



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

“CARACTERIZACIÓN Y APLICACIÓN DE BACTERIÓFAGOS LÍTICOS EN
Salmonella enterica UTILIZANDO UN MODELO *in vitro*”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

P R E S E N T A:

M en C. SAÚL AGUILAR MONTES DE OCA

El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, Estado de México, Julio 2019



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN
CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

“CARACTERIZACIÓN Y APLICACIÓN DE BACTERIOFAGOS LÍTICOS EN
Salmonella enterica UTILIZANDO UN MODELO *in vitro*”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

P R E S E N T A:

M en C. SAÚL AGUILAR MONTES DE OCA

COMITÉ TUTORAL

Director de Tesis

Dr. Martín Talavera Rojas

Asesores

Dr. Edgardo Soriano Vargas

Dra. Jeannette Barba León

El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, Estado de México, Julio 2019

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
1. ANTECEDENTES.....	3
2. CLASIFICACIÓN DE LOS BACTERIÓFAGOS.....	6
3. MORFOLOGÍA DE LOS BACTERIÓFAGOS.....	10
4. <i>Salmonella</i> : NOMENCLATURA E IMPORTANCIA CLÍNICA.....	18
5. SALMONELOSIS EN MÉXICO.....	21
6. APLICACIÓN DE BACTERIÓFAGOS CONTRA <i>Salmonella enterica</i> EN ALIMENTOS.....	25
III. JUSTIFICACIÓN.....	28
IV. HIPÓTESIS.....	30
V. OBJETIVOS.....	31
VI. MATERIAL Y MÉTODOS.....	32
1. AISLAMIENTOS BACTERIANOS.....	32
2. PRUEBA DE SENSIBILIDAD <i>in vitro</i>	32
3. PRUEBA CONFIRMATORIA PARA ESBLs.....	33
4. DETECCIÓN DE GENES DE RESISTENCIA A ANTIMOCRIBANOS.....	34
5. ELECTROFORESIS EN GEL DE CAMPOS PULSADOS.....	35

6. AISLAMIENTO Y ENRIQUECIMIENTO DE BACTERIÓFAGOS.....	36
7. PURIFICACIÓN DE BACTERIÓFAGOS.....	37
8. TITULACIÓN DE LOS BACTERIÓFAGOS.....	37
9. DETERMINACIÓN <i>in vitro</i> DEL RANGO DE HOSPEDEROS.....	38
10. EFECTO DE LA TEMPERATURA.....	38
11. EFECTO DEL pH.....	39
12. ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN.....	39
VII. RESULTADOS.....	40
VIII. DISCUSIÓN.....	51
IX. CONCLUSIONES.....	59
X. SUGERENCIAS.....	60
XI. LITERATURA REVISADA.....	61
XII. ANEXOS.....	73

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Receptores reconocidos por bacteriófagos de <i>Salmonella enterica</i>	17
Tabla 2	Posición taxonómica y nomenclatura de <i>Salmonella</i>	19
Tabla 3	Estudios sobre la presencia de <i>Salmonella enterica</i> en México.....	23
Tabla 4	Recopilación de aplicaciones de los bacteriófagos para controlar <i>Salmonella</i> en la etapa post-harvest y como sanitizante.....	26
Tabla 5	Antimicrobianos empleados e interpretación de la prueba de difusión con discos.....	33
Tabla 6	Antimicrobianos empleados e interpretación de la prueba confirmatoria para ESBLs.....	34
Tabla 7	Cebadores empleados para la identificación de genes de resistencia a antibióticos.....	35
Tabla 8	Cepas de referencia empleadas en este estudio.....	38
Tabla 9	Aislamientos empleados (n=243).....	42
Tabla 10	Perfil fenotípico y genotípico de aislamientos multirresistentes.....	45
Tabla 11	Actividad lítica del fago PHA17 contra aislamientos de <i>Salmonella enterica</i> MDR.....	47
Tabla 12	Perfil de susceptibilidad de los aislamientos de <i>Salmonella enterica</i> al bacteriófago PHA17.....	48

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Cronología de los principales hitos de la historia de los fagos.....	5
Figura 2.	Morfortipos de virus procarióticos, las familias que están en el cuadro rojo pertenecen al orden de los <i>Caudovirales</i>	6
Figura 3.	Representación esquemática de la estructura del fago T4 (<i>Myoviridae</i> , izquierda), fago ϕ (<i>Podoviridae</i> , centro), fago TP901-1 (<i>Siphoviridae</i> , derecha).....	10
Figura 4.	Representación esquemática del bacteriófago T4 (<i>Myoviridae</i>).....	11
Figura 5.	Estructura de la cabeza del bacteriófago T4. A) Reconstrucción de la cápside del fago T4, se observa la proteína gp23 (subunidades de color amarillo), gp24 (color morado), Hoc (color rojo) y Soc (color blanco); B) Estructura de la proteína Soc; C) Estructura del capsómero hexamérico constituido por gp23 (color azul), rodeado de la proteína Soc (color rojo); E) Estructura del capsómero pentamérico constituido por gp24.....	12
Figura 6.	Representación esquemática de la cola y cuello de un bacteriófago <i>Myoviridae</i> . Los fagos <i>Siphoviridae</i> no presentan la vaina de la cola (verde) y la proteína terminadora de la vaina de la cola (rojo).....	13
Figura 7.	Representación esquemática de la vaina del bacteriófago T4 en su conformación extendida y contraída. Los recuadros negros muestran la placa basal y el reordenamiento que ocurre durante el proceso de infección del hospedero.....	14
Figura 8.	A y B) Representación esquemática de las fibras largas de la cola del bacteriófago T4 adherido a la membrana bacteriana antes (izquierda) y después (derecha) de la contracción de la vaina. El dominio de la punta esta en un recuadro. C) Dominios P1-P5 corresponde a la proteína gp34, la bisagra (K-C) está formada por la proteína gp35, mientras que la porción distal de la fibra consiste de gp36 (dominio D1-D2) y gp37 (D3-D11).....	16
Figura 9.	Representación del proceso de infección de un bacteriófago. Las fibras	

largas de la cola (FLC) y las fibras cortas de la cola (FCC) se han unido a los receptores presentes en la membrana externa de la bacteria como FuhA, OmpC o lipopolisacáridos (LPS). La vaina de la cola del bacteriófago se ha contraído empujando una “aguja puncionadora” constituida por la proteína gp5 (recuadro rojo) a través de la membrana externa permitiendo la entrada del ADN en el citoplasma de la bacteria.... 17

Figura 10.	Frecuencia de resistencia antimicrobiana en aislamientos de <i>Salmonella enterica</i> (n=243) de México. Antimicrobianos: AMP, ampicilina; FOX, cefoxitina; CAZ, ceftazidima; CTX, cefotaxima; NAL, ácido nalidíxico; CIP, ciprofloxacino; GEN, gentamicina; AK, amikacina.....	44
Figura 11.	Detección de los genes <i>bla</i> _{TEM} y <i>bla</i> _{CMY} . Gel de agarosa (2%); M, marcador de peso molecular, Carril 1 Control negativo (<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028), Carril 2 <i>E. coli bla</i> _{TEM} ⁺ y <i>E. coli bla</i> _{CMY} ⁺ , Carril 3 al 7 Aislamientos <i>Salmonella enterica</i> (Fuente: datos originales).....	44
Figura 12.	Detección de los genes <i>qnr</i> . Gel de agarosa (2%); M, marcador de peso molecular, Carril 1 Control negativo (<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028), Carril 2 <i>E. coli qnrB</i> ⁺ y <i>E. coli qnrS</i> ⁺ , Carril 3-6 Aislamientos <i>Salmonella enterica</i> (Fuentes: datos originales).....	45
Figura 13	Imagen de un gel de PFGE. Se observa el patrón genotípico generado por la enzima de restricción XbaI. Los carriles encerrados en el marco rojo corresponden a la cepa control <i>Salmonella</i> Braenderup H8912. En el margen izquierdo se observa el peso molecular de las bandas generadas por esta cepa (Fuente: datos originales).....	46
Figura 14.	Dendograma representando la relación genética entre los aislamientos de <i>Salmonella enterica</i>	46
Figura 15.	A) Efecto del pH en la viabilidad del bacteriófago PHA17. B) Efecto de la temperatura en la viabilidad del bacteriófago PHA17.....	50

ABREVIATURAS

Å	Ángstrom
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AK	Amikacina
AMP	Ampicilina
ARN	Ácido ribonucleico
AST	Agar soya tripticaseina
CAZ	Ceftazidima
CIP	Ciprofloxacino
CLSI	<i>Clinical & Laboratory Standards Institute</i> (Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio)
CRISPR	Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas
CST	Caldo soya tripticaseina
CTX	Cefotaxima
dsADN	ADN de cadena doble
<i>et al.</i>	y otros
FDA	<i>U.S. Food and Drug Administration</i> (Agencia de Alimentos y Medicamentos)
FOX	Cefotaxina
GEN	Gentamicina
ICTV	<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i> (Comité Internacional de la Taxonomía de los Virus)
MDR	Resistencia a múltiples fármacos
NAL	Ácido nalidíxico
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reacción en cadena de la polimerasa)
PFGE	<i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i> (Electroforésis en gel de campos pulsados)
TET	Tetraciclina
UFC	Unidades formadoras de placas
URSS	Unión de Repúblicas Socialistas Soviéticas

RESUMEN

CARACTERIZACIÓN Y APLICACIÓN DE BACTERIÓFAGOS LÍTICOS EN *Salmonella enterica* UTILIZANDO UN MODELO *in vitro*

Aguilar-Montes de Oca S, Talavera-Rojas M, Soriano-Vargas E, Barba-León J

Palabras clave: *Salmonella enterica*, resistencia antimicrobiana, bacteriófago

Salmonella enterica es uno de los patógenos transmitidos por alimentos más comunes a nivel mundial y se conocen más de 2500 serovares, sin embargo solo algunos de éstos son responsables por la mayoría de los casos de salmonelosis en humanos. En México este patógeno ha sido reportado en diferentes fuentes, incluyendo carne y vegetales. También la emergencia de aislamientos resistente a múltiples fármacos (MDR) principalmente de *S. enterica* serovar Typhimurium constituyen una preocupación para la Salud Pública. Una alternativa para lidiar con esto, es el uso de bacteriófagos cuyo potencial ha sido evaluado en años recientes. Los bacteriófagos son virus capaces de lisar diferentes bacterias y aunque generalmente se limitan a ciertas cepas o serovares también hay aquéllos que son capaces de lisar más de un serovar o bacteria de diferente especie y género. El objetivo de este estudio fue aislar, seleccionar y caracterizar bacteriófagos líticos como agentes de control de aislamientos regionales de *Salmonella* MDR.

Un total de 243 aislamientos de *S. enterica* de diversas fuentes y de dos entidades federativas fueron evaluados en cuanto a su susceptibilidad a diferentes antimicrobianos mediante la prueba de difusión en disco con especial énfasis en antibióticos β -lactámicos y quinolonas, así mismo, se buscaron algunos genes de resistencia antimicrobiana mediante PCR.

Para la detección de los bacteriófagos se emplearon aguas residuales obtenidas de ríos en el Estado de México, las cuales fueron sometidas a filtración y enriquecimiento con serovares de *S. enterica* multirresistentes a los antibióticos con el fin de encontrar bacteriófagos líticos.

Se encontró una resistencia antimicrobiana para la tetraciclina (TET) del 41.6%, seguido de la ampicilina (AMP) (21.7%), ácido nalidixico (NAL) (21.8%), gentamicina (GEN) (9%), cefotaxina (CTX), ceftazidima (CAZ) y cefoxitina (FOX) (6.6%), mientras que los niveles más bajos de resistencia se observaron para la amikacina (AK) (0.8%). En el caso del ciprofloxacino (CIP), sólo se encontró susceptibilidad intermedia (1.2%). Se realizó una caracterización adicional de 16 aislamientos resistentes a múltiples fármacos. Un total de 10 patrones de MDR fueron identificados, el patrón predominante fue CTX-CAZ-FOX-AMP-NA-GEN-TET.

