

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



**AISLAMIENTO DE BACTERIÓFAGOS LÍTICOS PARA *Salmonella* spp.  
MULTIDROGA RESISTENTES**

**TESIS**

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

**PRESENTA**

**MVZ. ELSA HERNÁNDEZ CAMPOS**

**DIRECTOR DE TESIS**

**DRA. SAWAKO OSHIMA**

**MEXICALI, BAJA CALIFORNIA**

**ABRIL 2019**

**AISLAMIENTO DE BACTERIÓFAGOS LÍTICOS PARA *Salmonella* spp. MULTIDROGA RESISTENTES.** Tesis presentada por MVZ. Elsa Hernández Campos 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. Tomas Benjamín Rentería Evangelista  
Asesor

---

MC. Lourdes Carolina Pujol Manríquez  
Asesor

---

MC. Carlos Alberto Martínez Vidal  
Asesor

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por hacer posible la realización de este proyecto de investigación, gracias al apoyo económico que me otorgaron.

Al Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias (IICV) de la Universidad Autónoma de Baja California (UABC) por darme la oportunidad de formar parte del cuerpo estudiantil de posgrado.

A la Coordinación de la Maestría en Ciencias Veterinarias por facilitarme la información y los trámites durante esta etapa.

Quiero agradecer muy especialmente a la Dra. Sawako Oshima por darme la oportunidad y la confianza para llevar a cabo este proyecto bajo su dirección, pero sobre todo gracias por su amistad y apoyo incondicional.

A mis asesores de tesis por sus consejos, observaciones y asesorías que hicieron posible la culminación de este proyecto.

A todos mis compañeros por brindarme parte de sus conocimientos, por su ayuda y apoyo incondicional durante este proyecto, pero sobre todo muchas gracias por el tiempo que me regalaron.

## **DEDICATORIA**

A mis padres por su amor y apoyo incondicional, por alentarme siempre a seguir superándome, por aconsejarme y guiarme en todos los aspectos de mi vida.

A mi abuelita y hermanos por su apoyo, por creer en mí y por estar siempre presentes.

A todas las personas que conocí y que me acompañaron durante esta etapa de mi vida, pero sobre todo quiero agradecerles por hacer de esta etapa una hermosa experiencia.

## 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* multidroga resistentes (MDR) se necesita buscar alternativas a los antibióticos para su control. El objetivo del presente trabajo fue aislar nuevos fagos líticos específicos para *Salmonella* spp. Al previo aislamiento se determinó el perfil de resistencia a antibióticos del cepario de *Salmonella* spp. del Laboratorio de Biología Molecular del IICV (29 aislados) y se identificaron 5 cepas (17%) MDR. Debido a que los animales domésticos son reservorios naturales de *Salmonella* se utilizaron heces frescas de perros callejeros como fuente de fagos líticos. Utilizando *Salmonella* spp. como cepas indicador con la estrategia de pre-amplificación, logrando aislar tres nuevos fagos líticos ( $\phi 1$ ,  $\phi 2$  y  $\phi 8$ ). El fago  $\phi 8$  resulto ser de gran interés al infectar una cepa de *Salmonella* Typhimurium, el serotipo de *Salmonella* con mayor importancia en salud pública. Los fagos obtenidos del presente trabajo junto con otros cinco fagos previamente aislados en nuestro laboratorio, poseen potencial para utilizarse como coctel para el biocontrol de *Salmonella* MDR combinado con otras medidas de bioseguridad e higiene para reducir el riesgo en salud pública y veterinaria.

Palabras clave: Bacteriófagos - Fagos líticos – Aislamiento de fagos – *Salmonella* spp. – *Salmonella* MDR

## ABSTRACT

Lytic bacteriophages (or phages) are viruses that infect bacteria causing their death; this is of great interest as a tool for the biological and therapeutic control of bacterial pathogens. *Salmonella* spp. strains bacteria that causes a gastroenteric disease in humans and animals, due to the emergence of multi-drug resistant (MDR) *Salmonella*, an alternative to antibiotics for the effective control is needed. The objective of the present study was isolate new specific lytic phages for *Salmonella* spp. The profile of antimicrobial resistance of the *Salmonella* spp. strains was determined prior to selection from the Laboratory of Molecular Biology of the IICV (29 strains), five strains (17%) were identified as MDR. Because domestic animals are natural reservoirs of *Salmonella*, fresh feces of stray dogs were used as a source of lyric phages. Using *Salmonella* spp. as indicator strains with the pre-amplification strategy, three new lytic phages ( $\phi$ 1,  $\phi$ 2 and  $\phi$ 8) were isolated. The best antimicrobial activity was observed on phage  $\phi$ 8 when infecting a strain of *Salmonella* Typhimurium, the serotype of *Salmonella* with greater importance in public health. The phages obtained from this work together with other five phages previously isolated in our laboratory, have the potential to be used as a cocktail for the biocontrol of *Salmonella* MDR combined with other measures of biosecurity and hygiene to reduce the risk in public and veterinary health.

Key words: Bacteriophages – Lytic phages – Phage isolation – *Salmonella* spp. – *Salmonella* MDR.

# CONTENIDO

	pag.
AGRADECIMIENTOS .....	iii
DEDICATORIA .....	iv
RESUMEN .....	v
ABSTRACT .....	vi
LISTA DE CUADROS .....	ix
LISTA DE FIGURAS .....	x
LISTA DE ABREVIACIONES .....	xi
INTRODUCCIÓN .....	1
REVISIÓN DE LITERATURA .....	3
Bacteriófagos líticos .....	3
Estructuras de fagos .....	4
Ciclos de replicación de los fagos .....	5
Aplicaciones de fagos líticos.....	7
Fagoterapia.....	7
Control biológico en alimentos .....	8
Aislamiento de fagos .....	9
<i>Salmonella</i> spp. ....	10
Salmonelosis .....	11
Enfermedad en humanos .....	11
Enfermedad en animales .....	12
Importancia de <i>Salmonella</i> en salud pública .....	12
Resistencia de <i>Salmonella</i> a los antimicrobianos .....	13
Fagos líticos para <i>Salmonella</i> .....	14

MATERIALES Y METODOS .....	16
Localización del área de estudio .....	16
Cepas de <i>Salmonella</i> spp. ....	16
Susceptibilidad antibiótica .....	18
Detección de genes de resistencia antimicrobiana .....	19
Muestreo de heces .....	21
Aislamiento de fagos líticos .....	21
Prueba de gota.....	21
Ensayo de doble capa .....	22
Amplificación de fago aislado .....	24
Titulación del fago .....	24
Análisis estadístico .....	25
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	26
Detección de genes de resistencia antibiótica.....	31
Aislamiento de fagos líticos .....	32
CONCLUSIONES.....	38
LITERATURA CITADA .....	39



## LISTA DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1 Cepas de <i>Salmonella</i> spp. utilizadas en el presente estudio ....	17
Cuadro 2 Oligonucleótidos utilizados para la detección de genes de resistencia a antibióticos .....	20
Cuadro 3 Perfiles de resistencia fenotípica de las 29 cepas de <i>Salmonella</i> spp. ....	30
Cuadro 4 Perfil de resistencia de las cepas que fueron resistentes a $\geq 2$ antibióticos, de diferente grupo .....	30
Cuadro 5 Títulos de fagos aislados y amplificados por método de lisado de placa .....	34
Cuadro 6 Resistencia cruzada de cepas <i>Salmonellas</i> MDR y non-MDR frente a 8 fagos líticos .....	37

## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1 Estructuras proteicas que pueden componer a un fago.....	5
Figura 2 Ciclos de replicación fágica.....	6
Figura 3 Antibiograma de acuerdo con el halo de inhibición.....	19
Figura 4 Prueba de gota (spot test) .....	22
Figura 5 Método de doble capa .....	23
Figura 6 Diluciones seriadas para determinar la titulación de fagos ...	25
Figura 7 Susceptibilidad antibiótica de cepas de <i>Salmonella</i> spp. del presente estudio (n=29) .....	28
Figura 8 Detección del gen SipBC mediante PCR.....	31
Figura 9 Aislamiento de nuevos fagos líticos.....	34
Figura 10 Rango de hospedero de fagos líticos.....	37

## **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, también llamados fagos son virus que infectan bacterias, estos son capaces de utilizar los recursos de su anfitrión con la finalidad de reproducirse y provocar lisis celular, lo que conlleva a la liberación de nuevas partículas fágicas (Higgins y col., 2008; Anany y col., 2011). Dado que son los agentes virales más abundantes de la biosfera, representan un excelente mecanismo de control, ya que producen un equilibrio entre las bacterias que se multiplican y los fagos que destruyen una parte de esa población bacteriana. 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). 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 aislar nuevos fagos líticos capaces de infectar *Salmonella* spp. multidroga resistente (MDR), provenientes 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).

