

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



**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIÓFAGOS LÍTICOS EN
STAPHYLOCOCCUS AUREUS y *SALMONELLA* SPP.**

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

**PRESENTA
NIDYA ELIZABETH DÍAZ VARGAS**

**DIRECTORA DE TESIS:
DRA. SAWAKO OSHIMA**

**MC. LOURDES CAROLINA PUJOL MANRIQUEZ
SECRETARIA**

MEXICALI, BAJA CALIFORNIA, MÉXICO.

DICIEMBRE, 2017

Aislamiento y caracterización de bacteriófagos líticos en *staphylococcus aureus* y *salmonella* spp. Tesis presentada por Nidya Elizabeth Díaz Vargas, como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias Veterinarias, que ha sido aprobada por el comité particular indicado

Dra. Sawako Oshima

DIRECTORA

MC. Lourdes Carolina Pujol Manríquez

Secretaria

Dr. Gerardo Enrique Medina Basulto

ASESOR

Dr. Tomás Benjamín Rentería

Evangelista

ASESOR

MC. Carlos Alberto Martínez Vidal

ASESOR

AGRADECIMIENTOS

Al concejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), al Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias de la Universidad Autónoma de Baja California y a la 18va convocatoria interna de la UABC (clave 201/5/C/3/18), por el apoyo al otorgarme el apoyo y patrocinio para la realización de este importante proyecto para mi formación académica y científica.

Al Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias, por haberme abierto las puertas para poder realizar este sueño y seguir adelante en mi superación profesional y personal.

A mi directora de tesis Dra. Sawako Oshima, por su guía y apoyo para realizar todas y cada una de las actividades realizadas en esta tesis, y al resto de mi comité que fue un gran pilar para mi formación académica, profesional y personal en todo este periodo de aprendizaje. Gracias por todo su conocimiento que me fue transmitido.

DEDICATORIA

Para lograr un sueño, tienes que dejar familia y amigos. La vida te lleva a muchos caminos los cuales debes tener la sabiduría para elegir el correcto.

Elizabeth Vargas y mi Hermanito

Par de ángeles que en el cielo se encuentran, me llevan de la mano siempre y me confortan con sus besos y abrazos en los sueños más hermosos.

Rusbel Díaz Santiago

Hombre al cual admiro y respeto, que aunque con dolor, tristezas, preocupaciones sigue con esa entereza la cual me hace más fuerte día a día, por ti mi motor principal subí un escalón más. Te amo con todo mi corazón.

Perla Xóchitl Díaz Vargas y Yair Gutiérrez Alarcón

Por siempre creer en mí, por estar conmigo todo el tiempo a pesar de la distancia kilométrica por ser mi ejemplo y motores para salir adelante.

Amparo de la Torre González y Adrián David Díaz de la Torre

Por escucharme, apoyarme, darme alegrías y mucho amor cuando mis tristezas han sido grandes.

No se puede dejar a un lado a las personas que estuvieron conmigo durante este camino, Eslyn, Eli, Jennifer y Javier por su apoyo y consejos. Jerry, Michelle, Enrique y José mis ángeles que con su presencia en momentos en los que estuve a punto de caer, fueron mi soporte, fuerza y guía para seguir siempre con la frente en alto.

Gabriela, Karen, Roció, Dra. Laura, Ing. María Elia que a pesar de la distancia, siempre tienen palabras de aliento, regaños y felicitaciones, con todo mi corazón muchas gracias por estar conmigo en este escalón de mi vida.

INDICE

INDICE DE FIGURAS.....	XI
INDICE DE CUADROS.....	VI
RESUMEN	VII
ABSTRACT	VIII
I. INTRODUCCION	1
2.1. Bacteriófagos	3
2.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	12
2.4. <i>Salmonella</i> spp.....	19
III. MATERIALES Y METODOS.....	24
3.1. Localización del área de estudio	24
3.2. Fuente de bacteriófagos.....	24
3.3. Bacterias	25
3.4. Pre-amplificación de bacteriófagos.....	29
3.5. Ensayos de bacteriófagos líticos	32
IV. RESULTADOS.....	39
4.1. Aislamiento de un bacteriófago lítico de <i>Staphylococcus aureus</i> : φSa54.....	39
4.2. Aislamiento de bacteriófagos líticos de <i>Salmonella</i> spp.	45
V. DISCUSION	50
VI. LITERATURA CITADA	51

INDICE DE FIGURAS

Figura	Título	Página
1	Estructura de un bacteriófago T4	4
2	Ciclo de vida de los bacteriófagos.....	8
3	Clasificación morfológica de los bacteriófagos	9
4	Patología de mastitis bovina.....	15
5	Infección en humanos por <i>S. aureus</i>	17
6	Proceso de pre-amplificación.....	29
7	Diluciones seriadas de solución de bacteriófagos.	33
8	Ejemplos de resultados de la prueba de la gota...	38
9	Aislamiento de un nuevo bacteriófago lítico de <i>Staphylococcus aureus</i> (Φ Sa54A).....	39
10	Actividad lítica del bacteriófago Φ Sa54A purificado	39
11	Aislamiento de bacteriófagos líticos de <i>Salmonella</i> spp.	43
12	Amplificación del bacteriófago Φ Sal398 con el método de cultivo líquido.....	45
13	Rango de hospedero de bacteriófagos de <i>Salmonella</i> spp.	47
14	Prueba de la gota con diferentes especies bacterianas	50

INDICE DE CUADROS

Cuadro	Titulo	Página
1	Aislados de <i>Staphylococcus aureus</i> utilizados en el estudio.....	25
2	Aislados de <i>Salmonella</i> spp. utilizados en el estudio	26
3	Rango de hospedero del bacteriófago Φ Sa54A ..	41
4	Títulos de bacteriófagos de <i>Salmonella</i> spp.	44
5	Actividad lítica de 5 bacteriófagos de <i>Salmonella</i> spp. contra otras especies bacterianas.....	49

LISTA DE ABREVIACIONES

ϕ = Phi o fi

2× = Doble concentración

CaCl₂ = Cloruro de calcio

CEMCA = Centro Municipal de Control Animal

CHCl₃ = Cloroformo

CMT = Prueba de California para mastitis

ADN = Acido desoxirribonucleico

g = Constante de gravitación universal

IICV = Instituto de Investigación en Ciencias Veterinarias

LB = Luria Bertani

LPS = Lipopolisacaridos

MDR = Multidroga resistente

MgSO₄ = Sulfato de magnesio

SARM = *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina

mL = Mililitro

mM = Milimolar

NaCl = Cloruro de sodio

PFU= Unidades formadoras de calvas

ARN= Ácido ribonucleico

SM buffer = Solución de sodio y magnesio

μL= Microlitro

RESUMEN

Staphylococcus aureus es el principal agente causante de mastitis bovina, provocando grandes pérdidas económicas en establos lecheros. En Baja California, más de 74% de *S. aureus* asociados a mastitis bovina son multidrogo resistentes (MDR), lo que limita las opciones terapéuticas con fármacos antimicrobianos. Por otro lado, la prevalencia de *Salmonella* spp. en perros de Mexicali es de más de 10% en zonas urbanas, siendo un problema de la salud animal y humana. El objetivo del presente trabajo fue aislar nuevos bacteriófagos líticos capaces de infectar y destruir a *S. aureus*, o a *Salmonella* spp. Se utilizó la estrategia de la preamplificación para aislar 6 fagos líticos en total, uno de *S. aureus* (NV ϕ SA54) aislado de heces de bovino en un establo en Mexicali y 5 de *Salmonella* spp. (ϕ Sal298, ϕ Sal317, ϕ Sal398, ϕ Sal399 y ϕ Sal488) aislados de heces de perros en distintos sitios de la ciudad de Mexicali. El análisis de rango de hospedero del fago NV ϕ SA54 resultó en 4 aislados de *S. aureus* sensibles (14.3%) de un total de 28 aislados provenientes de distintas regiones de la Península de Baja California. Los 5 fagos contra *Salmonella* spp. se probaron contra 22 aislados, siendo ϕ Sal317 y ϕ Sal488 los que mostraron un mayor rango de hospedero (81% y 95%, respectivamente). Además, estos dos fagos demostraron actividad lítica para otros géneros de bacterias como *Escherichia coli* y *Enterobacter* spp. Es importante continuar la búsqueda de fagos líticos con un alto rango de hospedero, particularmente sobre cepas MDR, para su aplicación posterior como tratamientos alternativos y control biológico.

ABSTRACT

Staphylococcus aureus is the main causative agent of bovine mastitis, causing great economic losses in dairy stables. In Baja California, more than 74% of *S. aureus* associated with bovine mastitis are multidrug resistant (MDR), which limits the therapeutic options with antimicrobial drugs. On the other hand, the prevalence of *Salmonella* spp. in dogs from Mexicali is more than 10% in urban areas, resembling an animal and human health issue. The aim of this work was to isolate new lytic bacteriophages capable of infecting and destroying these pathogenic bacteria with importance in animal and human health. Using the preamplification strategy, 6 lytic phages were isolated, one from *S. aureus* (NV ϕ SA54) isolated from bovine feces from Mexicali and 5 from *Salmonella* spp. (ϕ Sal298, ϕ Sal317, ϕ Sal398, ϕ Sal399 and ϕ Sal488) isolated from the feces of dogs in the same city. The host range analysis of NV ϕ SA54 resulted in 4 susceptible *S. aureus* isolates (14.3%) out of a total of 28 isolates from different regions of the Baja California Peninsula. Of the 5 phages of *Salmonella* spp. ϕ Sal317 and ϕ Sal488 were noteworthy for their broad host range (81% and 95%, respectively), of 22 local isolates of *Salmonella* spp. In addition, these two phages showed lytic activity for other genera of bacteria such as *Escherichia coli* and *Enterobacter* spp. It is important to continue the search for lytic phages with a greater host range, particularly to MDR strains, for later application as alternative treatments and for biological control.

INTRODUCCION

Los bacteriófagos o fagos son virus que infectan exclusivamente a bacterias y juegan un papel muy importante en la regulación del balance del ecosistema microbiano (Kutter, 2005). Los bacteriófagos líticos lisan a las bacterias hospedadoras, liberando los viriones producidos que pueden continuar el ciclo. Estos bacteriófagos se han investigado para el tratamiento terapéutico de infecciones bacterianas desde el inicio del siglo XX, sin embargo por el desarrollo de medicamentos antimicrobianos y la quimioterapia altamente efectiva, han pasado a ser ignorados durante gran parte del siglo pasado (Marcuk, 2005). En los últimos años la resistencia de algunas bacterias ante los antibióticos en el medio agropecuario y medicina humana ha sido alarmante. Se ha incrementado el interés en el uso de bacteriófagos líticos como agentes terapéuticos y preventivos eficaces y seguros para controlar infecciones por bacterias Multidroga Resistente (MDR por sus siglas en inglés) (Abedon, *et al.*, 2011)

La mastitis bovina es una enfermedad inflamatoria de la glándula mamaria que causa grandes pérdidas económicas en la industria lechera. Palacios (2017) reportó que el agente principal de mastitis bovina en establos de Baja California fue la bacteria *Staphylococcus aureus* y además el 74% de aislados *S. aureus* fue multidroga resistente (MDR). El uso de bacteriófagos líticos específicos a *S. aureus* MDR podría ser una alternativa para el control de la mastitis bovina asociada a este patógeno. Por otra parte, Núñez (2014) ha aislado *Salmonella* spp. en heces de aproximadamente el 10% de perros callejeros en la ciudad de Mexicali.

Existen estudios donde se observa que algunos géneros de *Salmonella* como son Typhimurium y Enteritidis son resistentes a antibióticos como ampicilinas, tetraciclinas y sulfonamidas (Toro, *et al*; 2013), por lo que se considera un problema potencial en salud pública, por lo que el objetivo de este trabajo fue aislar nuevos bacteriófagos líticos capaces de infectar a dos bacterias patógenas de la región, *S. aureus* y *Salmonella* spp., y caracterizar su rango de especificidad de hospedero.

REVISION DE LITERATURA

2.1. Bacteriófagos

Los bacteriófagos son virus que infectan exclusivamente a las bacterias, cada partícula de bacteriófago (virión) contiene su genoma (ADN o ARN) encerrado en una cápside de proteínas o lipoproteínas; la combinación del ácido nucleico y la cápside forman la núcleocápside (Figura1). La bacteria hospedadora es un grupo de bacterias específicas. Este grupo es a menudo algunas subespecies de una especie bacterias, pero también se ha investigado que múltiples especies bacterianas pueden ser hospedador de un mismo bacteriófago (Kutter, 2005). En 1896 Ernest Hankin observó una actividad antibacteriana contra *Vibrio cholerae* en aguas del Río Ganges y Junna en India, lo que se considera la primera observación sobre la presencia de bacteriófagos. En 1917 fue otorgado por Félix d'Herelle el nombre de bacteriófago a una sustancia bacteriolítica que aisló de las heces de pacientes humanos (Sulakvelidze, *et al*, 2001). Al comenzar la era moderna en estudios de biología molecular Max Delbruck utilizó bacteriófagos en 1938, para comprender las características fundamentales de la vida biológica. Inmediatamente se reunieron otros investigadores como Salvador Luria en el estudio de bacteriófagos, determinando la composición química del virión, (proteínas y material genético). Las primeras imágenes electrónicas de los bacteriófagos fueron obtenidas, por Thomas Anderson en 1943 (Vispo, *et al*, 2001; Wilson, *et al*, 1997).

Morfológicamente existen distintos virus bacterianos. Básicamente las

etapas de infección son semejantes a las producidas en los virus animales. La etapa de adsorción involucra primero el acoplamiento y luego la penetración del ácido nucleico (ADN o ARN) a través de la pared bacteriana, quedando los principales componentes proteicos fuera de la célula (Figura 1) (Stanchi *et al.* 2007). Muchos bacteriófagos tienen una constitución sencilla, y según la forma de los bacteriófagos maduros pueden diferenciarse en varios tipos (Schlegel, 1997).

