

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA**  
**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS VETERINARIAS**



**CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA Y MOLECULAR DE BACTERIÓFAGOS  
LÍTICOS DE *SALMONELLA* SPP.**

**TESIS**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS VETERINARIAS**

**PRESENTA**

**MVZ. RAMÓN FRANCISCO ONTIVEROS CAMARGO**

**DIRECTOR DE TESIS**

**DRA. SAWAKO OSHIMA**

**MEXICALI, BAJA CALIFORNIA**

**AGOSTO 2021**

**CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA Y MOLECULAR DE BACTERIÓFAGOS LÍTICOS DE *SALMONELLA* SPP.** Tesis presentada por MVZ. Ramón Francisco Ontiveros Camargo como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias Veterinarias ha sido aprobada por el comité particular indicado:

---

Dra. Sawako Oshima  
Director de tesis

---

Dr. Gerardo Enrique Medina Basulto  
Asesor

---

Dr. Miguel Arturo Cabanillas Gámez  
Asesor

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por proporcionar los medios para la realización de mis estudios y del proyecto de Investigación.

Al Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias (IICV) por abrir sus puertas durante estos años de posgrado.

A la Dra. Sawako, por ser una guía siempre y por su incondicional apoyo.

A mis amigos de posgrado, quienes recorrieron esta parte del camino junto a mi.

A docentes, personal y alumnos del IICV, por formar parte de mi desarrollo académico y personal.

## **DEDICATORIA**

A mis padres, Francisca Camargo y Ramón Ontiveros, creadores de los cimientos que impulsan mi avance. Moldearon gran parte de lo que soy y espero consolidarme al final como alguien en quien confíen plenamente

A mis hermanos, Alan y Diego, que prestan el color de su esencia a esta vida

A Sabu, por enseñarme lo inquebrantable de la amistad

## RESUMEN

Los bacteriófagos (o fagos) líticos son virus que infectan bacterias provocando su muerte; esto resulta de gran interés para el uso de fagos líticos como herramienta para el control biológico y terapéutico de patógenos bacterianos. *Salmonella* spp. causa enfermedad gastroentérica en humanos y animales, debido a que han emergido cepas de *Salmonella* multidrogo resistentes (MDR) se necesita buscar alternativas a los antibióticos para su control. El objetivo del presente trabajo fue caracterizar bacteriófagos específicos para *Salmonella* spp. previamente aislados a partir de materia fecal de perros en Mexicali. Se realizó experimentos para determinar el rango óptimo del pH y temperatura para las actividades líticas in vitro. El tamaño aproximado de su genoma ADN fue estimado por la electroforesis del gel de agarosa. Adicionalmente se determinó la actividad lítica del fago sobre nuevas cepas de *Salmonella* spp. aisladas de reptiles. Los datos obtenidos del presente trabajo muestran que los fagos poseen potencial para utilizarse como coctel para el biocontrol de *Salmonella* asociadas a diversas especies animales combinado con otras medidas de bioseguridad e higiene para reducir el riesgo en salud pública y veterinaria.

Palabras clave: Bacteriófagos, *Salmonella* spp. reptiles, actividad lítica, genoma del fago

## **ABSTRACT**

Lytic bacteriophages (or phages) are viruses that infect bacteria causing their death; This is of great interest for the use of lytic phages as a tool for the biological and therapeutic control of bacterial pathogens. *Salmonella* spp. causes gastroenteric disease in humans and animals, since multidrug resistant *Salmonella* strains (MDR) have emerged, it is necessary to seek alternatives to antibiotics for its control. The objective of the present work was to characterize specific bacteriophages for *Salmonella* spp. previously isolated from dog fecal matter in Mexicali. Experiments were performed to determine the optimum pH and temperature range for lytic activities in vitro. The approximate size of its DNA genome was estimated by agarose gel electrophoresis. Additionally, the lytic activity of the phage was determined on new strains of *Salmonella* spp. isolated reptiles. The data obtained from this work show that phages have the potential to be used as a cocktail for the biocontrol of *Salmonella* associated with various animal species combined with other biosafety and hygiene measures to reduce the risk in public and veterinary health.

Keywords: Bacteriophages, *Salmonella* spp. reptiles, lytic activity, phage genome

# CONTENIDO

	pag.
AGRADECIMIENTOS .....	iii
DEDICATORIA .....	iv
RESUMEN .....	v
ABSTRACT .....	vi
LISTA DE CUADROS .....	viii
LISTA DE FIGURAS .....	ix
LISTA DE ABREVIACIONES .....	x
INTRODUCCIÓN .....	1
REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
MATERIALES Y METODOS.....	17
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	27
CONCLUSIONES .....	39
LITERATURA CITADA.....	40

## **LISTA DE CUADROS**

Cuadro		Pág.
Cuadro 1	Resistencia fenotípica a antibióticos de bacterias aisladas de reptiles y anfibios.....	28
Cuadro 2	Determinación del rango de pH óptimo del fago 488.....	33

## LISTA DE FIGURAS

Figura		Pág.
Figura 1	Estructuras proteicas que pueden componer a un fago.....	5
Figura 2	Ciclos de replicación fágica.....	7
Figura 3	Prueba de gota.....	20
Figura 4	Prueba de doble capa .....	21
Figura 5	Titulación de fagos .....	22
Figura 6	Amplificación del gen InvA. ....	27
Figura 7	Análisis de resistencia a antibióticos con mediante multidiscos® Gram negativo. ....	28
Figura 8	Actividad lítica del fago 488 amplificado.....	29
Figura 9	Titulación final (1X10 <sup>9</sup> PFU/ml) del fago 488 amplificado....	30
Figura 10	Efecto de temperatura en actividad lítica del fago 488.....	31
Figura 11	Determinación del rango de temperatura óptima del fago 488	32

## **LISTA DE ABREVIACIONES**

**ADN:** Ácido desoxiribonucleico

**ARN:** Ácido ribonucleico

**Buffer SM:** Solución de sodio y magnesio

**CaCl<sub>2</sub>:** Cloruro de calcio

**CEMCA:** Centro Municipal de Control Animal

**IICV:** Instituto de Investigación en Ciencias Veterinarias

**LB:** Luria Bertani

**MDR:** Multidroga resistente

**MgSO<sub>4</sub>:** Sulfato de magnesio

**mM:** Milimolar

**ml:** Mililitro

**NaCl:** Cloruro de sodio

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa

**PFU:** Unidad formadora de calvas

**pmol:** Picomol

**UABC:** Universidad Autónoma de Baja California

**UFC:** Unidad formadora de colonias

**μl:** Microlitro

**φ:** Phi o fi

## INTRODUCCIÓN

Los bacteriófagos son virus que solo infectan bacterias. Cada uno carga su genoma de una célula bacteriana a otra, dentro de las cuales puede dirigir la producción de más fagos. El hospedero para cada fago es un grupo bacteriano específico. Este grupo es a menudo un subconjunto de una especie, pero varias especies relacionadas a veces pueden infectarse por el mismo fago. Están ampliamente distribuidos en todo el mundo, son las entidades más abundantes en la tierra (las estimaciones oscilan entre  $10^{30}$  y  $10^{32}$  en total) y juegan un papel clave en la regulación del equilibrio microbiano en cada ecosistema (Kutter y Sulakvelidze, 2004).

El uso de fagos para la reducción de patógenos bacterianos fue empleada por d'Herelle en 1919 y desde entonces se utilizaron para el control de diversas infecciones bacterianas (Callaway y col., 2006). Sin embargo el uso generalizado de los antibióticos, unido al inconveniente de emplear preparaciones poco purificadas, condujo al abandono de la fagoterapia (Ronda y col., 2016). Es así como la aparición y transmisión de microorganismos resistentes a los antibióticos ha intensificado la búsqueda de alternativas para el control no antibiótico de estos patógenos. Ya que las bacterias oportunistas resistentes a antibióticos son un riesgo de salud pública (Moreno y col., 2018).

La salmonelosis es una enfermedad de distribución mundial y de gran importancia para la salud pública, debido a que *Salmonella entérica* se encuentra en el tracto gastrointestinal de mamíferos, aves y reptiles, además de que puede

sobrevivir durante mucho tiempo en agua, suelo o en los alimentos (Capparelli y col., 2010). *S. Enteritidis*, es la serovariedad más prevalente en el mundo seguida de *S. Typhimurium* (Uribe y col., 2006), causantes de la mayoría de las infecciones entéricas en animales y humanos (Augustine y col., 2013; Sillankorva y col., 2010).

La aparición y propagación de patógenos resistentes a antibióticos ha creado un serio problema en el tratamiento de infecciones, representando un riesgo para la salud pública y un desperdicio de recursos en los servicios de dicho sector. Dentro de este grupo de patógenos esta la bacteria *Salmonella* con más de 2600 serovariedades. Posee una gran capacidad de adaptación, de desarrollo de mecanismos de resistencia y es responsable de una considerable cantidad de casos de enfermedades transmitidas por alimentos en todo el mundo.

La preocupación de que la humanidad este volviendo a la era pre-antibiótica se ha vuelto muy real, y el desarrollo alternativas que frenen los estragos de los patógenos infecciosos se ha vuelto una de las principales prioridades para la medicina moderna y la biotecnología. Previo al descubrimiento y amplio uso de los antibióticos, se sugirió que las infecciones bacterianas podrían ser prevenidas o tratadas mediante la administración de bacteriófagos (Sulakvelidze et al, 2001). Esta alternativa de biocontrol requiere ser extraída del medio en el que habita para, posteriormente, descubrir las propiedades que presenta frente a diferentes estímulos que pueden influir en su mecanismo de acción. El aislamiento y la caracterización de bacteriófagos son

herramientas primordiales que permiten el acceso a potenciales fuentes de tratamiento de enfermedades y control de patógenos.

De tal manera que la presencia de *Salmonella* resistente a diferentes antibióticos hace necesaria la búsqueda de alternativas para combatirlas (Capparelli y col., 2010). Por esta razón la fagoterapia se ha usado para combatir patógenos gastrointestinales, gracias a su potencial para controlar bacterias (Callaway y col., 2006). Es por esto que el objetivo del presente trabajo es caracterizar fagos líticos específicos a *Salmonella* spp previamente aislados a partir de heces de perro callejeros de Mexicali, Baja California.