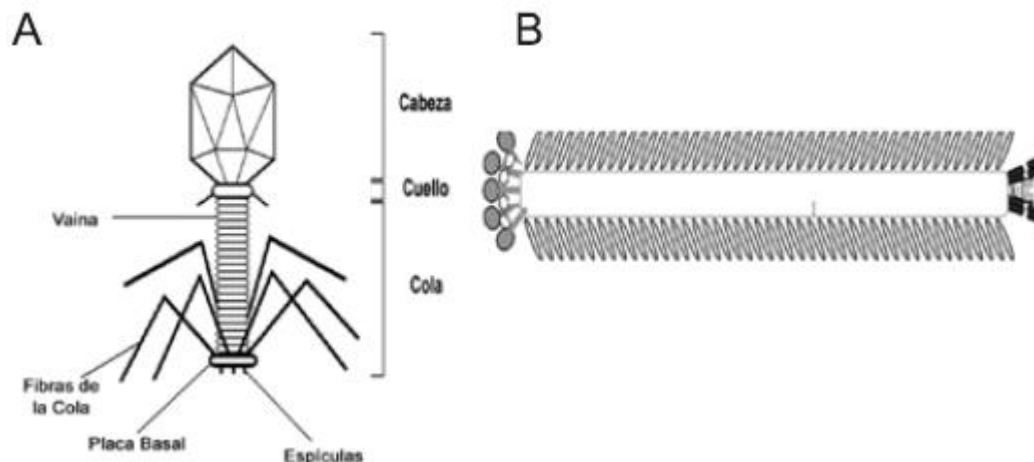


Figura 1. Estructuras proteicas que pueden componer a un fago  
**A:** fago con simetría icosaédrica; **B:** fago con simetría helicoidal o filamentososa.  
 Fuente imagen: Segundo y col. 2010

### 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; Spicigo, 2012).

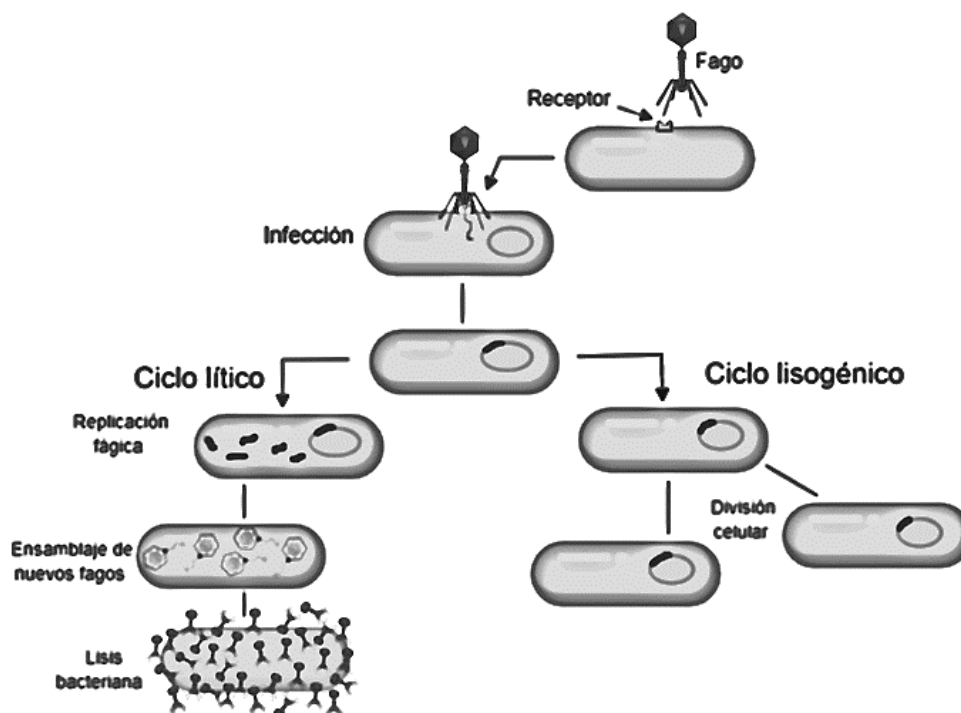


Figura 2. Ciclos de replicación fágica

## 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 género *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).

#### 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 estudio se desarrolló en el Laboratorio de Biología Molecular del instituto de investigaciones en Ciencias Veterinarias (IICV) de la Universidad Autónoma de Baja California (UABC); ubicado en el municipio de Mexicali, Baja California, México.

### Cepas de *Salmonella* spp.

Se utilizaron un total de 29 cepas de *Salmonella* spp.; 27 aislados obtenidos por estudios previos en el IICV (cortesía del Dr. Tomas Rentería Evangelista, MC. Karla Michelle Núñez Castro y MVZ. Carolina Rivera García), 1 aislado de *Salmonella* Typhimurium obtenido de camarón marino (cortesía del Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez) y una cepa de referencia ATCC 14028 (cortesía del Dr. Rafael Martínez Miranda). Los aislados de perros fueron identificados bacteriológicamente, confirmados por medio del sistema API20e (Núñez, 2015) y/o la técnica de PCR dirigido al gen *InvA*. En el presente trabajo se empleó además la técnica automatizada para la identificación bioquímica de las cepas (23/29) por medio del sistema VITEK®2 (cuadro 1).

Cuadro 1. Cepas de *Salmonella* spp. utilizadas en el presente estudio

#ID	Referencia	Identificación bioquímica (%)	
		API20e (Ref. 1)	VITEK®2 (Presente trabajo)
51	2	ND	ND
70	2	ND	ND
120	1	99	98
133	2	ND	ND
151	2	ND	ND
208	1	99.9	98
267	1	89	99
268	1	89	97
296	1	ND	99
298	1	99.9	99
317	1	77.1	97
335	1	89	95
338	1	99.9	98
352	1	99.9	97
354	1	99.7	ND
375	1	89	99
383	1	89	97
387	1	89	97
396	1	83.6	97
398	1	92.8	99
399	1	99.9	99
411	1	99.7	97
437rv	1	99.9	95
437sc	1	89	97
454	1	89	99
488	1	89	99
501	1	99.7	98
ST	3	ND	99
ATCC14028	4	ND	ND

ND: no determinado; Referencia 1, Núñez (2015); 2, cortesía de MVZ. Carolina Rivera García; 3, cortesía del Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez; 4, cortesía del Dr. Rafael Martínez Miranda.

Las cepas bacterianas fueron inicialmente resembradas en caldo de cultivo Luria Bertani (LB) con glicerol al 10% para su almacenamiento a  $-20^{\circ}\text{C}$ ; además se liofilizaron y almacenaron para su posterior utilización.

El levantamiento de las cepas congeladas en glicerol fue por cultivo en caldo LB, estos se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  con agitación de 250 rpm por un periodo de 24 horas. Posteriormente se resembraron en cajas Petri con agar base LB y se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  por un periodo de 18 a 24 horas para confirmar la morfología de las colonias. Para la preparación de bacterias indicador de fagos líticos se tomó una sola colonia de la caja almacenada a  $4^{\circ}\text{C}$  no mayor a 1 mes; se preparó un caldo de cultivo con crecimiento por toda la noche como un “pre-cultivo”, para obtener caldos de cultivo fresco de 2 a 5 horas de crecimiento bacteriano de la etapa de crecimiento exponencial para utilizarse en las pruebas de fagos. Los medios se prepararon y esterilizaron siguiendo las recomendaciones indicadas por los fabricantes.

#### Susceptibilidad antibiótica

Para determinar la susceptibilidad antibiótica de cada cepa de *Salmonella* 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 (Figura 3).



Figura 3. Antibiograma de acuerdo con el halo de inhibición  
I: resistencia intermedia; S: sensible; R: resistente.

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, levofloxacina (LEV) 5 µg, netilmicina (NET) 30 µg, nitrofurantoina (NF) 300 µg, trimetoprim-sulfametoxazol (SXT) 25 µg.

#### Detección de genes de resistencia antimicrobiana

Este experimento se realizó en colaboración con la MVZ. Carolina Rivera García y MC. Karla Michelle Núñez Castro del IICV – UABC contribuyendo a sus

proyectos de tesis en proceso, por lo que se presentaron solo los datos con énfasis en cepas indicadores de fagos del presente estudio.

Para realizar la técnica de PCR se llevó a cabo la metodología descrita por Talavera y colaboradores (2011). Los oligonucleótidos utilizados se muestran en el cuadro 2.