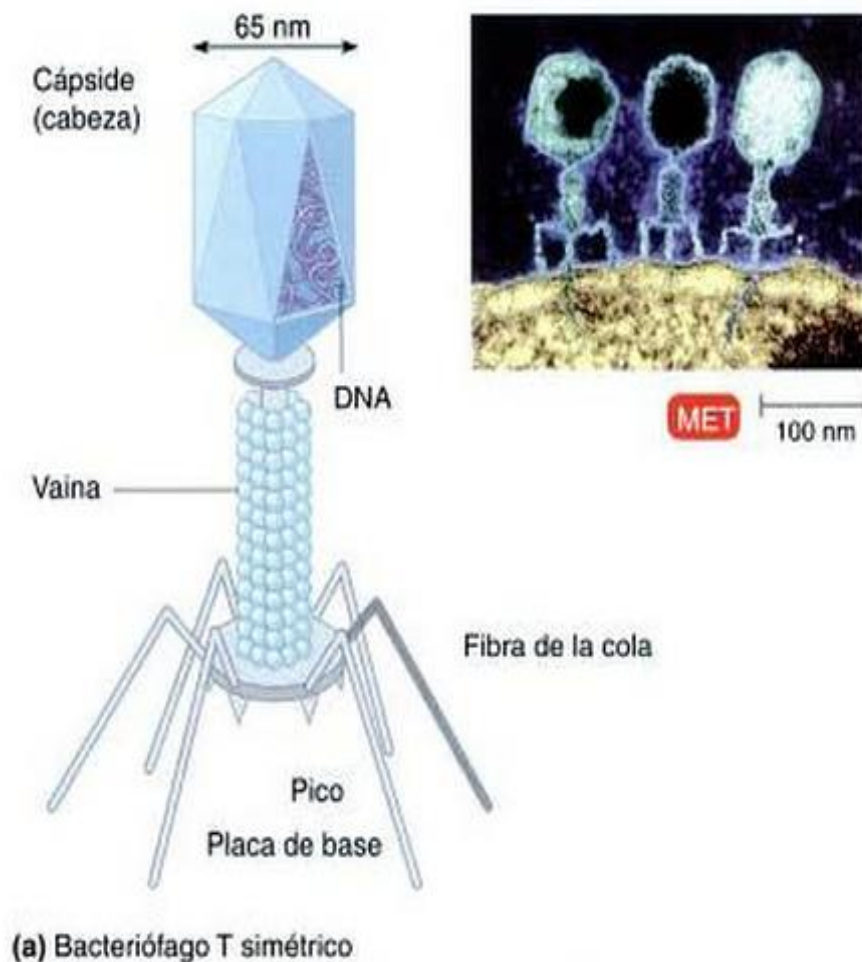


Figura 1. Estructura de un bacteriófago T4 (Tortora, 2007)

Ciclo de vida

Los bacteriófagos pueden ser divididos en dos grupos de acuerdo a su tipo de infección, el primer grupo está caracterizado por una infección lítica y otra es representado por infección lisogénica o temperado. La figura 2 muestra los dos tipos ciclo de vida de bacteriófagos, ciclo lítico y ciclo lisogénico.

En el ciclo lítico, la liberación de ADN induce el cambio de la maquinaria proteica de la bacteria hospedero en beneficio del bacteriófago para producir 50-200 viriones nuevos y la célula bacteriana se lisa causando la muerte de la misma y la liberación de nuevos bacteriófagos en el espacio extracelular.

El ciclo lisogénico, se caracteriza por la integración del ADN del bacteriófago en el genoma de la célula hospedero, aunque también puede existir como plásmido. El ADN incorporado se replicará junto con el genoma de las bacterias hospedero y las nuevas bacterias heredarán el ADN viral en forma de profago. El profago podría mantenerse durante varias generaciones de bacterias sin grandes consecuencias metabólicas para ella. Finalmente, los genes del bacteriófago, en diversas condiciones como el estrés impiden la replicación bacteriana y se reversionarán al ciclo lítico, conduciendo a la liberación de bacteriófagos completamente ensamblados. El análisis de bacteriófagos con el modo lisogénico o lítico de la infección han demostrado que hay una gran variedad de bacteriófagos con variaciones en las propiedades de cada tipo de infección. Además, bajo

ciertas condiciones, algunos bacteriófagos fueron capaces de cambiar el modo de infección, especialmente si el número de células hospederas estaba disminuyendo. Los bacteriófagos con el ciclo de vida lítico son de interés para su aplicación terapéutica como agentes antibacterianos, mientras los bacteriófagos lisogénicos tienen utilidad en el diagnóstico o tipificación de bacterias (Orlova, 2012).

Las interacciones entre los bacteriófagos y hospederos son producidas entre las proteínas de la cola del virus y los receptores de la superficie bacteriana como las proteínas y los lipopolisacáridos (LPS) como son de *Salmonella* spp. y *Pseudomonas aeruginosa* reportados por Chaturongkul, et al., 2014.

Taxonomía

El Comité Internacional de Taxonomía en Virus (ICTV por sus siglas en inglés) clasificó a los bacteriófagos dentro de 6 géneros correspondiendo a 5 de los tipos básicos de Bradley, nombrados T4, λ , ϕ X174, MS2, FD y el nuevo tipo PM2. Actualmente organizados en un orden de 13 familias y 31 géneros. Muchos bacteriófagos contienen dsADN, pero hay pequeños grupos de bacteriófagos de cadena simple (ss) ADN, ssARN, o doble cadena (ds) RNA. Algunos tipos tienen una envoltura lipídica o contienen una parte de lípidos en su envoltura. Los bacteriófagos con cola son cerca de 5100 virus descritos (96% de virus) y clasificados dentro del orden de los Caudovirales, una familia de las más grandes filogenéticamente. Los bacteriófagos con filamento cúbico y pleomórfico comprenden menos de 190 virus (3.6% de los bacteriófagos) y son clasificados dentro de 10 pequeñas familias. La presencia de lípidos es acompañada por una pequeña densidad

flotante y una alta sensibilidad al cloroformo y éter (Figura 3.) (Ackerman, 2001).

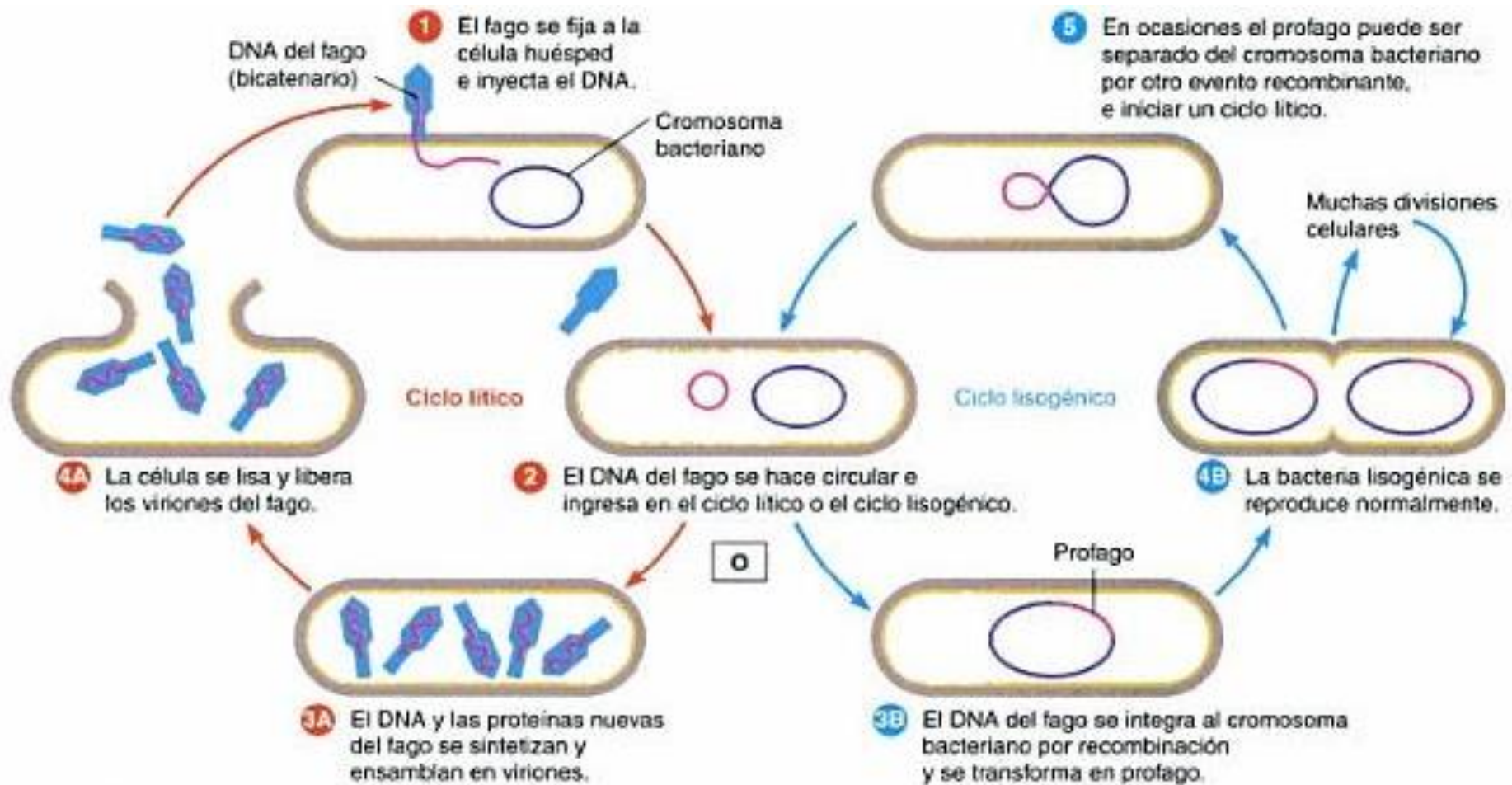
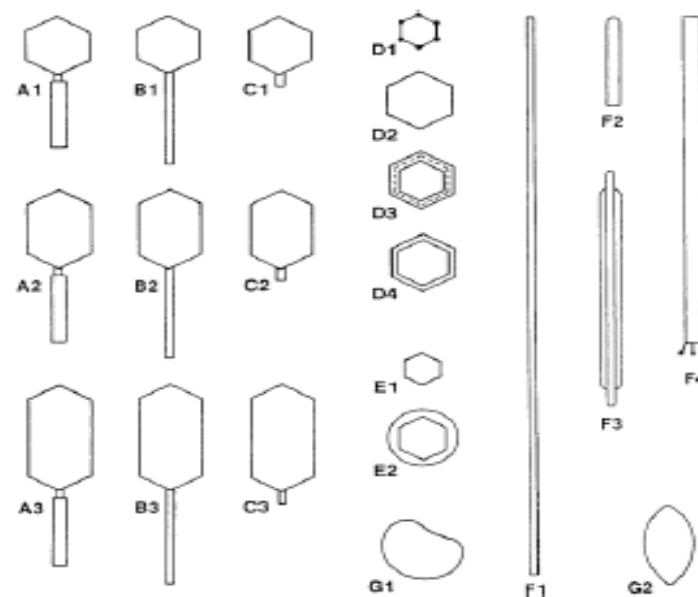


Figura 2. Ciclo de vida de bacteriófagos (Tortora, 2007)

Morfotipo	Forma	Ácido nucleico	Familia	Particularidades
A1 a A3 B1 a B3 C1 a C3	Fagos con cola	ADN dc, L	<i>Myoviridae</i>	Cola contráctil
			<i>Siphoviridae</i>	Cola larga, no contráctil
			<i>Podoviridae</i>	Cola corta
D1 D3 D4 E1 E2	Fagos poliédricos	ADN sc, C	<i>Microviridae</i>	Capsómeros sobresalientes
		ADN dc, C, S	<i>Corticoviridae</i>	Cápside compleja, lípidos
		ADN dc, L	<i>Tectiviridae</i>	Vesícula lipídica, pseudocola
		ARN sc, L	<i>Leviviridae</i>	Cubierta lipídica
		ARN dc, L, seg.	<i>Cystoviridae</i>	
F1 F2 F3 F4	Fagos filamentosos	ADN sc, C	<i>Inoviridae</i>	a- filamentos largos b- bastones cortos
		ADN dc, L	<i>Lipothrixviridae</i>	Cubierta lipídica
		ADN dc, L	<i>Rudiviridae</i>	Similar al virus del mosaico del tabaco
G1 G2	Fagos pleomórficos	ADN dc, C, S	<i>Plasmaviridae</i>	Cubierta lipídica, sin cápside
		ADN dc, C, S	<i>Fuselloviridae</i>	Cubierta lipídica, sin cápside, en forma de limón



Sc: simple cadena, dc: doble cadena, C: circular, S: superhelicoidal, L: lineal, seg.: segmentado. Imagen obtenida

Figura 3. Clasificación morfológica de bacteriófagos (Ackermann, 2001)

Los receptores varían dependiendo de la bacteria hospedero ya sean bacterias gram negativas o positivas, la diferencia radica en la estructura de la membrana plasmática (Nikaido, 2003).

Aplicaciones de los bacteriófagos

La terapia con bacteriófagos en la antigua Unión Soviética (URSS) fue aplicada dentro del esquema en su sistema de salud; aun cuando el uso de los antibióticos estaba en su esplendor en el hemisferio oeste. Las preparaciones de bacteriófagos se usaron en la terapia, profilaxis o el diagnostico de infecciones gastrointestinales y en infecciones provenientes de quemaduras. (Pimienta - Rodríguez, 2013).

El uso y producción de bacteriófagos para la terapia y profilaxis en humanos continuó a pequeña escala, aun después del advenimiento y propagación de los antibióticos en el oeste de Europa y los EE. UU (Gill y Hyman, 2010). La utilización de bacteriófagos como agentes de biocontrol en el campo de la salud alimentaria es un tema al que actualmente se le está dando mucha importancia, principalmente debido a que el uso de antibióticos como conservadores y para el control de patógenos es cada vez más cuestionando por favorecer la proliferación de bacterias resistentes. Los tratamientos físicos y químicos de inactivación de bacterias pueden alterar las características organolépticas de los productos. El tratamiento con bacteriófagos puede aplicarse en diferentes etapas a lo largo de todo el proceso de elaboración de alimentos: origen animal (de los que se extraen materias primas o para consumo) que actúan como reservorios de

enfermedades provocadas por bacterias (fagoterapia); sobre carcasas y productos crudos (biocontrol); sobre superficies y utensilios de producción (biosanitización), y como conservantes naturales sobre productos manufacturados perecederos para extender su vida útil (biopreservación) (García *et al.* 2008). La fagoterapia en animales se ha utilizado para el control de *Salmonella* en aves de corral y de *E. coli* O157:H7 en bovinos (O'Flynn *et al.*, 2004, Viscardi *et al.*, 2008). En el área de biocontrol de patógenos se ha puesto énfasis en la caracterización y aplicación de bacteriófagos para *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* y *Campylobacter* (Leverentz *et al.*, 2003, Bigwood *et al.*, 2009, Bigwood *et al.*, 2008, Goode *et al.*, 2003). Así, como también, fueron aprobados por la *Food and Drug Administration* (FDA) dos mezclas comerciales de bacteriófagos para biocontrol de *Listeria monocytogenes* en diversos productos listos para el consumo (Hurley *et al.*, 2008, Vandeplas *et al.*, 2010).

Fagoterapia

La situación actual de la fagoterapia, se vio retrasada de los 50's a los 80's, en Rusia, Polonia, Georgia y la India las investigaciones continuaron. En Georgia, el centro Tbilisi, fundado por d'Herelle y Eliava ha sido el principal productor de cepas de bacteriofagos. En Polonia el Instituto Hirzfield ha proporcionado datos importantes sobre el tratamiento de más de 5500 casos de infecciones bacterianas supurativas (enfisemas, peritonitis, osteomielitis, y otras) en humanos, la mayor parte de las cuales fueron casos crónicos. Los bacteriófagos utilizados para el tratamiento de estas infecciones, se administraron por vía oral, previo tratamiento de los pacientes con antiácidos y gelatina para proteger a los bacteriófagos de la

acidez gástrica y posteriormente se comprobó que los fagos llegaban a torrente sanguíneo. En este trabajo los investigadores Polacos reportaron que el 90% de los pacientes tratados, se recuperó satisfactoriamente cesando la supuración y cerrándose las heridas y las fístulas (Vispo, *et al.*, 2001; López, 2005) . Tras la administración de bacteriófagos se encontró un 100% de efectividad en el tratamiento de infecciones gastrointestinales, sin embargo en el caso de úlceras varicosas solo el 75% de los pacientes (Vispo, *et al.*, 2001). Los bacteriófagos han sido administrados por varias vías por ejemplo oral, tópica, intravenosa e intrapleural, utilizando títulos desde 10^5 hasta 10^{11} , sin reportes de complicaciones serias asociadas con su uso, probablemente porque los bacteriófagos son extremadamente comunes en el ambiente, calculándose que en el agua hay alrededor de 10^8 fagos/mL (Sulakvelidze, *et al.*, 2001). La fagoterapia ha sido diversa por ejemplo el grupo del Dr. Benhar, desarrolló con un éxito moderado, un bacteriófago que contenía en su superficie moléculas de antibióticos, basados en la idea de que al reconocer el bacteriófago filamentoso al patógeno (*Staphylococcus aureus*) se necesita poco antibiótico para matarlo y que al requerir tan poca cantidad de antibiótico, las reacciones adversas del cloranfenicol se verían reducidas (Yacoby, I., *et al.*, 2006).