La prueba de PCR detectó el gen *bla_{CMY}* en todos los aislamientos MDR, también se encontró en tres aislamientos la co-presencia con genes *bla_{TEM}*. Ninguno de los aislamientos fue positivo para los genes *qnr*.

La relación genética entre los 16 aislamientos MDR mostró que los aislamientos del Estado de México mostraron un índice de similitud mayor en comparación con los aislamientos del Estado de Jalisco.

Un bacteriófago, PHA17, fue seleccionado para posterior caracterización. El PHA17 fue capaz de lisar al menos 42% de la colección empleada (219 aislamientos), incluyendo aislamientos de *Salmonella* Typhi y no tipificables. Otra característica sobresaliente fue la capacidad de lisar aislamientos MDR (de los 16 aislamientos, 13 fueron susceptibles al fago PHA17).

En cuanto a la supervivencia de PHA17 a diferentes condiciones de temperatura y de pH revelaron que fue estable a 42°C y 60°C por 24 h, mientras que para el pH fue estable entre pH 4.0 y pH 7.0 por al menos 3 h. Los resultados sugieren que este bacteriófago podría ser empleado como una forma de control de *Salmonella* spp. con diferentes propósitos (inocuidad alimentaria, aplicaciones clínicas, entre otros), sin embargo se necesita una caracterización genética más exhaustiva.

ABSTRACT

CHARACTERIZATION AND APLICATION OF LYTIC BACTERIOPHAGES IN *Salmonella enterica* EMPLOYING AN *in vitro* MODEL

Aguilar-Montes de Oca S, Talavera-Rojas M, Soriano-Vargas E, Barba-León J

Keywords: *Salmonella enterica*, antimicrobial resistance, bacteriophage

Salmonella enterica is one of the most common foodborne pathogen worldwide and more than 2500 serovars are known, however, only some of them are responsible for the majority of human salmonellosis cases. In Mexico, this pathogen has been previously reported from different sources including meat and vegetables. Also, the emerging increase of multidrug-resistant (MDR) isolates, mostly of *S. enterica* serovar Typhimurium represents a Public Health concern. A new approach to deal with these problems is the use of bacteriophages whose potential has been evaluated in recent years. Bacteriophages (phages) are viruses capable of lysing bacteria and although generally phages are limited to certain strain or serovar of a specific bacterial species, some studies have reported phages capable of infecting more than one serovar or even different bacterial genus. The aim of this study was to isolate, characterize and select lytic bacteriophages as potential biocontrol agents against regional MDR *Salmonella* isolates.

A total of 243 *S. enterica* isolates from two federal states (Jalisco and State of Mexico) were evaluated in terms of their antimicrobials susceptibility through disk diffusion test with special emphasis in β -lactams and quinolones, likewise, several antimicrobial resistance genes were searched through PCR. Bacteriophage isolation was carried out employing sewage from rivers in the State of Mexico, which were subjected to filtration and enrichment with MDR *S. enterica* isolates in order to find lytic bacteriophages.

Antimicrobial resistance was found for TET (41.6%), followed by AMP (24.7%), NAL (21.8%), GEN (9%), CTX, CAZ and FOX (6.6% each), moreover the lowest resistant was observed to AK (0.8%). In case of CIP, only intermediate susceptibility was found (1.2%). Further characterization was applied to 16 MDR isolates that showed phenotypic resistance

to β -lactam antibiotics. A total of 10 MDR patterns were identified among them, the predominant pattern was CTX-CAZ-FOX-AMP-NA-GEN-TET.

The PCR test detected the *bla*_{CMY} gen through all MDR isolates; also in three isolates the co-presence with *bla*_{TEM} genes was found. None of the isolates was positive for *qnr* genes. The PFGE profile generated clades with an evident differentiation between isolates from State of Mexico and Jalisco, the clade from State of Mexico showed a major relatedness.

One bacteriophage, PHA17 was selected for further characterization. PHA17 was capable to lyse at least 42% of the collection employed (219 isolates), including *S. Typhi* and non-typeables isolates. Another outstanding characteristic was the capacity to lyse MDR isolates (of 16 isolates 13 were susceptible to phage PHA17).

Regarding the survivability of PHA17 to different conditions of temperature and pH, it was observed that was steady at 42 and 60 °C for 24 h, while for pH was stable between pH 4.0-7.0 for at least 3 h. The results suggest that this bacteriophage could be employed as a control agent of *Salmonella* spp. in different areas (food safety, clinical applications, among others) however; a more extensive genotypic characterization is needed to ensure its usefulness.

I. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades transmitidas por alimentos constituyen un riesgo para la Salud Humana y Veterinaria, además de una pérdida económica importante. Por ejemplo, en términos clínicos el número de casos por año en los Estados Unidos se estima en 55,961 hospitalizaciones y 1,351 muertes (Scallan *et al.* 2011). En México se ha documentado la presencia de microorganismos patógenos importantes en alimentos como *E. coli* (especialmente el serovar O157:H7) (Reyes-Rodríguez *et al.* 2013), y diferentes serovares de *Salmonella* como Typhimurium (Cabrera-Díaz *et al.* 2013; Varela-Guerrero *et al.* 2013), los cuales han causado diversos brotes epidémicos (Vázquez-Garcidueñas *et al.* 2014), además de portar genes de resistencia contra diversos antimicrobianos como lo son los β -lactámicos (Zaidi *et al.* 2007).

Los microorganismos patógenos transmitidos por alimentos, además de poseer características que les otorgan su patogenicidad, han adquirido otros mecanismos que les ayudan a generar resistencia a los antimicrobianos, lo cual, es un fenómeno que se ha extendido entre una gran cantidad de patógenos como *Staphylococcus aureus* (Lowy 2003), *Mycobacterium tuberculosis* (Di Perri y Bonora 2004), *Campylobacter jejuni* (Lindmark *et al.* 2004), *Salmonella* (Fluit 2005) y *Escherichia coli* (Saenz *et al.* 2004) entre muchos otros de importancia para la Salud Pública.

Otro aspecto que pone en riesgo la Salud Pública es la alarmante disminución que se observa en los últimos años en la producción de antimicrobianos por parte de la industria farmacéutica, en donde varias empresas han disminuido la investigación y desarrollo de nuevos antimicrobianos, principalmente debido a que se obtiene una ganancia menor a lo que se ha invertido originalmente (Norrby *et al.* 2005).

Este problema ha intensificado la necesidad de implementar nuevas medidas que sean efectivas para controlar infecciones ocasionadas por patógenos bacterianos. Dichas medidas incluyen: 1) mejorar la higiene y manejo de las instalaciones hospitalarias, 2) estricto control en el uso de los antibióticos que se emplean actualmente, 3) desarrollo de nuevos

fármacos antibacterianos, incluyendo péptidos y lípidos y, 4) la reevaluación de la fagoterapia en el contexto de una mejor comprensión de la biología de los fagos (O'Flaherty *et al.* 2009).

Los bacteriófagos o fagos se encuentran en casi cualquier lugar del planeta donde la bacteria hospedadora con la que interacciona se encuentre. Se sabe que la población de fagos en ecosistemas acuáticos se encuentra en un rango de 10^4 a 10^8 viriones por mL, y alrededor de 10^9 viriones por g en la tierra (Weinbauer 2004), con un número total estimado de 10^{32} fagos en el planeta, por lo que juegan un rol determinante en el balance de los ecosistemas bacterianos (Hatfull 2015).

El estudio de los bacteriófagos después de haber sido dejado de lado temporalmente ha tomado un nuevo impulso y se están realizando investigaciones sobre su utilidad clínica (fagoterapia), como agentes reductores de poblaciones bacterianas en animales y seres humanos, o inclusive para revertir la resistencia antimicrobiana empleándolos como herramientas genéticas (Edgar *et al.* 2012).

En México, la investigación con bacteriófagos para emplearlos como aditivos alimenticios o con aplicaciones clínicas (fagoterapia) es incipiente y se ha enfocado en aquellos microorganismos patógenos que son considerados de mayor riesgo para la Salud Pública como *E. coli* O157:H7, diferentes serovares de *Salmonella*, incluyendo *Salmonella* Typhimurium (López-Cuevas *et al.* 2011) y *Pseudomonas aeruginosa* (Sepúlveda-Robles *et al.* 2012).

Debido a la importancia que tiene para la Medicina Humana y Veterinaria la presencia y diseminación de ciertos serotipos y serovares de *Escherichia coli* y *Salmonella* que poseen diferentes factores de virulencia y genes que le otorgan resistencia a los principales antimicrobianos que se emplean en la actualidad es necesario evaluar el uso de los bacteriófagos tanto en los productos cárnicos para generar alimentos inocuos, y en modelos animales para conocer su posible aplicación clínica.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

1. ANTECEDENTES

Los bacteriófagos, también conocidos como fagos, son virus que infectan específicamente a bacterias. Fueron descritos por primera vez en el año de 1896 por Ernest Hanbury Hankin, un bacteriólogo inglés que trabajaba en la India y que había demostrado que el agua de algunos ríos contenía un “principio biológico” que destruía cultivos bacterianos productores de cólera. De igual manera, Frederick Twort en 1915 describió que cultivos bacterianos podían estar asociados a un “agente filtrable” que podía lisar las bacterias y que no podían crecer en ausencia de estas, sin embargo su investigación no avanzó más allá de esta observación (Wittebole *et al.* 2014). Dos años después (1917) fueron redescubiertos de manera independiente por Félix d’Herelle, quien expandió el estudio de estos microorganismos, siendo el primero en darles el nombre de *bacteriófagos* por su capacidad de lisar bacterias (del griego *phagein*: “comer”), también fue el primero en emplear el término “placa” para describir el área circular o “halo de inhibición” que se forma en placas de agar con crecimiento confluyente de bacterias que han sido infectadas con fagos (Ceyssens 2009; Wittebole *et al.*, 2014). Además fue pionero en la aplicación de los fagos como agentes biológicos para erradicar o disminuir poblaciones de insectos (biocontrol) como las langostas y también se le considera el “padre” de la terapia fágica o “fagoterapia” al emplearlos en Medicina Humana como tratamiento de enfermedades causadas por bacterias patógenas (Wittebole *et al.* 2014).

D’Herelle publicó varios boletines sobre el empleo de los bacteriófagos y ayudó a establecer el Instituto George Eliava en 1923 en Tsibili, Georgia, el cual continúa funcionando hasta hoy en día realizando investigación sobre la fagoterapia y también como centro de suministro de fagos para el tratamiento de varias infecciones bacterianas (O’Mahony *et al.* 2011).

El primer artículo científico sobre el uso clínico de los fagos fue publicado en Bélgica por Bruynoghe y Maisin en 1921 quienes emplearon fagos específicos para tratar infecciones cutáneas estafilocócicas (furúnculos) y quienes describen evidencia de una mejoría clínica

en 48 h, con reducción de dolor, hinchazón y fiebre en los pacientes que fueron tratados (Wittebole *et al.* 2014).

La invención del microscopio electrónico permitió una mejor comprensión de la morfología de los fagos. Helmut Ruska, un doctor alemán fue el primero en describir tanto partículas redondas como otras con “forma de espermatozoide” de una suspensión de fagos (Wittebole *et al.* 2014).

El desarrollo de la fagoterapia llegó a ser tan importante que D’Herelle comenzó a producir comercialmente 5 preparaciones de fagos, los cuales fueron posteriormente comercializados por una nueva compañía francesa que más tarde sería L’Oreal. Otras empresas como Eli Lilly, Pfizer y Bristol-Myers Squibb empezaron a desarrollar sus propias preparaciones comerciales de fagos (O’Mahony *et al.* 2011). Sin embargo, varios factores ocasionaron que su empleo cayera en desuso. Uno de estos fue que había resultados variables en la fagoterapia, es decir, podía haber éxito o fracaso, este último muy posiblemente a la falta de comprensión de la biología del fago, técnicas experimentales inadecuadas, una pobre calidad en la preparación del fago o un desconocimiento de las causas subyacentes de la enfermedad (O’Flaherty *et al.* 2009). Sumado a esto, la aparición y comercialización de la penicilina, seguido de la estreptomycin y terramicina en la década de los 40s condujo a que la civilización occidental declinara en el uso de fagos y optara por los antibióticos (Sulakvelidze y Morris 2001).