Cuadro 2. Oligonucleótidos utilizados para la detección de genes de resistencia a antibióticos

Oligonucleótidos	Secuencia 5' → 3'	Tamaño del amplicón (pb)
SipBC-F	ACAGCAAAATGCGGATGCTT	232
SipBC-R	GCGCGCTCAGTGTAGGACTC	
cmlA-tetR-F	CGCTCCTTCGATCCCGT	260
cmlA-tetR-R	GCTGCGTTCATCTACAACAGAT	
PSE-1-F	TTTGGTTCCGCGCTATCTG	132
PSE-1-R	TACTCCGAGCACCAAATCCG	
TEM-F	GCACGAGTGGGTTACATCGA	291
TEM-R	GGTCCTCCGATCGTTGTCAG	

La reacción consistió en 2.5 µl de buffer de PCR 10x, 1.5 µl de MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 1 µl de dNTP's a 10 mM, 1 µl de cada oligonucleótido a una concentración de 10 pmol/µl, 1 µl de Taq polimerasa (preparado en nuestro laboratorio), 2 µl de ADN bacteriano y 15 µl de agua grado molecular, con un volumen final de 25 µl. Las reacciones se sometieron a una desnaturalización inicial de 95°C por 5 minutos, seguido por 40 ciclos de 95°C por 1 minuto, 48°C por 30 segundos y una extensión a 72°C por 30 segundos con una extensión extra de 72°C por 3 minutos y el almacenamiento final a una temperatura de 4°C. Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% y se

visualizaron con tinción por bromuro de etidio a 0.5 µg/ml bajo el transiluminador de luz ultravioleta (UV) del sistema de foto-documentación de la marca UVP, modelo BioDoc-It™ Imaging System. Se usó un marcador de peso molecular (100 pb DNA Ladder, GeneRuler) para confirmar el tamaño de los productos amplificados.

#### Muestreo de heces

Como fuente de fagos líticos se realizaron muestreos de heces de perros de manera aleatoria en el CEMCA de Mexicali, Baja California en el periodo de agosto 2017 a febrero 2018. Una vez que se obtenían las muestras frescas se transportaban al laboratorio para iniciar con el procedimiento de la pre-amplificación de fagos, descrito por Díaz (2017).

#### Aislamiento de fagos líticos

Se empleó la estrategia de “pre-amplificación” para aumentar la probabilidad de detectar la presencia de fagos líticos siguiendo el método descrito por Díaz (2017), consiste en la amplificación de posibles fagos líticos de las muestras de heces con una o múltiples cepas indicador durante toda la noche en medio de cultivo líquido.

#### *Prueba de gota*

Una vez obtenida la muestra pre-amplificada del fago se llevó a cabo la prueba de gota o “spot test” en inglés (Figura 4). En esta prueba se utilizaron cajas Petri con agar base LB, suplementado con CaCl<sub>2</sub> 2mM; donde se inoculaba la bacteria con ayuda de un hisopo estéril y posteriormente se añadió el fago (5 µl) sobre la bacteria inoculada, posteriormente las cajas se incubaron a 37°C por



un periodo de 24 a 48 horas. Una vez que transcurrió el tiempo las cajas eran examinadas para identificar zonas redondas, transparentes o parcialmente transparentes sobre el tapete bacteriano; si se observaron zonas redondas se dio como positivo a la presencia de la actividad lítica por posibles fagos líticos. Esta prueba se llevó a cabo con cada experimento de pre-amplificación.

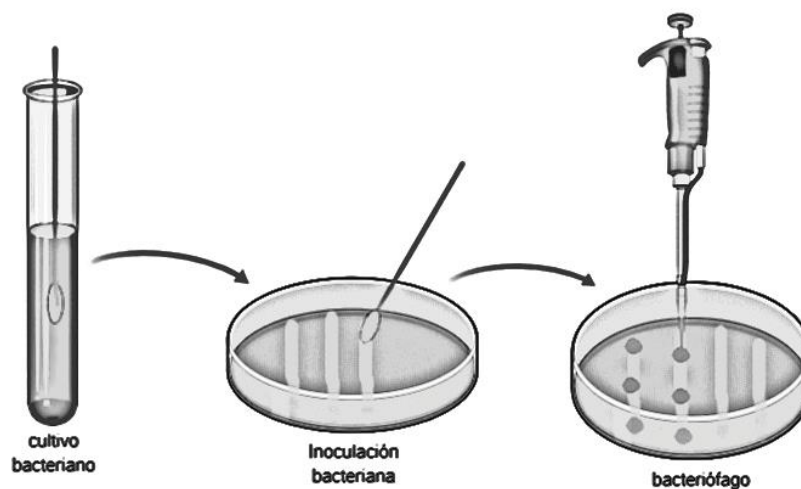


Figura 4. Prueba de gota (spot test)

#### *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 (Figura 5) con la finalidad de poder observar y corroborar la presencia de calvas (zonas transparentes o claras provenientes de un fago lítico). 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 nos permite observar calvas sobre el agar. De tal manera que esta prueba se realizó para diferentes experimentos del presente trabajo,

tanto el aislamiento inicial de los fagos líticos como la titulación, la propagación y la amplificación de fagos.

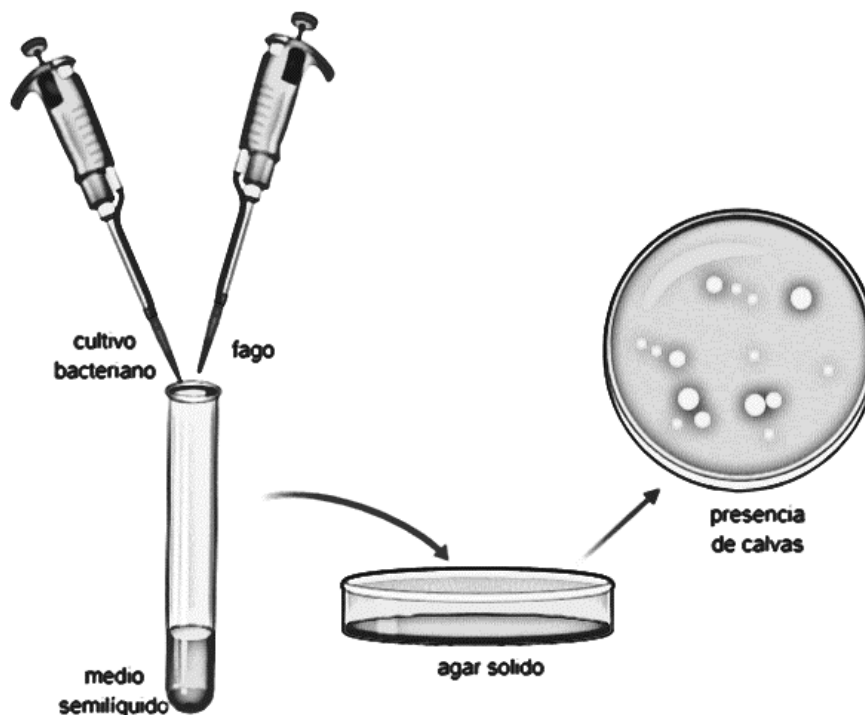


Figura 5. Método de doble capa

Una vez que se identificó la presencia de calvas aisladas de la muestra de pre-amplificación se hizo la resiembra del fago a partir de la prueba de doble capa, anteriormente descrita. Donde se tomaron de 5 a 20 calvas del mismo tamaño y forma, estas se diluyeron en 500 ml de buffer SM [NaCl 5.8 g, MgSO<sub>4</sub>·7H 2g, Tris-Cl (1 M, pH 7.5) 50 ml, H<sub>2</sub>O 1 L], se centrifugo a 12,000 rpm y se dejó a 4°C durante una hora, posteriormente se utilizó como la fuente de fagos. Se repitió al menos 3 veces para considerarse como un fago aislado, se conservó la suspensión de fagos o calvas a 4°C evitando agitación, burbujas y su exposición a la luz.

### *Amplificación de fago aislado*

Se prepararon las cajas de la prueba de doble capa con un crecimiento confluyente de fago y se les agregó 1.5 ml de buffer SM/placa. Se dejó reposar por 10 minutos y se recuperó la suspensión de fago por pipeteo en un microtubo estéril. Se centrifugó por 10 minutos a 12,000 rpm a 4°C y se recuperó el sobrenadante para almacenarlo a 4°C por una hora. Se combinó la suspensión de fagos de múltiples placas para que alcance al título deseado de la solución de fagos (lisado de fagos) almacenado.