Inocuidad alimentaria

La utilización de bacteriófagos como agentes de biocontrol en salud alimentaria es un tema al que se le está dando mucha importancia en la actualidad, debido al uso indiscriminado de antibióticos como conservantes y control de patógenos está cada vez más cuestionado ya que las bacterias han desarrollado resistencia a diversas familias de antibióticos su

inactivación con agentes químicos puede alterar las características de los productos (García *et al.*, 2008).

2.1.1. Aislamiento de bacteriófagos

Estos virus pueden aislarse fácilmente suspendiendo material del medio ambiente en el que se encuentre de forma natural la especie bacteriana implicada, junto con la propia bacteria en un medio de cultivo líquido. Todos los bacteriófagos son absolutamente parásitos intracelulares. A pesar de que ellos llevan toda la información para su propia reproducción en la bacteria apropiada no tienen una maquinaria que genere energía y ribosomas para sintetizar proteínas (Guttman, *et al.*, 2005). Si el cultivo de enriquecimiento se incubaba en condiciones bajo las cuales se desarrollen bien las bacterias hospedadoras, los bacteriófagos que se encuentran en el inóculo se reproducirán exclusivamente en células en crecimiento (Schlegel 1997)

2.2. *Staphylococcus aureus*

Esta especie es coagulasa positiva y algunas cepas son hemolíticas en agar sangre, sin embargo, las zonas de hemólisis son relativamente pequeña comparada con el diámetro de la colonia. Las colonias tienen un característico color amarillo-oro y en algunos cultivos jóvenes no muestran ningún pigmento sino hasta que el cultivo tiene aproximadamente 1 o 2 días en la temperatura idónea. Es causante de infecciones piogénicas e intoxicaciones alimentarias y puede ser diseminado por actividades domésticas, como acomodar el dormitorio o vestirse. Esta bacteria está presente por ejemplo en vías aéreas altas y piel (Collins y Lyne's, 2004). El

género *Staphylococcus* tiene por lo menos, 30 especies, y las subespecies descritas son: *Staphylococcus aureus*, subespecie *anaerobius*, *Staphylococcus capitis* subespecie *urealyticus*; *Staphylococcus cohnii* subespecie *urealyticum*, *Staphylococcus cohnii* subespecie 3; *Staphylococcus* subespecie 2; *Staphylococcus swarneri* subespecie 2 y *Staphylococcus auticularis* subespecie 2. El nombre de la subespecie está dado en base a sus características fenotípicas. Las tres especies principales de importancia clínica son: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus saprophyticus* (LLop et al; 2001). *S. aureus* es una bacteria de importancia mundial e importante en la comunidad hospitalaria y que ha incrementado su reporte en problemas nosocomiales en todo el mundo (Figura 4) (Lowy, 1998). La susceptibilidad del hospedero al patógeno no solo depende de la cantidad de toxina que se ha ingerido, sino también del tipo de cepa que se ha adquirido, ya que diversas especies presentan resistencia contra antibióticos denominándose Multidroga Resistente (MDR) (Zendejas-Manzo, et al., 2014).

Infecciones en animales y humanos

Staphylococcus aureus un agente transmitido principalmente por el personal encargado de la manipulación durante el ordeño, por fómites (la toalla de aseo de la ubre) y por la máquina de ordeño durante su funcionamiento. La bacteria penetra por el canal lácteo al tejido glandular muy profundamente y frecuentemente se encapsula para formar nódulos en la ubre los cuales se pueden palpar, es una bacteria que difícilmente o en muy pocas ocasiones se puede eliminar mediante una terapia

medicamentosa (Figura 4). Los niveles de curación son también bajos, especialmente en animales con mastitis crónica. Para evitar la transmisión del agente patógeno dentro del hato son irremplazables las medidas higiénicas durante el ordeño (Wolter *et al.* 2004).

Pellegrino y colaboradores (2011) obtuvieron 271 muestras, de las cuales se aislaron 300 cepas bacterianas, de las cuales 226 (75,3%) correspondieron al género *Staphylococcus* y de ellas, 63 (27,9%) fueron identificadas como *Staphylococcus aureus*. Al realizar el antibiograma, identificaron 37 (58,7%) cepas, mismas que fueron resistentes a uno o más antibióticos. De vacas con mastitis subclínica se aislaron 24 (64,9%) y 2 (5,4%) de vacas con mastitis clínica. El 36,5% (23/63), 22,2% (14/63) y 20,6% (13/63) del total de las cepas de *Staphylococcus aureus* fueron resistentes a eritromicina, penicilina y estreptomina, respectivamente.

La prevalencia de mastitis subclínica en Venezuela diagnosticada a través del CMT (California Mastitis Test) se puede considerar como elevada, ya que el 31.17% de los cuartos y el 49.89% de los animales dieron reacciones positivas al CMT y la prevalencia de infección subclínica estimada por cultivo, puede considerarse de la misma manera elevada ya que el 36.41% de los cuartos permitió el aislamiento de patógenos considerados mayores como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus agalactiae*, miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus*, *A. pyogenes* (Ferraro, *et al.*, 1999).

En México se realizó un estudio en el municipio de Marquelia, Guerrero, donde la prevalencia de mastitis subclínica fue de 45.9%, siendo

Staphylococcus aureus el principal agente etiológico (Santiago, et al., 2012).

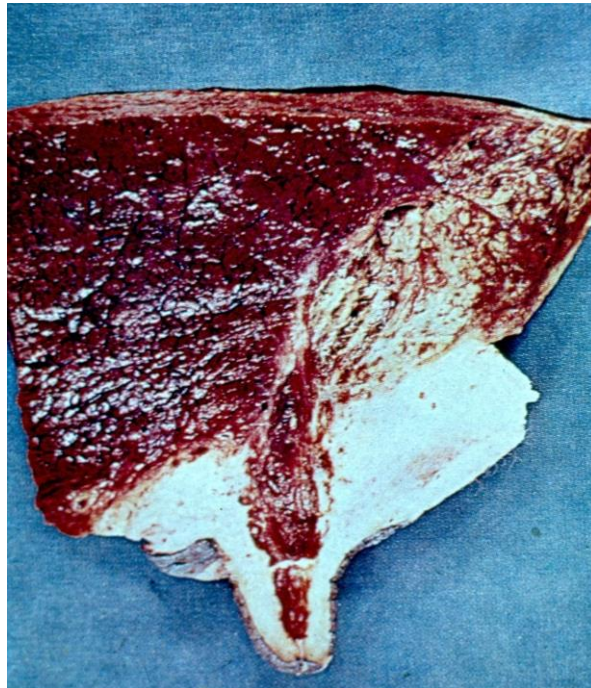


Figura 4. Patología de mastitis bovina (Blowey, 1999)
Mastitis gangrenosa (arriba). Cuarto infectado por *S. aureus* (abajo)

La mortalidad de bacteriemias provocadas por *Staphylococcus aureus* es aproximadamente el 20-40% a pesar de la disposición de los medicamentos no son efectivos (Division of Healthcare Quality Promotion, National Center for Infectious Diseases 2004), además de causar infecciones como osteomielitis, artritis séptica, infecciones en la piel, endocarditis y meningitis, el 95% de las infecciones causadas por esta bacteria no responden a la primera línea de antibióticos como penicilina y ampicilina (Rubin *et al.* 1999). En clínicas vasculares de Gran Bretaña e Irlanda se detectaron infecciones en pacientes que se realizaron cirugías vasculares, al realizar el aislamiento de las muestras obtenidas de heridas e injertos, observaron que en un 73% las infecciones fueron ocasionadas por *Staphylococcus aureus* meticilina resistentes (Figura 5). (Naylor, *et al.*, 2001).

En 1961 se observó que *Staphylococcus aureus* fue el primer aislado clínico detectado como Multidroga Resistente (SAMR) justo un año después de la utilización de la meticilina (Hiramatsu *et al.* 2001). En el 2004, clasificaron a *S. aureus* Multidroga Resistente y oxacilina resistente, como el patógeno aislado frecuentemente en infecciones nosocomiales demostrando un alto grado de transmisión, siendo más de un tercio (38.8%) los aislados de esta especie (Deshpande,*et al*; 2004).

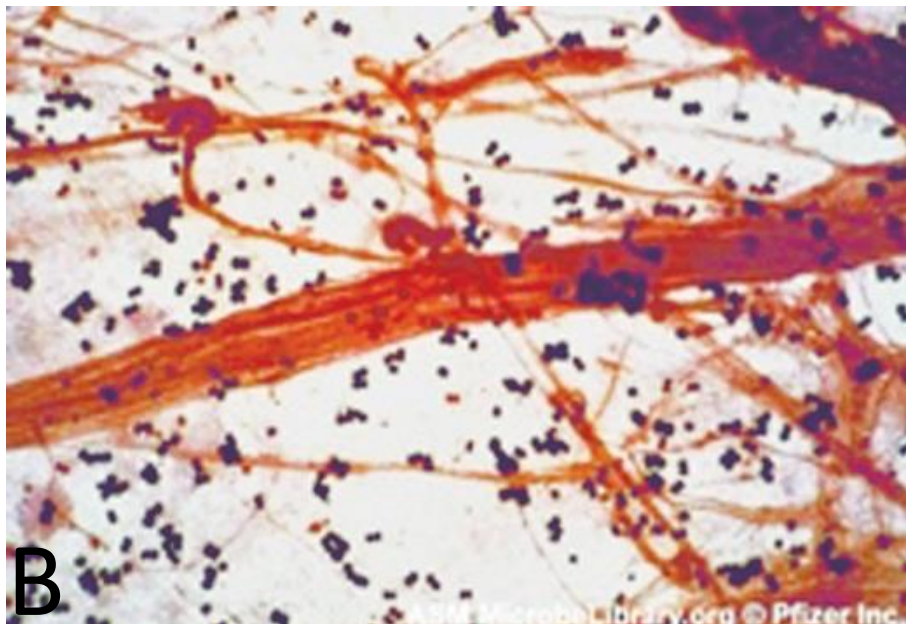
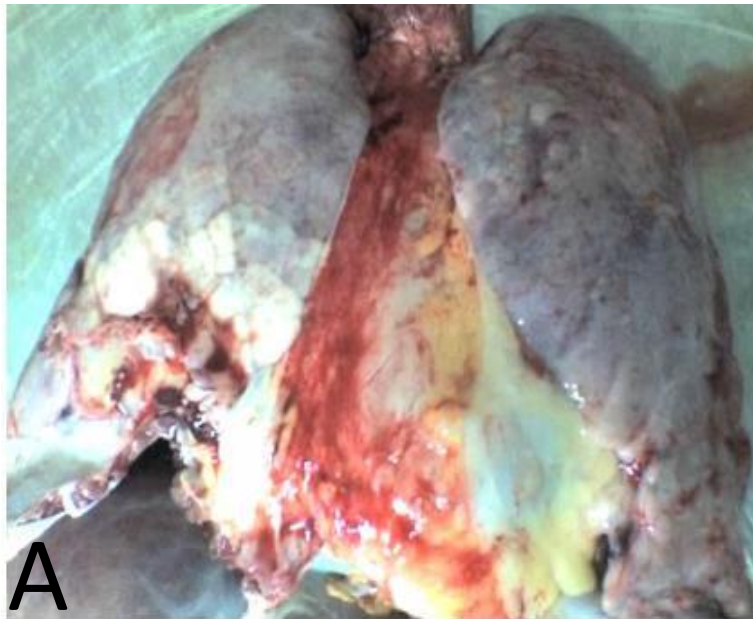


Figura 5. Infección en humanos por *S. aureus* .

(A) P neumonía bilateral (Solar-Marchela, 2012); (B) Cocos gram negativos

2.3. Bacteriófagos lítico de *Staphylococcus aureus*

De igual manera se han tratado de encontrar alternativas para combatir a esta bacteria en diversos países, en Corea se aislaron 2 bacteriófagos de muestras de bovinos con un problema de mastitis denominados SAP-1 y SAP-3 observando su actividad lítica ante cepas de *S. aureus*, en las cuatro cepas tomadas para el ensayo aleatoriamente, cada bacteriófago lítico a dos y tres cepas respectivamente y siendo resistentes *S. agalactiae*, *Streptococcus faecalis*, *Lactobacillus planarum*, *E. coli* y *Citrobacter koseri* a estos bacteriófagos al no observarse ninguna actividad lítica (Soon, *et al.*, 2010). En China fue aislado un bacteriófago denominado SPW de aguas residuales con una actividad lítica muy fuerte ante cinco cepas de *S. aureus* y una de *E. coli*, siendo este un candidato para estudios posteriores para tratamiento en animales diagnosticados con mastitis (Li y Zhang, 2014). Los estudios de aislamiento de cepas de este patógeno en hospitales es importante para su erradicación. En Irlanda se aisló un bacteriófago que fue probado con 54 cepas de *S. aureus* aisladas de muestras de humanos, bovinos y cepas de referencia, teniendo una actividad lítica en 39 cepas: 5 de referencia, 22 de humano y 12 de bovinos. Reportando que dicho bacteriófago será utilizado para realizar estudios para prevención o tratamiento en problemas nosocomiales y de mastitis (O'Flaherty, *et al.*, 2005).

2.4. *Salmonella* spp.

Es un patógeno común en el intestino de animales y humanos, siendo de importancia médica como otras bacterias de la familia de las

Enterobacteriaceae (Sterzenbach et al. 2013). La salmonelosis es una enfermedad de distribución mundial que afecta a humanos y animales de sangre caliente y fría, varía según la gravedad de los casos en la morbilidad y mortalidad (Figura 4). La epidemiología de esta enfermedad es muy compleja debido a su distribución, su creciente número de serovariedades. Su amplio rango de hospedadores y su compleja patogénesis. Colonizando el tracto intestinal de animales vertebrados e invertebrados, además de su excreción dan como resultado la contaminación del agua, los alimentos y el medio ambiente (N. O. Stanchi et al. 2007).

La taxonomía del genero *Salmonella* ha estado cambiando, así la subespecie de *S. entérica* fue considerada como subgénero y los serovares fueron tratados como especies. Así, hay subgénero I (*S. entérica* subsp. *entérica*), II (*S. entérica* subsp. *salamae*), III forma el género *Arizona*; subdividido en IIIa, *S. entérica* subsp. *arizonae* y IIIb *S. entérica* subsp. *diarizonae*, IV (*S. entérica* subsp. *houtenae*), V (*S. bongori*) y VI (*S. entérica* subsp. *indica*) (Grimont and Weill 2008).

El esquema de Kauffman-White, publicado por primera vez en 1929, divide actualmente *Salmonella* en más de 2600 serotipos basados en sus reacciones serológicas a lipopolisacáridos somáticos (O), flagelares (H) y capsulares (Vi) (Sterzenbach et al. 2013).