## **REVISIÓN DE LITERATURA**

### **Bacteriófagos líticos**

Los fagos líticos, son virus que infectan bacterias, llevándolas a la destrucción, debido a la multiplicación y liberación de nuevos fagos, que re-infectaran a otras bacterias de manera especie-específica. Ya que, su rango hospedero se encuentra asociado a nivel de serotipo y especie (Hagens y Lossner, 2010). Sin embargo se ha reportado que diferentes especies bacterianas pueden ser huésped de un mismo fago (Kutter y Sulakvelidze, 2004). Cada partícula fágica (virión) está formada por una nucleocápside; esta está compuesta por material genético y proteínas. De tal manera que el genoma puede ser DNA o RNA de doble o de una sola cadena; y este estará protegido por una cubierta de proteínas denominada cápside. (Clark y March, 2006; Guttman y col., 2005). Los fagos, como todos los virus, son parásitos absolutos que solo proliferan en ambientes que colonizan sus huéspedes bacterianos. Esto se debe a que a pesar de llevar toda la información para dirigir su propia replicación, no tienen la maquinaria necesaria para generar energía ni ribosomas, para la fabricación de proteínas. Es así como estos contribuyen a mantener un equilibrio dinámico entre las especies bacterianas de cualquier ecosistema natural (Kutter y Sulakvelidze, 2004; Brüssow y Kutter, 2005). Fue así como la primera observación asociada a la existencia de fagos líticos, fue reportada por Hankin en 1896, quien observo actividad antibacteriana en los ríos jumna y ganges en la India. Sin embargo el descubrimiento de los fagos líticos fue dado de manera independiente por Twort (1915) y d'Herelle (1917). Desde su

descubrimiento hasta los años 40 los fagos eran de uso común, como fármacos particularmente en Georgia, Rusia, Polonia y Estados Unidos (Summers, 2005). Sin embargo el uso terapéutico de estos fue cayendo en el olvido, debido al descubrimiento de los antibióticos (García y col. 2008; Gaviria y col. 2012).

### Estructuras de fagos

Los fagos tienen un alto nivel de especificidad, viabilidad y capacidad para proliferar rápidamente dentro del huésped apropiado. Esto es gracias a su estructura, la cual está determinada por la conformación y organización proteica de su cápside; de tal manera que estas proteínas definen la complejidad estructural y la forma de fago, ya que pueden proveerlos de cuello, cola, fibras caudales, laminas basales y/o espículas (Figura 1); su función principal es proteger al genoma viral. Además les proporciona la habilidad de permanecer viables por largos periodos de tiempo, en ambientes adversos como la exposición a ADN-asas, variaciones de pH y temperatura (Segundo y col. 2010; Gaviria y col. 2012). De modo que existen fagos icosaédricos (su genoma se encuentra condensado, su forma es casi esférica) y helicoidales (su genoma se encuentra como un filamento extendido y está rodeado por proteínas dispuestas helicoidalmente) (Maciel, 2012).

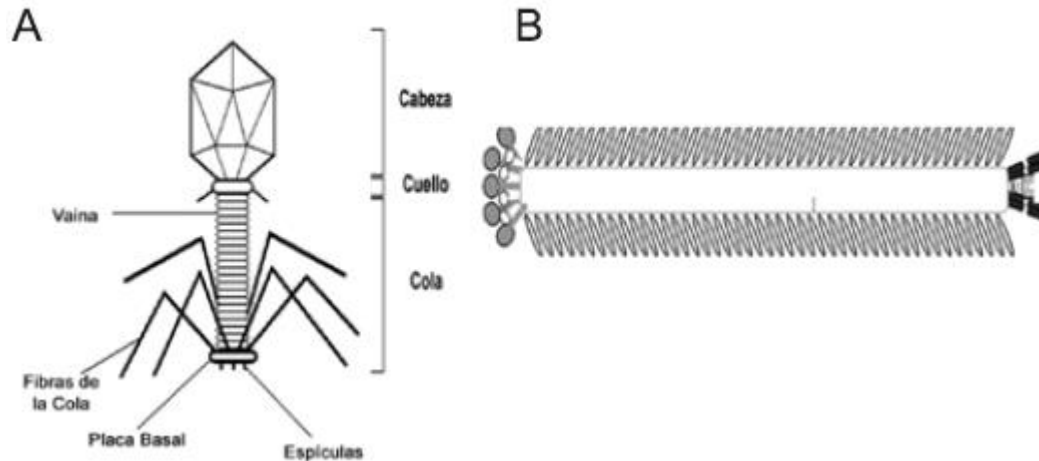


Figura 1. Estructuras proteicas que pueden componer a un fago  
**A:** fago con simetría icosaédrica; **B:** fago con simetría helicoidal o filamentososa.  
 Fuente imagen: Segundo y col. 2010

### Ciclos de replicación de los fagos

La infección fágica se inicia cuando el fago entra en contacto con una bacteria hospedadora. Sin embargo los fagos pueden ser líticos (virulentos) o temperados (lisogénicos), según su ciclo de replicación (Figura 2). El ciclo lisogénico, inicia una vez que el fago inserta su genoma en el ADN bacteriano, replicándose en cada división bacteriana, sin afectar la viabilidad de esta. Mientras que el ciclo lítico se da cuando el fago domina la maquinaria metabólica de la bacteria, dando lugar a la replicación y transcripción únicamente del genoma fágico, esto con la finalidad de formar la nueva progenie y ocasionar la muerte bacteriana (Ley de Coss, 2013; Spricigo, 2012). De manera que el primer paso se da en el reconocimiento de los receptores de la bacteria, por los contra receptores del fago. Este se fija adsorbiendo componentes específicos de la superficie bacteriana, que contengan su receptor. Una vez que ocurre la adsorción, se produce un cambio en las proteínas de la placa basal y producen

un poro en la membrana citoplasmática de la bacteria, en donde la vaina del fago inyecta y/o ingresa su material genético, mientras que la envoltura proteica del fago queda en el exterior. Estas proteínas reparan el poro de la membrana citoplasmática por donde ingreso el genoma viral y posteriormente se da la expresión de los genes tempranos del fago, lo que permite la síntesis de proteínas involucradas en la replicación del genoma vírico. Después se da la replicación del genoma fágico y la síntesis de las proteínas víricas de la expresión tardía que están implicadas en la formación de las nuevas partículas (empaquetamiento del genoma y ensamblaje de las nuevas partículas víricas), y finalmente se da la destrucción bacteriana por lisis y liberación de la nueva progenie. La forma de replicación del genoma viral es dependiente del tipo de material genético (Quiroz, 2005; Spricigo, 2012).

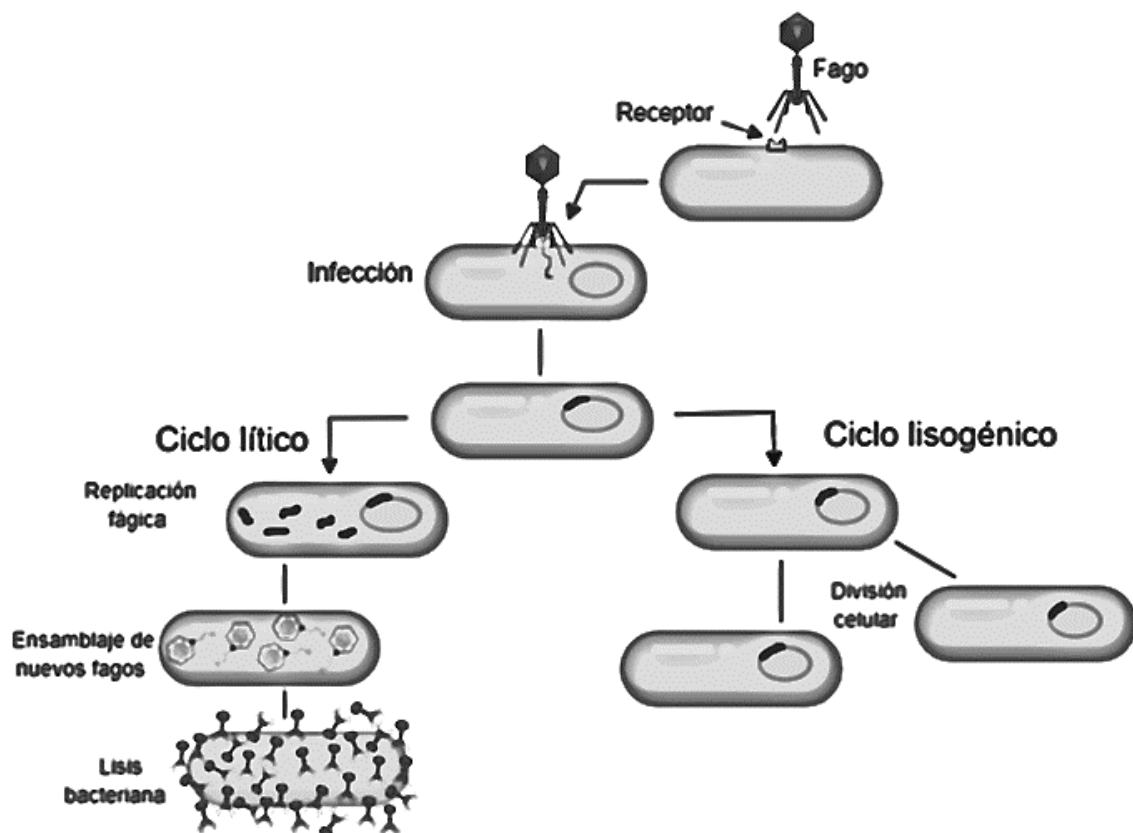


Figura 2. Ciclos de replicación fágica

### Aplicaciones de fagos líticos

En los últimos años se ha reconocido que los fagos tienen varias aplicaciones potenciales sin embargo la amenaza actual de bacterias resistentes a los antibióticos ha renovado el interés hacia los fagos líticos como agentes terapéuticos y como agentes de control biológico (García y col. 2008).

### *Fagoterapia*

Fue d'Herelle quien empezó a utilizar los fagos líticos como tratamiento para enfermedades infecciosas, desde entonces la fagoterapia ha demostrado ser una alternativa viable para enfermedades bacterianas (Segundo y col. 2010). De tal manera que la fagoterapia se refiere a la administración de fagos líticos

(virulentos), aislados directamente del paciente que es portador del patógeno bacteriano que se considera responsable de una infección crónica. Sin embargo hoy en día se busca obtener más conocimientos sobre la diversidad de los fagos y de las interacciones fago-bacteria en individuos sanos y enfermos con el fin de obtener nuevas alternativas para la prevención y/o tratamientos contra las infecciones bacterianas. Los fagos han sido administrados por varias vías (oral, tópica, intravenosa, intrapleural), sin reportar complicaciones asociadas con su uso. Se cree que los fagos son seguros por el hecho de que son comensales omnipresentes dentro de los ecosistemas (Viertel y col. 2014). Algunas de las ventajas de la terapia con fagos son: su uso como tratamiento preventivo, alternativa para bacterias resistentes a antibióticos, su alta especificidad evita el daño a la biota normal del paciente, además de que no son tóxicos para animales, plantas y humanos. A pesar de que han demostrado ser efectivos como tratamiento de enfermedades infecciosas, existen limitantes que hacen difícil su desarrollo en formas farmacéuticas, retrasando su uso. Algunas de las limitantes son: que su espectro de acción es limitado al ser altamente específicos, la concentración del fago debe ser lo suficientemente alta para permitir el contacto con la célula hospedera, se eliminan rápidamente por el sistema inmune, además de que las bacterias pueden presentar resistencia a los fagos (Jorquera y col. 2015). Sin embargo, la aplicación de cócteles fágicos (más de un fago específico contra la bacteria hospedador) puede contrarrestar la aparición de bacterias resistentes, además de aumentar la efectividad del tratamiento (Spricigo, 2012; Tamariz y col. 2014).