Aunque Occidente abandono el empleo de los bacteriófagos, éstos se siguieron empleando en la antigua Unión de Repúblicas Socialistas Soviéticas (URSS) en el Instituto Eliava previamente mencionado, Polonia (Instituto Hirsfeld) y en menor medida en la India. Sin embargo, la aparición no prevista de bacterias resistentes a los antibióticos ocasiono que los médicos e investigadores volvieran a reconsiderar la fagoterapia como una forma viable de contrarrestar este fenómeno emergente (O’Flaherty *et al.* 2009; O’Mahony *et al.* 2011). Así las investigaciones en Occidente comenzaron con animales en la década de los 80s empleando ratones, bovinos, ovinos y porcinos (Smith y Huggins 1982; Smith y Huggins 1983) y posteriormente los primeros experimentos en humanos que comenzaron en la

década del 2000 con el primer ensayo aleatorio en fase I en los Estados Unidos en 2009 (Rhoads *et al.* 2009).

Otro gran avance en los últimos años es la aceptación del empleo de fagos por parte de la Agencia de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) para usarlos como aditivos alimenticios, lo cual permitió el desarrollo de nuevas empresas que ahora comercializan varios aditivos alimenticios compuestos de fagos contra diversos patógenos como *Listeria monocytogenes*, *E. coli* O157:H7 y *Salmonella* spp. (García *et al.* 2008).

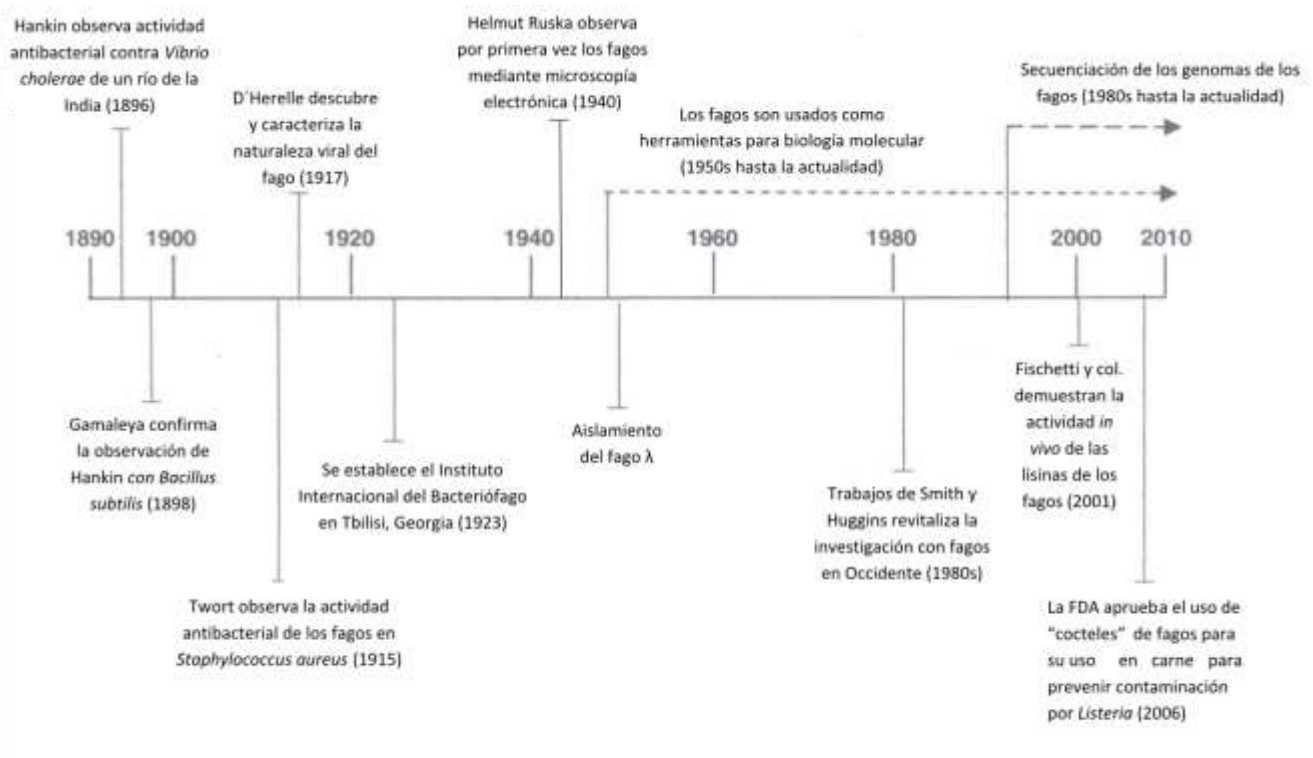


Figura 1. Cronología de los principales hitos de la historia de los fagos (Tomado y modificado de O'Flaherty *et al.*, 2009)

2. CLASIFICACIÓN DE LOS BACTERIÓFAGOS

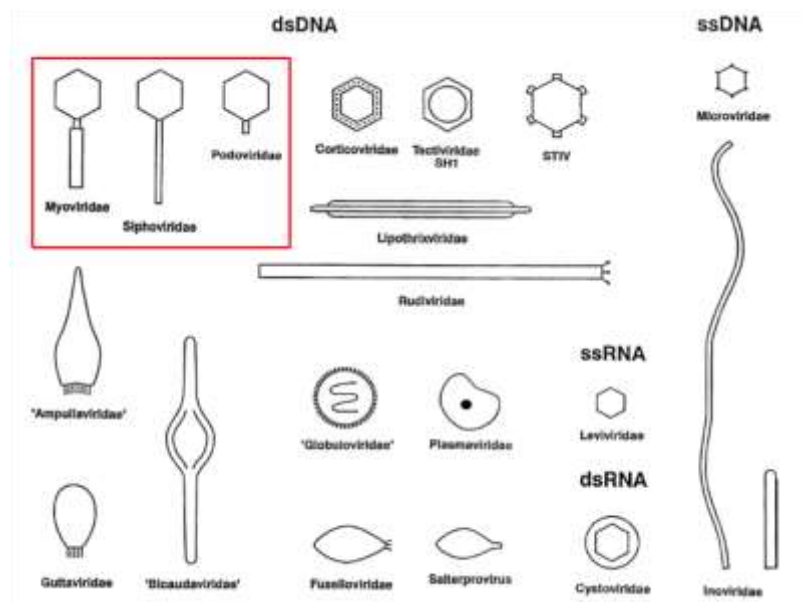
La clasificación de virus procarióticos incluye tanto virus de arqueas y bacterianos. Actualmente se han descubierto y descrito morfológicamente más de 6300 fagos, incluyendo 6196 virus bacterianos y 88 virus de arqueas, lo que indica que los bacteriófagos constituyen el grupo de virus más grande que se conoce (Ackermann y Prangishvili 2012).

De manera general los bacteriófagos pueden ser clasificados de diferentes formas:

- Con base a su morfología (con cola, poliédricos, filamentosos o pleomórficos)
- De acuerdo a su material genético (ADN, ARN)
- A la especificidad de su hospedero (familia de fagos estafilocócica, familia de fagos de *Pseudomonas*)
- De acuerdo al lugar donde viven (marinos, terrestres)
- Ciclo de vida (líticos, lisogénicos)

(Wittebole *et al.* 2014)

Figura 2. Morfotipos de virus procarióticos, las familias que están en el cuadro rojo pertenecen al orden de los *Caudovirales* (Tomado y modificado de Ackermann 2007).



El uso de la microscopía electrónica y la composición genómica constituyeron las bases del primer esquema de clasificación de los bacteriófagos (Adriaenssens and Rodney Brister 2017) (Figura 2). Actualmente el organismo internacional que se encarga de clasificar a los bacteriófagos es el Comité Internacional sobre la Taxonomía de Virus (ICTV, por sus siglas en inglés), según su criterio de clasificación existen a nivel taxonómico 25 órdenes para los virus dsADN, el orden más importante es el de los *Caudovirales* que se dividen en tres familias:

➤ *Myoviridae*

- a) Subfamilia *Eucampyvirinae*
- b) Subfamilia *Ounavirinae*
- c) Subfamilia *Peduovirinae*
- d) Subfamilia *Tevenvirinae*
- e) Subfamilia *Vequintavirinae*

➤ *Siphoviridae*

- a) Subfamilia *Arquatrovirinae*
- b) Subfamilia *Bclasvirinae*
- c) Subfamilia *Chebruvirinae*
- d) Subfamilia *Dclasvirinae*
- e) Subfamilia *Guernseyvirinae*
- f) Subfamilia *Mclasvirinae*
- g) Subfamilia *Mccleskeyvirinae*
- h) Subfamilia *Nclasvirinae*
- i) Subfamilia *Nymbaxtervirinae*
- j) Subfamilia *Pclasvirinae*
- k) Subfamilia *Tunavirinae*

➤ *Podoviridae*

- a) Subfamilia *Autographivirinae*
- b) Subfamilia *Picovirinae*
- c) Subfamilia *Sepvirinae*

Alrededor del 95% de todos los fagos descritos en la literatura pertenecen al orden de los *Caudovirales*, siendo estos de particular interés por sus aplicaciones como agentes para el biocontrol de bacterias: 60% de los fagos de este orden pertenecen a la familia *Siphoviridae* (siendo la familia más grande con más de 3600 virus descritos) y se distingue por la presencia de colas largas y flexibles; 25% son *Myoviridae* con colas contráctiles de doble capa y 15% son *Podoviridae* con colas cortas (Ackermann y Prangishvili 2012). También es importante mencionar que morfológicamente, la cantidad de virus con cola es muy superior en comparación con virus pleomórficos (Ackermann y Prangishvili 2012) (Figura 2).

La clasificación del ICTV está siendo reevaluada constantemente, teniendo en cuenta que falta una gran cantidad de información sobre la secuencia del genoma de estos virus, lo que llega a ocasionar aspectos contradictorios, sin embargo, realizar una reclasificación ha sido una tarea difícil hasta la fecha debido a que no hay un gen universal presente en todas las familias de fagos, como el gen 16S rARN que se emplea en las bacterias (Paul *et al.* 2002).

Actualmente la comparación de genomas virales se realiza con programas como BLASTN, CLANS, GEGENEES y Mvista. El análisis de estos genomas y homologías de proteínas es el principal objetivo del ICVT para desarrollar parámetros estandarizados en la definición molecular de género, subfamilias y familias de estos virus. En 2008 se delinearon nuevas subfamilias de fagos y géneros usando diferentes herramientas basadas en el software BLAST para medir las relaciones genéticas basadas en las similitudes de proteínas (Krupovic *et al.* 2016; Lavigne *et al.* 2008).

Otros sistemas de clasificación han sido propuestos como herramientas taxonómicas en los últimos años, e incluye el análisis de las secuencias genéticas de la subunidad mayor de la enzima terminasa (enzima que pertenece a la familia de las ATPasas) (Serwer *et al.* 2004), o el uso de varios genes (genes implicados en la replicación del ADN y genes que codifican proteínas estructurales de la cola y cápside del fago) (Chibani-chennoufi *et al.* 2004), y análisis comparativos de proteomas completos empleando el software BLASTp (Rohwer y Edwards 2002).

Un sistema de clasificación propuesto recientemente se basa en el empleo de proteínas estructurales de la cabeza, cuello y cola del bacteriófago y su correspondiente secuencia nucleotídica para agruparlos, interesantemente, este sistema es consistente con la clasificación morfológica de las tres principales familias de bacteriófagos, la utilidad de este sistema de clasificación es que puede analizar una gran cantidad de virus no clasificados o provenientes de análisis metagenómicos (Lopes *et al.* 2014).

Aun a pesar de los esfuerzos que se realizan para clasificar a los bacteriófagos, cada año se adicionan alrededor de 400-600 genomas nuevos en el GenBank, por lo que la clasificación de estos resulta ser un proceso difícil y lento mientras no se adopte una taxonomía genómica unificada, sin embargo debe considerarse que una clasificación basada exclusivamente en una secuencia genómica puede ser incorrecta debido a los constantes cambios en el genoma de los virus, no obstante, el empleo del genoma viral puede ser la única solución viable hasta el momento (Krupovic *et al.* 2016).