Gastroenteritis por *Salmonella* spp. en animales y humanos

La gastroenteritis es la forma más frecuente de salmonelosis. Los síntomas suelen aparecer entre las 6 y 48 horas siguientes a la ingestión de alimentos o agua contaminada (Murray, et al., 2005). En un estudio realizado

en el año 2011, se estimó que las enfermedades ocasionadas diversos patógenos es de 37.2 millones, de los cuales 36.4 millones fueron adquiridos en el país, observando que 1.0 millón son infecciones transmitidas por alimentos; 80.060 de 228,744 hospitalizaciones y 731.3 de 2.612 muertes fueron ocasionadas por *Salmonella* spp. no tifoidea en Estados Unidos (Scallan *et al.* 2011). Puede clasificarse ampliamente en dos grupos: la fiebre entérica (tifoidea) y la salmonelosis no tifoidea (NTS). La enfermedad puede manifestarse de cinco maneras: fiebre entérica, gastroenteritis, bacteriemia, infección focal extra-intestinal y un estado portador (Sterzenbach *et al.* 2013).

Todas las especies de *Salmonella* pueden dar lugar a bacteriemia, aunque las infecciones por *Salmonella* cholerasuis, *Salmonella* paratyphi y *Salmonella* typhi, son las que con mayor frecuencia la producen. La presentación clínica de la bacteriemia es idéntica a las otras causadas por gramnegativos, aunque pueden aparecer infecciones supurativas localizadas (osteomielitis, endocarditis y artritis) (Murray, *et al.*, 2005).

Salmonella typhi produce una enfermedad febril conocida como fiebre tifoidea, se produce por *Salmonella* paratyphi A, *Salmonella* paratiphi B, *Salmonella* paratiphi C. La fiebre entérica pasa a través de las células que tapizan el intestino y son engullidas por los macrófagos, se replica después de ser transportadas al hígado, el bazo y la médula ósea. Entre 10 y 14 días después de la ingestión de los bacilos, los pacientes presentan fiebre que va aumentando progresivamente, con síntomas inespecíficos como cefalea, mialgias, malestar general y anorexia (Murray, *et al.*, 2005).

Se han encontrado *Salmonella* spp., en todas las especies de mamíferos, aves, reptiles y anfibios investigados. Los peces y los invertebrados también pueden infectarse. Las infecciones principalmente prevalecen en las aves de corral, porcinos y reptiles (CFSPH 2006). Entre los reptiles, se han observado infecciones en tortugas, serpientes y lagartos incluidos camaleones e iguanas (CFSPH 2006).

En rumiantes, es una enfermedad significativa que afecta a animales jóvenes principalmente de 4 a 6 semanas de edad, ocasiona septicemia o ser limitado en tracto gastrointestinal. La neumonía hidatógena, es muy común en becerros con septicemia por *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Dublin y *Salmonella* Newport que son serotipos aislados comúnmente en ganado, *Salmonella* Typhimurium es el serotipo aislado en varias especies (Chung, 1999).

En perros y gatos, la forma más común es diarrea aguda, con o sin septicemia, se recuperan en 3 a 4 semanas, pero se puede observar también neumonía, abscesos, meningitis, osteomielitis celulitis o conjuntivitis, en gatos puede haber enfermedad febril crónica caracterizada por anorexia y letargo pero no diarreas. En hembras preñadas pueden abortar o dar cachorros o gatitos débiles (CFSPH, 2006).

En aves muy jóvenes, se registran casos más sintomáticos. Los síntomas pueden incluir anorexia, letargo, diarrea, polidipsia y signos en el sistema nervioso central (CFSPH, 2006).

2.5. Bacteriófagos líticos de *Salmonella* spp.

Se han realizado diversos estudios donde se han encontrado múltiples bacteriófagos por mencionar algunos, en 2013 en la India se aisló *Salmonella* abortusequi de muestras tomadas de aguas residuales de granjas, drenajes de hospitales veterinarios y humanos, identificándose 2 fagos denominados PSAE/1 y PSAE/2, siendo el fago PSAE/1 el que mostro una actividad lítica muy fuerte y fue seleccionado para su caracterización (Verma et al. 2013). En cepas encontradas de *Salmonella* gallinarum biovariedad gallinarum, que han sido aisladas en agar MacConkey y TBS, se identificó un fago el cual fue denominado Φ SG-JL2 teniendo actividad lítica en esta cepa y tomándose en cuenta para realizar prácticas profilácticas contra fiebre tifoidea (Kwon et al. 2008). En Corea se aislaron muestras de heces, vegetales, frutas y carne, obteniendo un fago denominado Wksl3 el cual mostro una alta actividad lítica en las cepas de *Salmonella* entérica serovariedad enteritidis y typhimurium (Kang et al. 2013).

III. MATERIALES Y METODOS

3.1. Localización del área de estudio

El presente estudio se realizó en el Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias (IICV) de la Universidad Autónoma de Baja California (UABC), Mexicali Baja California, México.

3.2. Fuente de bacteriófagos

Las muestras de bovinos, fueron obtenidas del establo lechero (50 heces y 2 pool de leche) del IICV-UABC. Muestras de medioambiente (8 muestras de agua bebederos de bovinos y 4 muestras de charcos y 6 muestras de suelo del establo) fueron también obtenidas del mismo Instituto. Se transportaron al laboratorio en tubos de 50 ml estériles o bolsas de plástico, con refrigerante. Las muestras de heces de perros fueron 10 muestras obtenidas del Centro Municipal de Control Animal (CEMCA) y 10 muestras provenientes de la colonia Villa Colonial y 7 muestras provenientes del Fraccionamiento los Reyes, guardadas en bolsas de plástico y transportadas con refrigerantes al laboratorio para su procesamiento el mismo día.

Se pesaron 10 gr. de heces y se diluyeron en 60 ml de agua destilada (protocolo modificado de Yang, *et al*, 2010), dejando sedimentar durante 30 minutos. Se centrifugaron a 6500 x *g* por 10 minutos en tubos tipo Falcon de 50 ml a temperatura ambiente, se le agregan 15 µl de cloroformo al tubo con la etiqueta correspondiente y de se dejó reposar durante dos horas,

finalmente se centrifugo nuevamente y se recuperó el sobrenadante (Walker, *et al.*, 2009).

3.3. Bacterias

Cepas y aislados bacterianos utilizadas para este estudio fueron las siguientes:

Staphylococcus aureus

Se utilizaron un total de 28 aislados cepario del Laboratorio de Biología Molecular del IICV. Estos aislados fueron obtenidos de muestras de leche de bovinos de diferentes establos de Baja California y Baja California Sur, e identificadas con pruebas bioquímicas así también con la secuenciación del gen 16S rADN (Brisuela *et al* y Palacios, *et al* 2017, Cuadro 1). Las alícuotas originales congeladas en el medio Tood Hewitt con glicerol al 10% fueron resembradas y utilizadas sin exceder más de 5 pasajes en el laboratorio, adicionalmente se incluyeron dos cepas de referencia ATCC1026 y ATCC 33591.

Salmonella spp

Se utilizaron un total de 22 aislados del cepario de *Salmonella spp.* del laboratorio de Biología Molecular del IICV proporcionadas por el Dr. Tomas Renteria Evangelista y la MC. Karla Michelle Núñez Castro. Estos aislados originalmente fueron obtenidos de muestras de heces de perros del Centro del control animal de la Cd. de Mexicali (CEMEC), e identificadas mediante el sistema API20e (Núñez, 2015) (Cuadro 2). Las alícuotas originales fueron congeladas en medio Tood Hewitt con glicerol al 10% y

fueron resembradas y utilizadas sin exceder más de 5 pasajes en el laboratorio.

Cuadro 1. Aislados de *Staphylococcus aureus* utilizadas en el estudio.

ORIGEN	ID
MEXICALI (n= 4)	54 A
	54 B
	54 C
	54D
TECATE (n=20)	S/N(A)
	150C
	612C
	612D
	634D
	944D
	1007D
	1017DR
	109BMINI
	1098A
	1111A
	1113C
	1141A
	1141C
	1153A
	1172C
LA PAZ (n=4)	5890B
	7114A
	7114C
	5821C
	7416B
	1438D-2
	7419B(1)
	7419C

*Nota: Todos los S. aureus fueron aislados por
Brisuela y Palacios (2014) y Felipe (2015).*

Cuadro 2. Aislados de *Salmonella* spp. Utilizados en el estudio

ORIGEN	ID	% ID POR API
MEXICALI (n=17)	120	99
	296	*
	298	99
	317	77
	352	99
	375	89
	383	89
	387	89
	396	83
	398	92
	399	99
	411	99
	437 rv	99
	437 sc	89
	454	89
	488	89
	501	99
VALLE DE MEXICALI (n=2)	335	89
	338	99
SAN FELIPE (n=3)	208	99
	267	89
	268	89

(*)= Sin Dato

Nota: Todos las Salmonellas spp. fueron aislados por Núñez, (2015).

Para la resiembra inicial se inoculo la alícuota congelada con glicerol en el medio liquido Luria Bertani (LB) [LB Broth (Lennox) Pronadisa, CONDA, Cat. 121.00] e incubado por 24 horas a 37°C con agitación de 250 rpm (VWR Incubating Orbital Shaker, serie 070809005, USA). El cultivo liquido nuevamente se inoculo en caja petri con LB agar base y se inoculo durante 10-24 horas en la incubadora (Fisher Scientific, modelo Isotemp Incubator) para verificar morfología de colonias aisladas y el resto del cultivo fue almacenado a 4°C con un tiempo máximo de 2 semanas (Pre-cultivo). Para los experimentos de los bacteriófagos, cada día del experimento se preparó el cultivo fresco inoculando en el medio líquido LB con 1% (v/v) del pre-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 (DO_{600}) (Walker, *et al.*; 2009).

3.4. Pre-amplificación de bacteriófagos

Para el procesamiento de muestras de heces y suelo se siguió el protocolo de Yang, *et al* (2010) con modificaciones. Brevemente se pesaron 15 gr. de heces y suelo, y se diluyeron en 40 ml de agua destilada durante 30 minutos a temperatura ambiente. Para el procesamiento de heces de perros se diluyeron 10 gr. de heces con 60 mL de agua destilada. Transcurrido el tiempo se recuperaron 30 mL aproximadamente de sobrenadante centrifugado en tubos tipo Falcon de 50 mL a 6,500 x *g* por 10 minutos a 25°C. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo debidamente identificado y se utilizó como la fuente de bacteriófagos. Para obtener o verificar bacteriófagos resistentes a cloroformo se le agrego 1% (v/v) de

cloroformo a la solución de bacteriófagos y se dejó reposar durante dos horas a 4°C, se centrifugó y se recuperó el sobrenadante como la fuente de bacteriófagos (Walker, *et al*; 2009). Las muestras de leche y agua se centrifugaron en tubos tipo Falcon de 50 mL a 6,500 x *g*, el sobrenadante se colocó en tubos tipo Falcon de la misma capacidad y se les añadió 1% (v/v) de cloroformo a los tubos debidamente identificados, se dejó reposar durante dos horas, se centrifugó y se recuperó el sobrenadante. 5 mL de muestras procesadas se colocaron en un tubo de ensayo o matraz estéril con 5 mL de caldo LB 2x suplementado con 2mM de CaCl₂ y 100 µl de pool de bacteria hospedero, y se incubó con agitación a 200 rpm a 37°C durante 10 a 24 horas para realizar la pre-amplificación (Figura 6) (Walker, *et al*; 2009).

Si hubiese algunos bacteriófagos líticos capaces de infectar a las bacterias hospedadoras inoculadas se esperarían numerosos ciclos de infección y liberación del bacteriófago lítico durante este proceso de pre-amplificación. El día siguiente en tubos de 2 mL, se colocaron 1.5 mL de muestra pre-amplificada, se centrifugó a 12,000 rpm por 10 minutos (Centrifuga marca Eppendorf AG, Centrifuge 5430, Germany) se recuperó el sobrenadante en un tubo estéril y se almacenó a 4°C para observar la presencia de bacteriófagos líticos en estas muestras pre-amplificadas. Posteriormente se procedió el ensayo de la gota como se menciona a continuación.

Solamente para muestras de leche se empleó un protocolo de doble amplificación utilizada por Haddad y col. (2013) para aumentar la posibilidad de la obtención de bacteriófagos líticos. Para ello el sobrenadante de pre-

amplificación del primer día fue inoculado con el mismo procedimiento para la segunda ronda de pre-amplificación.

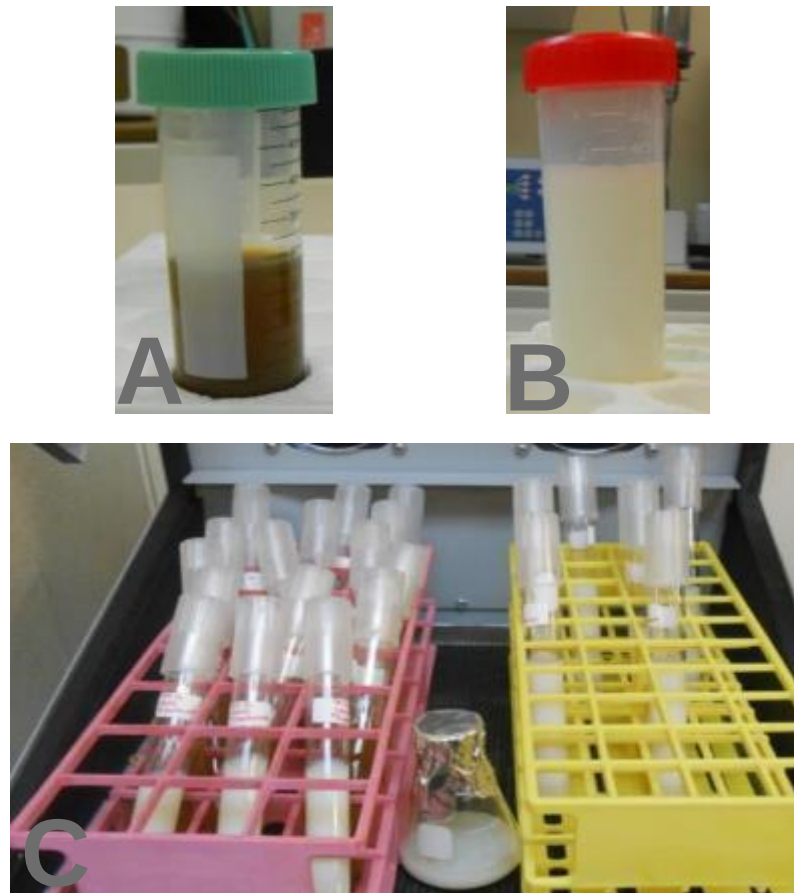


Figura 6. Proceso de pre-amplificación. (A) Sobrenadante de heces de bovinos sin cloroformo, (B) Leche de bovino con cloroformo; (C) Incubación de muestras con la bacteria hospedadora durante toda la noche.

3.5. Ensayos de bacteriófagos líticos

Prueba de la gota

Para detectar la actividad lítica de los posibles bacteriófagos presentes en las muestras pre-amplificadas, se realizó la prueba de la gota (*spot test* en inglés) según la metodología reportada previamente (Adams, 1959; Turton *et al.*; 2012). Antes del ensayo se calentó una caja petri con agar LB suplementada con CaCl_2 2mM (Spectrum Quality Products, Inc. C1096, Gardena, CA) en la incubadora a 37°C por un mínimo de 2 horas. Se inoculó la bacteria hospedador sobre la base de LB atemperada utilizando un hisopo estéril con el cultivo líquido fresco de la bacteria en la fase exponencial de crecimiento. Se dejó secar 3 minutos y se colocaron 5 µl de la muestra de bacteriófagos pre-amplificados sobre el espacio donde se inocula la bacteria hospedadora correspondiente. Se dejó reposar y secar e incubó a 37°C por 24 a 48 horas. Cuando se presentó la actividad lítica de la muestra de bacteriófagos pre-amplificados, se observó una zona transparente (o parcialmente transparente) sobre el tapete del crecimiento de la bacteria hospedadora (Figura 8 en IV Resultado). Una vez observada la actividad lítica en la prueba de la gota se procedió con el ensayo de calvas para confirmar la presencia de bacteriófagos líticos y aislarlos.