### *Control biológico en alimentos*

El control biológico basado en la aplicación de fagos líticos contra bacterias causantes de enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs), es relativamente nueva en comparación con su uso terapéutico y de diagnóstico. Sin embargo, la aplicación de fagos líticos en el área de inocuidad alimentaria puede abordarse en todas las etapas de producción con el enfoque de “granja a la mesa”. De tal manera que se pueden aplicar: en animales enfermos como fagoterapia, en productos crudos de origen animal y vegetal (biocontrol), en superficies y utensilios (biohigienización) y como conservadores naturales en productos manufacturados perecederos, para aumentar su vida útil (García y col. 2008). Hoy en día, diversos productos comerciales a base de fagos líticos, han sido aprobados por la Food and Drug Administration (FDA). Estos se aplican en diferentes etapas de la producción de alimentos con la finalidad de eliminar patógenos bacterianos como *L. monocytogenes*, *E. coli* y *Salmonella* spp. Sin embargo, la utilización de fagos como agentes de control biológico en alimentos presenta diversas ventajas y desventajas. Dentro de las ventajas se describen: alta especificidad, crecimiento exponencial de las partículas fágicas en presencia de su bacteria hospedero, efectos mínimos sobre la microbiota normal presente en los alimentos, además de tener bajo impacto ambiental. Por otro lado las principales preocupaciones y desventajas del uso de fagos son: la selección rigurosa (utilizar únicamente fagos líticos, estables bajo ciertas condiciones físico-químicas y temperaturas de almacenamiento), bajo rango de hospederos, alta concentración de fagos para que se dé la interacción con la bacteria hospedador, barreras físico-químicas que disminuyen la interacción bacteria-fago

(características físicas del alimento, siendo reportado un mejor efecto en alimentos líquidos que en sólidos), y por último la presencia de problemas en la percepción del consumidor (Joquera y col. 2015).

#### Aislamiento de fagos

Una de las ventajas del uso de fagos líticos es que se pueden encontrar de manera ubicua en el ambiente, de tal manera que son de fácil acceso ya que se pueden utilizar diversas fuentes para su aislamiento (suelo, aguas residuales, heces, etc.) (Albino y col. 2014; Atterbury y col. 2007). Se han reportado diversos trabajos en los que se aislaron fagos líticos. Hwang y colaboradores (2009), usaron diversas muestras ambientales (suelos de criaderos y mataderos, aguas residuales) y de pollos (piel y heces) como fuente para el aislamiento de fagos líticos; lograron aislar seis fagos para *Campylobacter jejuni* de las muestras obtenidas de los pollos. Así mismo Melo y colaboradores (2014) aislaron cinco fagos líticos para *Staphylococcus epidermidis*, a partir de aguas residuales sin embargo ellos seleccionaron el fago SEP1 por presentar mayor espectro de actividad lítica, posteriormente hicieron diversas pruebas para su caracterización. Por otro lado se reportó el aislamiento del fago A318 que infecta *Vibrio alginolyticus*, este se aisló a partir de aguas destinadas para la acuicultura en el sur de Taiwan (Lin y col. 2012). También se han reportado aislamientos de fagos líticos para *E. coli* y *Salmonella* spp., donde usaron como fuente de fagos aguas residuales (Bercieri y col. 1991).

*Salmonella* spp.

*Salmonella* es una bacteria omnipresente y resistente, puede sobrevivir durante varias semanas en un ambiente seco y varios meses en agua. De tal manera que *Salmonella* es un género de bacilos gramnegativos que pertenecen a la familia Enterobacteriaceae, y que además son anaerobios facultativos, no hemolíticos, no esporulados, ureasa y oxidasa negativos (Caffer y col. 2001). Actualmente hay 2,463 serotipos (serovares) de *Salmonella*, este género consta de dos especies *Salmonella bongori* y *Salmonella entérica*, esta última se divide en seis subespecies *S. entérica* subsp. *entérica*; *S. entérica* subsp. *salamae*; *S. entérica* subsp. *arizonae*; *S. entérica* subsp. *diarizonae*; *S. entérica* subsp. *houtenae* y *S. entérica* subsp. *indica* (Brenner y col. 2000).

De los serotipos que son específicos para animales de producción tenemos *S. Abortus ovis*, *S. Cholerae suis*, *S. Gallinarum*, *S. Abortus equi*, *S. Dublín*, estos provocan abortos y gastroenteritis principalmente en sus hospedadores. Sin embargo, cuando los humanos se infectan con estos serotipos, causan septicemia severa. De tal manera que el 99% de los serotipos de subespecie entérica, son responsables de la salmonelosis en humanos y animales (Gutiérrez y col. 2007). Sin embargo *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* son los dos serotipos de mayor importancia, ya que se transmiten de animales a humanos (zoonosis), y que además es de distribución mundial (OMS, 2018).

## Salmonelosis

La salmonelosis es una enfermedad zoonótica constituida por un grupo de infecciones provocadas por bacterias del genero *Salmonella* spp. (Fonneg y col. 2009), con manifestaciones que van desde una gastroenteritis, bacteriemia y fiebre tifoidea (Rivera y col. 2012).

### *Enfermedad en humanos*

En los humanos se suele desarrollar la enfermedad con severidad variable. De tal manera que los pacientes infectados excretan con elevada carga bacteriana al inicio de la enfermedad y esto va disminuyendo con el paso del tiempo, sin embargo algunos pacientes se convierten en portadores que pueden propagar la bacteria hasta después de tres meses. Los signos clínicos suelen comenzar de 6 a 72 horas, después de la exposición a *Salmonella* spp., estos pueden durar de 2 a 7 días. Los signos clínicos que pueden presentarse son: fiebre, náuseas, vómito, diarrea (puede ser sanguinolenta), dolor de estómago y rara vez sepsis (OMS, 2018). La transmisión de *Salmonella* spp. se puede dar por: la exposición a individuos infectados, alimentos contaminados o por exposición a condiciones ambientales donde estuvo presente la bacteria; esto último se debe a que *Salmonella* puede sobrevivir durante largos períodos en el medio ambiente, aunque no haya multiplicación significativa (Forshell y col. 2006). A pesar de que la mayoría de los casos son relativamente leves y que los pacientes se recuperan sin tratamiento específico se debe considerar de alto

riesgo en pacientes pediátricos, geriátricos y con inmunosupresión, ya que en ellos puede ser particularmente grave (Uribe y col. 2006).

### *Enfermedad en animales*

A menudo se encuentra *Salmonella* en el tracto gastrointestinal de mamíferos domésticos y salvajes, reptiles, aves e insectos (Caffer y col. 2001). De manera que estos pueden o no desarrollar la enfermedad, no obstante son portadores y propagadores potenciales de la bacteria. Los animales infectados pueden presentar vómito, diarrea (puede ser sanguinolenta), fiebre, pérdida de apetito y bajo nivel de actividad física (OMS, 2018).

### Importancia de *Salmonella* en salud pública

En la segunda mitad del siglo XX ocurrieron dos cambios importantes en la epidemiología de la salmonelosis en el mundo; en primer lugar el surgimiento de infecciones en humanos provocadas por el consumo de alimentos contaminados por *Salmonella* Enteritidis y en segundo lugar la múltiple resistencia a los antibióticos de cepas de *Salmonella* Typhimurium (Castillo y col. 2008). De tal manera que la salmonelosis representa un problema de salud pública nacional e internacional ya que se ha agudizado con la apertura económica y la globalización, esto se debe al incremento en el consumo de alimentos de origen animal (carne, huevos, lácteos, etc.) dando como resultado un mayor riesgo de infección por los cambios que se han dado durante el

desarrollo de las fases de producción de los alimentos, como son las prácticas de manejo, almacenamiento, distribución y preparación de los mismos, de tal manera que estas variaciones dan como resultado un gran problema en la higiene de los alimentos. Como es sabido *Salmonella* spp. se encuentra comúnmente en el tracto gastrointestinal y otros tejidos ocasionando la contaminación de la carne durante el sacrificio animal, así mismo los animales infectados excretan la bacteria en heces y orina dando lugar a la contaminación del ambiente, de tal manera que se ha incrementado la diseminación por vía oral. Los alimentos contaminados tienen un impacto directo sobre la salud de las colectividades, no solo debido al patógeno sino frecuentemente por la presencia de antimicrobianos que pueden contribuir a la aparición de cepas resistentes (Uribe, 2006; Rábago y col. 2010). De manera que la aparición de resistencia a múltiples agentes antimicrobianos en bacterias patógenas se ha convertido en una amenaza importante para la salud pública ya que hay menos agentes antimicrobianos disponibles o incluso a veces ninguno disponible para las infecciones causadas por estas bacterias (Magiorakos y col. 2012).

En una investigación en curso de un brote de *Salmonella* entérica realizada en el Estado de Pensilvania en EUA, las infecciones por el serotipo Paratyphi B var. L (+) tartrato (+) fueron asociadas con la exposición a las tortugas mascotas (Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2010).. Las tortugas han sido reconocidas desde hace mucho tiempo como fuentes de infecciones humanas por *Salmonella* y son un riesgo particular para los niños pequeños (CDC, 2010).

Aunque la venta o distribución de tortugas pequeñas (aquellas con una longitud de caparazón <4 pulgadas [<10,2 cm]) está prohibida en los Estados Unidos desde 1975 (con excepciones para fines científicos o educativos), todavía están disponibles para usos ilegales comprar a través de vendedores ambulantes en la calle, en los mercados de pulgas y en las ferias..

Entre el 5 de agosto de 2010 y el 26 de septiembre de 2011, un total de 132 casos de *Salmonella Paratyphi B* var. Se informó infección de L (+) tartrato + en 18 estados. La mediana de edad de los pacientes fue de 6 años (rango: <1 a 75 años), el 66% tenía menos de 10 años y el 63% eran mujeres. No se reportaron muertes. De los 56 pacientes entrevistados, 36 (64%) informaron haber estado expuestos a tortugas. Para 15 pacientes que pudieron recordar el tipo de tortuga contactada, 14 identificaron tortugas demasiado pequeñas para ser comercializadas legalmente. Cinco muestras de agua de tanques de tortugas de los hogares de los pacientes dieron positivo para la cepa del brote (cuatro de Pensilvania y una de Carolina del Sur). La investigación para rastrear la fuente de estas tortugas es difícil porque los vendedores son pasajeros. Estos casos ilustran que las tortugas pequeñas siguen siendo una fuente de infecciones humanas por *Salmonella*, especialmente para los niños pequeños (CDC, 2012).