### *Titulación del fago*

La titulación se hizo para conocer la concentración del stoc de fago almacenada (Cuadro 5). Se realizaron diluciones seriada 1:10 con buffer SM. En cada tubo se agregaron 90 µl de buffer SM y en el primer tubo se añadieron 10 µl del lisado de fago, llegando a un volumen final de 100 µl (concentración  $10^{-1}$ ) y en el siguiente tubo con buffer SM (90 µl) se pasaron 10 µl de la mezcla anterior (concentración  $10^{-2}$ ) y así sucesivamente hasta obtener una serie de diluciones del fago con la finalidad de que resultaran en calvas contables (10-1000 calvas/placa) (Figura 6). Transcurrido el tiempo de incubación se realizó el recuento de las placas de lisis para calcular los títulos correspondientes a unidades formadoras de calvas por mililitro (PFU/ml) utilizando la siguiente formula:

PFU/ml = Número de calvas × factor de dilución × factor de volumen inoculado

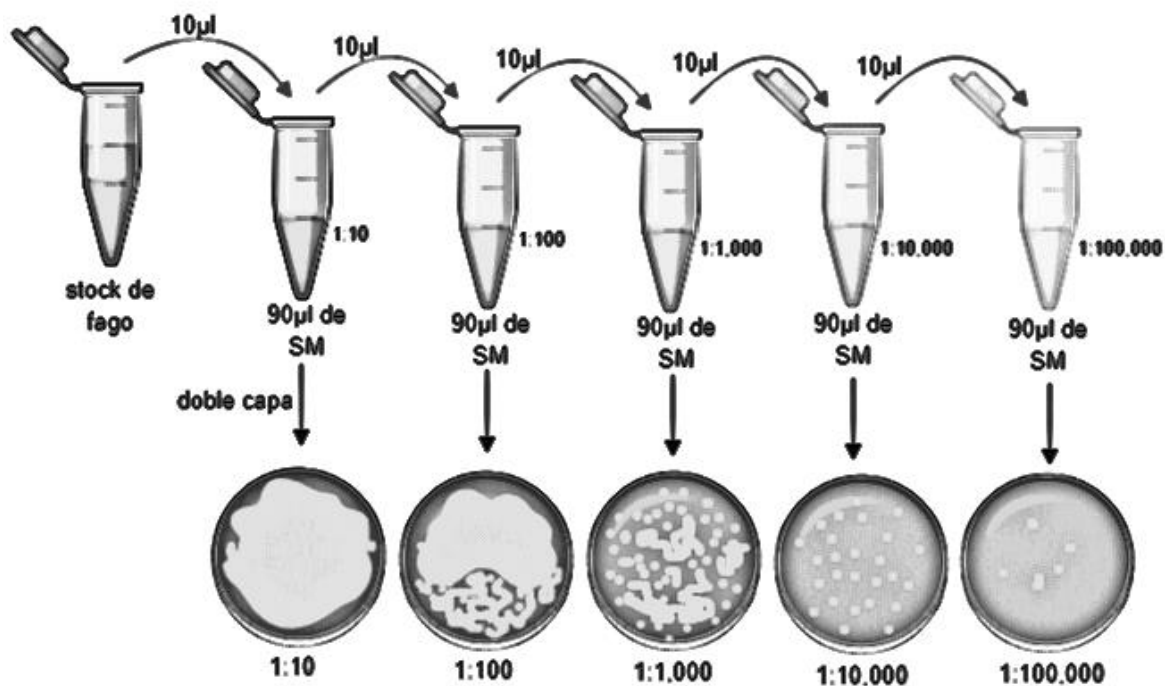


Figura 6. Diluciones seriadas para determinar la titulación de fagos

Se analizó el rango de hospedero de 8 fagos líticos de nuestro laboratorio; 5 fagos aislados por Díaz (2017) y los 3 nuevos fagos aislados en el presente trabajo. Mediante la prueba de gota se determinó la resistencia/susceptibilidad para cada uno de los fagos por parte de las 29 cepas de *Salmonella* spp. presentados en el cuadro 1.

#### Análisis estadístico

Se determinó la frecuencia del rango hospedero de cada fago, se realizó estadística descriptiva utilizando el cociente de número de cepas infectadas entre el número de cepas utilizadas.

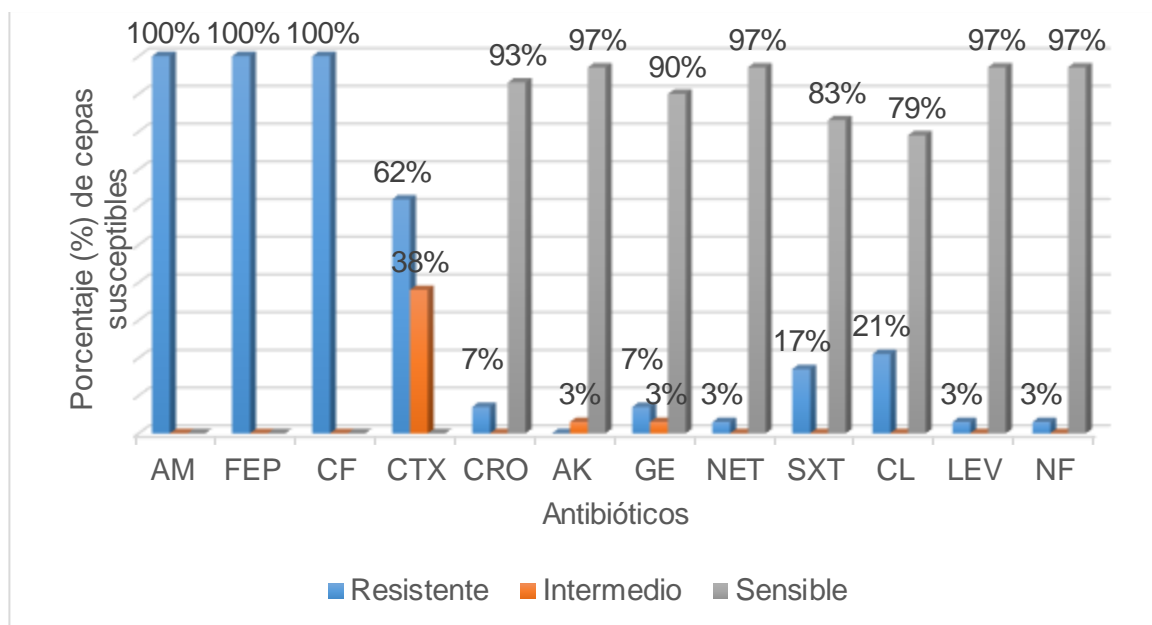
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 7 se muestra el porcentaje de sensibilidad a antibióticos de los aislados utilizados en el presente trabajo. Se observa que el 100% (29/29) de las cepas fueron resistentes a ampicilina, cefepime y cefalotina; así mismo el 62% (18/29), 21% (6/29) y 17% (5/29) de las cepas presentaron resistencia a cefotaxima, cloranfenicol y a trimetoprim-sulfametoxazol, respectivamente. Los niveles de resistencia que se observaron hacia el resto de los antibióticos testados fueron menor al 10%. Por otro lado cabe mencionar que el 97% (28/29) de las cepas fueron sensibles a amikacina, netilmicina, levofloxacina y nitrofurantoina; seguido por el 93% (27/29), 90% (26/29), 83% (24/29) y el 79% (23/29) de las cepas presentaron sensibilidad a ceftriaxona, gentamicina, trimetoprim-sulfametoxazol y cloranfenicol, respectivamente. De las cepas que presentaron resistencia intermedia destaca el 38% (11/29) de las cepas que resultaron resistencia intermedia a cefotaxima. En los hallazgos de este trabajo se hace evidente el alto porcentaje de resistencia que presentaron las cepas hacia los antibióticos del grupo  $\beta$ -lactámicos, así mismo se han reportado porcentajes similares de resistencia hacia los antibióticos de este grupo (Fernández y col., 2017; Tsai y col., 2007; Kiflu y col. 2017; Srisanga y col., 2017), esto se atribuye a que estos antibióticos son de uso común como tratamiento para diversas infecciones, tanto en humanos como en animales.