Ensayo de calvas

Este ensayo de calvas o ensayo de doble capa de agar, se utilizó para aislar un bacteriófago lítico, cuantificar el número de bacteriófagos (titulación), amplificar y purificar bacteriófagos. El ensayo consiste en la

sobre posición de agar blando (2 gr. LB Broth, 0.5% de agar bacteriológico [MCD Lab Cat. 9011] en 100 mL de agua destilada) con bacteria hospedadora y bacteriófagos líticos sobre una base de LB agar para observar la presencia de zonas claras (calvas o “*plaque*” en inglés) en la capa del agar blando. Las calvas son producto de la infección inicial de un solo bacteriófago y sus descendientes después de haber lisado a la bacteria hospedero en la capa semisólida del agar blando).

Para preparar muestras de bacteriófagos a partir de la caja Petri del ensayo de la gota se tomó un fragmento de agar de la zona clara con una puntilla de 1000 µl y se diluyo en 1 ml de buffer SM con gelatina [NaCl 5.8g, MgSO₄·7H 2g, 1M Tris-Cl (ph 7.5) 50 mL, 2% (w/v) solución de gelatina 5 mL, agua destilada 1Lt.] en un tubo de 1.5 ml. Se incubo a 4°C por 1 hora para difundir partículas de bacteriófagos y se centrifugó a 12,000 rpm para sedimentar los restos de agar y bacteria contaminada, y se guardó el sobrenadante como solución de bacteriófago. En un tubo nuevo de 1.5 mL se colocaron 190 µl de bacteria hospedadora y se agregaron 10 µl de la solución de bacteriófagos (volumen final de 200 µl) estos se colocaron en un tubo con 3 ml de agar blando previamente calentada a una temperatura de 44°C en baño maría (Precision, serie S030710855, División of Jouan Winchester, Virginia). Se dio una agitación con vortex (Vortex-Gene2, Scientific Industries, Inc, mod. 6560, USA), y se vertieron sobre la capa de agar LB base adicionado con CaCl₂ al 2mM. atemperado previamente a 37°C. Se dejó solidificar la capa del agar blanco y se incubo a 37°C durante 24 a 48 horas para observa la presencia de calvas.

Titulación

Todas las muestras y soluciones que contenían bacteriófagos fueron conservadas a 4°C, evitando factores que podrían causar daños físicos a la muestra como la agitación, burbujas y exposición a la luz. Para cuantificar la cantidad y concentración de bacteriófagos se realizaron diluciones seriadas 1:10 con solución SM. Se colocaron 90 µl de solución SM y 10 µl de solución original de bacteriófago, llegando a un volumen final de 100 µl (Concentración 10^{-1}), posteriormente se pasaron 10 µl de esta solución al siguiente tubo con 90 µl de solución SM (Concentración 10^{-2}), hasta obtener un rango de soluciones de bacteriófagos que resultaran en calvas visibles en una cantidad $<10^{-3}$ calvas/placa. Posteriormente se realizó el ensayo de la calva para cada tubo de dilución seriada según el procedimiento antes mencionado. Al día siguiente se realizó el conteo de cada caja y se calculó la concentración de bacteriófagos de la solución original como unidades formadoras de bacteriófagos por mililitro (pfu/ml), utilizando la siguiente formula:

$$pfu/ml = (No. de calvas) \times (factor de dilución) \times (factor de volumen inoculado)$$

En el ejemplo de la figura 7, el tubo de la máxima dilución (10^{-5}) resultó con 4 calvas en el ensayo de calvas, para cada ensayo de calvas se inocularon con solo 10 µl de la solución diluida, por lo que el cálculo de pfu/ml de la solución original fue el siguiente:

$$pfu/ml = 4 (No. de calvas) \times 10^5 (factor de dilución) \times 1000/10 (factor de volumen inoculado)$$

$$= 4 \times 10^7 \text{ (pfu/ml)}$$

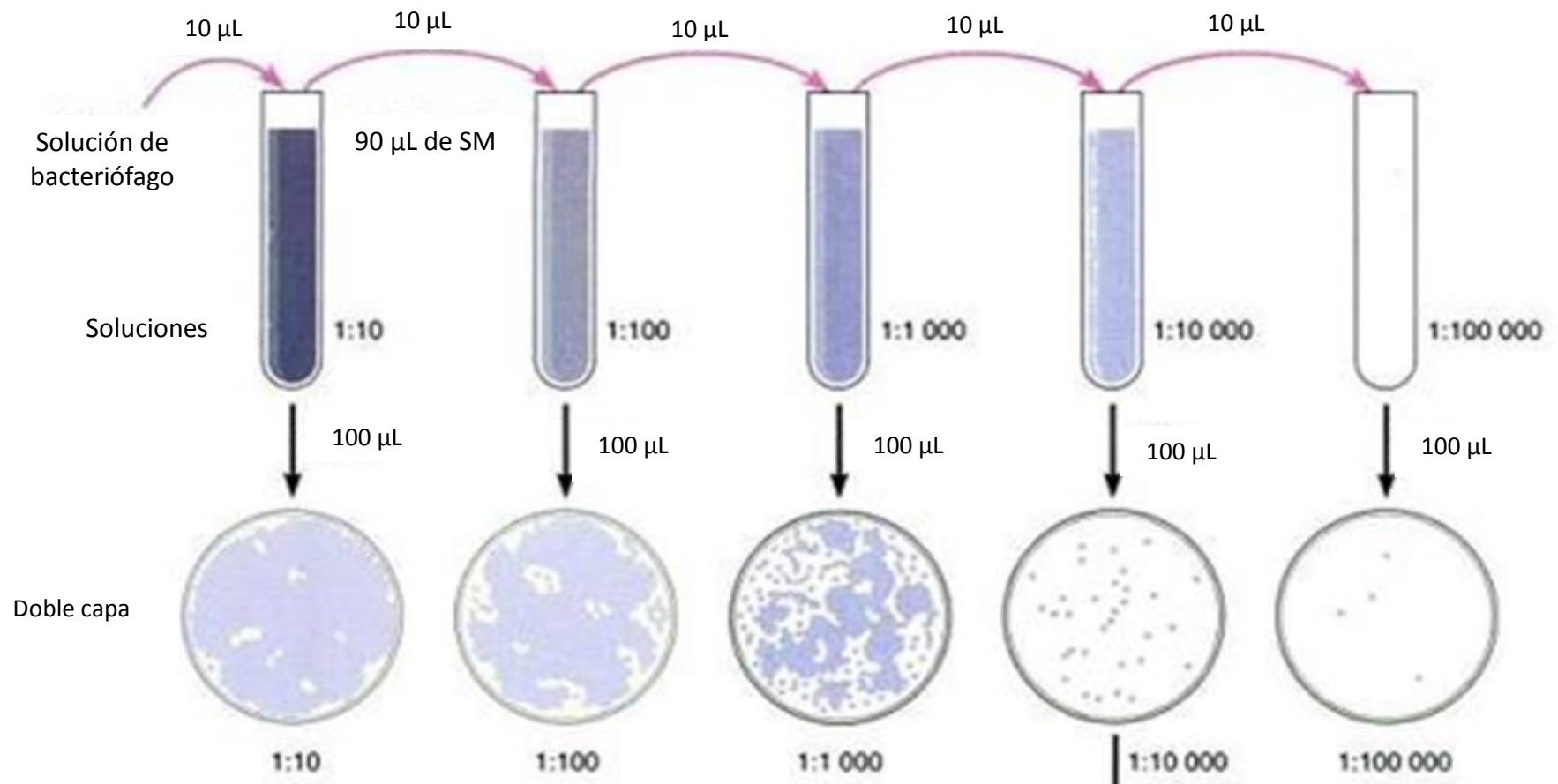


Figura 7. Diluciones seriadas de solución de bacteriófago.

Purificación en caja

Se tomaron de 5 a 20 calvas y se diluyó en 500 µl de buffer SM en un tubo de 1.5 ml refrigerando a 4°C por 1 hora y se centrifugo a 12000 rpm, mientras en otro tubo de 1.5 se colocaron 190 µl de bacteria hospedadora y se agregaron 10 µl del sobrenadante anterior para así llegar a un volumen final de 200 µl. Estos se colocaron en un tubo con 3 ml de agar blando (LB Broth (LENNOX) Pronadisa, Conda, Cat. 1231.00; Agar-Agar BD .2%, .02 mM de CaCl₂) a una temperatura de 44 °C en baño maría y se vertieron en una caja petri con agar LB adicionado con CaCl₂, atemperada previamente en incubadora a 37°C por dos horas. Se dejó secar durante 5 minutos y se colocó en incubadora a 37°C durante toda la noche para observar la presencia de calvas iguales y de un tamaño aproximado de 1mm. Este procedimiento se realizó 3 veces hasta que se consideró que estaba totalmente puro el bacteriófago tomando una caja confluyente para posteriormente realizar la elución de la caja. Se realizó una modificación de agar blando, adicionando glicina a un 5% para observar calvas más grandes y que pudieran ser contables.

Amplificación y purificación de bacteriófagos

Método por cultivo en líquido. En tubos de ensayo con rosca de 30 ml se colocaron 10 ml de medio líquido LB, 100 µl de bacteria hospedero con crecimiento de 3 horas y 10 µl de solución de bacteriófago. Se utilizó un negativo en el que se colocaron solo 100 µl de bacteria hospedero, incubando a 37 °C con agitación a 200 rpm, realizando una observación cada hora esperando observar un cambio a simple vista utilizando como

negativo medio liquido LB estéril y como positivo medio liquido con 100 µl de bacteria hospedero.

Amplificación de bacteriófagos por lisado de placa. En la placa con crecimiento confluyente se adicionaron 1.3 ml de buffer SM, se dejó reposar 10 min y se recuperó el líquido. Se centrifugo 10 min a 12 000 rpm y se recuperó el sobrenadante, se atemperaron cajas de agar LB base y se calentó el agar blando, en tubos de 10 mL, se colocaron 3 ml del agar blando previamente calentado y se colocó en baño María a una temperatura de 44°C. En el agar blando se colocaron 100 µl de bacteria y 100 µl de fago, vertiendo la mezcla en las cajas de agar base atemperada previamente, se dejó incubar 24 horas. Posteriormente se adicionaron 1.3 ml de buffer SM dejando reposar 10 min y se obtuvo el sobrenadante almacenando en tubo de 1.5 mL a 4°C para su realizar su titulación.

Rango de hospedero

El rango de hospedero, es la verificación de la efectividad del bacteriófago de lisar a otras bacterias del mismo o distinto género. En esta observación se utilizó el ensayo de la gota, realizando el mismo procedimiento anteriormente mencionado.

Staphylococcus aureus. Se utilizaron 28 aislados del cepario del Laboratorio de Biología Molecular crecidas en caja petri de Luria Bertani (LB) a partir de stock de glicerol e incubadas a 37°C por 24 horas (Cuadro 1).

Salmonella spp. Se utilizaron 25 aislados del cepario del Laboratorio de *Brucella* y Tuberculosis crecidas en caja petri de medio solido

Salmonella-Shigella y en caja de medio solido LB durante 24 horas a 37°C (Cuadro 2).

Otras especies bacterianas. Se utilizaron 5 aislados (*Staphylococcus chromogenes*, *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Proteus* spp. y *Enterobacter* spp.) del cepario del Laboratorio de Biología Molecular.

IV. RESULTADOS

4.1. Aislamiento de un bacteriófago lítico de *Staphylococcus aureus*: ϕ Sa54

Prueba de la gota

Un sobrenadante de la muestra de pre amplificación obtenida de leche y el aislado de *S. aureus* 54^a, dio una zona lítica en la prueba de la gota en un tiempo de 72 horas (Figura 8, A y B). Como se muestra en la Figura 8 el tapete de bacteria hospedera se contaminó con otros microorganismos de origen del sobrenadante pre amplificado. La desinfección del sobrenadante con cloroformo eliminó la contaminación del tapete bacteriano y también la zona lítica. Las muestras de pre amplificación de leche de bovino y del medio ambiente (agua y suelo) del establo del IICV dieron resultados negativos en las pruebas de la gota. (Figura 8).

Ensayo de calvas

Se recuperó la suspensión del agar de la zona lisada de la figura 8 A y B y se probó la presencia del bacteriófago en el ensayo de calvas. Al inicio el resultado del ensayo de calvas, resultó con contaminación de colonias de otros microorganismos con color amarillo o blanco, con calvas visibles de distintos tamaños de 0.2 a 0.5 mm aproximadamente, con formas irregulares y redondas. Se filtraron las muestras (suspensión de geles) para los ensayos posteriores con membranas de polyethersulfone de 0.2 μ m de diámetro (Puradisc TM 25mm Whatman GI healthcare UK) lográndose obtener resultados de ensayo de calvas limpios y consistentes. La Figura 9 muestra

un ejemplo de las calvas aisladas, considerándose como un bacteriófago puro, el cual se nombró Φ Sa54A, por la cepa indicador.

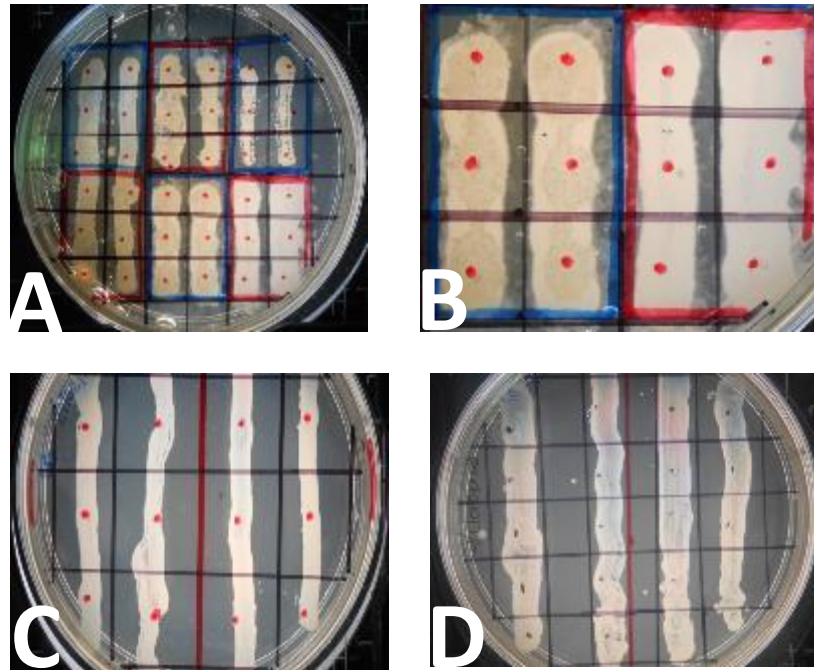


Figura 8. Ejemplos de resultados de la prueba de gota. Presencia de la actividad lítica de muestras pre-amplificadas (A y B) y ausencia de actividad lítica (C y D). (A) Heces de bovino como fuente de bacteriófagos. Se aplicaron muestras pre-amplificadas sobre tiras de *S. aureus* (ATCC BAA1026, ATCC 33591 y 54A). (B) Aumento de una fracción de la imagen A que indica la presencia de actividad lítica sobre el aislado 54A (las dos tiras izquierdas); (C) Leche de bovino como fuente de bacteriófago. Ausencia de actividad lítica con bacterias hospederas 54A y ATCC 33591. (D) Caja de control negativo. Tiras de ATCC BAA1026 y 54A, de *S. aureus* con gotas de agua.