Aunque muchos reptiles son portadores de *Salmonella*, las tortugas pequeñas representan un mayor riesgo para los niños pequeños porque se las percibe como mascotas seguras, son lo suficientemente pequeñas para colocarse en la boca y pueden manipularse como juguetes. A pesar de una prohibición de 30 años sobre las tortugas pequeñas, este brote en curso sugiere

que los esfuerzos de aplicación de la prohibición, así como los esfuerzos de educación pública, no han sido completamente exitosos y deben ser examinados. En 2010, en respuesta a una demanda presentada en 2007 por Independent Turtle Farmers of Louisiana, Inc. que buscaba revocar la prohibición, un tribunal de distrito federal confirmó la autoridad de la Administración de Alimentos y Medicamentos para hacer cumplir la prohibición (3). Es probable que la regulación de la venta de tortugas pequeñas siga siendo la acción de salud pública más eficaz para prevenir la salmonelosis asociada a las tortugas (Cohen y col., 1980, Harris y col., 2010).

#### Resistencia de *Salmonella* a los antimicrobianos

La aparición de resistencia de *Salmonella* a los antibióticos ha crecido rápidamente en diferentes partes del mundo, debido al abuso en la aplicación de estos como tratamiento en animales y humanos. Existen dos formas de transmisión de resistencia adquirida en *Salmonella*: por transmisión de material genético extra cromosómico procedente de otras bacterias o a través de mutaciones en el cromosoma bacteriano. La resistencia a los antibióticos como el cloranfenicol, ampicilina y sulfametoxazol-trimetoprim, surgen y se diseminan principalmente por la captación de nuevo material genético transferible, a diferencia de la resistencia a las fluoroquinolonas ya que es el resultado de mutaciones en el genoma bacteriano (Rivera y col. 2012). Se ha identificado una amplia variedad de genes y mutaciones mediadoras de resistencia a fenicoles,

aminoglucósidos, fluoroquinolonas y betalactámicos en *Salmonella* spp. (Michael y Schwarz, 2016).

#### Fagos líticos para *Salmonella*

Varios estudios han aplicado tratamientos con fagos líticos para contrarrestar la colonización por *Salmonella* spp., sugiriendo que los fagos pueden ser considerados como una herramienta alternativa y/o complementaria para los métodos de control y prevención de esta bacteria. Atterbury y colaboradores (2007) aislaron fagos líticos para *Salmonella* spp., ellos seleccionaron tres fagos ( $\phi$ 151,  $\phi$ 25 y  $\phi$ 10) que fueron aplicados en pollos de engorda en dos diferentes concentraciones de multiplicidades de infección (MOI), una baja (9.0 long 10 PFU/ml) y una alta (11.0 long 10 PFU/ml). De tal manera que ellos reportan no haber observado reducción significativa de la colonización por *Salmonella* spp., utilizando la concentración mínima del fago a pesar de haber obtenido un incremento en la titulación del mismo, por otro lado ellos reportan que observaron reducción significativa de la colonización cecal de la bacteria, utilizando una alta titulación del fago. Así mismo Borie y colaboradores (2008) usaron un fago (f3SE) para reducir la incidencia de *S. Enteritidis* en pollos. Ellos aplicaron diferentes tratamientos donde utilizaron fagos a diferentes concentraciones (MOI de  $1 \times 10^6$  UFP/dosis y de  $10 \times 10^7$  UFP/dosis), además de administrar *S. Enteritidis* por vía oral. Después de 10 días pos infección los pollos fueron sometidos a eutanasia para tomar muestras intestinales y un pool de órganos (bazo, hígado y corazón). Ellos detectaron la presencia de fagos en

intestino y en órganos de tal manera que demostraron que el fago que se utilizó presentó una permanencia sistémica contribuyendo a una potencial ventaja en la prevención de futuras reinfecciones en las aves. Además de que no observaron lesiones macroscópicas sugerentes a alguna patología lo que refuerza el concepto de inocuidad de los fagos. Por otro lado Gong y colaboradores (2017) usaron un cóctel de fagos líticos ( $\phi$ jc1,  $\phi$ s5p2,  $\phi$ 29,  $\phi$ 52,  $\phi$ 1pb y  $\phi$ vca1) para reducir la contaminación por *Salmonella* spp., en botas de trabajadores. Ellos aplicaron diferentes tratamientos por inmersión y/o remojo de las botas, en los que incluían el cóctel de fagos. De tal manera que ellos reportan que existen muchos factores que afectan la efectividad de los fagos como desinfectante habitual, sin embargo reconocieron que presentaron mayor efectividad combinados con otro tipo de herramienta (hipoclorito de sodio o cepillado) que ayude a aumentar la efectividad de estos.

## **MATERIALES Y METODOS**

### Localización del área de estudio

El presente trabajo se desarrolló en el laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Investigación en Ciencias Veterinarias (IICV) de la Universidad Autónoma de Baja California (UABC); carretera Mexicali-San Felipe Km 3.5, Laguna Campestre, Mexicali, B. C., México.

### Cepa bacteriana

Se utilizó una cepa de *Salmonella* identificada con el número 488, del cepario de *Salmonella* spp. del laboratorio de Biología Molecular del IICV, obtenida de heces de perros en Mexicali (cortesía del Dr Tomas Rentería Evangelista y MC. Karla Michelle Núñez Castro). El aislado fue identificado bacteriológicamente, confirmado por medio del sistema API20e y la técnica de PCR dirigido al gen *InvA*.

El aislado fue sembrado en caldo de cultivo Luria Beltrani (LB), se incubó a 37 °C con agitación de 250 rpm por un periodo de 24 horas; posterior a esto se resembraron en cajas Petri con agar base LB y se incubaron a 37°C por un periodo de 18 a 24 horas y después se almacenaron a 4°C, para su posterior utilización. Además, se utilizaron caldos de cultivo fresco, de 3 a 5 horas de crecimiento bacteriano y cajas Petri con agar LB pre-calentadas en incubadora (de 2 a 3 horas), esto para las pruebas con fagos. Los medios se prepararon y esterilizaron siguiendo las recomendaciones indicadas por los fabricantes.

Para los experimentos de los bacteriófagos, cada día del experimento se preparó el cultivo fresco, inoculando en el medio líquido LB el cultivo de la bacteria hospedera, seguido por incubación a 37°C con agitación por 3-5 horas en crecimiento exponencial con una densidad óptica a 600 nm ( $OD_{600}$ ).

Adicionalmente se realizó el aislamiento de *Salmonella* spp a partir de heces de reptiles y fueron identificados por el PCR del gen *Inv A*.

#### Susceptibilidad antibiótica

Para determinar la susceptibilidad antibiótica de las nuevas cepas de *Salmonella* spp aislados del reptiles se llevó a cabo la técnica de difusión en agar utilizando sensidiscos de la marca Bio-Rad® para Gram negativos y cajas con medio agar Muller-Hinton (MH, MCDLAB) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Primero se creció un caldo de 18 a 24 horas, el cual fue diluido en PBS hasta alcanzar una turbidez comparable con el estándar 0.5 MacFarland (va de  $1$  a  $2 \times 10^{-8}$  UFC/ml). Una vez que se llegó a la turbidez deseada se sembró sobre la caja de agar MH, con ayuda de un hisopo estéril, distribuyendo la muestra en toda la superficie; después de 3 a 5 minutos se colocó un sensidisco en cada caja y se incubó a 37°C durante 18 horas. Una vez transcurrido el tiempo se examinó cada caja, de manera que los resultados se clasificaron como resistencia intermedia, sensible y resistente, según el diámetro del halo de inhibición (CLSI, 2012), formado de acuerdo al rango de referencia de los sensidiscos

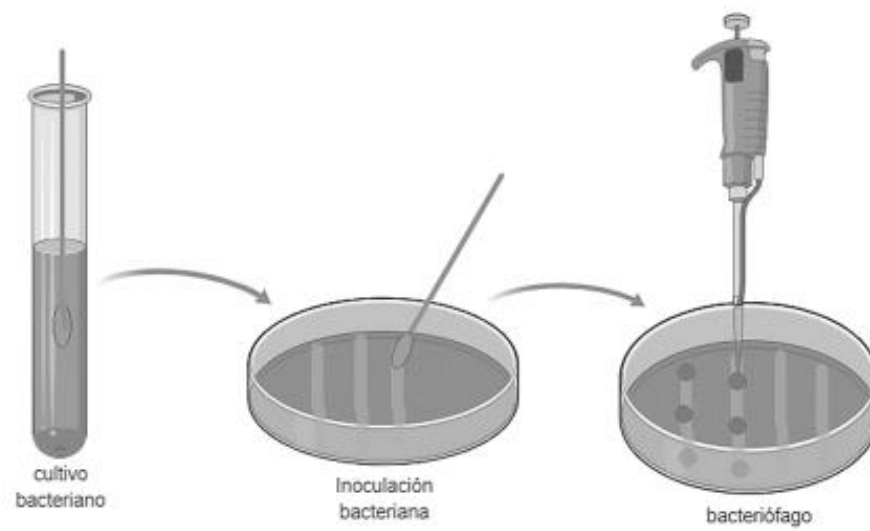
Cada sensidisco cuenta con los siguientes antibióticos: amikacina (AK) 30 µg, ampicilina (AM) 10 µg, cefalotina (CF) 30 µg, cefepime (FEP) 30 µg, cefotaxima (CTX) 30 µg, ceftriaxona (CRO) 30 µg, cloranfenicol (CL) 30 µg, gentamicina (GE) 10 µg, levofloxacin (LEV) 5 µg, netilmicina (NET) 30 µg, nitrofurantoina (NF) 300 µg, trimetoprim-sulfametoxazol (SXT) 25 µg.

### Bacteriófago

Se utilizó el bacteriófago 488, aislado por Diaz (2017) a partir de heces de perro, utilizando como cepa bacteriana indicadora la *Salmonella* identificada con el mismo número.

