. K. Bhunia, and G. C. Paoli, "Studies on Simultaneous Enrichment and Detection of *Escherichia coli* O157:H7 during Sample Shipment," *Foods*, vol. 11, no. 22, p. 3653, Nov. 2022, doi: 10.3390/foods11223653.
- [31] S. Xu, E. Campisi, J. Li, and V. A. Fischetti, "Decontamination of *Escherichia coli* O157:H7 on fresh Romaine lettuce using a novel bacteriophage lysin," *International Journal of Food Microbiology*, vol. 341, p. 109068, Mar. 2021, doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109068.
- [32] P. Mozaffari *et al.*, "Isolation and characterization of *E. coli* O157: H7 novel bacteriophage for controlling this food-borne pathogen," *Virus Research*, vol. 315, p. 198754, Jul. 2022, doi: 10.1016/j.virusres.2022.198754.
- [33] M. Benala *et al.*, "A revisited two-step microtiter plate assay: Optimization of in vitro multiplicity of infection (MOI) for Coliphage and Vibriophage," *Journal of Virological Methods*, vol. 294, p. 114177, Aug. 2021, doi: 10.1016/j.jviromet.2021.114177.
- [34] S. Eid, H. M. N. Tolba, R. I. Hamed, and N. M. Al-Atfeehy, "Bacteriophage therapy as an alternative biocontrol against emerging multidrug resistant *E. coli* in broilers," *Saudi Journal of Biological Sciences*, vol. 29, no. 5, pp. 3380–3389, May 2022, doi: 10.1016/j.sjbs.2022.02.015.
- [35] E. Ekiz, E. K. Tayyarcan, E. Evran, K. Guven, E. Acar Soykut, and I. H. Boyaci, "Investigation of the effect of bacteriophage cocktail on microbial quality in the case of cold chain breakage: A case study on *Escherichia coli* contamination in milk," *Food and Humanity*, vol. 1, pp. 1073–1081, Dec. 2023, doi: 10.1016/j.foohum.2023.09.004.
- [36] T. Xiao *et al.*, "A novel lytic bacteriophage against colistin-resistant *Escherichia coli* isolated from different animals," *Virus Research*, vol. 329, p. 199090, May 2023, doi: 10.1016/j.virusres.2023.199090.
- [37] F. Li *et al.*, "Isolation, characterization and genomic analysis of a novel phage IME178 with lytic activity against *Escherichia coli*," *Microbial Pathogenesis*, vol. 179, p. 106099, Jun. 2023, doi: 10.1016/j.micpath.2023.106099.
- [38] M. I. Sultan-Alolama, A. Amin, R. Vijayan, and K. A. El-Tarabily, "Isolation, Characterization, and Comparative Genomic Analysis of Bacteriophage Ec\_MI-02 from Pigeon Feces Infecting *Escherichia coli* O157:H7," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 24, no. 11, p. 9506, May 2023, doi: 10.3390/ijms24119506.
- [39] J. T. Lin *et al.*, "Isolation, Characterization, and Genome Analysis of a Novel Bacteriophage, *Escherichia* Phage vB\_EcoM-4HA13, Representing a New Phage Genus in the Novel Phage Family Chaseviridae," *Viruses*, vol. 14, no. 11, p. 2356, Oct. 2022, doi: 10.3390/v14112356.
- [40] Z. Yildirim, T. Sakin, M. Akçelik, and N. Akçelik, "Identification and characterization of lytic bacteriophages specific to foodborne pathogenic *Escherichia coli* O157:H7," *Food Science and Technology International*, vol. 27, no. 1, pp. 56–72, Jun. 2020, doi: 10.1177/1082013220929836.
- [41] G. Shakeri, A. Jamshidi, and K. Ghazvini, "Isolation of broad-host-range bacteriophages against food- and patient-derived Shiga toxin-producing *Escherichia coli*," *Iranian Journal of Veterinary Science and Technology*, vol. 12, no. 1, pp. 11–20, Jan. 2020, doi: 10.22067/veterinary.v12i1.85298.
- [42] Y. Zhang, Y.-T. Liao, and V. C. H. Wu, "Whole-Genome Analysis of a Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O103:H2 Strain Isolated from Cattle Feces," *Microbiology Resource Announcements*, vol. 9, no. 45, Nov. 2020, doi: 10.1128/mra.00896-20.
- [43] H. M. Duc *et al.*, "Isolation, characterization and application of a polylysine phage capable of controlling *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 in different food matrices," *Food Research International*, vol. 131, p. 108977, May 2020, doi: 10.1016/j.foodres.2020.108977.