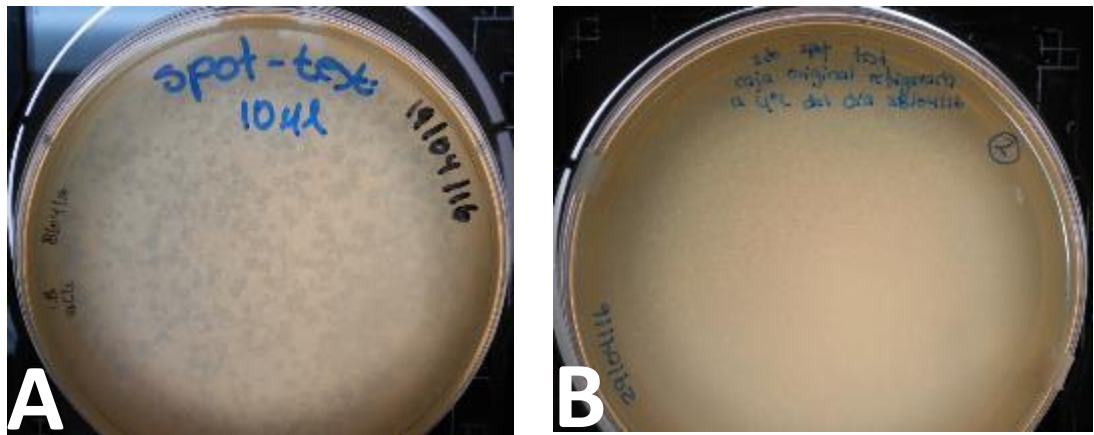


Figura 9. Aislamiento de un nuevo bacteriófago lítico de *Staphylococcus aureus* (ΦSa54A). Resultados de dos ensayos de calvas; (A) Aislamiento de calvas a partir de bacteriófagos recuperados de la zona de lisis de la prueba de la gota de la Figura 9 B. (B) Re-aislamiento de una calva.

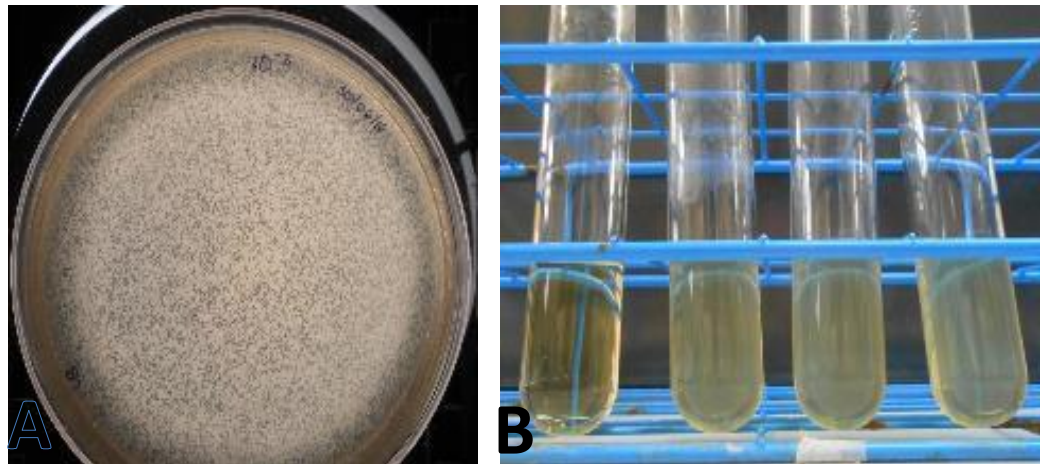


Figura 10. Actividad lítica del bacteriófago ΦSa54A purificado (A) ejemplo de una placa para la titulación del fago ΦSa54A, 99 calvas formadas por la muestra de bacteriófago diluida a 10^{-3} . (B) Amplificación del ΦSa54A en cultivo en líquido de *S. aureus* (aislado 54A).

En la figura 10 se muestra un ejemplo de placa para la titulación de calvas donde se hizo el conteo de una muestra de bacteriófagos diluida a 10^{-3} (Figura 10A). Por ejemplo el conteo de las calvas fue de 99 lo cual se obtuvo con 10 μ L de la muestra del fago diluido por placa, por lo que el título de la solución original del fago se calculó 9.9×10^6 (PFU/mL) de acuerdo a la siguiente formula:

$$PFU/mL = 99 (\# \text{ de calvas}) \times 10^3 (\text{factor de dilución}) \times 10^2 (\text{conversión por mL})$$

Posteriormente se amplificó y se purificó el fago ϕ Sa54A mediante las placas completamente lisadas. Además se realizó una amplificación con el método de cultivo en medio líquido, sin embargo se lisaron todos los cultivos relativamente rápido en 2-3 horas posterior al inóculo con el ϕ Sa54A y no resultaron con el título suficiente de bacteriófagos ($< 10^5$ PFU/mL) (Figura 10).

Rango de hospedero del ϕ Sa54A

Se analizó la susceptibilidad de infección por el bacteriófago ϕ Sa54A de 28 aislados de *S. aureus* Multidroga resistente (MDR) provenientes de diferentes establos de la Península de Baja California. Se observó la actividad lítica del ϕ Sa54A en 4 aislados (14.3%) de diferentes municipios. Ninguna de las dos cepas de referencia de *S. aureus* fue susceptible al ϕ Sa54A (Cuadro 3)

Cuadro 3. Rango de hospedero del bacteriófago ϕ Sa54A.

<i>S. aureus</i>	No. de aislados		Aislados susceptibles	Resistencia antimicrobiana
	Analizados	Susceptibles (%)		
Cepas referencia*	2	0 (0%)		
Mexicali (IICV)	4	1 (25%)	54A MDR	β -lac, A, Q (M)
Tecate, BC	20	1(5%)	5821C (MDR)	β -lac (A, Q)
La Paz, BCS	4	2 (50%)	7416B (MDR) 1438D-2 (MDR)	β -lac, T,(Q, A, Q, S) β -lac, M (T, Q)
Total	28	4 (14.3%)		

*ATCC33591, ATCC BAA1026

4.2. Aislamiento de bacteriófagos líticos de *Salmonella* spp.

Prueba de la gota

A partir de una pre-amplificación con 9 aislados de *Salmonella* spp. y mezcla de heces de perros callejeros se comprobó la presencia de la actividad lítica en un tiempo de 24 horas contra 5 diferentes aislados. Esta actividad lítica observada fue resistente al tratamiento del sobrenadante con cloroformo.

Ensayo de calvas

Al igual que el bacteriófago ϕ Sal54A, las suspensiones en gel de agar (zona de lisis) no dieron resultados uniformes en forma y tamaño de calvas, por lo que se hicieron por lo menos 2-3 rondas de aislamiento por calva a calva. Se logró aislar en total 5 bacteriófagos nuevos, uno para cada una de las bacterias hospederas susceptibles en la prueba de la gota, denominándose como ϕ Sal298, ϕ Sal317, ϕ Sal398, ϕ Sal399 y ϕ Sal488. Los tamaños de las calvas fueron variadas entre diferentes bacteriófagos, sin embargo la presencia de glicina que favoreció el crecimiento de calvas en general. Todos los bacteriófagos aislados fueron esterilizados utilizando una membrana de polyethersulfone de 0.2 μ m de diámetro (Puradisc™ 25mm Whatman GI healthcare UK). Se observaron algunas calvas muy pequeñas de aproximadamente 1 mm y otras irregulares las cuales no se observó si eran una sola calva o calvas juntas o uno o varios bacteriófagos. Para los ensayos posteriores los bacteriófagos se pasaron por un filtro de jeringa de .22 μ m de diámetro (Puradisc™ 25mm Whatman GI healthcare UK) (Figura 11).

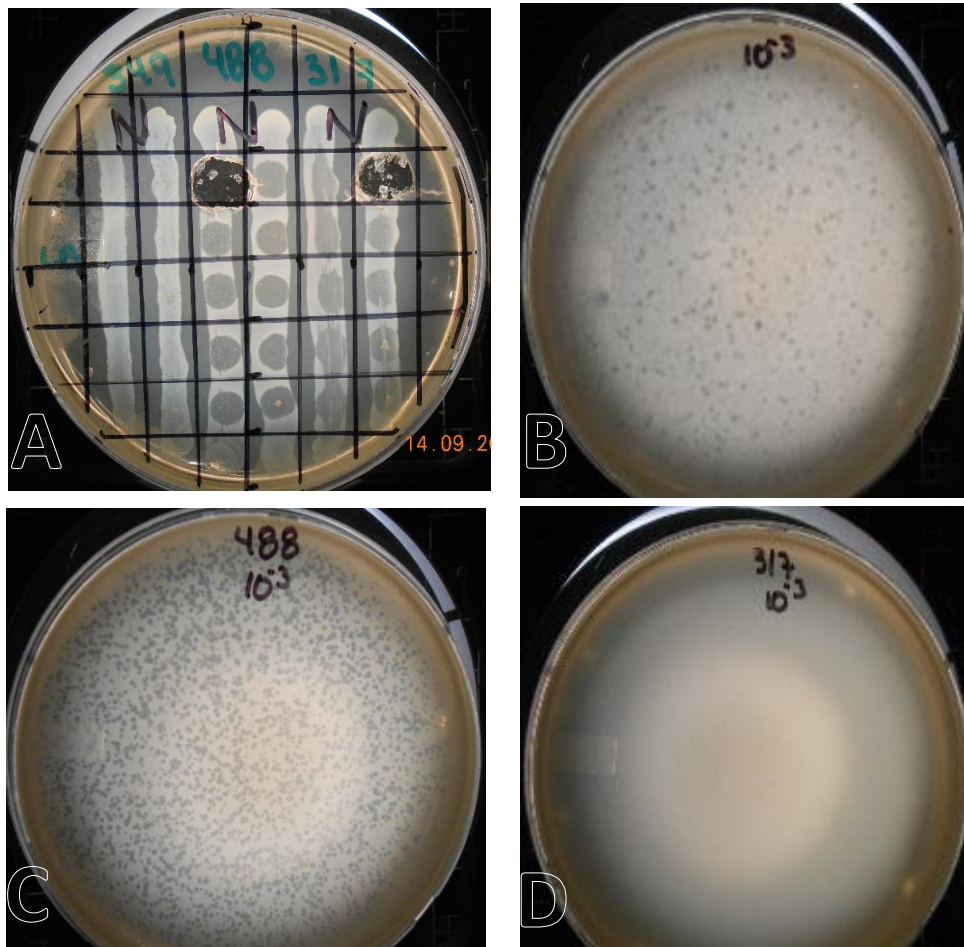


Figura 11. Aislamiento de bacteriófagos líticos de *Salmonella* spp. (A) Resultados de la prueba de la gota con los aislados 349, 317 y 488, se observó la actividad lítica de las muestras pre-amplificadas de heces de perros. (B) Aislamiento primario de calvas a partir de zona clara de la prueba de la gota. (C) Re-aislamiento de bacteriófago (Φ Sal488) con la bacteria hospedadora 488. (D) Re-aislamiento de bacteriófago (Φ Sal317) con la bacteria hospedadora 317.

Amplificación y purificación de 5 bacteriófagos de Salmonella spp. ϕ Sal298, ϕ Sal317, ϕ Sal398, ϕ Sal399 y ϕ Sal488

Purificación por método de lisado de caja Se amplificaron y purificaron los 5 bacteriófagos mediante el método del lisado total de placas saturadas con calvas. Las placas con calvas saturadas fueron obtenidas con 10 μ l de la suspensión de una o múltiples calvas diluidas entre 10^2 y 10^3 . Se amplificaron por lo menos en tres placas, se juntaron y se determinó el título de bacteriófagos amplificados (Cuadro 4).

Para el fago ϕ Sal398 se amplificó mediante el método del cultivo en medio líquido observando lisis completa en aproximadamente 4 horas (Figura 12)

Cuadro 4. bacteriófagos de Purificados	Bacteriófago	PFU/mL	Títulos de <i>Salmonella</i> spp.
	ϕ Sal298	6×10^8	
	ϕ Sal317	6.2×10^9	
	ϕ Sal398	2×10^6	
	ϕ Sal399	8.7×10^5	
	ϕ Sal488	6.2×10^9	

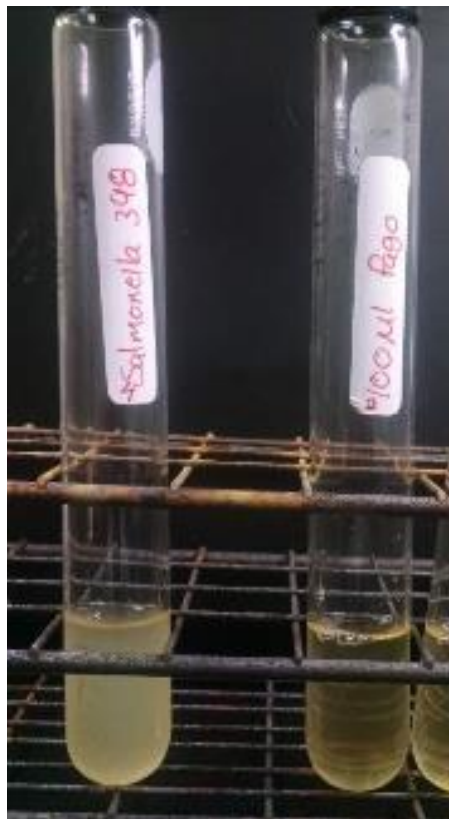
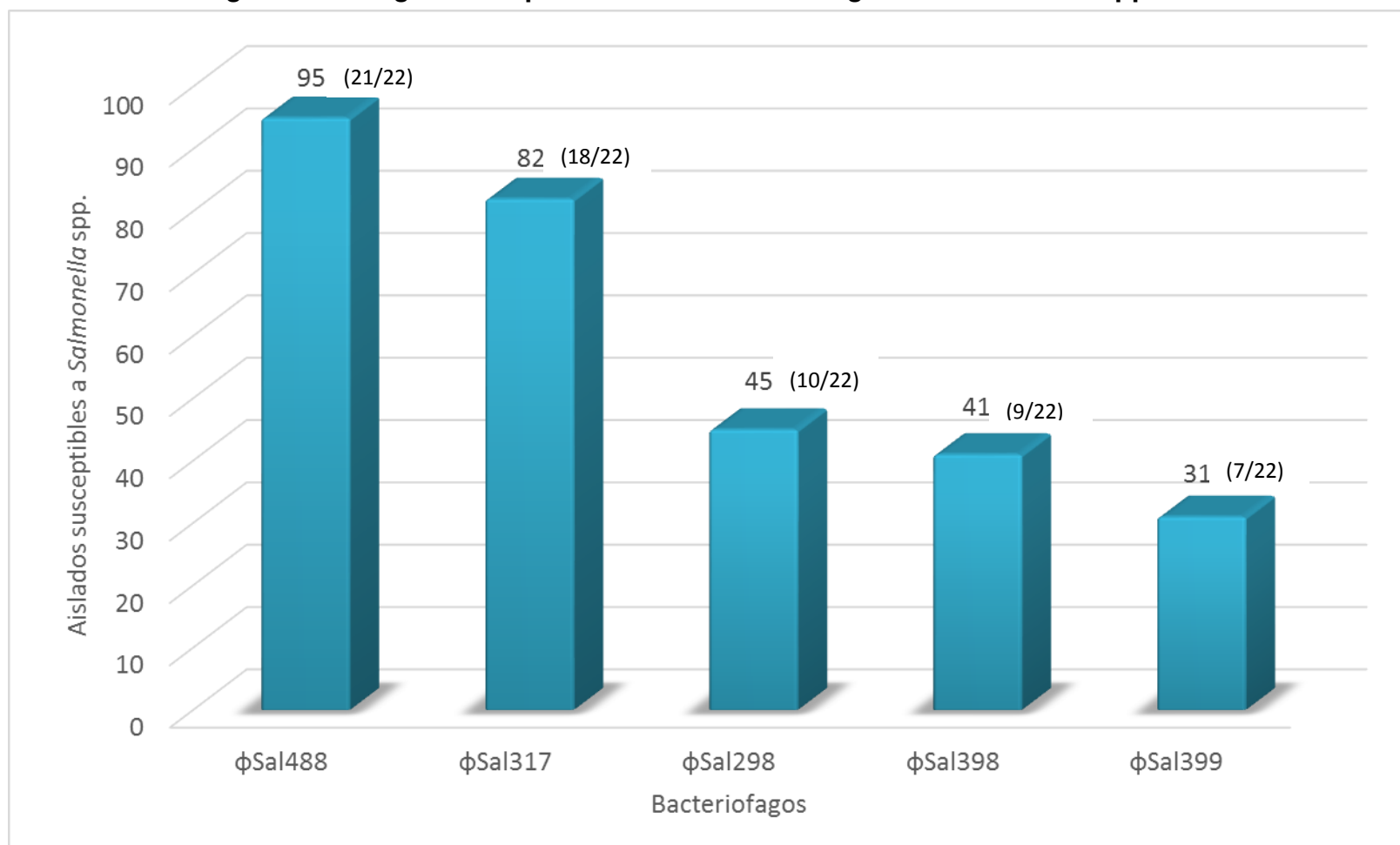