### Prueba de gota

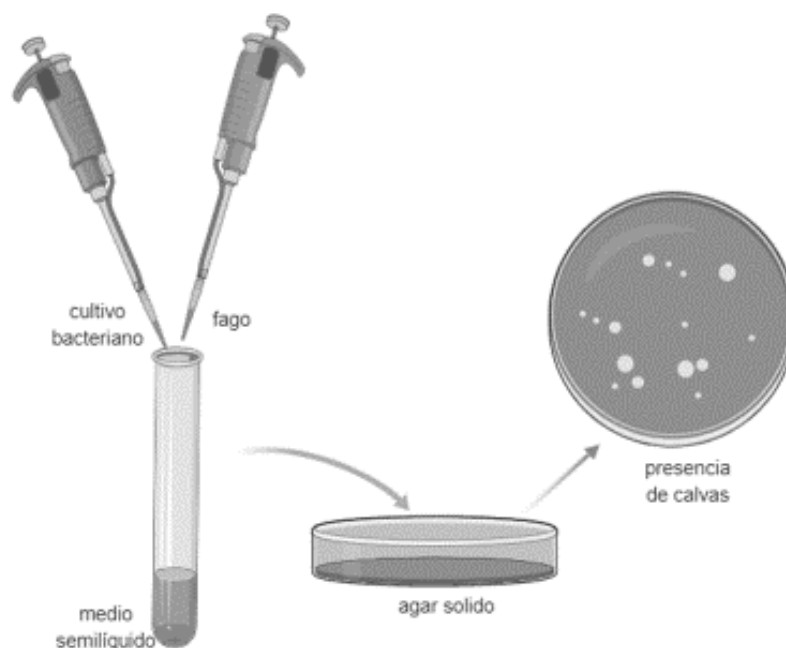
Primero se preparó una caja Petri para inocular la bacteria hospedera haciendo líneas con ayuda de un hisopo estéril y posteriormente se añadieron gotas (5 ml) de la muestra de fago sobre la bacteria inoculada, para después incubar las cajas a 37°C por 24 hrs. Posteriormente se examinaron las cajas, se identificaron zonas de lisis transparentes o parcialmente transparentes sobre el tapete bacteriano y para finalmente dar como positiva la presencia fagos en la muestra.



**Figura 3.** Prueba de gota

## Ensayo de doble capa

Una vez que se detectó la presencia de un posible fago lítico en la prueba de gota, se realizó el ensayo de doble capa con la finalidad de poder observar y corroborar la presencia de calvas (zonas transparentes o claras). Esta prueba consiste en la sobre posición de agar blando mezclado con bacteria hospedadora y fago lítico; sobre una base de agar sólido, que finalmente permite observar calvas sobre el agar.

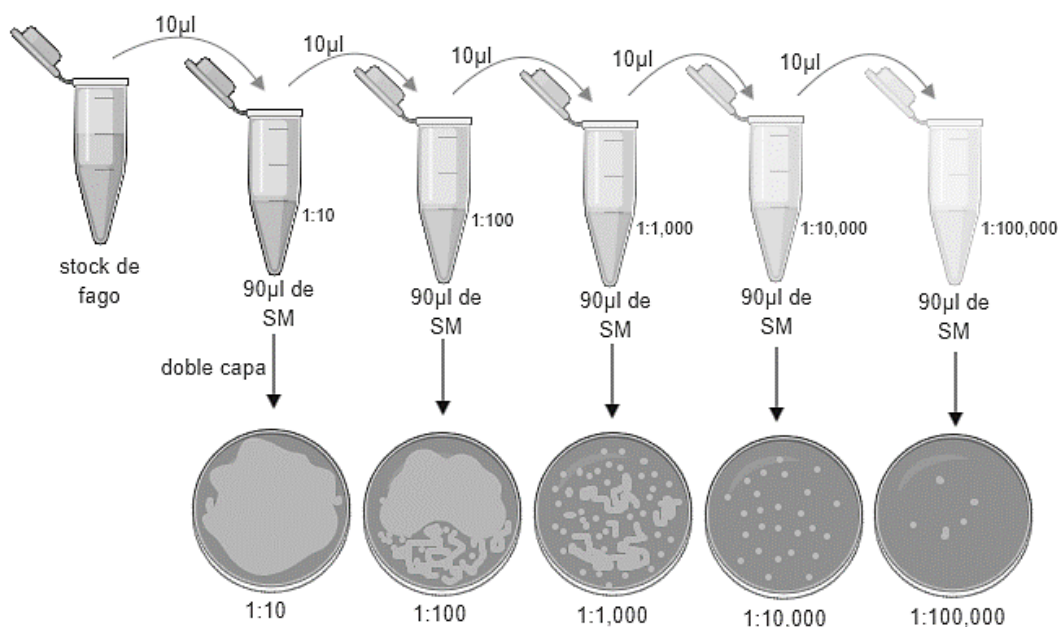


**Figura 4.** Prueba de doble capa

## Titulación

Una vez que se tiene el stock de fagos, se procedió a realizar la titulación del mismo, calculando el número de partículas víricas infectivas por ml. Se tomaron 10  $\mu$ L del stock y 90  $\mu$ L de buffer SM para mezclarse en un tubo eppendorf. De esta mezcla se tomaron 10  $\mu$ L, se pasaron a otro tubo con 90  $\mu$ L de buffer SM y así sucesivamente. De cada tubo se realizó la prueba de doble capa con 100  $\mu$ L de la bacteria hospedera y 10  $\mu$ L de muestra diluida para observar la cantidad de calvas presentes, realizando el conteo y calculando su titulación en unidades formadoras de fagos por mililitro (PFU/ml= Plaque Forming Units/ml) con la siguiente formula:

$Pfu/ml = \text{No. de calvas} \times \text{factor de dilución} \times \text{factor de volumen inoculado}$



**Figura 5.** Titulación del fago

Amplificación del bacteriófago “stock de trabajo”.

En un matraz conteniendo 500 ml de caldo LB suplementado con NaCl 1%, se agregó 5 ml de un cultivo en fase logarítmica de la cepa y 5 ml del lisado fágico y se incubó a 25°C por 24 horas. Transcurrido el tiempo de incubación, se procedió a la remoción de los restos bacterianos mediante centrifugación, a 3300 g por 15 minutos y el sobrenadante fue filtrado a través de una membrana de 0,22  $\mu\text{m}$  de porosidad. Los filtrados obtenidos (stock de trabajo) se mantuvieron a 4°C.

Efecto de la temperatura sobre la estabilidad del bacteriófago

La prueba de la estabilidad térmica se realizó con 100  $\mu\text{L}$  de muestra de bacteriófagos con un título de  $1 \times 10^9$  pfu/ml, dispensados en tubos eppendorf los cuales contenían 900  $\mu\text{L}$  de buffer SM y sometidos a temperaturas de 10, 20, 30, 40, 50, 60 y 70°C (Eppendorf Thermomixer R), por 1 hora. Concluido el tiempo, se determinó el título final de los bacteriófagos mediante la técnica de la doble capa.

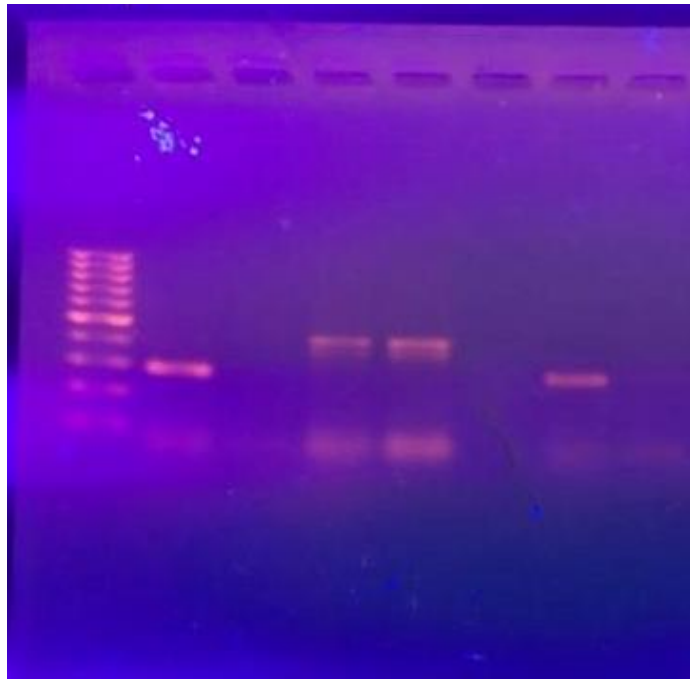
Resistencia del fago al pH

La prueba de sensibilidad a diferente pH se hizo tomando 100  $\mu\text{L}$  de bacteriófagos en solución buffer SM con un título de  $1 \times 10^9$  pfu/ml los cuales se

pasaron a tubos eppendorf con 1 ml de PBS con pH ajustado (4,5,6,7, 7.4,8,9 y Ctrl) utilizando HCl o NaOH a 25°C durante una hora. Culinado el tiempo, se determinó el título final de los bacteriófagos mediante la técnica de la doble capa.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se aislaron tres bacterias gram negativo a partir de muestras de heces de tortuga y dragón barbudo y se denominaron T2 y T3 de dos aislados de *Gopherus agassizii* y D1 de un aislado de *Pogona vitticeps*. Los resultados de del PCR del gen de InvA confirmó que el D1 es *Salmonella* spp. T2 y T3 no fueron sometidos por más análisis de identificación.



**Figura 6..** Amplificación del gen InvA

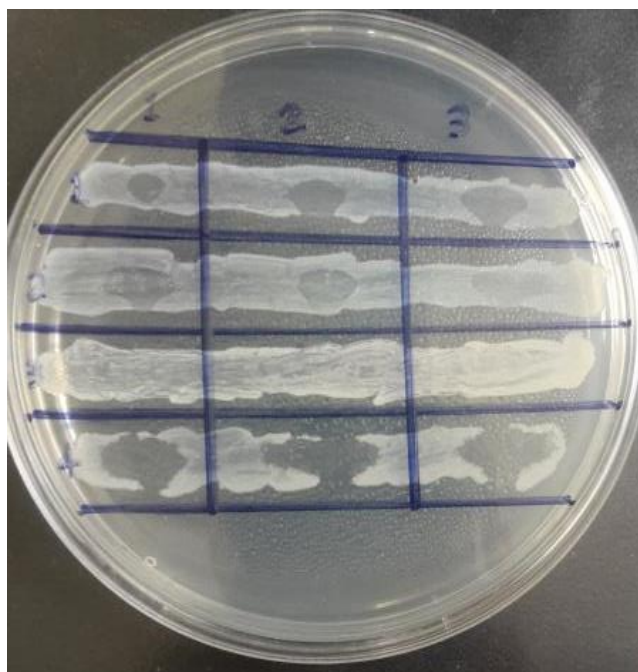


**Figura 7.** . Análisis de resistencia a antibióticos con mediante multidiscos® Gram negativo.

	NF	CB	PEF	NET	GE	CTX	SXT	AK	AM	CRO	CL	CF
D1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
T2	I	I	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R
T3	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R

**Cuadro 1.** . Resistencia fenotípica a antibióticos de bacterias aisladas de reptil y anfibios de mascotas

El aislado del *Salmonella* spp D1 fue sensible a antibióticos utilizados en el análisis, mientras los dos aislados T2 y T3 mostraron perfil de resistencia similar siendo resistente a ampicilina (AM), cefalotina (CF). Para la carbenicilina (CB) el T2 fue resistente mientras T3 mostró una sensibilidad intermedia, a parte de contar una sensibilidad intermedia contra nitrofurantoína (NF).