3. MORFOLOGÍA DE LOS BACTERIÓFAGOS

Tomando en cuenta que más del 95% de los fagos descritos en la literatura pertenecen al orden de los *Caudovirales* y las tres familias que lo representan (fagos de dsADN) existe un mayor número de artículos dedicados a describir su morfología (Fokine y Rossmann 2014). Al observar los bacteriófagos por microscopía electrónica de transmisión (TEM) se puede observar que los bacteriófagos de la familia *Siphoviridae* presentan colas largas y flexibles; los miembros de la familia *Myoviridae* presenta colas contráctiles de doble capa y los *Podoviridae* tienen colas cortas (Ackermann y Prangishvili 2012) (Figura 3).

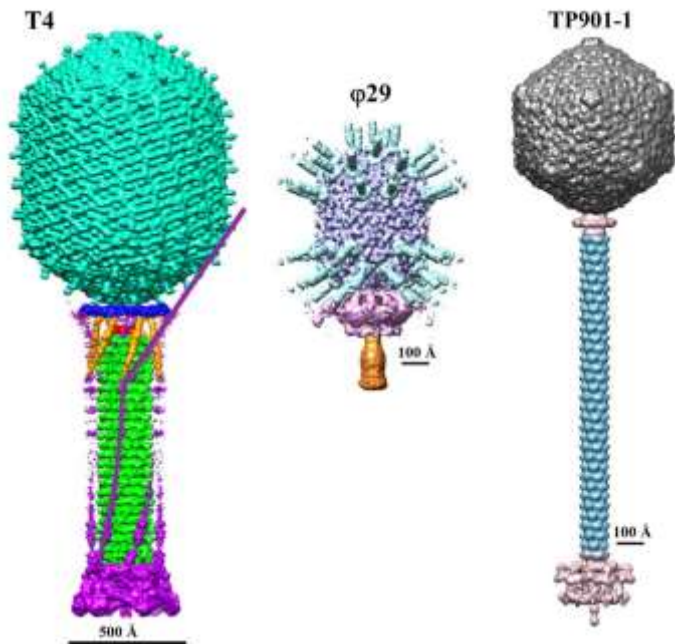


Figura 3. Representación esquemática de la estructura del fago T4 (*Myoviridae*, izquierda), fago ϕ (*Podoviridae*, centro), fago TP901-1 (*Siphoviridae*, derecha) (Tomado de Fokine y Rossmann 2014).

De manera general los bacteriófagos contienen su material genético (ssADN, dsADN o ARN) encapsulado en una cabeza o cápside que tiene la forma de un icosaedro y que está conectada a través de un collar a la cola, la cual puede ser contráctil o no, en cuya extremidad distal presenta una placa basal, de la cual se desprenden fibras con puntas que reconocen diferentes receptores presentes en la superficie de la célula bacteriana. En la parte inferior de la placa basal se encuentran unas espículas que participan en el proceso de infección al puncionar la membrana celular de su hospedero (Figura 4) (Wittebole *et al.* 2014).

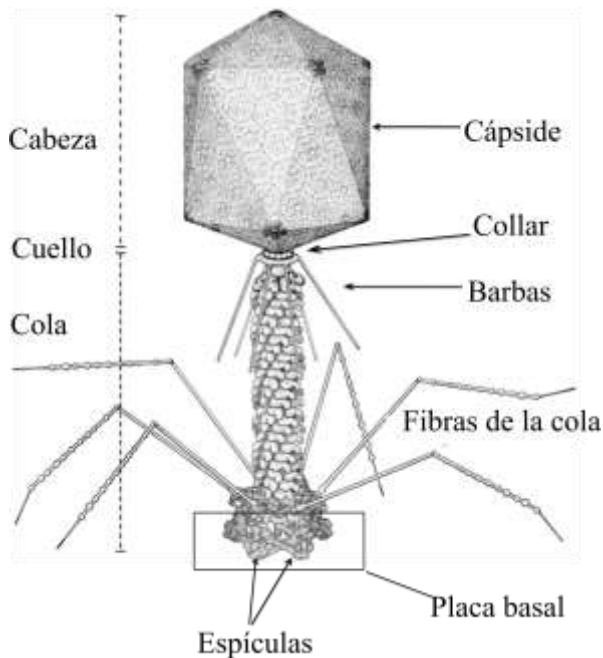


Figura 4. Representación esquemática del bacteriófago T4 (*Myoviridae*) (Tomado y modificado de Yap *et al.* 2016).

Los bacteriófagos presentan una cabeza con una gran variedad de tamaños con un diámetro que puede abarcar de los 400 a los 1700 Å (amstrongs) y su tamaño se correlaciona con el tamaño del genoma que almacena (Ackermann 2007). La mayoría de los *Caudovirales* (75%) examinados en el microscopio electrónico tienen cápsides icosaédricas (isométricas) (20 lados/12 vértices), mientras que aproximadamente el 15% restante de este orden tienen cabezas alargadas (Ackermann 2007). La cápside está compuesta por subunidades denominadas capsómeros, y que conforman ensambles de muchas copias de una o más proteínas; (estas proteínas también se les denomina “productos génicos” o gp). Generalmente, las esquinas de los icosaedros están compuestos de proteínas que forman pentámeros (capsómeros pentaméricos), mientras que el resto está hecho de hexámeros de la misma (o similar) proteína (capsómeros hexaméricos) (Figura 5) (Fokine *et al.* 2005).

Muchos bacteriófagos presentan dominios adicionales sobre la superficie de la cápside que se observan como protrusiones y que ayudan a estabilizar y reforzar la estructura de la cápside, por ejemplo la cápside del bacteriófago T4 contiene la proteína Soc, la cual refuerza la unión entre dos capsómeros hexaméricos (Figura 5). También existen proteínas decorativas, algunas en particular tienen dominios similares a las inmunoglobulinas y se

han encontrado en cerca del 25% de los *Caudovirales*, lo cual podría indicar que son benéficos en el ciclo de vida de los bacteriófagos. Se cree que dichas estructuras permiten que el bacteriófago pueda adherirse a diferentes superficies, lo que podría ser ventajoso para movilizarse o encontrar un hábitat favorable para interactuar con hospederos potenciales. Un ejemplo es la proteína Hoc del bacteriófago T4 y que es altamente inmunogénica (Figura 5).

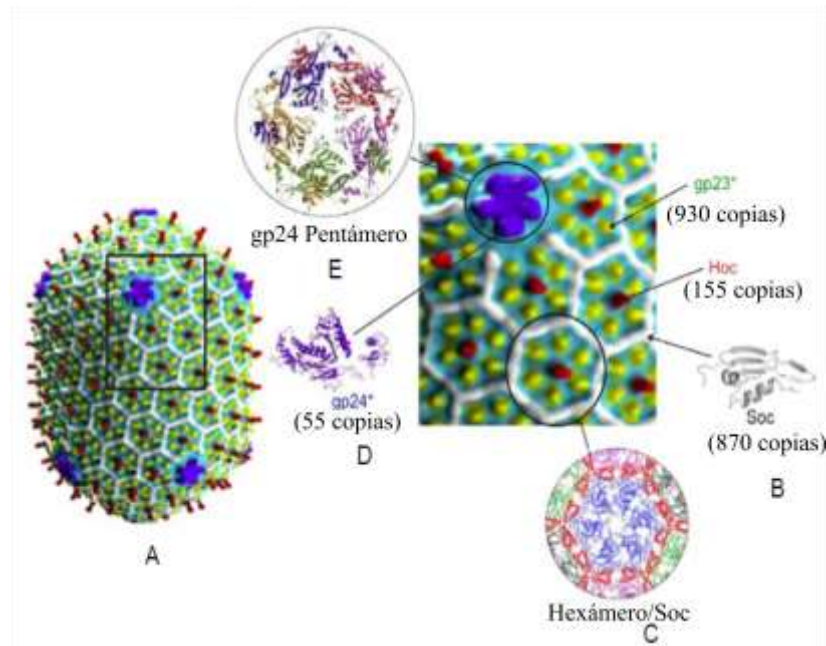
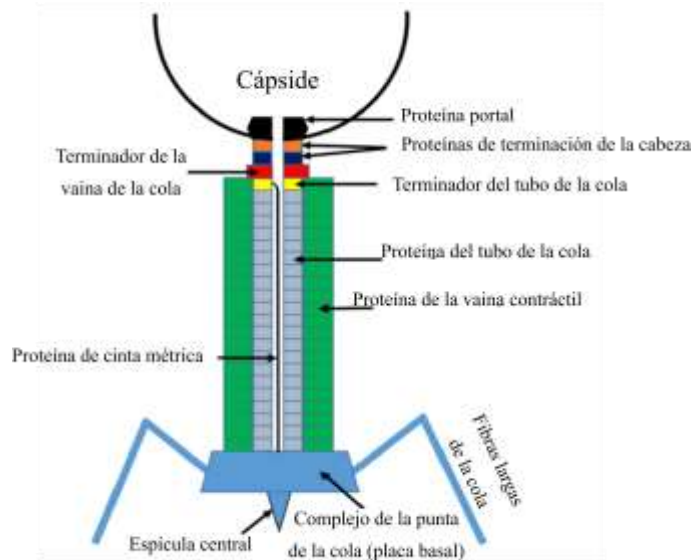


Figura 5. Estructura de la cabeza del bacteriófago T4. A) Reconstrucción de la cápside del fago T4, se observa la proteína gp23 (subunidades de color amarillo), gp24 (color morado), Hoc (color rojo) y Soc (color blanco); B) Estructura de la proteína Soc; C) Estructura del capsómero hexamérico constituido por gp23 (color azul), rodeado de la proteína Soc (color rojo); E) Estructura del capsómero pentamérico constituido por gp24 (Tomado y modificado de Rao y Black 2010).

El cromosoma del fago que está en la cápside representa el 20-50% de su masa total y se encuentra almacenado a una densidad alta de ~500 g/L y genera una presión interna de 10 atmósferas sobre las paredes de la cápside (Evilevitch *et al.* 2003). El genoma de los *Caudovirales* oscila entre 15 a 500 Kbp. El ADN de algunos fagos contiene nucleótidos modificados, lo cual ayuda a proteger los genomas contra la degradación por nucleasas generadas por las bacterias hospedadoras. Por ejemplo, el cromosoma de fagos similares al fago T contienen residuos de hidroximetilcitosina glucosilada (Bryson *et al.* 2015).

El cuello del bacteriófago sirve de enlace entre la cabeza y la cola, aunque esta porción es más pequeña en comparación con las otras, las proteínas que lo conforman son críticas para el ensamblaje adecuado del bacteriófago. La proteína portal forma un conducto con una conformación dodecamérica (complejo formado por 12 subunidades proteicas) y tiene una carga negativa, lo que permite el paso adecuado del ADN hacia la cápside. Esta proteína está implicada en la formación de la partícula viral y la salida del ADN durante el proceso de infección sirviendo como una válvula que previene la fuga del ADN (Figura 6) (Fokine y Rossmann 2014; Valpuesta *et al.* 2000).

Figura 6. Representación esquemática de la cola y cuello de un bacteriófago *Myoviridae*. Los fagos *Siphoviridae* no presentan la vaina de la cola (verde) y la proteína terminadora de la vaina de la cola (rojo) (Tomado y modificado de Fokine y Rossmann 2014)



Justo debajo de la proteína portal se encuentran las proteínas de terminación de la cabeza (los bacteriófagos de las familias *Siphoviridae* y *Myoviridae* generalmente tienen dos proteínas con forma de anillos), estas son necesarias para que la cápside pueda unirse a la cola, además en la etapa final del ensamblaje del fago, estas proteínas constituyen el sitio de adhesión para el collar y las barbas que están hechas de fibritina (Figura 6) (Fokine *et al.* 2013).