Figura 22. Amplificación del bacteriófago ϕ Sal398 con el método de cultivo en líquido. Se monitoreó el cultivo del aislado 398 infectado con el fago ϕ Sal398 por un tiempo de 4 a 8 horas en medio LB. En 4 horas se observó la lisis completa (tubo a la derecha) a diferencia del cultivo de bacteria hospedadora sin bacteriófago (tubo a la izquierda).

Rango de hospedero

Se realizó la prueba de la gota de los 5 bacteriófagos obtenidos contra 22 aislados de *Salmonella* spp. de perros de la región. Los porcentajes de los aislados sensibles varían entre 32 y 95% donde los bacteriófagos ϕ Sal317 y ϕ Sal488 destacaron al obtener un porcentaje de lisis de 82% y 95% respectivamente (Figura 13).

Figura 33. Rango de hospedero de los bacteriófagos de *Salmonella* spp.



Especificidad de hospedero contra Staphylococcus chromogenes, Proteus spp., Enterobacter spp., Klebsiella spp. y E. coli

Se realizó la prueba de la gota con aislados de *Staphylococcus chromogenes*, *Proteus spp.*, *Enterobacter spp.*, *Klebsiella spp.* y *E. coli*, del cepario del Laboratorio de Biología Molecular del IICV, y de dos cepas de referencia ATCC 10145 *Pseudomonas aureaginosa* y *E. coli* (cortesía del Dr. Rafael Martínez Miranda). En el cuadro 6 se muestran los resultados de la actividad lítica de los dos bacteriófagos ϕ Sal317 y ϕ Sal488 demostrándose actividad en diferentes especies bacterianas (Figura 14). Estos dos bacteriófagos fueron resistentes al cloroformo.

Cuadro 5. Actividad lítica de 5 bacteriófagos de *Salmonella* spp. contra otras especies bacterianas.

Aislados	Bacteriófagos				
	ϕ Sal298	ϕ Sal398	ϕ Sal399	ϕ Sal317	ϕ Sal488
<i>S. chromogenes</i>	-	-	-	-	-
<i>Proteus spp.</i>	-	-	-	-	-
<i>Enterobacter spp.</i>	-	-	-	X	-
<i>Klebsiella spp.</i>	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	-	-	-	X	X

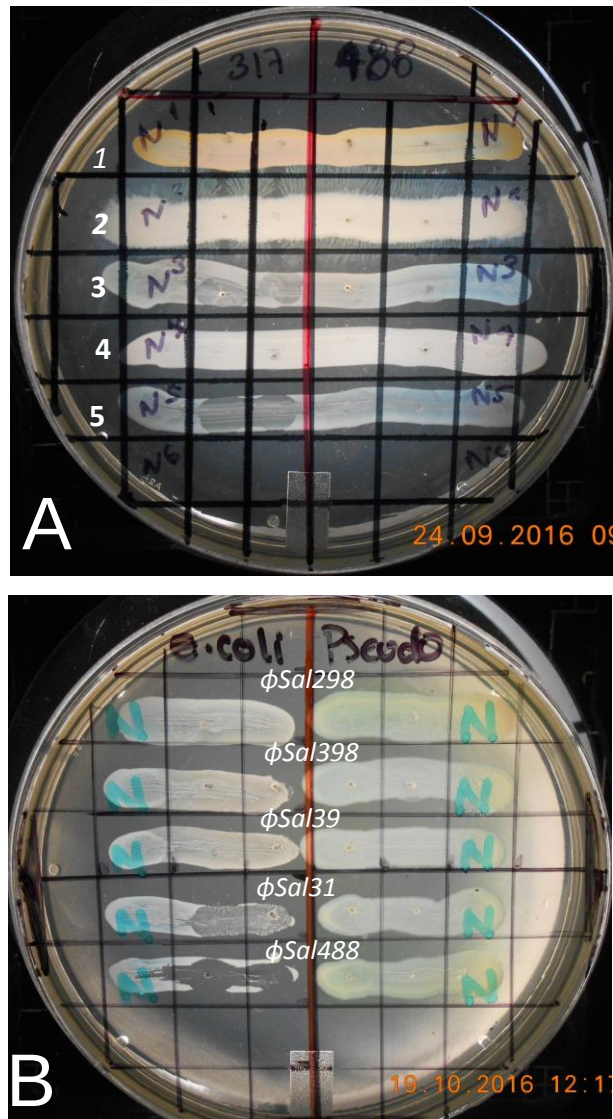


Figura 14. Prueba de la gota con diferentes especies bacterianas. A) Φ Sal317 y Φ Sal488 con bacteria hospedera: 1. *S. chromogenes*, 2. *Proteus* spp., 3. *Enterobacter* spp., 4. *Klebsiella* spp., 5. *E. coli*, se observa una actividad lítica marcada en el Φ Sal317 sobre *Enterobacter* spp., mientras en el Φ Sal488 en *E. coli* se observa un actividad lítica muy leve. B) Φ Sal298, Φ Sal398, Φ Sal399, Φ Sal317 y Φ Sal488 (en orden descendente) sobre un tapete de bacterias hospederos *E. coli* y *Pseudomonas aureaginosa*. Se observa una actividad lítica marcada sobre *E. coli* de los fagos Φ Sal317 y Φ Sal488. Mientras que en *Pseudomonas aureaginosa*, no hay actividad lítica.

V. DISCUSION

En el presente estudio es el primer reporte en el estado en que se ha logrado aislar nuevos bacteriófagos que lisan a *Staphylococcus aureus* y *Salmonella* spp., además, se estandarizaron protocolos para aislar bacteriófagos de muestras ambientales de la ciudad de Mexicali Baja California, utilizando como hospederos bacterias aisladas de diferentes lugares y animales de la Península de Baja California como *Salmonella* spp. y *Staphylococcus aureus*, siendo este el primer trabajo de este tipo realizado hasta el momento en esta región. El objetivo inicial fue aislar y caracterizar en su totalidad los bacteriófagos encontrados, pero solo se llegó a una caracterización parcial, debido al tiempo y la disponibilidad de materiales, quedando pendientes para posteriores periodo de eclipse, tiempo de adsorción, tiempo de explosión y microscopia electrónica.

Bacteriófago Staphylococcus aureus

Lo que dio origen e impulso del presente trabajo fue el estudio de Palacios (2014), donde se reportó que el 74% de los aislados de *Staphylococcus aureus* asociados a mastitis bovina en la Península de Baja California eran multirresistentes (Palacios, et al., 2014). Se buscaron bacteriófagos líticos capaces de lisar este patógeno, posteriormente se extendió el estudio para buscar bacteriófagos de otro patógeno bacteriano con importancia en salud animal, *Salmonella* spp. Durante la ejecución del presente trabajo se han logrado establecer e implementar algunos protocolos de aislamiento de nuevos bacteriófagos líticos, los cuales serán

fácilmente empleados para extender la búsqueda de bacteriófagos líticos con potencial en el uso terapéutico y biocontrol de otras bacterias patógenas con importancia en salud animal y humana.

En Polonia Kwiatek y colaboradores (2012) reportaron el aislamiento de 25 bacteriófagos de *Staphylococcus aureus* de muestras de leche de bovino y suelo, todos con una actividad lítica muy similar, por lo que, eligieron al azar al bacteriófago MSA6 para su caracterización y rango de hospedero ante 53 bacterias aisladas de muestras de humanos y animales. Además utilizaron cepas de referencia y otros aislados como *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus saprofiticus*. Este bacteriófago fue lítico ante 46 aislados (86.79%) lo cual nos dice que es un buen candidato para su futuro uso en terapia de bacteriófagos en animales y humanos, como un antimicrobiano muy específico al género de *Staphylococcus* sin tener actividad lítica en otras bacterias (Kwiatek y col., 2012). En India Mishra y colaboradores (2013), encontraron 6 bacteriófagos contra *Staphylococcus aureus* a partir de muestras de heces de cabra con mastitis y de suelo, con un rango de hospedero de 70 al 86%, tres de ellos, además de mostrar amplio rango de hospedero de 82 a 86%, fueron resistentes al cloroformo al 5% (v/v) y se obtuvieron títulos muy altos de bacteriófagos amplificados (10^9 a 10^{11}). En nuestro trabajo el bacteriófago ϕ Sa54A fue susceptible al cloroformo, lo que implica una desventaja en el manejo y mantenimiento cotidiano; además no se logró una buena amplificación siendo esta de 9.9×10^6 . Probablemente las características líticas como el tamaño de explosión del bacteriófago no son ideales para obtener títulos de fagos extremadamente altos. En Japón, Synnot y colaboradores (2009) aislaron 52

bacteriófagos y observaron la actividad lítica contra 15 aislados provenientes de vacas con mastitis, y una cepa de referencia (ATCC 6538). Solo dos bacteriófagos (ϕ Sa012 y ϕ Sa039) tuvieron una actividad lítica de contra *S. aureus* de 8/15 (53%) y 13/15 (87%). O'Flaherty y col. (2005), aislaron 2 bacteriófagos (DW2 y CSI) provenientes de heces líquidas obtenidas de un corral de bovinos, observando que podrían ser efectivos para el tratamiento de bovinos con mastitis ya que su rango de hospedero fue de 6/8 (75%), para ambos en cepas Multidroga resistentes de humanos y animales (O'Flaherty, *et al.*; 2005).

El rango de hospedero del bacteriófago ϕ Sa54 fue inferior (13.3%) comparado con otros bacteriófagos de *S. aureus* previamente reportados. El hospedero original de esta fago (54A) fue aislado de un cuarto de la vaca identificada con el número 54 del IICV. El otro aislado de *S. aureus* denominado 54B no fue susceptible al bacteriófago ϕ Sa54 fue aislado de otro cuarto afectado del mismo animal. Lo que demuestra una especificidad del reconocimiento del hospedero muy alto de este bacteriófago. Sin embargo la especificidad del reconocimiento del hospedero-bacteriófago no fue limitada por la región geográfica, el mismo bacteriófago ϕ Sa54 fue capaz de lisar a otros aislados encontrados en muestras del municipio de Tecate y de La Paz, Baja California Sur.

Bacteriófagos Salmonella spp.

Se han aislado bacteriófagos líticos de *Salmonella* de diferentes fuentes ambientales como suelos, pacientes de hospitales, diversas granjas y aguas residuales (Austine, et al, 2013; Kang, et al.; 2013; Park et al., 2012; Santos et al.; 2010), en donde los rangos de hospedero de los bacteriófagos obtenidos fueron reportados 34.3 a 91.8% contra serovares analizadas como *S. Enteritidis*, *S. typhimurium*, *S. Dublin*, *S. paratyphi*, *S. agona*, *S. heldeberg*, y *S. Juliana*) Los resultados del rango de hospedero de los bacteriófagos aislados en nuestro estudio fueron de 45.5 a 95.4% ante los 22 aislados del genero *Salmonella* sp. En particular, los dos fagos con mayor rango de hospedero (>80%) ϕ Sal317 y ϕ Sa488, pueden ser buenos candidatos para utilizarse como agente terapéutico o para biocontrol de *Salmonella*; seria de importancia estudiar sus características morfológicas, genómicas, así como también las estabilidades dinámicas de sus actividades líticas. Otro aspecto notable de estos dos bacteriófagos fue que cuentan con actividad lítica contra otras bacterias (*E. Coli* y *Enterobacter* spp.). La lisis observada con el aislado de *E. coli* fue total, mientras tanto con *Enterobacter* spp. no fue completa debido a la ocurrencia de colonias resistentes dentro de la zona lítica. Los tres géneros de bacterias susceptibles a nuestros bacteriófagos son gram negativos, igual que salmonella, sin embargo se desconoce el mecanismo molecular por el cual interactúan hospedero-bacteriófago para realizar la infección. Hong y col. (2008) reportaron moléculas como BF23 y H8 como los posibles ligandos de un bacteriófago tipo T5 (EPS7), el cual posee actividad lítica para *E. coli* y *Salmonella* spp.

En bacterias gram negativas, se conocen otros receptores como lipoproteínas (Llp), proteínas de membranas externas (Omp) y receptor de enterbactina férrica (FepA) (Hong, *et al.*; 2008).

Se pretende continuar con el análisis de los bacteriófagos de *Salmonella* obtenidos en el presente estudio, primeramente determinando su capacidad de infección ante otras serovariedades de *Salmonella* asociadas a infecciones en humanos y animales, incluso en reptiles, utilizando un panel de bacterias más amplio. Aunque cada uno de los bacteriófagos tenga una especificidad muy limitada, la combinación de múltiples bacteriófagos (coctel de bacteriófagos) podrá ampliar el espectro del hospedero, a la vez evitando el problema de resistencia. Así mismo, faltan estudios como la administración de bacteriófagos *in vivo* en animales de experimentación, y el análisis *in vitro* de la evolución de hospedero.

VI. CONCLUSIONES

Se logró aislar nuevos bacteriófagos líticos que infectan a aislados de bacterias patógenas de la región, 1 bacteriófago de *Staphylococcus aureus* denominado Φ SA54A y 5 bacteriófagos de *Salmonella* spp. denominados ϕ Sal298, ϕ Sal317, ϕ Sal398, ϕ Sal399 y ϕ Sal488.