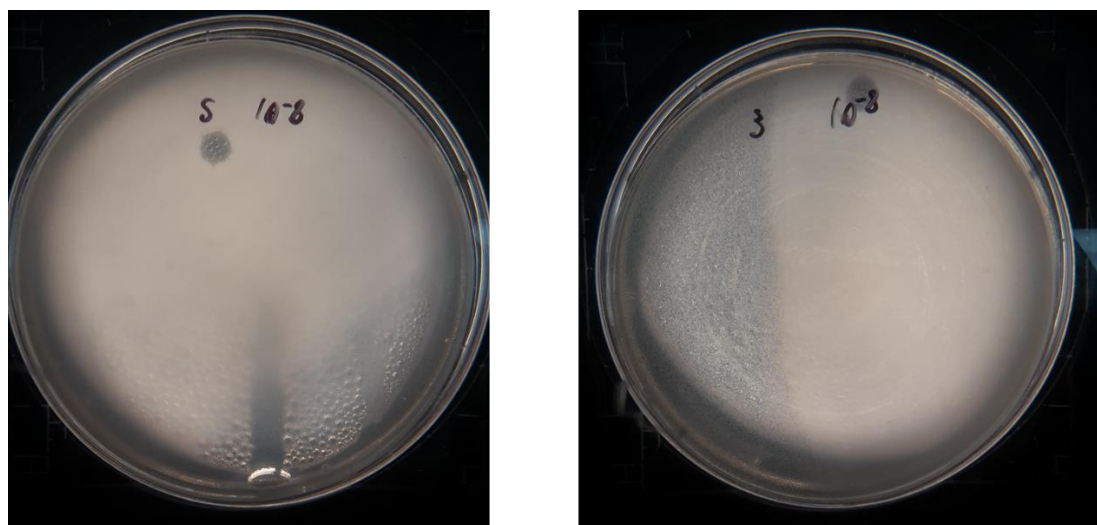


- **Figura 8.** Actividad lítica del fago 488 amplificado.

Identificación del fago 488. 1 (alíquota original del 488), 2 (lisado placas sin filtración), 3 (lisado de placas filtrado). Las 4 tiras de bacterias representan diferentes aislados de *Salmonella* spp. susceptibles al fago 488.

Después de la amplificación del fago 488 por las placas lisadas, se compararon las actividades líticas del fago almacenado sin filtración y fagos filtrados para eliminar residuales bacterias. No había diferencias notorias en los patrones de lisis en la prueba de gotas, por lo que se continuó almacenando la mayor porción del fago sin filtración.

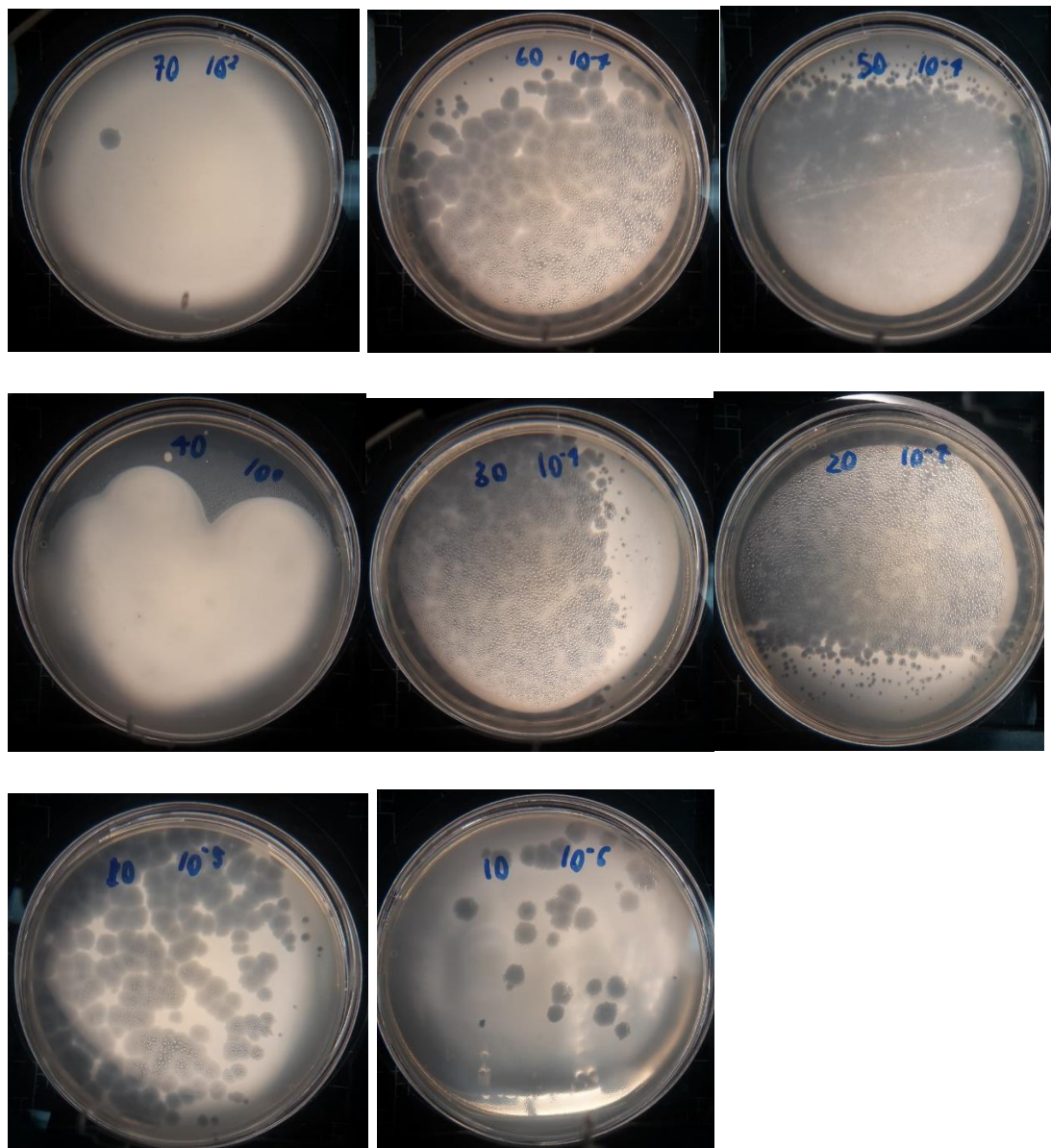
Después del periodo de incubación se observaron las cajas de la prueba de doble capa para determinar la titulación del amplificado, en ambas muestras se obtuvo una sola calva de gran tamaño en la caja plaqueada con la dilución de  $10^{-8}$ , por lo que se tituló la muestra con  $1 \times 10^9$  PFU/ml.



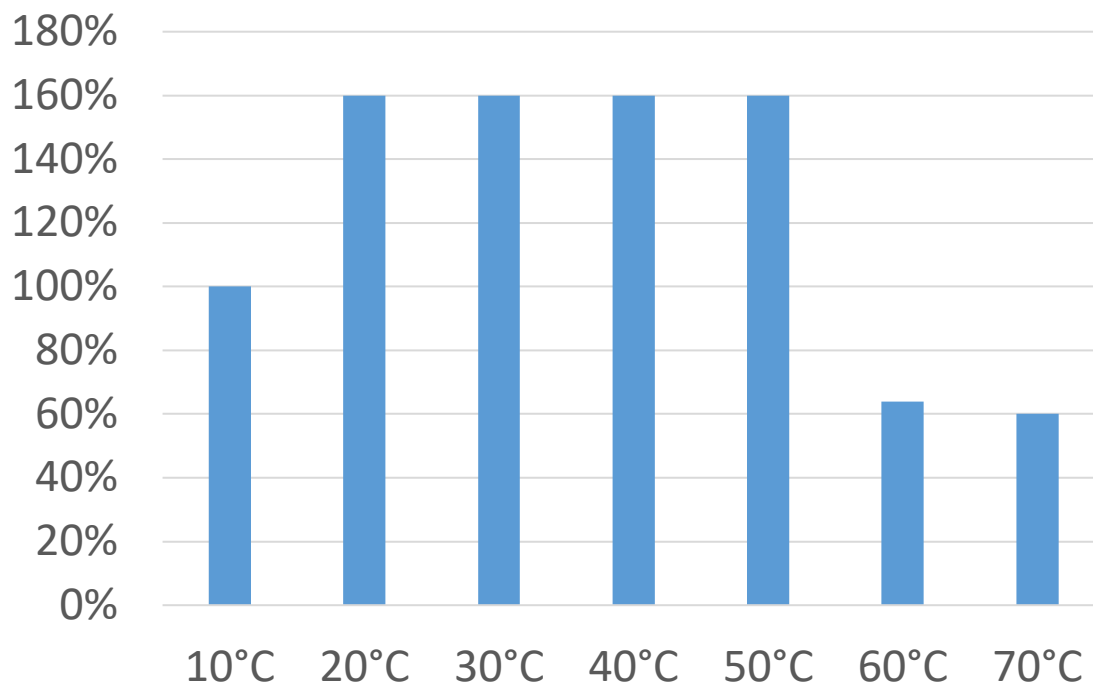
**Figura 9.** Titulación final ( $1 \times 10^9$  PFU/ml) del fago 488 amplificado.

En el caso de las pruebas de viabilidad a diferentes temperaturas, se analizaron las cajas después de 24 horas de incubación y se determinó el título para cada caja. Aparentemente los títulos se conservaron desde los  $10^\circ\text{C}$  hasta los  $60^\circ\text{C}$ , pero al llegar a  $70^\circ\text{C}$  se obtuvo una disminución significativa ( $2 \times 10^4$  PFU/ml).

Las calvas observadas en las cajas plaqueadas con la muestra sometida a  $10^\circ\text{C}$  resultaron similares a las calvas obtenidas después de plaquear la muestra almacenada a  $4^\circ\text{C}$  sin tratamiento alguno (calvas de gran tamaño). Las muestras tratadas con temperaturas desde  $20^\circ\text{C}$  a  $50^\circ\text{C}$  resultaron con calvas con dimensiones menores. De los  $60^\circ\text{C}$  en adelante la morfología de las calvas volvió a ser similar a la obtenida a temperaturas menores a  $20^\circ\text{C}$ .



**Figura 10.** Efectos de temperatura en actividad lítica del fago 488.



**Figura 11.** Determinación del rango de temperatura óptima del fago 488

La actividad lítica del fago 488 analizado por número de calvas en la prueba de doble capa tuvo su rango de temperatura óptima de 20-50 °C. En la temperatura arriba del 60 °C, la reducción de número de calvas fueron más de 60 %, mientras en la temperatura a 10 °C se observó una reducción de 37% de número de calvas.