La cola del fago cumple con la función de adherirse al hospedero y servir como un conducto para la “inyección” de su genoma. La cola de los *Caudovirales* tiene diferentes tamaños que van de $\sim 100 \text{ \AA}$ en algunos *Podoviridae* a $\sim 8000 \text{ \AA}$ en los *Siphoviridae*. El ensamblaje de la cola en los *Podoviridae* se realiza en el extremo de la cápside, mientras que con los *Siphoviridae* y *Myoviridae*, primero se forma el complejo de la punta de la cola

(placa basal), la cual sirve como plataforma para ensamblar las subunidades proteínicas del tubo de la cola. La proteína de cinta métrica se encarga de determinar el largo de la cola, esta se adhiere a la placa basal y se extiende a través del canal central de la cola, mientras que la proteína del tubo de la cola forma anillos hexaméricos que la van rodeando, este ensamble continua hasta que la proteína terminadora de la cola se adhiere en la parte superior del tubo de la cola. Sin esta última proteína la cola no puede unirse a la cabeza del bacteriófago y la cola sigue creciendo más allá de lo establecido por la proteína de cinta métrica, resultando en la formación de colas aberrantes de diferentes tamaños (Figura 6) (Ackermann 2003; Mahony *et al.* 2016; Pell *et al.* 2009).

Los bacteriófagos de la familia *Myoviridae* poseen otra estructura adicional, la vaina contráctil de la cola, la cual se ensambla alrededor del tubo de la cola mediante subunidades en forma de anillos hexaméricos que se van rotando relativamente creando una hélice de 6 estrellas. El ensamble de la vaina es finalizado por la proteína terminadora de la vaina. Esta última proteína crea la interface para la adherencia de la cabeza, mientras que en el caso de los *Siphoviridae* que carecen de la vaina, esta función es realizada por la proteína terminadora de la cola (Figura 7) (Aksyuk *et al.* 2009; Fokine *et al.* 2013)

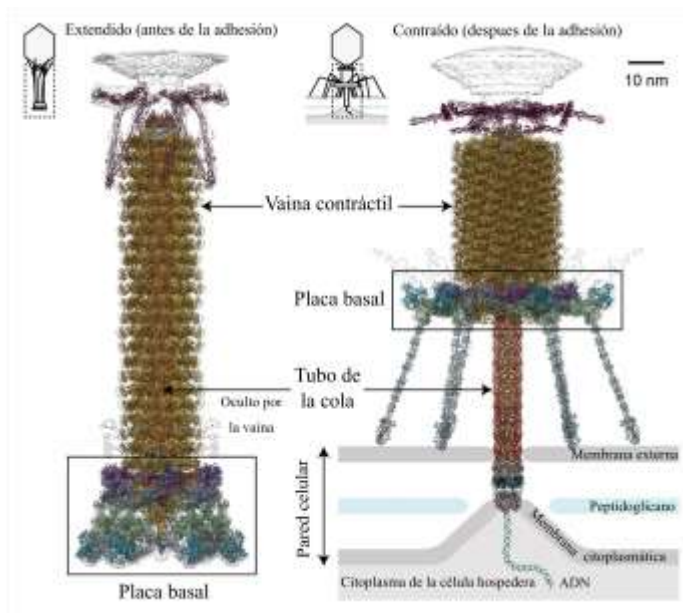


Figura 7. Representación esquemática de la vaina del bacteriófago T4 en su conformación extendida y contraída. Los recuadros negros muestran la placa basal y el reordenamiento que ocurre durante el proceso de infección del hospedero (Tomado y modificado de Taylor *et al.* 2016).

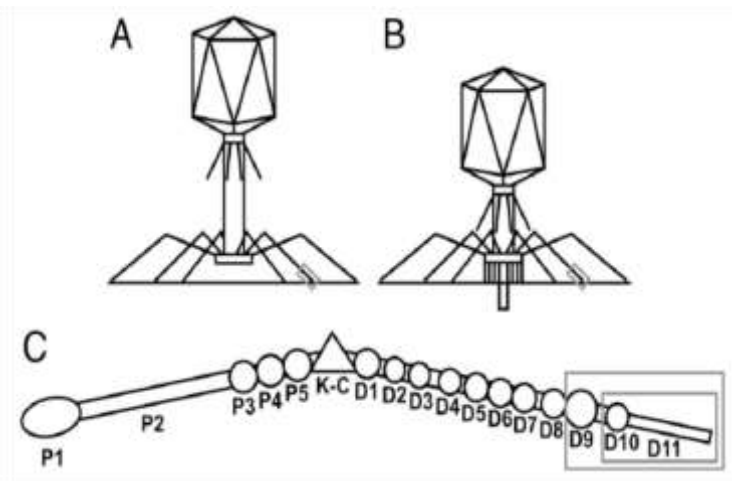
El complejo de la punta de la cola tiene diferente tamaño y morfología dependiendo del fago. Los fagos que emplean receptores de proteína para unirse a la célula bacteriana usualmente tienen puntas cónicas (ej. fago λ), mientras que fagos que emplean receptores polisacáridos generalmente tienen complejas placas basales en el final distal de la cola (ej. fagos lactocococicos TP901-1). Estos fagos pueden tener diferentes proteínas unidas al final de los tubos de la cola. Por ejemplo el fago ϕ 29 tiene 2 copias de una proteína degradadora de peptidoglucano y el fago P22 posee una “aguja” puncionadora de células de 240 Å conformada por una proteína trimérica y que sirve como un tapón para prevenir una fuga prematura de ADN (Figura 9) (Fokine y Rossmann 2014).

Los eventos iniciales del proceso de infección que realizan los bacteriófagos son diversos, por ejemplo, la adhesión del bacteriófago T4 (*Myoviridae*) a los receptores de lipopolisacáridos (LPS) del hospedero induce un reordenamiento en el extremo de la cola permitiendo una unión irreversible con la célula blanco seguido de la perforación de la superficie bacteriana, mientras que al parecer los *Podoviridae* después de adherirse a la membrana celular eyectan algunas proteínas para formar un tubo a través del periplasma dirigiendo el ADN viral dentro del citoplasma del hospedero. Algunos *Siphoviridae* como el fago p2 exhiben un mecanismo de adhesión mediado por iones de Ca^{2+} e inducen una rotación de 200° de las proteínas de unión a receptores (RBPs) para establecer múltiples interacciones con los sacáridos del huésped e iniciar la infección; no obstante, otros fagos de esta misma familia como el fago TP901-1 no requieren modificar su conformación o la presencia de iones de Ca^{2+} , lo cual resalta la diversidad de mecanismos empleados por los bacteriófagos para adherirse a su hospedero (Vessler 2012).

Además, los fagos tienen las fibras largas de la cola que están localizadas periféricamente al complejo de la punta de la cola, Las fibras de la cola permiten el reconocimiento de receptores que están en la membrana externa de la bacteria hospedera, las fibras largas de la cola pueden unirse de manera reversible con un receptor, mientras que las espículas o fibras cortas de la cola generan una unión irreversible (Shin *et al.* 2012).

Las fibras largas de la cola son un ensamble de diferentes proteínas, como es el caso del bacteriófago T4 cuyas fibras largas están constituidas por 4 proteínas diferentes (gp34, gp35, gp36 y gp37), formando un segmento proximal y otro distal separados por una estructura en forma de bisagra con un ángulo de 160°C. En el extremo distal de las fibras largas de la cola, se encuentra la punta que contiene el sitio de interacción con el receptor bacteriano (Figura 8) (Bartual *et al.* 2010).

Figura 8. A y B) Representación esquemática de las fibras largas de la cola del bacteriófago T4 adherido a la membrana bacteriana antes (izquierda) y después (derecha) de la contracción de la vaina. El dominio de la punta esta en un recuadro. C) Dominios P1-P5 corresponde a la proteína gp34, la bisagra (K-C) está formada por la proteína gp35, mientras que la porción distal de la fibra consiste de gp36 (dominio D1-D2) y gp37 (D3-D11) (Bartual *et al.* 2010).



Actualmente se conocen diversos receptores en los bacteriófagos que tienen a *Salmonella* como hospedero y que incluyen diferentes proteínas de membrana externa, lipopolisacáridos, proteínas flagelares, etc. Algunos receptores que se describen para alguna especie bacteriana en particular, también se encuentra presentes en otras especies, lo cual podría explicar la capacidad de algunos bacteriófagos de tener hospederos de diferentes especies bacterianas (Tabla 1). En una revisión reciente se encontró que de 19 bacteriófagos que tiene como hospedero a *Salmonella*, 11 de ellos tenían receptor proteínico, 7 alguna fracción de azúcares y 1 que requería ambos tipos de receptores. También se ha observado que el bacteriófago P22 es capaz de reconocer a *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* y *S. Paratyphi A* mediante una proteína con función de aguja punccionadora presente en la cola del fago, curiosamente, estos serovares comparten la misma unidad repetitiva de cadenas de trisacárido del antígeno O, sin embargo difieren en el epímero (esteroisómeros que difieren

en cuanto a su configuración en un solo átomo de carbono, en este caso C-3), estando presente el azúcar paratosa en *S. Paratyphi A*, tivelosa en *S. Enteritidis* y abequosa en *S. Typhimurium*, dichos azúcares también son los responsables de asignar un serotipo en particular (Tabla 1) (Andres *et al.* 2013; Bertozzi Silva *et al.* 2016; Shin *et al.* 2012).

Tabla 1. Receptores reconocidos por bacteriófagos de *Salmonella enterica*.

Receptor	Función
FhuA	Proteína de membrana externa
TolC	Proteína de membrana externa
BtuB	Proteína de membrana externa
OmpC	Proteína de membrana externa
Grupos acetil del exopolisacárido capsular Vi	Capsula
FliC	Proteína flagelar
FliK	Proteína flagelar

(Shin *et al.* 2012; Bertozzi Silva *et al.* 2016)

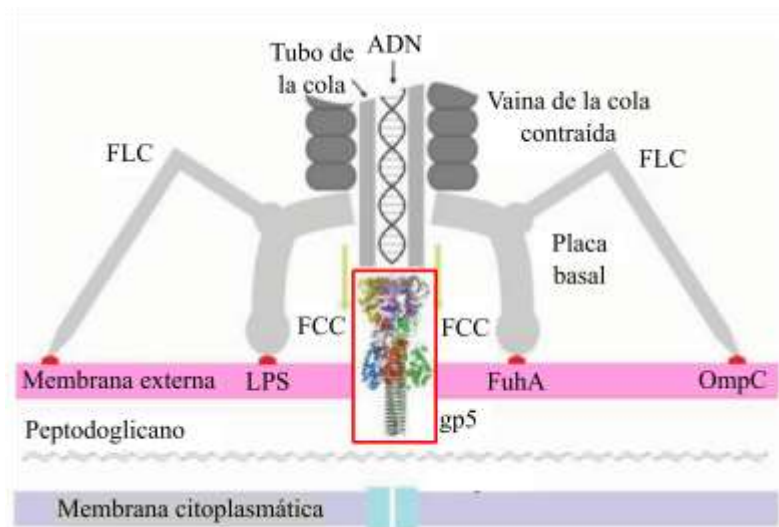


Figura 9. Representación del proceso de infección del bacteriófago T4. Las fibras largas de la cola (FLC) y las fibras cortas de la cola (FCC) se han unido a los receptores presentes en la membrana externa de la bacteria como FuhA, OmpC o lipopolisacáridos (LPS). La vaina de la cola del bacteriófago se ha contraído empujando una “aguja punccionadora” constituida por la proteína gp5 (recuadro rojo) a través de la membrana externa permitiendo la entrada del ADN en el citoplasma de la bacteria (Tomado y modificado de Rossmann *et al.* 2006)

4. *Salmonella*: NOMENCLATURA E IMPORTANCIA CLÍNICA

Salmonella es un género de la familia *Enterobacteriaceae*, cuyos miembros se caracterizan por ser bacilos Gram-negativos, facultativos y generalmente móviles con flagelo peritríco, no fermenta la lactosa, oxidasa negativo, ureasa negativo y utiliza el citrato (Agbaje *et al.* 2011).

Las salmonellas están ampliamente distribuidas en la naturaleza y afecta un gran número de animales y al hombre. En animales, la salmonelosis se manifiesta en cuatro formas principales: enteritis, septicemia, aborto y portador asintomático. En humanos, la salmonelosis incluye varios síndromes como la fiebre entérica, gastroenteritis, septicemia, infecciones locales y, en el caso de algunas cepas tifoideas, un estado de portador asintomático. Las infecciones de *Salmonella* en animales para consumo humano y su transmisión a los humanos constituye un riesgo para la Salud Pública (Agbaje *et al.* 2011).