- [44] Y.-T. Liao, F. Liu, and V. C. H. Wu, "Complete Genome Sequence of a Lytic T7-Like Phage, *Escherichia* Phage vB\_EcoP-Ro451w, Isolated from Nonfecal Compost Samples," *Microbiology Resource Announcements*, vol. 8, no. 9, Feb. 2019, doi: 10.1128/mra.00036-19.
- [45] Y.-K. Li *et al.*, "Isolation, characterization and application of an alkaline resistant virulent bacteriophage JN01 against *Escherichia coli* O157:H7 in milk and beef," *LWT*, vol. 144, p. 111266, Jun. 2021, doi: 10.1016/j.lwt.2021.111266.
- [46] H. B. Erol, B. Kaskatepe, S. Ozturk, and Z. Safi Oz, "The comparison of lytic activity of isolated phage and commercial Intesti bacteriophage on ESBL producer *E. coli* and determination of Ec\_P6 phage efficacy with in vivo *Galleria mellonella* larvae model," *Microbial Pathogenesis*, vol. 167, p. 105563, Jun. 2022, doi: 10.1016/j.micpath.2022.105563.
- [47] T. Kitti *et al.*, "Comparative genome analysis of *Escherichia coli* bacteriophages isolated from sewage and chicken meat," *Virus Research*, vol. 315, p. 198784, Jul. 2022, doi: 10.1016/j.virusres.2022.198784.
- [48] H.-Y. Shen, Z.-H. Liu, J.-S. Hong, M.-S. Wu, S.-J. Shiue, and H.-Y. Lin, "Controlled-release of free bacteriophage nanoparticles from 3D-plotted hydrogel fibrous structure as potential antibacterial wound dressing," *Journal of Controlled Release*, vol. 331, pp. 154–163, Mar. 2021, doi: 10.1016/j.jconrel.2021.01.024.
- [49] P. Li *et al.*, "Characterization and genome analysis of a broad lytic spectrum bacteriophage P479 against multidrug-resistant *Escherichia coli*," *Virus Research*, vol. 308, p. 198628, Jan. 2022, doi: 10.1016/j.virusres.2021.198628.
- [50] J. Hu *et al.*, "Dietary D-xylose promotes intestinal health by inducing phage production in *Escherichia coli*," *npj Biofilms and Microbiomes*, vol. 9, no. 1, Oct. 2023, doi: 10.1038/s41522-023-00445-w.
- [51] I. Choi, D. S. Yoo, Y. Chang, S. Y. Kim, and J. Han, "Polycaprolactone film functionalized with bacteriophage T4 promotes antibacterial activity of food packaging toward *Escherichia coli*," *Food Chemistry*, vol. 346, p. 128883, Jun. 2021, doi: 10.1016/j.foodchem.2020.128883.
- [52] S. Sattar *et al.*, "Characterization of two novel lytic bacteriophages having zoonotic potential against MDR avian pathogenic *Escherichia coli* strains of zoonotic potential," *Scientific Reports*, vol. 13, no. 1, Jun. 2023, doi: 10.1038/s41598-023-37176-z.
- [53] L. A. L. A. and D. E. Waturangi, "Application of BI-EHEC and BI-EPEC bacteriophages to control enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli* on various food surfaces," *BMC Research Notes*, vol. 16, no. 1, Jun. 2023, doi: 10.1186/s13104-023-06371-6.
- [54] B. Wei, C. Cong, L. Zheng, L. Chen, and X. Yan, "Isolation, characterization and whole genome analysis of the novel genus Lederbergvirus, phage vB\_EcoP\_E212 infecting enterotoxigenic *Escherichia coli* K88," *Virus Research*, vol. 331, p. 199125, Jul. 2023, doi: 10.1016/j.virusres.2023.199125.
- [55] L. Wang *et al.*, "Isolation, Characterization and Whole Genome Analysis of an Avian Pathogenic *Escherichia coli* Phage vB\_EcoS\_GN06," *Veterinary Sciences*, vol. 9, no. 12, p. 675, Dec. 2022, doi: 10.3390/vetsci9120675.
- [56] Md. R. Islam, C. E. Martinez-Soto, J. T. Lin, C. M. Khursigara, S. Barbut, and H. Anany, "A systematic review from basics to omics on bacteriophage applications in poultry production and processing," *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, vol. 63, no. 18, pp. 3097–3129, Oct. 2021, doi: 10.1080/10408398.2021.1984200.
- [57] M. Al-Anany *et al.*, "Phage Therapy in the Management of Urinary Tract Infections: A Comprehensive Systematic Review," *PHAGE*, vol. 4, no. 3, pp. 112–127, Sep. 2023, doi: 10.1089/phage.2023.0024.