Por otro lado, la Figura 7 nos muestra que la mejor opción terapéutica contra estas cepas en particular es la rotación de los antibióticos que presentaron un mayor porcentaje de sensibilidad, como es el caso de los aminoglucósidos,

levofloxacin, trimetoprim-sulfametoxazol, nitrofurantoina y cloranfenicol. El alto porcentaje de sensibilidad de algunos antibióticos que se reportaron en este trabajo es similar a los reportados en otros estudios como López y col. (2009) que aislaron cepas de *Salmonella* spp y *E. coli* de agua y suelo agrícola, donde obtuvieron 20 cepas de *Salmonella* spp., aisladas de las muestras de agua, ellos reportaron que el 100% de estas cepas fueron susceptibles a trimetoprim-sulfametoxazol, gentamicina, ciprofloxacina y ampicilina. Carvalho y col. (2009) analizaron 23 cepas de *Salmonella* spp. aisladas de muestras de agua, sedimento y de camarón, ellos reportan que el 100% de estas cepas fueron resistentes a cloranfenicol, nitrofurantoina, ciprofloxacina y ampicilina. La diferencia de ambos estudios al nuestro es la alta susceptibilidad que ellos reportaron a la ampicilina. Por otro lado, el uso de antibióticos como nitrofurantoina y cloranfenicol están contraindicados para animales de producción (Nayarit y col., 2016), sin embargo son utilizados en perros y gatos, aunque no son medicamentos de primera elección por esta razón creemos que hay un alto porcentaje de susceptibilidad de las cepas utilizadas en este trabajo, hacia estos antibióticos.

Figura 7. Susceptibilidad antibiótica de cepas de *Salmonella* spp. del presente estudio (n=29)



AM: Ampicilina; FEP: Cefepime; CF: Cefalotina; CTX: Cefotaxima; CRO: Ceftriaxona; AK: Amikacina; GE: Gentamicina; NET: Netilmicina; SXT: Trimetoprim-sulfametoxazol; CL: Cloranfenicol; LEV: Levofloxacina; NF: Nitrofurantoina.

En el Cuadro 3 se resumen los resultados del antibiograma con énfasis en el perfil de resistencia de cada cepa. Se identificaron un total de 9 perfiles de resistencia (Cuadro 3). El perfil de resistencia más común (11/29, 38%) fue el perfil 3 con resistencia a antibióticos que pertenecen al grupo de  $\beta$ -lactámicos como la ampicilina, cefepime, cefalotina y cefotaima. Leonard y col. (2011) analizaron 120 cepas de *Salmonella* spp. aisladas de perros domésticos en Ontario, Canadá; ellos reportaron que el 14% (17/120) de las cepas de *Salmonella* spp. que utilizaron fueron resistentes a  $\geq 2$  antibióticos de diferente grupo, de tal manera que ellos mencionan que el perfil de resistencia que encontraron con mayor frecuencia fue: amoxicilina-ac.clavulánico, ampicilina, cefoxitina, ceftiofur y ceftriaxona, esto coincide con nuestro trabajo ya que de

igual manera estos antibióticos pertenecen al grupo de los  $\beta$ -lactámicos. El resto de los perfiles del Cuadro 3 se encontraron con menor frecuencia, sin embargo se identificaron tres perfiles (6, 8 y 9) con resistencia a la mayoría de los antibióticos probados; considerándose como MDR, por ser resistentes al menos a tres diferentes grupos de antibióticos. Las cepas MDR representan el 17% (5/29) de las cepas analizadas en el presente estudio. En el Cuadro 4 se presentan los detalles de los perfiles de resistencia de 8 cepas que fueron resistentes a antibióticos de al menos dos grupos diferentes, incluyendo las cepas MDR. Algunas de estas cepas fueron utilizadas como bacterias indicador en el aislamiento de nuevos fagos líticos.



Cuadro 3. Perfiles de resistencia fenotípica de las 29 cepas de *Salmonella* spp

Perfil	Resistente	Intermedio	# Cepas
1	AM-FEP-CF-NF	CTX	1
2	AM-FEP-CF	CTX	9
3	AM-FEP-CF-CTX		11
4	AM-FEP-CF-CTX	GE	1
5	AM-FEP-CF-CL	CTX	1
6	AM-FEP-CF-CTX-SXT-CL		3
7	AM-FEP-CF-CTX-CL		1
8	AM-FEP-CF-CTX-CRO-GE-NET-SXT-LEV	AK	1
9	AM-FEP-CF-CTX-CRO-GE-SXT-CL		1

AM: Ampicilina; FEP: Cefepime; CF: Cefalotina; CTX: Cefotaxima; CRO: Ceftriaxona; AK: Amikacina; GE: Gentamicina; NET: Netilmicina; SXT: Trimetoprim-sulfametoxazol; CL: Cloranfenicol; LEV: Levofloxacin; NF: Nitrofurantoina.

Cuadro 4. Perfil de resistencia de las cepas que fueron resistentes a  $\geq 2$  antibióticos, de diferente grupo.

	AM	FEP	CF	CTX	CRO	AK	GE	NET	SXT	CL	LEV	NF	Perf.
51	R	R	R	I	S	S	S	S	S	S	S	R	1
208	R	R	R	I	S	S	S	S	S	R	S	S	5
268 <sup>1</sup>	R	R	R	R	S	S	S	S	R	R	S	S	6
387 <sup>1</sup>	R	R	R	R	S	S	S	S	R	R	S	S	6
396 <sup>1</sup>	R	R	R	R	S	S	S	S	R	R	S	S	6
298	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	S	7
354 <sup>1</sup>	R	R	R	R	R	I	R	R	R	S	R	S	8
ST <sup>1</sup>	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	S	S	9

Cepas marcadas (1) son MDR; AM: Ampicilina; FEP: Cefalotina; CTX: Cefotaxima; CRO: Ceftriaxona; AK: Amikacina; GE: Gentamicina; NET: Netilmicina; SXT: Trimetoprim-sulfametoxazol; CL: Cloranfenicol; LEV: Levofloxacin; NF: Nitrofurantoina.

### Detección de genes de resistencia antibiótica

Mediante la técnica de PCR se detectó la presencia de al menos uno de los 4 genes de resistencia a antibióticos que se identificaron en por lo menos una cepa. Los detalles de resultados se publicaran posteriormente por colaboradores. Las frecuencias de la detección de los 4 genes, SipBC, TEM, PSE-1 y cmlA/tetR fueron 100% (29/29), 93% (27/29), 10% (3/29) y 3% (1/29), respectivamente.

De las 8 cepas que se utilizaron como indicador (208, 267, 268, 396, 399, 411, 437sc y ST) en el aislamiento de los nuevos fagos, 5 cepas (208, 267, 399, 411 y 437sc) fueron positivas a los genes SipBC y TEM, mientras que 2 cepas (268 y 396) fueron positivas a los genes SipBC, TEM y PSE-1 y la cepa ST fue positiva a los genes SipBC y cmlA/tetR. La Figura 8 demuestra un ejemplo de resultados representativos de la amplificación del gen SipBC.

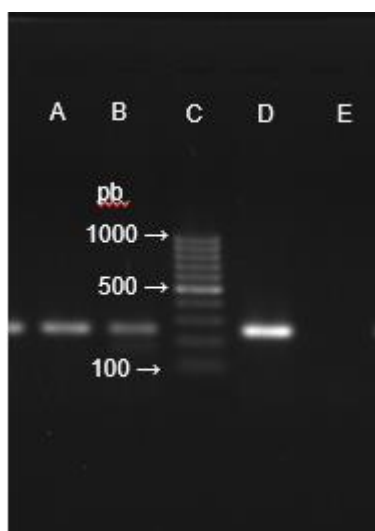


Figura 8. Detección del gen SipBC mediante PCR

Visualización del producto de PCR (fragmento de 232 pb) en electroforesis de gel de agarosa al 1.5%. A, B y D: muestras positivas (354, ST y 396, respectivamente) al gen SipBC; C: 100 pb DNA Ladder (GeneRuler); E: control negativo.