Actualmente se conocen más de 2,500 serovares de *Salmonella* en el mundo de acuerdo a sus antígenos somáticos (O) y flagelares (H). Con base a la adaptabilidad del hospedero, estos serovares se pueden clasificar funcionalmente en tres grandes grupos:

- Grupo 1: Salmonelas adaptadas al ser humano y primates superiores, ej. *Salmonella* Typhi, *Salmonella* Paratyphi A y *Salmonella* Sendai.
- Grupo 2: Salmonelas totalmente o ampliamente adaptadas a hospederos específicos, ej. *Salmonella* Dublin en ganado vacuno, *Salmonella* Gallinarum en aves de corral, *Salmonella* Abortusequi en equinos, *Salmonella* Abortusovis en ovinos y *Salmonella* Cholerasuis en cerdos, pero infrecuentes en humanos.
- Grupo 3: Las salmonelas que no son específicas de hospedero y producen infecciones en el hombre y una amplia gama de animales, ej. *Salmonella* Typhimurium y *Salmonella* Enteritidis.

(Tomado y modificado de Agbaje *et al.* 2011)

La nomenclatura de *Salmonella* ha sido controversial considerando que la taxonomía original de este género no estuvo basada en la relación genética sino que se basó en aspectos clínicos. El nombre del género *Salmonella* se empleó en honor al bacteriólogo americano D.E. Salmon, quien aisló este microorganismo del intestino de un cerdo en 1884 (Su y Chiu 2007) .

El género *Salmonella* se divide en dos especies, *Salmonella bongori* y *Salmonella enterica*, esta última incluye seis subespecies (Tabla 2), la mayoría de los serovares que se conocen pertenecen a *S. enterica* subsp. *enterica* (subsp. I), las cepas de estos serovares son responsables de la mayoría de las infecciones en humanos y animales de sangre caliente (Popoff y Le Minor, 1997). El restante de los serovares distribuidos en las otras subespecies son aislados usualmente de animales de sangre fría (reptiles) y el medio ambiente, pero rara vez en humanos (Agbaje *et al.* 2011).

Tabla 2: Posición taxonómica y nomenclatura de *Salmonella*

Género	Especies	Subespecies	Serovares	No. de Serovares *
<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>enterica</i> (o subespecies I)	Cholerasuis, Enteritidis, Paratyphi, Typhi, Typhimurium	1586
		<i>salamae</i> (o subespecies II)	9,46:z:z39	522
		<i>arizonae</i> (o subespecies III)	43:z29:-	102
		<i>diarizonae</i> (o subespecies IIIa)	6,7:1,v,:1,5,7	338
		<i>houtenae</i> (o subespecies IV)	21:m,t:-	76
		<i>indica</i> (subespecies VI)	59:z36:-	13
<i>Salmonella</i>	<i>bongori</i>	(Subespecies V)	13,22:z39:-	22
No. total de serovares				2659

(Tomado y modificado de Su and Chiu 2007)

*(Issenhuth-Jeanjean *et al.* 2014)

Otra preocupación es que el abuso de antibióticos ha contribuido a la aparición de nuevas cepas de *Salmonella* especialmente en países en vías de desarrollo y USA (Sánchez-Vargas *et al.* 2011). En décadas anteriores para tratar la salmonelosis invasiva, la ampicilina, cloranfenicol y sulfametoxazol-trimetropim eran antibióticos de elección,

desafortunadamente, la resistencia a estos antimicrobianos se ha incrementado hasta en un 70% en varios países del mundo (Su *et al.* 2004).

Otro factor a considerar es que los niveles de resistencia pueden variar dependiendo del serovar; *Salmonella* Enteritidis es generalmente más susceptible a los antimicrobianos, mientras *Salmonella* Typhimurium exhibe un mayor nivel de resistencia a estos compuestos (Su *et al.*, 2004). En el caso de este último serovar, ha aparecido una cepa multirresistente que corresponde al fagotipo 104 (DT104) en los Estados Unidos y Europa desde la década de 1990. Esta cepa se caracteriza por presentar una resistencia concomitante a 5 antibióticos: ampicilina (A), cloranfenicol (C), estreptomina (S), sulfonamida (Su) y tetraciclina (T) (= tipo-R ACSSuT) (Threlfall 2002).

5. SALMONELOSIS EN MÉXICO

En México, la presencia de 142 enfermedades sujetas a vigilancia epidemiológica son registradas semanalmente en el “Boletín Epidemiológico” que es una publicación de la Secretaría de Salud y es el medio oficial de difusión de la morbilidad del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE), la divulgación de dicha información es obligatoria según lo establece la Norma Oficial Mexicana NOM-017-SSA2-2012; la información sobre casos nuevos es presentada por sexo, grupo de edad y entidad federativa. En el caso particular de *Salmonella* de acuerdo al Boletín Epidemiológico, la información se presenta como casos de “fiebre tifoidea” (*Salmonella Typhi*), “fiebre paratifoidea” (*Salmonella Paratyphi A, B o C*) y “otras salmonelosis” (otros serovares de *Salmonella*). A pesar de este seguimiento constante, información importante como la identificación particular de los diferentes serovares y los perfiles de resistencia antimicrobiana no son publicados y si la información existe está restringida a personal del SINAVE.

Además de las publicaciones gubernamentales también existen diversas investigaciones que revelan la presencia de *Salmonella* en diferentes ambientes, por ejemplo, este microorganismo ha sido aislada de ríos (Jiménez *et al.* 2014), cultivos hidropónicos (Avila-Vega *et al.* 2014), animales silvestres en cautiverio (Silva-Hidalgo *et al.* 2014), en vegetales crudos para consumo humano (Quiroz-Santiago *et al.* 2009; Gómez-Aldapa *et al.* 2013) y también en animales productores de alimentos y productos cárnicos procesados; la relevancia de estos últimos es particularmente importante si consideramos que la mayoría de las infecciones causadas por *Salmonella enterica* están asociadas al consumo de algún producto de origen animal o inclusive en algunos casos el contacto directo con los animales (Hur *et al.* 2012). Algunas investigaciones realizadas en México con respecto a la presencia de este patógeno en productos de origen animal están en la Tabla 3.

Con respecto a los casos clínicos registrados en los centros de salud del país se ha encontrado que los serovares más frecuentes son: Typhimurium, Enteritidis, Derby, Agona y Anatum (Gutiérrez-Cogco *et al.* 2000), también, aunque de manera limitada, se han descrito algunos serovares implícitos en algunos brotes epidémicos, por ejemplo un brote

epidémico que surgió en una prisión de México en el año 2010 y donde se encontró que el agente causal fue *Salmonella* Oranienburg (Vazquez-Garcidueñas *et al.* 2014) y otro brote epidémico que ocurrió durante una conferencia internacional en Puerto Vallarta, México en 1996 y se encontró que el agente causal fue *Salmonella* Enteritidis (Shane *et al.* 2002).

Tabla 3 Estudios sobre la presencia de *Salmonella enterica* en México

Autores	Alimentos analizados	Entidad Federativa	Serovares	Pruebas de sensibilidad	Antibióticos analizados*
(Cabrera-Díaz <i>et al.</i> 2013)	Carne de res molida	Jalisco	Anatum, Agona, Infantis, Havana, Typhimurium, Derby, Sinstorf, Panama, Brandenburg, Give, Rissen, Saintpaul, Albany, Braenderup, Bredeney, Kentucky, Lockleaze, Worthington, Adelaide, Azteca, Cannstatt, Montevideo, Muenchen, Muenster, Reading	Difusión en agar	AMP, CEF, CHL, GEN, NAL, STR, STX, TET
(Gragg <i>et al.</i> 2013)	Res faenada	Información no mencionada	Kentucky, Anatum, Reading, Meleagridis, Cerro, Muenster, Give, Mbandaka	Microdilución en caldo	AMP, AMC, CEF, CHL, NAL, STR, STX, SXZ, TET
(Varela-Guerrero <i>et al.</i> 2013)	Res faenada	Estado de México	Typhimurium, Typhi, Enteritidis	Dilución en caldo	AMP, FF, NAL, STR, SMX, TET
(Perez-Montaña <i>et al.</i> 2012)	Res faenada	Jalisco	Give, Typhimurium, Infantis, Anatum, Bovismorbificans, Montevideo, Havana, Muenster, Enteritidis, Livingstone, Oranienburg, Panama, Sinstrof	Difusión en agar	AMP, CEF, CHL, CIP, CRO, GEN, KAN, NAL, STR, STX, TET
(Talavera-Rojas <i>et al.</i> 2011)	Cerdos faenados	Estado de México	Typhimurium, London, Agona, Anatum, Bredeney, Grupo B monofasica, Infantis, Reading, Havana, Cholerasuis, Tennessee, Adelaide, Enteritidis	Difusión en agar	AMP, CHL, SMX
(Miranda <i>et al.</i> 2009)	Carne de cerdo, carne de pollo, carne de res, pescado	Hidalgo	<i>Salmonella</i> spp.	Microdilución en caldo	AMP, CHL, CEF, CIP, CTX, GEN, KAN, NAL, STR, STX, TET
(Zaidi <i>et al.</i> 2008)	Piezas de pollo, cerdo y res a la venta	Yucatán	Typhimurium, Enteritidis, Agona, Muenchen, Oranienburg, Anatum, Newport, Meleagridis	Difusión en agar	AMP, CHL, CIP, CRO, GEN, KAN, NAL, STR, STX, SXZ, TET

(Zaidi <i>et al.</i> 2006)	Carne de pollo, cerdo y res	Yucatán	Albany, Agona, Adelaide, Anatum, Braenderup, Cerro, Cannstatt, Derby, Enteritidis, Havana, Infantis, Meleagridis, Reading, Stanleyville, Worthington, Typhimurium	Difusión en agar	AMP, CHL, CIP, CRO, GEN, KAN, NAL, STR, STX, SXZ, TET
----------------------------	-----------------------------	---------	---	------------------	---

(Tomado y modificado de Quesada *et al.* 2016)

AMP, ampicilina; AMC, amoxicilina-ácido clavulánico; CEF, cefalotina; CHL, cloranfenicol; CIP, ciprofloxacino; CRO, ceftriaxona; FF, florfenicol; GEN, gentamicina; KAN, kanamicina; NAL, ácido nalidíxico; SMX; sulfametoxazol; STR, estreptomicina; STX, trimetoprim-sulfametoxazol; SXZ, sulfisoxazol; TET, tetraciclina.

*Se listan solo los antimicrobianos a los cuales los aislamientos de *Salmonella* spp. fueron resistentes.

6. APLICACIÓN DE BACTERIÓFAGOS CONTRA *Salmonella enterica* EN ALIMENTOS

Los bacteriófagos pueden ser incorporados a las matrices alimenticias en diferentes formas aspersión, inmersión o inmovilización, sea un solo fago o una combinación de varios (cóctel), también se puede acoplar con otros aditivos. La eficacia de los fagos sobre las matrices alimenticias depende de varios factores que influyen en la estabilidad y habilidad del fago para adherirse a su hospedero, como es el pH, temperatura, cantidad de iones, osmolaridad, interacción con los componentes del alimento, capacidad de difusión, concentración del fago y accesibilidad a la bacteria hospedera (Pérez Pulido *et al.* 2016).

Actualmente existen productos comerciales a base de bacteriófagos (cócteles o fagos individuales) que tienen el grado GRAS (Generalmente reconocidos como seguros) y que están disponibles para usar contra diferentes patógenos transmitidos por alimentos. En 2007 la FDA (Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos) aprobó el uso de un compuesto a base de fagos (manufacturado por OmniLytics Inc.) contra *E. coli* y *Salmonella*. Otra compañía que comercializa fagos es Intralytix Inc., la cual tiene una preparación comercial denominada SalmoFresh™ y su posterior reformulación (SalmoLyse™) que consiste en un cóctel de fagos con la capacidad de eliminar diferentes serovares de *Salmonella enterica*, incluyendo: Typhimurium, Enteritidis, Heidelberg, Newport, Hadar, Kentucky, Thompson, Georgia, Agona, Grampian, Senftenberg, Alachua, Infantis, Reading y Schwarzengrund. Existen otros productos comerciales como Biotector® desarrollado por CJ CheilJedang (Corea del Sur) el cual es un aditivo basado en fagos desarrollado como alternativa a los antibióticos empleados actualmente en la alimentación animal, este aditivo se diseño para eliminar *S. Gallinarum* y *S. Pullorum* (Pérez Pulido *et al.* 2016; Petsong y Vongkamjan 2015).