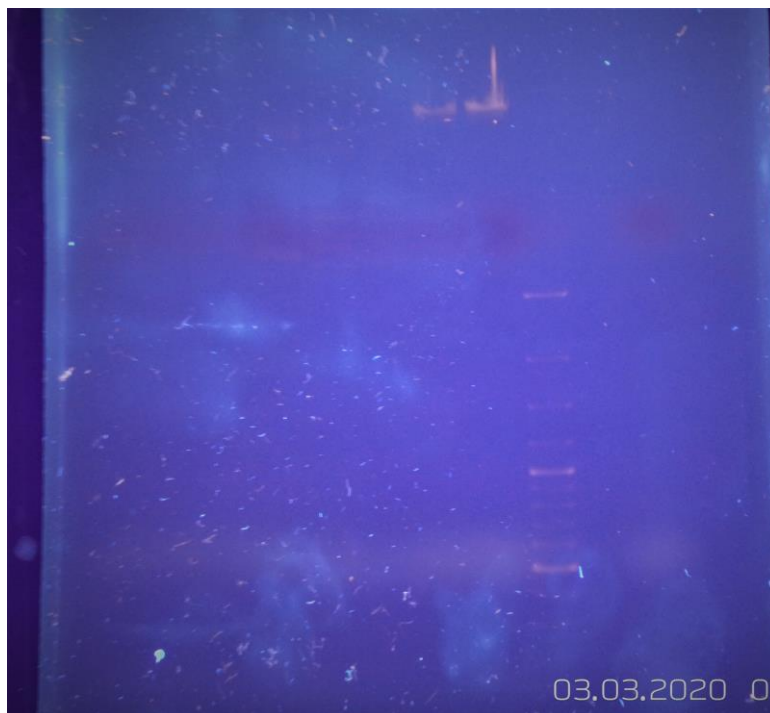
La razón de que se incrementó 60 % de número de calvas en tratamientos de 20-50°C comparado con el control negativo podría ser por el tiempo de incubación que posiblemente resultó reducir la agregación de las partículas de fagos ya que el fenómeno de agregación de fagos es la causa de subestimación del título de fagos líticos (Guttmann y col. 2015).

En el caso de la viabilidad del fago a los cambios de pH, se observó alta actividad en las diluciones de  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$  con pH desde 4 a 7. En las diluciones de  $10^{-4}$  la actividad se mantuvo estable hasta alcanzar pH de 4, donde disminuyó ligeramente. Al aumentar la dilución a  $10^{-5}$ , naturalmente se obtienen menos títulos en todas las muestras, y de la misma forma que en la dilución de  $10^{-4}$ , la disminución ocurre en el pH de 4. En las cajas con las muestras sometidas a pH de 8,9, el control (para  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$ ), 6 y 5 (para  $10^{-5}$ ) no fue posible hacer un conteo de calvas ya fuere por ausencia de estas o por crecimiento severo de bacterias.

pH	Dilución plaqueada			
	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$
Ctrl (pH 8)	Contaminación	Contaminación	+++	++
9	Sin actividad	Sin actividad	Sin actividad	Sin actividad
8	Contaminación	Contaminación	Contaminación	Contaminación
7	+++	+++	+++	++
6	+++	+++	+++	ND
5	+++	+++	+++	ND
4	+++	+++	++	+

Porcentajes de sobrevivencia del fago 488 a diferentes pH. El número de calvas observadas se representa como: +(10/pfu), ++(100/pfu), +++(>1000/pfu). ND: no determinado.

**Cuadro 3.** Determinación del rango de pH óptimo del fago 488



**Figura 12.** Estimación del tamaño de ADN genómico del fago 488.

DNA genómico extraído fue digerido por la enzima EcoRI y fue analizado por la electroforesis del gel de agarosa a 0.6%. Se comparó con los marcadores del tamaño del ADN y se determinó el tamaño de genoma como entre 40-50kb.

## **CONCLUSIONES**

- El fago 488 demostró la actividad lítica óptima en el rango de temperatura de 20-50 °C.
- El rango de pH óptimo del fago 488 no fue determinado con la exactitud, solo se confirmó su actividad entre pH 4-7.
- Es necesario descartar el mecanismo físico de la termoresistencia y resistencia a pH acida como por ejemplo las agregaciones de los fagos.
- Se determinó el tamaño aproximado del genoma de ADN como 40-50kb, facilitando el futuro estudio de secuenciación del genoma completo para identificar genes involucrados en el reconocimiento y lisis del hospedador específico.
- Reptiles y anfibios de mascota son fuentes de infección por Salmonella dentro de hogares por lo que será necesario realizar más estudios sobre bacterias resistentes a antibióticos asociados a estos animales.

## LITERATURA CITADA

- Abedon, S.T. (2012) Phages. En Hyman, P., Abedon, S. T. Bacteriophages in Health and Disease. Cabi.
- Ackermann, H.W., d'Hérelle, F. (1997). Découvreur des bactériophages. Med. Sci. 8 3–6.
- Ackermann, H. W. (2001) Frequency of morphological phage descriptions in the year 2000. Brief review. Arch Virol 146: 843-857.
- Ackermann, H. W. (2003). Bacteriophage observations and evolution. Research in Microbiology, 154(4), 245-251.
- Ackermann HW (2011) Bacteriophage taxonomy. Microbiol Aust 32(2):90–94
- Adams, M.H. (1959). Bacteriophages. Interscience Publishers, Inc.
- Besser, J. M. (2018). Salmonella epidemiology: A whirlwind of change. Food microbiology, 71, 55-59.
- Bigwood, T., Hudson, J. A., Billington, C., Carey-Smith, G. V., Heinemann, J. A., (2008). Phage inactivation of foodborne pathogens on cooked and raw meat. Food Microbiol. 25, 400–406.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2010). Multistate outbreak of human Salmonella typhimurium infections associated with pet turtle exposure- United States, 2008. MMWR. Morbidity and mortality weekly report, 59(7), 191-196.

- CDC (2012), Notes from the Field: Outbreak of Salmonellosis Associated with Pet Turtle Exposures — United States, 2011 MMWR. Morbidity and mortality weekly report, 61(04);79
- Clokie, M., Kropinski, A., Lavigne, R. (2018). Bacteriophages: Methods and Protocols, Volume 3. Springer International Publishing.
- Cohen ML, Potter M, Pollard R, Feldman R. (1980) Turtle-associated salmonellosis in the United States. JAMA ;243:1247–9.
- Contreras, M. B., Medrano, J. A., Ibarra, J. R., Martínez, J., Chaidez, Q. C., Castro-del Campo, N. (2019). Los últimos 50 años de Salmonella en México: Fuentes de aislamiento y factores que influyen en su prevalencia y diversidad. Revista bio ciencias, 6(spe), e540.
- Deresinski, S. (2009). Bacteriophage therapy: exploiting smaller fleas. Clin. Infect. Dis. 48:1096–1101.
- d’Herelle, F. (1917) Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques. Compt Rend Acad Sci. 165, 373–375, 1917.
- El-DougDoug, N. K., Cucic, S., Abdelhamid, A. G., Brovko, L., Kropinski, A. M., Griffiths, M. W., Anany, H. (2019). Control of Salmonella Newport on cherry tomato using a cocktail of lytic bacteriophages. Int J Food Microbiol, 293, 60-71.

- Emmerich, R., Löw, O. (1901) Die künstliche Darstellung der immunisierenden Substanzen (Nucleasen-Immunitätsproteine) und ihre Verwendung zur Therapie der Infektionskrankheiten und zur Schutzimpfung and Stelle de Heilserums. *Zeitsch f Hyg u Infektionskrankh*, 36, 9.
- Ferrari, R. G., Rosario, D. K. A., Cunha-Neto, A., Mano, S. B., Figueiredo, E. E. S., Conte-Junior, C. A. (2019) Worldwide epidemiology of Salmonella serovars in animal-based foods: a metaanalysis. *Appl Environ Microbiol* 85:e00591-19.
- Fujiwara, A., Fujisawa, M., Hamasaki, R., Kawasaki, T. (2011) Biocontrol of *Ralstonia solanacearum* by treatment with lytic bacteriophages. *Appl Environ Microbiol* 77(12):4155–4162
- Gast, K R., Robert E. P. (2020). *Salmonella infections. Diseases of Poultry*. John Wiley and Sons.
- Golshahi, L., Seed, K. D., Dennis, J. J., & Finlay, W. H. (2008). Toward modern inhalational bacteriophage therapy: nebulization of bacteriophages of *Burkholderia cepacia* complex. *Journal of aerosol medicine and pulmonary drug delivery*, 21(4), 351-360.
- Griffiths, M. W. (1996) The role of ATP bioluminescence in the food industry: new light on old problems. *Food Technol.* 50:62–72.
- Griffiths, W. M. (2010) Phage-based methods for the detection of bacterial pathogens. En Sabour, P. M., Griffiths, W. M. *Bacteriophages in the control of food and waterborne pathogens*. ASM Press.
- Guttman, B., Raya, R., Kutter, E. (2005) *Basic Phage Biology*. En Kutter, E., Sulakvelidze, A. (2004). *Bacteriophages: biology and applications*. Crc press.

- Guenther, S., Herzig, O., Fieseler, L., Klumpp, J., Loessner, M.J., (2012) Biocontrol of *Salmonella* Typhimurium in RTE foods with the virulent bacteriophage FO1-E2. *Int. J. Food Microbiol.* 154, 66–72.
- Hammerum, A.M., Larsen, J., Andersen, V.D., Lester, C. H., Skovgaard Skytte, T. S., Hansen, F., Olsen, S. S., Mordhorst, H., Skov, R. L., Aarestrup, F. M., Agerso, Y. (2014) Characterization of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* obtained from Danish pigs, pig farmers and their families from farms with high or no consumption of third- or fourth-generation cephalosporins. *J Antimicrob Chemother.*;69(10):2650-7.
- Hankin, E. H. (1896). L'action bactericide des eaux de la Jumna et du Gange sur le vibrion du cholera. *Ann. Inst. Pasteur* 10:511.
- Harris J, Neil K, Barton Behravesh C, Sotir M, Angulo F. Recent multistate outbreaks of human *Salmonella* infections acquired from turtles: a continuing public health challenge. *Clin Infect Dis* 2010;50:554–9.
- Harrison, E.M., Paterson, G.K., Holden, Larsen, J., Stegger, M., Larsen, R. A., Petersen, A., Skov, L. R., Christensen, M. J., Zeuthen, A. B., Heltberg, O., Harris, S. R., Zadoks, R. N., Parkhill, J., Peacock, S. J., Holmes, M. A. (2013) Whole genome sequencing identifies zoonotic transmission of MRSA isolates with the novel *mecA* homologue *mecC*. *EMBO Mol Med* 5:509–515
- Hawkins, C., Harper, D., Burch, D., Änggård, E., Soothill, J. (2010). Topical treatment of *Pseudomonas aeruginosa* otitis of dogs with a bacteriophage mixture: a before/after clinical trial. *Veterinary microbiology*, 146(3-4), 309-313.