### Aislamiento de fagos líticos

Mediante la estrategia de pre-amplificación se logró aislar tres nuevos fagos líticos ( $\phi 1$ ,  $\phi 2$  y  $\phi 8$ ), provenientes de diferentes muestreos de heces frescas de perros. Para las combinaciones de cepas indicador con resultados exitosos para el aislamiento de los fagos  $\phi 1$ ,  $\phi 2$  y  $\phi 8$  fueron (399, 396, 208, 267, ST), (208, 411, 437sc, 268, ST) y ST, respectivamente. Las cepas indicador 267, 399, 411 y 437sc fueron incluidos por el interés de obtener fagos líticos de estas cepas, meta que no se ha podido lograr en estudios previos en nuestro laboratorio. Estas cepas no son resistentes a más de dos grupos de antibióticos por lo que no se incluyeron en el Cuadro 4. La Figura 9 demuestra ejemplos representativos de una serie de pruebas para el aislamiento de fagos. Una vez detectada la presencia de actividad lítica de fagos pre-amplificados (Figura 9-A), prueba de gotas), se continuó con el aislamiento de los mismos, esto fue posible al ensayo de doble capa que nos permitió observar y corroborar la presencia de calvas (Figura 9-B). Tras la resiembra de los nuevos fagos se realizó la amplificación de estos, dándonos como resultado una solución de fago para almacenamiento (Figura 9-C, lisado de placa). Una vez que se obtuvo la solución de almacenamiento de cada fago se determinó la concentración (titulación) de cada uno (Cuadro 5), donde destaco el  $\Phi 8$  por presentar características de fácil amplificación en el laboratorio. Así mismo se han reportado aislamientos exitosos de nuevos fagos líticos específicos para *Salmonella* spp. Carey-Smith y col. (2006) reportaron el aislamiento de dos nuevos fagos líticos (FGCSSa1 y FGCSSa2) para *Salmonella* spp. obtenidos a partir de aguas residuales, estos fueron altamente específicos ya que utilizaron 8 cepas de cinco serotipos

distintos de *Salmonella* spp. (*S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Infantis*, *S. Menston*, *S. Saintpaul*) y dos cepas de *Escherícia coli*. para evaluar su rango hospedero pero ninguno de los fagos fue efectivo contra *E. coli*. Ellos buscaron fagos que presentaran actividad lítica a 4°C para usarlos como biocontrol de *Salmonella* en alimentos refrigerados. La diferencia con nuestro estudio es que no utilizaron la estrategia de pre-amplificación con cepas indicador. Es decir, la muestra que ellos utilizaron como la fuente de fagos se utilizó directamente o con incubación a 4°C toda la noche con solo buffer SM para realizar la prueba de doble capa con múltiples cepas indicador en el agar blando. Albino y col. (2014) aislaron seis fagos líticos (F3, F4, F5, F6, F7 y F8) con la estrategia de pre-amplificación, las muestras que usaron como fuente de fagos fueron tomadas del medio ambiente de granjas de cerdos, ellos evaluaron la especificidad de sus fagos usando ocho serotipos de *Salmonella* spp. (*S. Abony*, *S. Aruzonae*, *S. Cholerae suis*, *S. Enteritidis*, *S. Gallinarum*, *S. Pullorum*, *S. Typhy*, y *S. Typhimurium*). Aunque la estrategia de pre-amplificación es un método eficiente y ampliamente utilizado para el aislamiento de nuevos fagos, no hemos podido aislar fagos líticos de algunas cepas aplicando este método durante varios años (ej. Cepas 268 y 354). Estrategias para el aislamiento de fagos, como la pre-precipitación por polietilenglicol o por la prueba directa podrían emplearse para obtener fagos líticos de estas cepas.



Figura 9. Aislamiento de nuevos fagos líticos

**A:** resultados de prueba de gota (fago  $\phi 8$ ), **B:** resultados del ensayo doble capa (fago  $\phi 1$ ), **C:** stoc del lisado de fago (fagos  $\phi 1$ ,  $\phi 2$ ,  $\phi 8$  amplificados)

Cuadro 5. Títulos de fagos aislados y amplificados por método de lisado de placa

Fago	Título (PFU/ml)	Volumen (ml/placa)
$\phi 1$	$1 \times 10^9$	1.3
$\phi 2$	$1 \times 10^5$	1.3
$\phi 8$	$1 \times 10^{18}$	1.3

La Figura 10 muestra el resumen de comparación del rango de hospedero de 8 fagos líticos de *Salmonella* spp. (3 fagos del presente estudio y 5 fagos de Díaz, 2017). Se analizaron frente a 29 cepas de *Salmonella* spp. de los cuales el 90% (26/29) y 66% (19/29) de los aislados fueron susceptibles a los fagos  $\phi 488$  y  $\phi 317$ , respectivamente, siendo estos dos fagos los que presentaron mayor rango hospedero (Díaz, 2017). El rango hospedero de los tres nuevos fagos oscila entre el 14% ( $\phi 2$ ) – 31% ( $\phi 1$  y  $\phi 8$ ), los cuales son comparables a la susceptibilidad mostrada por los fagos de Díaz (2017) ( $\phi 399$ ,  $\phi 398$  y  $\phi 298$ ). Una de las posibles razones para explicar el rango de hospedero relativamente bajo de los tres nuevos fagos podría deberse a características únicas de cada cepa indicador que fueron utilizadas en el aislamiento, puede ser que no conservan las

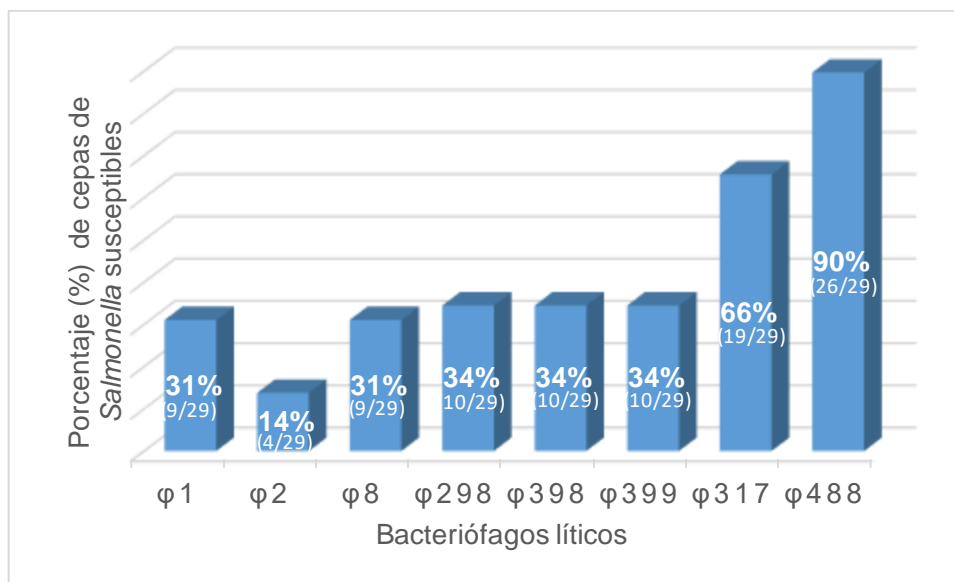
estructuras moleculares de la superficie celular o los mecanismos de adhesión por fagos con otras cepas de *Salmonella* analizadas. El desglose parcial de resultados del experimento del rango hospedero fue presentado en el Cuadro 6, como cuadro de la resistencia cruzada de cepas de interés, MDR (n=5) y non MDR (n=7) incluyendo cepas indicador utilizadas en el aislamiento. En el Cuadro 6 observamos que los fagos aislados del presente trabajo tienen tendencia a no mostrar actividad lítica en las cepas MDR utilizadas durante el aislamiento. Por ejemplo el fago  $\phi$ 1 demostró actividad lítica en cepas non-MDR (208 y 399) pero no en cepas MDR (396 y ST) utilizadas. Igualmente el  $\phi$ 2 demostró su actividad lítica en cepas indicador non-MDR (411 y 437sc) pero no a MDR (268 y ST). El fago  $\phi$ 8 fue el caso exitoso de aislamiento con actividad lítica a *S. Typhimurium* MDR, el serotipo con importancia en salud pública. Otra característica notable del fago  $\phi$ 8 fue su adaptación en las condiciones del laboratorio permitiéndose su fácil amplificación para lograr alto título de fagos, en la solución de almacenamiento (stock de lisado de placa) (Cuadro 5). Esto nos permitirá propagar gran cantidad de este fago para posteriores análisis como: propiedades físico químicas, fisiológicas, genómicas y proteicas. Originalmente la cepa de *S. Typhimurium* MDR fue aislada de camarón marino por lo que este fago tiene potencial para utilizarse en el biocontrol de *S. Typhimurium* en la acuicultura. En un trabajo similar Mahmoud y col. (2018) aislaron tres fagos líticos (Salmacey 1, 2 y 3) provenientes de aguas residuales usando la estrategia de pre-amplificación, utilizaron 31 cepas de *Salmonella* spp. de tres diferentes serotipos (*S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* y *S. Kentucky*) aisladas de pollos de engorda. Además reportaron que todos los serovares fueron resistentes al menos a dos

antibióticos diferentes, sin embargo el serotipo que determinaron como MDR fue *S. Kentucky*. Estos fagos resultaron ser de amplio espectro, al ser capaces de detener el crecimiento de *Salmonella* spp. y *Citrobacter freundii*, *in vitro*.