Una ventaja de usar bacteriófagos es que las poblaciones bacterianas pueden ser controladas selectivamente sin perturbar la microbiota natural y sin afectar las propiedades físico-químicas y organolépticas de los alimentos, además, los tratamientos que emplean

bacteriófagos se consideran más económicos en comparación con otros (Pérez Pulido *et al.* 2016).

La aplicación de bacteriófagos puede ser realizada antes de realizar el faenado de los animales (pre-harvest), posterior a este (post-harvest) o como un agente sanitizante en las superficies de instalaciones de procesamiento de alimentos. Actualmente existe una gran cantidad de artículos que han aplicado uno o varios bacteriófagos caracterizados en carne de cerdo, aves, bovinos, peces y carne de otras especies consumidas en menor cantidad, además de otros productos de origen animal como huevos y productos lácteos (Tabla 4).

Tabla 4. Recopilación de aplicaciones de los bacteriófagos para controlar *Salmonella* en la etapa post-harvest y como sanitizante.

Tipo de matriz	Serovar	Fago	Resultado	Referencia
Carne de res cocida/sin cocer	Typhimurium	Fago P7	Reducción de UFC en 2-3 log a 5 °C y 6 log aproximadamente a 24°C	(Bigwood <i>et al.</i> 2008)
Piel de pollo	Enteritidis	Cóctel/agentes químicos	Reducción de 1 log CFU/cm ²	(Hungaro <i>et al.</i> 2013)
Piel de cerdo	Typhimurium	Cóctel (4 fagos)	Se empleo una MOI de 10 o mayor a 4°C durante 96 h. Se observó una reducción a niveles indetectables de cepas multirresistentes	(Hooton <i>et al.</i> 2011)
Piel de cerdo Pechuga de pollo Huevos frescos Lechuga romana	Enteritidis Typhimurium	Cóctel (3 fagos)	Se observó una reducción significativa en todas las matrices empleadas, a pesar de emplear diferentes tiempos y temperaturas.	(Spricigo <i>et al.</i> 2013)
Fruta: rebanadas de melón y manzana	Enteritidis	Cóctel (4 fagos)	Se observó una reducción de 3.5 unidades logarítmicas a 5°C y 10°C y de 2.5 unidades a 20°C en rebanadas de melón. No se observó una disminución significativa en las rebanadas de manzana.	(Leverentz <i>et al.</i> 2001)
Superficies de acero inoxidable y vidrio	Kentucky Brandenburg	Cóctel (6 fagos)	Se observó una reducción de 2.1 a 4.3 log en el conteo de <i>Salmonella</i> .	(Woolston <i>et al.</i> 2013)

Hot-dogs Pechuga de pavo Mezcla de mariscos Leche con chocolate Yema de huevo	Typhimurium	Fago F01-E2	Se observó una eliminación completa de <i>Salmonella</i> en todos los alimentos a una temperatura de 8°C	(Guenther <i>et al.</i> 2012)
Queso	Enteritidis	Fago SJ2	Se aplicó el fago en queso elaborado con leche pasteurizada y sin pasteurizar, no se detectó <i>Salmonella</i> después de 89 días de almacenamiento a 8°C (queso pasteurizado) y de 50 UFC/g en queso elaborado con leche sin pasteurizar.	(Modi <i>et al.</i> 2001)
Bebida energética Jugo de manzana Leche descremada/ entera pasteurizada Pechuga de pollo	Typhimurium	Fago P22	Se observó una reducción entre 2-4 unidades logarítmicas después de 48 h a 4°C.	(Zinno <i>et al.</i> 2014)
Piel de pollo	Montevideo	Fago AV-08	Se obtuvo una reducción de 5 unidades logarítmicas del microorganismo a 4°C. También se observó su reducción en copresencia con <i>E. coli</i> O157:H7.	(López-Cuevas <i>et al.</i> 2012)
Filetes de salmón crudo y ahumado	Enteritidis	Cóctel (5 fagos)	Las muestras se incubaron a 18°C y 4°C durante 10 días. Se observó reducción de hasta 3 log CFU/g en el salmón crudo, y de 1 log CFU/g en el salmón ahumado.	(Galarce <i>et al.</i> 2014)

(Tomado y modificado de Petsong y Vongkamjan 2015)

III. JUSTIFICACIÓN

La resistencia a los antimicrobianos es un problema que se ha agravado y extendido en las últimas décadas, mermando la efectividad de los que se han desarrollado. Entre las causas de esta merma está el uso indiscriminado de antimicrobianos en Medicina Humana y Veterinaria; ejemplo de esto son varias “prácticas” o “costumbres” como la “automedicación”, la aplicación médica de un antibiótico para curar determinada enfermedad infecciosa sin conocer al agente causal o el empleo de dosis subterapéuticas de antimicrobianos como promotores de crecimiento en los sistemas de producción animal.

La exposición constante a los antimicrobianos a ocasionado una presión selectiva sobre las poblaciones bacterianas las cuales han generado mutaciones o han adquirido genes de resistencia a los antimicrobianos mediante elementos genéticos móviles como los plásmidos e integrones, lo cual les ha permitido el intercambio y diseminación de estos genes entre microorganismos de diferente especie o género.

Además de los problemas evidentes que genera el uso negligente de antimicrobianos también se observa una disminución en la capacidad de la industria farmacéutica de generar nuevos fármacos para combatir este problema, los altos costos que implica la investigación y desarrollo de estas moléculas ha ocasionado que varias empresas opten por abandonar este rubro.

El incremento constante de la resistencia a los antimicrobianos, la aparición de nuevos genes de resistencia y la cada vez menor capacidad de contrarrestar este fenómeno por parte de los antibióticos ha llevado a los investigadores a buscar otras alternativas viables como es el uso de bacterinas, nanotecnología o bacteriófagos; estos últimos han sido empleados exitosamente para tratar diferentes enfermedades y se ha incrementado el número de publicaciones científicas en donde dan a conocer su aplicación como control biológico, pudiéndose aplicar en la industria alimenticia, en los sistemas de producción animal, en el diagnóstico de patógenos y en la Medicina Humana y Veterinaria como tratamiento (fagoterapia) de diversas enfermedades.

Debido a la necesidad de buscar alternativas para contrarrestar la resistencia a los antimicrobianos presente en microorganismos patógenos de importancia para la Salud Pública como lo es *Salmonella* spp. se plantea en este trabajo el empleo de bacteriófagos como una medida viable para enfrentarse a este fenómeno.

IV. HIPÓTESIS

Los bacteriófagos aislados de aguas residuales tendrán una actividad lítica del 50% contra los aislamientos de *Salmonella enterica* en un modelo *in vitro*.

V. OBJETIVOS

- OBJETIVO GENERAL:
 - Evaluar la actividad lítica de bacteriófagos aislados de aguas residuales contra aislamientos de *Salmonella enterica*

- OBJETIVOS ESPECÍFICOS:
 - Caracterizar la resistencia antimicrobiana de aislamientos de *Salmonella enterica*.
 - Aislar fagos de ríos de aguas residuales del Estado de México.
 - Determinar la especificidad lítica de los fagos contra aislamientos de *Salmonella enterica*.
 - Evaluar la viabilidad de los fagos en diferentes condiciones de pH y temperatura.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

1. AISLAMIENTOS BACTERIANOS

Se incluyeron 243 aislamientos de *Salmonella enterica* que fueron serotipificados en el Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (INDRE) (Ciudad de México) de acuerdo al esquema de Kauffmann-White Le Minor. Los aislamientos fueron recolectados en el Estado de Jalisco (carne molida, $n= 135$)(Cabrera-Diaz *et al.* 2013) y muestras clínicas humanas (diarrea) ($n= 35$) (Realpe-Quintero *et al.* 2018), actualmente resguardados en el CUCBA (Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias), mientras que del Estado de México se emplearon 73 aislamientos (cerdos, $n=53$; aves de corral, $n=8$ y bovinos $n=12$) depositados en el CIESA (Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal). Todos los aislamientos fueron cultivados en agar Verde Brillante y fueron incubados a 37 °C por 24 h, una colonia con la morfología típica fue seleccionada y posteriormente incubada otras 24 h en TSB para emplear los aislamientos posteriormente.

2. PRUEBA DE SENSIBILIDAD *in vitro*

La sensibilidad antimicrobiana se evaluó mediante una prueba de difusión con discos. Se preparó un inóculo bacteriano de cada aislamiento en tubos de ensaye con caldo Mueller Hinton (MH) con un patrón de turbidez de 0.5 en la escala de McFarland lo que equivale aproximadamente de 1 a 2×10^8 unidades formadoras de colonias (UFC); se introdujo un hisopo estéril de algodón y se sumergió completamente en el tubo de ensayo, antes de retirarlo se escurrió sobre las paredes del tubo para retirar el exceso de líquido del mismo (CLSI 2012).

Para inocular las placas de Petri con agar MH, se estrió el hisopo con la suspensión de bacteria sobre toda su superficie en forma paralela y compacta, este paso se repitió dos veces más rotando la placa aproximadamente 60 grados cada vez para asegurar una

distribución constante del inóculo, finalmente se barrió el hisopo sobre el borde de la placa; cada caja inoculada se dejó secar durante 2-3 min. La inoculación individual de las placas de Petri se realizó en un período no mayor a 15 min (CLSI 2012).

Dentro de 15 minutos después de que las placas de Petri fueron inoculadas, se procedió a colocar los sensidiscos con una pinza estéril o con un dispensador comercial, asegurándose de que hicieran contacto con la superficie del agar. Después se invirtieron las placas de Petri y se incubaron por 18 h a 35 ± 2 °C (CLSI 2012). Como organismo control se empleo *E. coli* ATCC® 25922. La lectura se hizo midiendo el diámetro del halo de inhibición en mm con un vernier. Los aislamientos se clasificaron como susceptibles (S), intermedios (I) o resistentes (R) de acuerdo a los estándares del CLSI (Tabla 5) (CLSI 2015).

Tabla 5. Antimicrobianos empleados e interpretación de la prueba de difusión con discos

Agente antimicrobiano	Abreviación	Contenido del sensidisco (µg)	Criterio interpretativo del diámetro del halo de inhibición (mm)		
			S	I	R
Ácido nalidíxico	NAL	30 µg	≥19	14-18	≤13
Ciprofloxacino	CIP	5 µg	≥21	16-20	≤15
Ampicilina	AMP	10 µg	≥17	14-16	≤13
Cefoxitina	FOX	30 µg	≥18	15-17	≤14
Ceftazidima	CAZ	30 µg	≥21	18-20	≤17
Cefotaxima	CTX	30 µg	≥26	23-25	≤22
Amikacina	AMK	30 µg	≥17	15-16	≤14
Gentamicina	GEN	10 µg	≥15	13-14	≤12
Tetraciclina	TET	30 µg	≥15	12-14	≤11

3. PRUEBA CONFIRMATORIA PARA ESBLs

A los aislamientos que fueron clasificados como resistentes (R) a la CAZ o a la CTX en la prueba de difusión se les realizaron una prueba de discos en combinación para confirmar la detección fenotípica de ESBL; se usaron sensidiscos de CAZ y CTX solos y en combinación con ácido clavulánico (CLA, 10 µg). La elaboración del medio (MH), inóculo

y condiciones de incubación fueron iguales a la prueba de difusión con discos ya descrita. Los sensidiscos empleados y la interpretación se observan en la Tabla 6.