El bacteriófago Φ SA54A de *Staphylococcus aureus*, no es candidato para la aplicación en biocontrol o terapia ya que no fue posible obtener un rango de hospedero alto, además por ser susceptible al cloroformo no es posible ser almacenado por largo tiempo.

Los 2 bacteriófagos ϕ Sal317 y ϕ Sal488 de *Salmonella* spp, son candidatos para la aplicación en el biocontrol por su mayor rango de hospedero, pero requieren estudios más específicos de su actividad lítica así como microscopia electrónica para conocer su taxonomía y características genómicas, así como también su actividad en animales infectados por *Salmonella* spp. en el futuro.

VI. LITERATURA CITADA

Abedon, S. T., Kuhl, S. J., Blasdel, B. G., & Kutter, E. M. (2011). Phage treatment of human infections. *Bacteriophage*, 1(2), 66-85

Adams, Mark H. 1959. *Bacteriophages*. London: Interscience Publishers, INC, New York.

Ahiwale, S. S., Bankar, A. V., Tagunde, S. N., Zinjarde, S., Ackermann, H. W., & Kapadnis, B. P. (2013). Isolation and characterization of a rare waterborne lytic phage of *Salmonella enterica* serovar Paratyphi B. *Canadian journal of microbiology*, 59(5), 318-323.

Ackermann H.W.; (2001); Frequency of morphological phage descriptions in the year 2000, *Archives of Virology*; Australia; 146: 843-857.

Augustine, Jeena et al. (2013). "Isolation and Partial Characterization of Φ SP-1, a *Salmonella* Specific Lytic Phage from Intestinal Content of Broiler Chicken." *Journal of Basic Microbiology* 53(2): 111–20.

Braun, V., & Hantke, K. (1977). Bacterial receptors for phages and colicins as constituents of specific transport systems. In *Microbial interactions* (pp. 99-137). Springer US.

Blowey Roger; Edmondson Peter; (1999); *Controll de la mastitis en grajas de vacuno de leche: guía ilustrada y práctica*; Ed. Acribia, España.

Chaturongakul, S., & Ounjai, P.; (2014). Phage–host interplay: examples from tailed phages and Gram-negative bacterial pathogens.

Chung, Dwight C. Hirsh and Yuan; (1999); *Veterinary Microbiology*. 2a Edicion. United Kingdom: Blackwell Science Ltd.

- CFSPH, The Centro for food security and Public Healt; (2006). "Salmonelosis." : 8.
- de Lourdes Ríos-Ibarra, M., Rosas-Barbosa, B. T., & Juan-Morales, A. L.; (1997). Resistencia a antimicrobianos de cepas de Salmonella aisladas de fuentes animales. *Vet. Méx*, 28(3), 215.
- Deshpande, L. M., Fritsche, T. R., & Jones, R. N.; (2004). Molecular epidemiology of selected multidrug-resistant bacteria: A global report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 49(4), 231–236.
- Division of Healthcare Quality Promotion, National Center for Infectious Diseases, C. for D. C. and P.; (2004). National Nosocomial Infections Surveillance, Public Health Service, System Report data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. *American Journal of Infection Control*, 32(8), 470–485.
- El Haddad, L., & Moineau, S.; (2013). Characterization of a novel Panton-Valentine leukocidin (PVL)-encoding staphylococcal phage and its naturally PVL-lacking variant. *Applied and environmental microbiology*, 79(8), 2828-2832.
- Ferraro, L., Scaramelli, A., & Troya, H; (1999). Prevalencia de la mastitis subclínica bovina en Venezuela y evaluación de la prueba de Mastitis de California (CMT) como prueba diagnóstica. *Revista Científica de La Facultad de Ciencias Veterinarias de La Universidad Del Zulia*, 9(2), 81–90.
- F Turton, Jane; (2012); "Isolation of Bacteriophage against Currently Circulating Strains of Acinetobacter Baumannii." *Journal of Medical Microbiology & Diagnosis* 1(3): 3–5.
- Garcia, P, B Martinez, J. M. Obeso, and A Rodriguez (2008); "Bacteriophages and Their Application in Food Safety." *Lett Appl Microbiol* 47(6): 479–85.
- Gill, Jason, and Paul Hyman; (2010); "Phage Choice, Isolation, and

Preparation for Phage Therapy.” *Current Pharmaceutical Biotechnology* 11(1): 2–14.

Grimont, Patrick, and François-Xavier Weill; (2008); “Antigenic Formulae of the *Salmonella* Serovars.” *WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella*: 1–167.

Higgins, J. P., Andreatti Filho, R. L., Higgins, S. E., Wolfenden, A. D., Téllez, G., & Hargis, B. M. (2008). Evaluation of *Salmonella*-lytic properties of bacteriophages isolated from commercial broiler houses. *Avian diseases*, 52(1), 139-142.

Hiramatsu, K., Cui, L., Kuroda, M., & Ito, T. (2001). The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends in Microbiology*, 9(10), 486–493.

Hong J.; Pyo-Kim K.; Heu S.; Jun Lee S.; Adhya S.; Ryu S.; (2008); Identification of host receptor and receptor binding module of a newly sequenced T5-like phage EPS7; Federation of European Microbiological Societies.

Hungaro, H. M., Mendonça, R. C. S., Gouvêa, D. M., Vanetti, M. C. D., & de Oliveira Pinto, C. L. (2013). Use of bacteriophages to reduce *Salmonella* in chicken skin in comparison with chemical agents. *Food research international*, 52(1), 75-81.

Kang, H.-W., J.-W. Kim, T.-S. Jung, and G.-J. Woo; (2013); “wksl3, a New Biocontrol Agent for *Salmonella Enterica* Serovars Enteritidis and Typhimurium in Foods: Characterization, Application, Sequence Analysis, and Oral Acute Toxicity Study.” *Applied and Environmental Microbiology* 79(6): 1956–68.

Kutter E., Sulakvelidze A.; (2005); Bacteriophages : biology and applications Biology and Applications. 1a Edition. Sulakvelidze Alexander Elizabeth Kutter. United States of America: CRC Press.

- Kutter, E., White, T., Kashlev, M., McKinney, J. D., & Guttman, B.; (1994). Effects on host genome and structure (No. EPFL-CHAPTER-153336, pp. 357-368). American Society for Microbiology.
- Kwon, H. J., Cho, S. H., Kim, T. E., Won, Y. J., Jeong, J., Park, S. C., ... & Kim, S. J.; (2008). Characterization of a T7-like lytic bacteriophage (ϕ SG-JL2) of *Salmonella Enterica* serovar Gallinarum biovar Gallinarum. *Applied and environmental microbiology*, 74(22), 6970-6979.
- Kwiatek, M., Parasion, S., Mizak, L., Gryko, R., Bartoszcze, M., & Kocik, J.; (2012). Characterization of a bacteriophage, isolated from a cow with mastitis, that is lytic against *Staphylococcus aureus* strains. *Archives of virology*, 157(2), 225-234.
- Li, L., & Zhang, Z.; (2014). Isolation and characterization of a virulent bacteriophage SPW specific for *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis of lactating dairy cattle. *Molecular biology reports*, 41(9), 5829-5838.
- Lin, N. T., Chiou, P. Y., Chang, K. C., Chen, L. K., & Lai, M. J.; (2010). Isolation and characterization of ϕ AB2: a novel bacteriophage of *Acinetobacter baumannii*. *Research in microbiology*, 161(4), 308-314.
- Lowy, F. D.; (1998). *Staphylococcus aureus* infections. *New England journal of medicine*, 339(8), 520-532.
- Mark H. Adams; (1959); *Bacteriophages*. London: Interscience Publishers, INC, New York.
- Merabishvili, M., Vandenheuvel, D., Kropinski, A. M., Mast, J., De Vos, D., Verbeken, G. & Pirnay, J. P.; (2014). Characterization of newly isolated lytic bacteriophages active against *Acinetobacter baumannii*. *PloS one*, 9(8).
- Mishra, A. K., Sharma, N., Kumar, A., Kumar, N., Bayyappa, M. G., Kumar, S., & Kumar, N.; (2014). Isolation, characterization and therapeutic

potential assessment of bacteriophages virulent to *Staphylococcus aureus* associated with goat mastitis. *Iranian journal of veterinary research*, 15(4), 320.

Murray, Patrick R, Ken S Rosenthal, and Michael A Pfaller.; (2005). *Microbiología Médica*. 5a Edición. Madrid España: Elsevier Barcelona España.

Naylor, A. R., Hayes, P. D., & Darke, S.; (2001). A prospective audit of complex wound and graft infections in Great Britain and Ireland: the emergence of SAMR. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*, 21(4), 289-294.

Nikaido, H.; (2003). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiology and molecular biology reviews*, 67(4), 593-656.

Núñez Castro Karla Michelle; (2015); Aislamiento e identificación de *Salmonella* spp. en perros del Centro Municipal de Control Animal en Mexicali Baja California, México; Tesis; Universidad Autónoma de Baja California.

O'flaherty, S., Ross, R. P., Meaney, W., Fitzgerald, G. F., Elbreki, M. F., & Coffey, A.; (2005). Potential of the polyvalent anti-*Staphylococcus* bacteriophage K for control of antibiotic-resistant staphylococci from hospitals. *Applied and environmental microbiology*, 71(4), 1836-1842.

O'flaherty, S., Ross, R. P., Flynn, J., Meaney, W. J., Fitzgerald, G. F., & Coffey, A. (2005). Isolation and characterization of two anti-staphylococcal bacteriophages specific for pathogenic *Staphylococcus aureus* associated with bovine infections. *Letters in applied microbiology*, 41(6), 482-486.

Palacios Torres Javier; (2017) Prevalencia y perfiles de resistencia de *Staphylococcus aureus* en casos de mastitis bovina en establos

lecheros de la Península de Baja California; Tesis; Universidad Autónoma de Baja California.

- Popova, A. V., Zhilenkov, E. L., Myakinina, V. P., Krasilnikova, V. M., & Volozhantsev, N. V. (2012). Isolation and characterization of wide host range lytic bacteriophage AP22 infecting *Acinetobacter baumannii*. *FEMS microbiology letters*, 332(1), 40-46.
- Pellegrino, M. S., Frola, I. D., Odierno, L. M., & Bogni, C. I.; (2011). Bovine Mastitis:Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* strains isolated from milk | Mastitis Bovina: Resistencia a antibióticos de cepas de *Staphylococcus aureus* asiladas de leche. *Revista Electronica de Veterinaria*, 12(7), 1–14.
- Pimienta-Rodríguez, Elsa T.; (2013). “Tratamiento Con Bacteriófagos Como Una Alternativa Antimicrobiana Potencial.” *Revista CENIC Ciencias Biológicas* 44(2).
- Rakhuba, D. V., Kolomiets, E. I., Dey, E. S., & Novik, G. I.; (2010). Bacteriophage receptors, mechanisms of phage adsorption and penetration into host cell. *Pol. J. Microbiol*, 59(3), 145-155.
- Rubin, R. J., Harrington, C. a., Poon, a., Dietrich, K., Greene, J. a., & Moiduddin, A.; (1999). The economic impact of *Staphylococcus aureus* infection in New York City hospitals. *Emerging Infectious Diseases*, 5(1), 9–17.
- Santiago, J. M., Andrade, L. H., Ballesteros, E. A., Díaz, L. M. C., & Valenzuela, D. H.; (2012). Aislamiento bacteriano en bovinos de doble propósito con mastitis subclínica, en la costa de Guerrero, México. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, 13(7), 1-11
- Santos, S. B., Fernandez E., Carvalho C. M., Killankorva S., Krylov N., Pleteneva E.A., Shoburova O. V., Nicolau A., Ferreira E. C., Azeredo J.; (2010). “Selection and Characterization of a Multivalent *Salmonella* Phage and Its Production in a Nonpathogenic *Escherichia Coli* Strain.” *Applied and Environmental Microbiology* 76(21): 7338–42.

Scallan, E., Hoekstra R.M., Angulo F. J., Tauxe R. V., Widdowson M.A., Roy S.L., Jones J.L., Griffin P.M.; (2011); "Foodborne Illness Acquired in the United States-Major Pathogens." *Emerging Infectious Diseases* 17(1): 7–15.

Schlegel, Hans G.; (1997). *Microbiología General*. Nueva Edic. Barcelona Espana: Ediciones Omega, S.A.

Stanchi, N. O., (2007), *Microbiología-Veterinaria*. 1a. Edicion. Julio Alberto Copes Pablo Eduardo Martino, Elida Gentilini, Enso Hugo Reinoso, María Gabriela Echeverria, Nelida Amelia Leardini. Buenos Aires, República de Argentina: Nestor Oscar Stanchi.

Sterzenbach, Torsten, Robert W. Crawford, Sebastian E. Winter, and Andreas J. Bäumler, (2013); Paul A. Barrow and Ulrich Methner *Salmonella* in Domestic Animals vol 2. *Salmonella in Domestic Animals*. eds. P. A. Barrow and U. Methner. Wallingford: CABI.

Solar Salaverry L.A.; Marchena Béquer J.J.; (2012); Infeccion por *Staphylococcus aureus* resistente ala meticilina adquirido en la comunidad (SAMR-AC); Revista Cubana de Pediatría; La Habana, Cuba; 84 (2):312-317.

Soo Son, J., Bae Kim, E., Jung Lee, S., Youn Jun, S., Jun Yoon, S., Hyeon Kang, S., & Jaie Choi, Y.; (2010). Characterization of *Staphylococcus aureus* derived from bovine mastitis and isolation of two lytic bacteriophages. *The Journal of general and applied microbiology*, 56 (4), 347-353.

Summers, W. C. (1999). *Felix dHerelle and the Origins of Molecular Biology*. Yale University Press.

Synnott, A. J., Kuang, Y., Kurimoto, M., Yamamichi, K., Iwano, H., & Tanji, Y. (2009). Isolation from sewage influent and characterization of novel *Staphylococcus aureus* bacteriophages with wide host ranges and potent lytic capabilities. *Applied and environmental microbiology*, 75(13), 4483-4490.

- Toro M. Seral C., Rojo-Bezares B., Torres C., Castillo F.J., Sáenz Y., (2013); Resistencia a antibióticos y factores de virulencia en aislados clínicos de *Salmonella entérica*, Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica; Ed. ElsevierDoyma; Zaragoza España; 32 (1):4-10
- Tortora Gerard J., Funke Berdell R., Case Christine L.; (2007) Introducción a la microbiología, Ed. Medica panamericana.
- Verma, V., Harjai, K., & Chhibber, S. (2009). Characterization of a T7-like lytic bacteriophage of *Klebsiella pneumoniae* B5055: a potential therapeutic agent. *Current microbiology*, 59(3), 274-281.
- Walker, John M, Martha R J Clokie, and Andrew M Kropinski. (2009). 501 *Bacteriophages*. Eds. Martha R.J. Clokie and Andrew M. Kropinski. Totowa, NJ: Humana Press.
- Wolter, W., Castañeda, V. H., Kloppert, B., & Zschoeck, M. (2004). La Mastitis Bovina. Prevención, Diagnóstico Y Tratamiento. Editorial Universitaria. Universidad de Guadalajara. México, 12–37.
- Yang, H., Liang, L., Lin, S., & Jia, S. (2010). Isolation and characterization of a virulent bacteriophage AB1 of *Acinetobacter baumannii*. *BMC microbiology*, 10(1), 131.
- Zendejas-Manzo, G. S., Avalos-Flores, H., & Soto-Padilla, M. Y. (2014). Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: Generalidades, patogenicidad y métodos de identificación, 25(3), 129–143.