En resumen, para las cinco cepas de *Salmonella* MDR (268, 387, 396, 354 y ST) de nuestro laboratorio hemos logrado el aislamiento de fagos líticos para tres de estas cepas; 2 fagos para la cepa 387 ( $\phi$ 317 y  $\phi$ 488), 5 fagos para la cepa 396 ( $\phi$ 298,  $\phi$ 398,  $\phi$ 399,  $\phi$ 317 y  $\phi$ 488) y 2 fagos para la cepa ST ( $\phi$ 8 y  $\phi$ 317). La actividad lítica del  $\phi$ 488 contra la cepa ST no fue confirmada con certeza debido a discordancia de resultados de múltiples intentos por posible contaminación o intercambio de muestras de fago (Cuadro 6). En el presente trabajo no se logró aislar fagos líticos para las cepas MDR (268 y 354), sin embargo podría funcionar utilizar una sola cepa indicador para el proceso de pre-amplificación como fue el caso del  $\phi$ 8. Es posible que la tasa de crecimiento de estas cepas MDR (268 y 354) sea tardado en comparación con las otras non-MDR que se utilizaron en el pool de cepas indicador y por lo tanto no fueron amplificados fagos específicos para estas cepas MDR. Otra de las posibilidades de no tener éxito en el aislamiento pudiese ser por la ausencia de fago en las muestras y/o por las características moleculares únicas de la superficie bacteriana.

No obstante es evidente que los fagos  $\phi$ 317 y  $\phi$ 488 destacan por su alto rango de hospedero incluyendo algunas cepas MDR. En paralelo a la búsqueda de nuevos fagos de cepas MDR es importante continuar la caracterización de estos fagos junto con  $\phi$ 8, para determinar las condiciones óptimas de actividad lítica tanto en experimentos *in vitro* e *in vivo*.

Figura 10. Rango de hospedero de fagos líticos

Cuadro 6. Resistencia cruzada de cepas *Salmonellas* MDR y non-MDR frente a 8 fagos líticos

	φ1	φ2	φ8	φ298 <sup>♦</sup>	φ398 <sup>♦</sup>	φ399 <sup>♦</sup>	φ317 <sup>♦</sup>	φ488 <sup>♦</sup>
51			+				ND	ND
208	+			+	+	+	+	+
268*								
387*							+	+
396*				+	+	+	+	+
298	+		+	+	+		+	+
354*							ND	
ST*			+				+	+ <sup>a</sup>
267			+		+	+	+	+
399	+		+	+	+	+	+	+
411	+	+		+		+	+	+
437sc		+		+				+

(+): Sensible al fago; ND: no determinado; (\*) cepas MDR; (■): cepas indicador utilizadas para el aislamiento de nuevos fagos del presente trabajo; (♦) fagos aislados por Díaz (2017); (a): Resultados no confirmados.



## CONCLUSIONES

Se determinaron 5 cepas de *Salmonella* spp. como MDR, de las cuales la 354 y ST fueron de alto riesgo para salud pública ya que presentan baja sensibilidad frente a diferentes antibióticos de uso común para el tratamiento de salmonelosis. De tal manera que se hace necesaria la vigilancia urgente en el uso de los antibióticos para combatir esta enfermedad.

Se logró aislar tres nuevos fagos específicos a *Salmonella* ( $\phi$ 1,  $\phi$ 2,  $\phi$ 8) de los cuales el fago  $\phi$ 8 demostró la capacidad de infectar a la cepa MDR de *Salmonella* Typhimurium (ST), además de mostrar su fácil amplificación en el laboratorio, por lo que se sugiere estudiar más su aplicación en el biocontrol de *S. Typhimurium*.

Debido al limitado rango hospedero presentado por los fagos  $\phi$ 1 y  $\phi$ 2 se recomienda su uso en combinación con otros fagos (coctel de fagos), para complementar y aumentar la eficacia en el biocontrol de *Salmonella* spp de perros.

## LITERATURA CITADA

- Albino, L. A., Rostagno, M. H., Húngaro, H. M., & Mendonça, R. C. (2014). Isolation, characterization, and application of bacteriophages for *Salmonella* spp. biocontrol in pigs. *Foodborne pathogens and disease*, 11(8), 602-609.
- Anany, H., Lingohr, E. J., Villegas, A., Ackermann, H. W., She, Y. M., Griffiths, M. W., & Kropinski, A. M. (2011). A *Shigella boydii* bacteriophage which resembles *Salmonella* phage Vil. *Virology journal*, 8(1), 242.
- Atterbury, R. J., Van Bergen, M. A. P., Ortiz, F., Lovell, M. A., Harris, J. A., De Boer, A., & Barrow, P. A. (2007). Bacteriophage therapy to reduce *Salmonella* colonization of broiler chickens. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73(14), 4543-4549.
- Augustine, J., Louis, L., Varghese, S. M., Bhat, S. G., & Kishore, A. (2013). Isolation and partial characterization of  $\Phi$ SP-1, a *Salmonella* specific lytic phage from intestinal content of broiler chicken. *Journal of basic microbiology*, 53(2), 111-120.
- Berchieri Jr, A., Lovell, M. A., & Barrow, P. A. (1991). The activity in the chicken alimentary tract of bacteriophages lytic for *Salmonella typhimurium*. *Research in Microbiology*, 142(5), 541-549.
- Borie, C., Zurita, P., Sánchez, M. L., Rojas, V., Santander, J., & Robeson, J. (2008). Prevención de la infección por *Salmonella enterica* subespecie *enterica* serotipo Enteritidis (*Salmonella Enteritidis*) en pollos mediante un bacteriófago. *Archivos de medicina veterinaria*, 40(2), 197-201

- Brenner, F. W., Villar, R. G., Angulo, F. J., Tauxe, R., & Swaminathan, B. (2000). Salmonella nomenclature. *Journal of clinical microbiology*, 38(7), 2465-2467.
- Brüssow H and Kutter E (2005) Phage Ecology. In: Kutter E and Sulakvelidze A (eds) *Bacteriophages Biology and Applications*. Boca Raton, FL: CRC Press, pp. 129–163.
- Caffer, M. I., & Terragno, R. (2001). *Manual de procedimientos para la caracterización de Salmonella*. Ministerio de Salud. Buenos Aires, Argentina. Subsecretaría de Investigación y Tecnología ANLIS Dr. Carlos G. Malbrán. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas. Departamento de Bacteriología. Servicio de Enterobacterias
- Carey-Smith, G. V., Billington, C., Cornelius, A. J., Hudson, J. A., & Heinemann, J. A. (2006). Isolation and characterization of bacteriophages infecting *Salmonella* spp. *FEMS microbiology letters*, 258(2), 182-186.
- Fonnegra Peña, L. P., Londoño Gomez, L. M., & Hernandez, C. (2009). Prevalencia de salmonella spp. en perros del centro de bienestar animal “La Perla”, en Medellín, Colombia.
- Castillo, A. D. C. G., Martínez, L. H. P., & Apodaca, N. L. C. (2008). Salmonelosis y campilobacteriosis, las zoonosis emergentes de mayor expansión en el mundo. *Veterinaria México*, 39(1), 81-90.

- Callaway, T. R., Edrington, T. S., Brabban, A. D., Keen, J. E., Anderson, R. C., Rossman, M. L., & Poole, T. L. (2006). Fecal prevalence of *Escherichia coli* O157, *Salmonella*, *Listeria*, and bacteriophage infecting *E. coli* O157: H7 in feedlot cattle in the southern plains region of the United States. *Foodborne Pathogens & Disease*, 3(3), 234-244.
- Capparelli, R., Nocerino, N., Iannaccone, M., Ercolini, D., Parlato, M., Chiara, M., & Iannelli, D. (2010). Bacteriophage therapy of *Salmonella enterica*: a fresh appraisal of bacteriophage therapy. *The Journal of infectious diseases*, 201(1), 52-61.
- CLSI. (2012). "Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-Second Informational Supplement." 15th informational supplement, M100-s22, 32, 188.
- de Carvalho, F. C. T., Barreto, N. S. E., dos Reis, C. M. F., Hofer, E., & dos Fernandes Vieira, R. H. S. (2009). Susceptibilidade antimicrobiana de *Salmonella* spp. isoladas de fazendas de carciniculturas no Estado do Ceará. *Revista Ciência Agronômica*, 40(4), 549-556.
- Díaz Vargas, Elizabeth Nidya (2017). Aislamiento y caracterización de bacteriófagos líticos en *Staphylococcus aureus* y *Salmonella* spp. Tesis de maestría de Universidad Autónoma de Baja California.
- Fernández Márquez, M. L., Burgos, M. J. G., Pulido, R. P., Gálvez, A., & López, R. L. (2017). Biocide tolerance and antibiotic resistance in *Salmonella* isolates from hen eggshells. *Foodborne pathogens and disease*, 14(2), 89-95.