- Hernandez, E., Segundo, N., Oliver, V., Oscar, A. (2010). Los bacteriófagos como una alternativa en el tratamiento de enfermedades infecciosas Bacterianas (Fagoterapia). *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 41. 17-26.
- Huang, C., Shi, J., Ma, W., Li, Z., Wang, J., Li, J., Wang, X. (2018) Isolation, characterization, and application of a novel specific *Salmonella* bacteriophage in different food matrices. *Food Res Int.*;111:631-641.
- Huff, W. E., Huff, G. R., Rath, N. C., Balog, J. M., Donoghue, A. M. (2003). Bacteriophage treatment of a severe *Escherichia coli* respiratory infection in broiler chickens. *Avian diseases*, 47(4), 1399-1405.
- Hyman, P., Abedon, S. T. (2012). *Bacteriophages in Health and Disease*. Cabi.
- Jassim, S. A. A., Abdulmir, A.S., Abu Bakar, F. (2010) Methods for bacteriophage design. WO/2010/064044.
- Jassim, S. A., Limoges, R. G. (2017). *Bacteriophages: Practical Applications for Nature's Biocontrol*. Springer International Publishing.
- Jiang, C., Shaw, K.S., Upperman, C.R., Blythe, D., Mitchell, C. and Murtuguddes. (2015). Climate change, extreme events and increased risk of salmonellosis in Maryland, USA: Evidence for coastal vulnerability. *Environment International*, 83: 58-62.
- Jiménez, M., Martínez-Urtaza, J., Chaidez, C. (2011). Geographical and Temporal Dissemination of *Salmonellae* Isolated from Domestic Animal Hosts in the Culiacan Valley, Mexico. *Microbial Ecology*, 61: 811-820.

- Jiménez, M., Martínez, J. U., Rodríguez, M. X. A, Leon, J. F. Chaidez, C. (2014). Prevalence and genetic diversity of *Salmonella* spp. in a river in a tropical environment in Mexico. *Journal Of Water And Health*, 12(4): 874-884.
- Karthik, K., Muneeswaran, N. S., Manjunathachar, H. V., Gopi, M., Elamurugan, A., & Kalaiyarasu, S. (2014). Bacteriophages: effective alternative to antibiotics. *Adv. Anim. Vet. Sci*, 2(3S), 1-7.
- Krueger, A. P., Scribner E. J. (1941). The bacteriophage: its nature and its therapeutic use. *JAMA* 116:2160–2167.
- Kurtböke, I. (2012) Bacteriophages. InTech.
- Kutateladze, M., Adamia, R. (2010). Bacteriophages as potential new therapeutics to replace or supplement antibiotics. *Trends Biotechnol*, 28(12), 591-595.
- Kutter, E., Sulakvelidze, A. (2005). Bacteriophages: biology and applications. Crc press.
- Kutter, E., De Vos, D., Gvasalia, G., Alavidze, Z., Gogokhia, L., Kuhl, S., & Abedon, S. T. (2010). Phage therapy in clinical practice: treatment of human infections. *Current pharmaceutical biotechnology*, 11(1), 69-86.
- Levantesi, C., Bonadonna, L., Briancesco, R., Grohmann, E., Toze, S., & Tandoi, V. (2012). *Salmonella* in surface and drinking water: occurrence and water-mediated transmission. *Food Research International*, 45(2), 587-602.
- Majowicz, S.E., Musto, J., Scallan, E., Angulo, F.J., Kirk, M., O'Brien, S.J., Jones, T.F., Fazil, A., Hoekstra, R.M. (2010) The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. *Clinical Infectious Disease* 50:882-889.

- Mathur M., Vidhani S., Mehndiratta, P., 2003. Bacteriophage Therapy: An alternative to conventional antibiotics. *Journal API*, 51:593-596.
- Matinkhoo, S., Lynch, K. H., Dennis, J. J., Finlay, W. H., Vehring, R. (2011). Spray-dried respirable powders containing bacteriophages for the treatment of pulmonary infections. *Journal of pharmaceutical sciences*, 100(12), 5197-5205.
- Merril, C.R., Scholl, D., Adhya, S.L. (2003) The prospect for bacteriophage therapy in Western medicine. *Nat Rev Drug Discov* 2:489–497
- Nataro, J., Bopp, C., Fields, P., Kaper, J., Strockbine, N. (2011) Escherichia, Shigella, and Salmonella” en *Manual of Clinical Microbiology*. Versalovic, J., Carroll, K., Funke, G., Jorgensen, J., Landry, M., Warnock, D. pp. 603–626, ASM Press, Washington, DC., USA, 10th edition.
- Olarte, J., Galindo, E. (1973) Salmonella typhi resistant to chloramphenicol, ampicillin, and other antimicrobial agents: Strains isolated during an extensive typhoid fever epidemic in Mexico. *Antimicrob Agents Chemother*. 4:597-601.
- Olsen, E. V., I. B. Sorokulova, V. A. Petrenko, I. H. Chen, J. M. Barbaree, and V. J. Vodyanoy. (2006) Affinity-selected filamentous bacteriophage as a probe for acoustic wave biodetectors of Salmonella typhimurium. *Biosens. Bioelectron*. 21: 1434–1442.
- Page, S.W., Gautier, P. (2012) Use of antimicrobial agents in livestock. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 31(1):145–188
- Pfankuch, E., Kausche, G.A. (1940). Isolierung und übermikroskopische Abbildung eines Bakteriophagen, *Naturwissenschaften* 28 46.

- Ponce de León R. S., Arredondo, H. R., Lopez, V. Y. (2015). La resistencia a los antibióticos: Un grave problema global. *Gaceta médica de México*, 151(5), 681-689.
- Pui, C.F., Wong, W.C., Chai, L.C., Tunung, R., Jeyaletchumi, P., Noor, H.M.N., Ubong, A., Farinazleen, M.G., Cheah, Y.K., Son, R. (2011) Salmonella: A foodborne pathogen. *Int. Food Res. J* 18: 465-473.
- Rodríguez, N. E., León, G. G., Petersen, M. S., Pérez, G. H. R., González, D. E., Morfín, O. R. (2014). La evolución de la resistencia bacteriana en México, 1973-2013. *Biomédica*, 34(1),181-190.
- Romillo, E. T. 1973. Bacteriófagos. Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico. Departamento de Asuntos Científicos, Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos.
- Ryan, E. M., Gorman, S. P., Donnelly, R. F., & Gilmore, B. F. (2011). Recent advances in bacteriophage therapy: how delivery routes, formulation, concentration and timing influence the success of phage therapy. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 63(10), 1253-1264.
- S. Islam, G., Wang, Q., M. Sabour, P. (2018) Encapsulation Strategies of Bacteriophage (Felix O1 for Oral Therapeutic Application). En Clokie, M., Kropinski, A., Lavigne, R. *Bacteriophages: Methods and Protocols*, Volume 3. (pp. 71-87) Springer International Publishing.
- Samsygina, G. A., & Boni, E. G. (1984). Bacteriophages and phage therapy in pediatric practice. *Pediatrriia*, (4), 67-70.

- Sanders, M. F. (2003). Methods of identifying bacteria of specific bacterial genus, species or serotype. U.S. patent 6,660,470.
- Santos, J.I., De la Maza, L., Tanaka, J. (1989) Antimicrobial susceptibility of selected bacterial enteropathogens in Latin America and worldwide. *Scand J Gastroenterol Suppl.*;169:28-33.
- Sillankorva, S. M., Oliveira, H., Azeredo, J. (2012). Bacteriophages and their role in food safety. *International journal of microbiology*, 2012.
- Spector, M. P., & Kenyon, W. J. (2012). Resistance and survival strategies of *Salmonella enterica* to environmental stresses. *Food Research International*, 45(2), 455-481.
- Spricigo, D. A., Bardina, C., Cortés, P., Llagostera, M. (2013) Use of a bacteriophage cocktail to control *Salmonella* in food and the food industry. *Int. J. Food Microbiol.* 165, 169–174.
- Sha, Q., Forstner, M. R., Hahn, D. (2013). Diversity of *Salmonella* in biofilms and water in a headwater ecosystem. *FEMS Microbiol. Ecol.* 83 (3), 642–649.
- Sulakvelidze, A., Alavidze, Z., Morris, J. G. (2001). Bacteriophage therapy. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 45(3), 649-659.
- Summers, W.C. (1998) Theorien der Verursachung, ihre Rechtfertigung und die experimentelle Wissenschaft: Daniel E. Salmon und die Schweinepest. Strategien der Kausalität. Konzeptionen der Krankheitsverursachung im 19 und 20, Jahrhundert, Gradmann, Christoph, Schlich, and Thomas, (Eds.), Centaurus, Pfaffenweiler. pp. 79–94.

- Summers, W. C. (1999). *Felix d'Herelle and the origins of molecular biology*. Yale University Press, New Haven, Conn.
- Summers, W.C. (2005) *Bacteriophage Research: Early History*. En Kutter, E., Sulakvelidze, A. (2005). *Bacteriophages: biology and applications*. Crc press.
- Tindall, B.J., Grimont, P.A., Garrity, G.M., Euzéby, J.P., (2005) *Nomenclature and taxonomy of the genus Salmonella*. *Int J Syst Evol Microbiol*. 55(Pt 1):521-4.
- Tortora, G. J., Funke, B. R., Case, C. L. (2010) *Microbiology: an introduction*, p. 1 v. (various pagings). Pearson Benjamin Cummings, San Francisco, CA.
- US Food and Drug Administration. (2018). *Summary report on antimicrobials sold or distributed for use in food-producing animals*. US Food and Drug Administration: Silver Spring, MD, USA.
- Wall, S.K., Zhang, J., Rostagno, M.H., Ebner, P.D., 2010. *Phage therapy to reduce preprocessing Salmonella infections in market-weight swine*. *Appl. Environ. Microbiol*. 76, 48–53.
- Wattiau, P., Boland, C., Bertrand, S. (2011) *Methodologies for Salmonella enterica subsp. enterica subtyping: gold standards and alternatives*. *Appl Environ Microbiol* 2011; 77:7877–7885.
- Wright, G. D. (2005). *Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification*. *Advanced drug delivery reviews*, 57(10), 1451-1470.

Wright, A., Hawkins, C. H., Änggård, E. E., & Harper, D. R. (2009). A controlled clinical trial of a therapeutic bacteriophage preparation in chronic otitis due to antibiotic - resistant *Pseudomonas aeruginosa*; a preliminary report of efficacy. *Clinical otolaryngology*, 34(4), 349-357.

Zhukov-Verezhnikov, N. N., Peremitina, L. D., Berillo, E. A., Komissarov, V. P., Bardymov, V. M. (1978). Therapeutic effect of bacteriophage preparations in the complex treatment of suppurative surgical diseases. *Sovetskaia meditsina*, (12), 64.