- Forshell, L. P., & Wierup, M. (2006). Salmonella contamination: a significant challenge to the global marketing of animal food products. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz*, 25(2), 541-554
- Garcia P., Martinez B., Obeso J. M., Rodriguez A. (2008). Bacteriophages and their application in food safety. *Letters in Applied Microbiology*, 47:479-485.
- Gaviria, G., & Castaño, J. (2012). Técnica para aislamiento de bacteriófagos específicos para E. coli DH5 $\alpha$  a partir de aguas residuales. *Revista MVZ Córdoba*, 17(1), 2852-2860.
- Gong, C., Jiang, X., & Wang, J. (2017). Application of bacteriophages to reduce Salmonella contamination on workers' boots in rendering-processing environment. *Poultry science*, 96(10), 3700-3708.
- Gutierrez, C. A., Paasch, M. L., Calderón, A. N. (2007). Salmonelosis y Campilobacteriosis, las zoonosis emergentes de mayor expansión en el mundo, 81-90
- Guttman B., Raya R., Kutter E. (2005). Basic Phage Biology, pp. 29 – 66. In: Kutter E., Sulakvelidze A. (editors). *Bacteriophages: Biology and Applications*. CRC Press, Florida, EE.UU.
- Hagens, s.; loessner, M. (2010). Bacteriophage for biocontrol of foodborne pathogens: calculations and considerations. *Current pharmaceutical biotechnology* 11: 58-68

- 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.
- Hwang, S., Yun, J., Kim, K. P., Heu, S., Lee, S., & Ryu, S. (2009). Isolation and characterization of bacteriophages specific for *Campylobacter jejuni*. *Microbiology and immunology*, 53(10), 559-566.
- Jorquera, D., Galarce, N., & Borie, C. (2015). El desafío de controlar las enfermedades transmitidas por alimentos: bacteriófagos como una nueva herramienta biotecnológica. *Revista chilena de infectología*, 32(6), 678-688.
- Kiflu, B., Alemayehu, H., Abdurahaman, M., Negash, Y., & Eguale, T. (2017). Salmonella serotypes and their antimicrobial susceptibility in apparently healthy dogs in Addis Ababa, Ethiopia. *BMC veterinary research*, 13(1), 134.
- Kutter, E., & Sulakvelidze, A. (Eds.). (2004). *Bacteriophages: biology and applications*. CRC Press
- Leonard, E. K., Pearl, D. L., Finley, R. L., Janecko, N., Reid-Smith, R. J., Peregrine, A. S., & Weese, J. S. (2011). Comparison of antimicrobial resistance patterns of *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* recovered from pet dogs from volunteer households in Ontario (2005–06). *Journal of antimicrobial Chemotherapy*, 67(1), 174-181.
- Ley de Coss, A., Cobos-Peralta, M.A., Aguirre-Medina, J.F., Marroquín-Agreda, F.J., Lerma-Molina, J.N., Posada-Cruz, S., Cerda-Ocaranza, (2013) M.BOVINA, E. L. I. G. BACTERIÓFAGOS. AGRO., 51-58

- Lin, Y. R., Chiu, C. W., Chang, F. Y., & Lin, C. S. (2012). Characterization of a new phage, termed  $\phi$ A318, which is specific for *Vibrio alginolyticus*. *Archives of virology*, 157(5), 917-926
- López Cuevas, O., León Félix, J., Jiménez Edeza, M., & Chaidez Quiroz, C. (2009). Detección y resistencia a antibióticos de *Escherichia coli* y *Salmonella* en agua y suelo agrícola. *Revista fitotecnia mexicana*, 32(2), 119-126.
- Maciel, N. E. (2012). Lisogenia y mecanismos nativos de fagorresistencia presentes en bacterias lácticas salvajes y comerciales (Doctoral dissertation).
- Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., ... & Paterson, D. L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical microbiology and infection*, 18(3), 268-281.
- Mahmoud, M., Askora, A., Barakat, A. B., Rabie, O. E. F., & Hassan, S. E. (2018). Isolation and characterization of polyvalent bacteriophages infecting multi drug resistant *Salmonella* serovars isolated from broilers in Egypt. *International journal of food microbiology*, 266, 8-13.
- Michael, G. B., & Schwarz, S. (2016). Antimicrobial resistance in zoonotic nontyphoidal *Salmonella*: an alarming trend?. *Clinical Microbiology and Infection*, 22(12), 968-974.

- Moreno, A. Mayra A.; Castillo, H. Mayra A.; Ferrebuz, Atilio J.; Osorio, Z. William F.; Torres, C. María I.; López, V. Diana P. (2018) Resistencia bacteriana en pequeños animales, potencial riesgo para la salud humana. REDVET. - Revista electrónica de Veterinaria, 19 (2)
- Nayarit-Ballesteros, N., Rubio-Lozano, M. S., Delgado-Suárez, E., Méndez-Medina, D., Braña-Varela, D., & Rodas-Suárez, O. (2016). Perfil de resistencia a antibióticos de serotipos de *Salmonella* spp. aislados de carne de res molida en la Ciudad de México. salud pública de méxico, 58, 371-377.
- 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.
- OMS. (2018). Organización Mundial de la Salud página: [www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-\(non-typhoidal\)](http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-(non-typhoidal)). Acceso Febrero, 2019.
- Quiroz Guzmán, E. (2005). Aislamiento de bacterias y fagos para el control biológico de *Vibrio* spp durante la eclosión de *Artemia* (Doctoral dissertation, Instituto Politécnico Nacional. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas).
- Rábago, O. C., Ruiz, L. E. A., Ibarra, G. M. M., Maríñez, R. I. S., Campaña, L. G. C., & Navarro, M. N. (2010). Detección de *Salmonella* resistente a los antibióticos en vísceras de pollo
- Rivera Calderón, L. G., Motta Delgado, P. A., Urbano, C., Farley, M., Coy, C., & Andrés, F. (2012). Resistance of *Salmonella* to conventional antimicrobials for their treatment. CES Medicina Veterinaria y Zootecnia, 7(1), 116-129.



- Ronda, C., Vázquez, M., & López, R. (2016). Los bacteriófagos como herramienta para combatir infecciones en Acuicultura. *Revista AquaTIC*, (18).
- Segundo, N., Hernández, E., López, O., & Torres, O. (2010). Los bacteriófagos como una alternativa en el tratamiento de enfermedades infecciosas Bacterianas (Fagoterapia). *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 41(3).
- Sillankorva, S., Pleteneva, E., Shaburova, O., Santos, S., Carvalho, C., Azeredo, J., & Krylov, V. (2010). Salmonella Enteritidis bacteriophage candidates for phage therapy of poultry. *Journal of applied microbiology*, 108(4), 1175-1186.
- Spicigo, D. A. (2012). La desinfección basada en bacteriófagos como herramienta de biocontrol de Salmonella en alimentos.
- Srisanga, S., Angkittrakul, S., Sringam, P., Le Ho, P. T., Vo, A. T., & Chuanchuen, R. (2017). Phenotypic and genotypic antimicrobial resistance and virulence genes of Salmonella enterica isolated from pet dogs and cats. *Journal of veterinary science*, 18(3), 273-281.
- Summers W (2005). Bacteriophage research: early history. In: Kutter E and Sulakvelidze A (eds) *Bacteriophages Biology and Applications*. Boca Raton, FL: CRC Press, pp. 5–27
- Talavera Rojas, M., Varela Guerrero, J. A., Reyes Rodríguez, N. E., Lagunas Bernabé, S., Valladares Carranza, B., Alonso Fresan, M. U., & Velázquez Ordoñez, V. (2011). Resistencia antibiótica de genotipos de cepas de Salmonella spp de cerdos sacrificados en rastros del Estado de México. *Veterinaria México*, 42(4), 269-276.

- Tamariz, J. H., Lezameta, L., & Guerra, H. (2014). Fagoterapia frente a infecciones por *Staphylococcus aureus* meticilino resistente en ratones. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 31, 69-77.
- Tsai, H. J., Huang, H. C., Lin, C. M., Lien, Y. Y., & Chou, C. H. (2007). Salmonellae and campylobacters in household and stray dogs in northern Taiwan. *Veterinary research communications*, 31(8), 931-939.
- Uribe, C., & Suárez, M. C. (2006). Salmonelosis no tifoidea y su transmisión a través de alimentos de origen aviar. *Colombia médica*, 37(2).
- Viertel, T. M., Ritter, K., & Horz, H. P. (2014). Viruses versus bacteria—novel approaches to phage therapy as a tool against multidrug-resistant pathogens. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69(9), 2326-2336.