Tabla 6. Antimicrobianos empleados e interpretación de la prueba confirmatoria para ESBLs

Agente antimicrobiano	Abreviación	Contenido del sensidisco (µg)	Criterio interpretativo del diámetro del halo de inhibición (mm)
Ceftazidima	CAZ	30 µg	Se debe observar un incremento en el halo de inhibición de ≥ 5 mm para cualquiera de los antimicrobianos que está en combinación con el ácido clavulanico en comparación al halo de inhibición del antimicrobiano individual.
Ceftazidima-ácido clavulánico	CAZ/CLA	30/10 µg	
Cefotaxima	CTX	30 µg	
Cefotaxima-ácido clavulanico	CTX/CLA	30/10 µg	

(Tomado y modificado de CLSI 2015)

En ambas pruebas la metodología e interpretación de resultados fue de acuerdo a las directrices del CLSI, empleando como cepa control a *E. coli* ATCC 25922 (CLSI 2015).

4. DETECCIÓN DE GENES DE RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS

Los aislamientos que presentaron resistencia a cefalosporinas de tercera generación o quinolonas fueron sometidos a una serie de pruebas de PCR para la detección de algunos genes que confieren resistencia a estos antibióticos. Para la detección de ESBLs se realizó un PCR múltiple para detectar variantes de los genes *bla_{TEM}* y *bla_{SHV}*, adicionalmente se empleo un PCR individual para detectar genes *bla_{CMY}*. En el caso de resistencia a quinolonas, se realizó un PCR múltiple para detectar los genes *qnr* (familia *qnrA*, *qnrB* y *qnrS*). Todas las pruebas se llevaron a cabo con cebadores ya establecidos (Tabla 7).

Para obtener el ADN se empleo la técnica de ebullición calentando una colonia (100 °C x 10 min) en un volumen de 100 µl de agua destilada estéril, posteriormente se centrifugó y se uso el supernatante. El ADN total (2µl) fue empleado para cada PCR múltiple o individual en una mezcla reactiva de 25 µl que contenía 12.5 µl de My Taq™ Red Mix (Bioline, Reino Unido), 2 µl de cebadores y agua destilada estéril. La amplificación de los

genes de ESBLs se realizaron de la siguiente manera: una desnaturalización inicial a 94°C por 10 min; 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 40 s, alineación a 60°C por 40 s y una elongación a 72°C por 1 min; y una elongación final a 72°C por 7 min. Mientras que para los genes *qnr* las condiciones fueron: 10 min a 95°C (desnaturalización inicial) y 35 ciclos de amplificación de 1 min a 95°C (desnaturalización), 1 min a 54°C (alineación) y 1 min a 72°C (elongación); y 10 min a 72°C para la elongación final. Los productos de PCR se examinaron en un gel de agarosa al 2% a 100V por 1 h con 0.05 mg/L de bromuro de etidio.

Tabla 7. Cebadores empleados para la identificación de genes de resistencia a antibióticos

Gen	Cebadores	Secuencia (5'→3')	Amplicón (pb)	Referencia
<i>bla</i> _{TEM}	MultiTSO-T_for MultiTSO-T_rev	CATTTCCGTGTCGCCCTTATTC CGTTCATCCATAGTTGCCTGAC	800	
<i>bla</i> _{SHV}	MultiTSO-S_for MultiTSO-S_rev	AGCCGCTTGAGCAAATTA AAC ATCCCGCAGATAAATCACCAC	713	(Dallenne <i>et al.</i> 2010)
<i>bla</i> _{CMY}	MultiCaseCIT_for MultiCaseCIT_rev	CGAAGAGGCAATGACCAGAC CGAAGAGGCAATGACCAGAC ^b	538	
<i>qnrA</i>	QnrAm-F QnrAm-R	AGAGGATTTCTCACGCCAGG TGCCAGGCACAGATCTTGAC	580	
<i>qnrB</i>	QnrBm-F QnrBm-R	GGMATHGAAATTCGCCACTG ^a TTTGCYGYCGCCAGTCGAA	264	(Cattoir <i>et al.</i> 2007)
<i>qnrS</i>	QnrSm-F QnrSm-R	GCAAGTTCATTGAACAGGGT TCTAAACCGTTCGAGTTCGGCG	428	

5. ELECTROFORESIS EN GEL DE CAMPOS PULSADOS

La metodología empleada para realizar la electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE) para los aislamientos multirresistentes de *Salmonella enterica* fue descrita previamente por Aguilar-Montes de Oca (2014).

6. AISLAMIENTO Y ENRIQUECIMIENTO DE BACTERIÓFAGOS

Un día antes de realizar el muestreo de aguas residuales, se inocularon los aislamientos de *Salmonella enterica* a emplear en 3 ml de caldo soya tripticaseina (CST) y se dejaron incubar durante la noche (24 h). También se preparó CST al 2X, el cual después de ser esterilizado se suplementó con 5 mM de MgSO₄ y se pipetearon 10 ml de caldo en tubos de 50 ml (CORNING®) (un tubo por cada aislamiento bacteriano a probar), se dejaron a prueba de esterilidad durante 24 h (Twist y Kropinski 2009).

Se tomaron muestras de aguas residuales provenientes del río Lerma, río Tejalpa y algunos ramales presentes en la zona periférica de la ciudad de Toluca, Estado de México, realizando 2 repeticiones en cada sitio de muestreo. En cada muestreo se recolectaron un total de 500 ml de agua residual en 2 tubos de 250 ml (CORNING®) y se conservaron a ~4 °C en una hielera. Las muestras fueron transportadas al CIESA (Centro de Investigación de Estudios Avanzados y Salud Animal), se procedió a centrifugar las muestras a 3,000 × g para sedimentar partículas sólidas, seguido de una filtración empleando filtros para jeringa de acetato de sodio con poros de 0.45 µm (CORNING®), el filtrado fue recolectado en tubos de 250 ml estériles. Posteriormente se adicionaron 10 ml de la muestra filtrada a cada tubo de CST al 2X y finalmente se adicionaron 100 µl de cada aislamiento bacteriano previamente incubado. Las muestras se dejaron incubar durante 24 h. Se preparó una muestra como control negativo con CST al 2X y el filtrado sin adicionar algún inóculo bacteriano para asegurarse que el filtrado estuviera libre de microorganismos bacterianos.

Después de 24 h de incubación, los tubos fueron centrifugados a 3,000 × g por 10 minutos y se filtró el sobrenadante usando filtros para jeringa de acetato de sodio con poros de 0.45 µm. El filtrado se almacena a ~4°C en tubos de 15 ml como muestras de bacteriófagos enriquecidas (Twist y Kropinski 2009; Akhtar *et al.* 2014).

Para determinar que muestras contenían bacteriófagos líticos se realizó una prueba de la gota (spot-test); se emplearon placas de agar soya tripticaseina (AST) suplementadas con 5 mM de MgSO₄ sobre las cuales se estriaron asadas de los mismos microorganismos que fueron empleados, se adicionaron 10 µl de cada muestra enriquecida y se dejó secar a

temperatura ambiente durante 1 h, seguido de una incubación por 24 h; se incluyó un control negativo adicionando a un estriado bacteriano y 10 µl de caldo soya tripticaseína estéril. Al día siguiente se examinó la presencia de una zona de lisis, aquellas muestras que fueron positivas se seleccionaron para su purificación (Twest y Kropinski 2009).

7. PURIFICACIÓN DE BACTERIÓFAGOS

Para obtener bacteriófagos individuales purificados se procedió a hacer diluciones seriadas de $10^1 - 10^{10}$ en viales de 1.5 ml (900 µl de CST y 100 µl de muestra enriquecida), una vez hechas las diluciones se empleó la técnica de doble capa de agar, mezclando 100 µl del filtrado diluido, 100 µl de la cepa a estudiar y 4 ml de agar blando fundido y mantenido a 45 °C (5 mM de $MgSO_4$ y 4 % de agar bacteriológico), esto se vertió sobre placas solidificadas de agar soya tripticaseína (5 mM de $MgSO_4$) (Twest y Kropinski 2009) y se incubaron durante 24 h a 37 °C. La presencia de los fagos fue determinada por la formación de “placas” (zonas de lisis en forma circular sobre el crecimiento confluyente de la bacteria), se seleccionaron placas individuales, aisladas y con una lisis bien definida y con un asa bacteriológica se cortó el agar blando que presentaba la zona de lisis y se disolvió en 1 ml de buffer SM (0.05 M de TRIS, 0.1 M de NaCl, 0.008 M $MgSO_4$), se dejó en agitación orbital durante 10 min, se filtró el líquido mediante un filtro de jeringa con poros de 0.45 µm y se conservó en otro vial de 1.5 ml. Este proceso de purificación se repitió tres veces para asegurar la pureza del stock de fagos. Los fagos se almacenaron a ~4°C (Carey-Smith *et al.* 2006; Alam *et al.* 2011).

8. TITULACIÓN DE LOS FAGOS

Para conocer la concentración de fagos en la solución stock ya purificada se procedió a titularlos mediante la técnica de doble capa de agar haciendo diluciones seriales de $10^1 - 10^{10}$, las placas de agar normal y blando se suplementaron con los reactivos mencionados

en la sección anterior, y las zonas de lisis se enumeraron como unidades formadoras de placas (PFU, por sus siglas en inglés) (Twest y Kropinski 2009).

9. DETERMINACIÓN *in vitro* DEL RANGO DE HOSPEDEROS

El espectro de hospederos se determinó para cada bacteriófago contra los 243 aislamientos y cepas ATCC, incluyendo microorganismos control tanto Gram – y Gram + (Tabla 8). La susceptibilidad se realizó mediante la prueba de la gota. Se tomaron con una micropipeta 15 µl de una suspensión de cada bacteriófago ($\sim 10^9$) y se adicionaron sobre una capa de agar blando previamente inoculado (100 µl del aislamiento a probar) y vertido en placas de agar pre-solidificado de AST. Las gotas conteniendo los fagos se dejaron secar por 20 min y posteriormente se incubaron durante 24 h a 37 °C; la presencia de actividad lítica se observó mediante la formación de áreas sin crecimiento bacteriano de forma circular en el lugar donde se colocó la gota (Raya *et al.* 2011).

Tabla 8. Cepas de referencia empleadas en este estudio

Especie	No. de cepas	Referencia/Fuente
<i>Escherichia coli</i>	1	ATCC 25922
<i>Aeromonas hydrophila</i>	1	ATCC 7966
<i>Listeria monocytogenes</i>	1	INIFAP BAA-751
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	ATCC 25923

10. EFECTO DE LA TEMPERATURA

Se emplearon 100 µl de cada bacteriófago (concentración inicial de 10^8 UFP/ml), los cuales fueron adicionados a 900 µl de PBS (1X) en tubos de 1.5 ml. Posteriormente fueron sometidos a diferentes temperaturas (40, 50, 60, 70, 80 y 90 °C) en un baño seco y se procedió a determinar su concentración mediante la técnica de doble placa de agar a los 0, 15, 30, 60, 120 y 180 minutos de incubación (Litt y Jaroni 2017; Zhang *et al.* 2015).

11. EFECTO DEL pH

Se emplearon 100 µl de cada bacteriófago (concentración inicial de 10^8 UFP/ml), los cuales fueron adicionados a 900 µl de TBS previamente ajustado a valores de pH de 2.0, 4.0, 7.0 y 10.0 empleando ya sea 1 M NaOH o 1 M HCL. Se procedió a determinar la concentración de los fagos mediante la técnica de doble placa de agar a los 0, 15, 30, 60, 120 y 180 minutos de incubación (Litt y Jaroni 2017; Zhang *et al.* 2015).

12. ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN

Los resultados obtenidos de los estudios del efecto de temperatura, pH y los conteos tanto de *Salmonella* como de cada bacteriófago fueron expresados en \log_{10} UFP/mL. Los resultados fueron presentados como valores medios. Las graficas fueron realizadas empleando el software Graph Pad Prism® 5 (GraphPad Inc., San Diego, CA, USA).

VII. RESULTADOS

ARTÍCULO PUBLICADO

El artículo se encuentra actualmente publicado en el Journal of Applied Microbiology.

Article type : Original Article

Phenotypic and genotypic profile of clinical and animal multi-drug resistant *Salmonella enterica* isolates from Mexico

S. Aguilar-Montes de Oca¹, M. Talavera-Rojas^{1*}, E. Soriano-Vargas¹, J. Barba-León², J. Vázquez-Navarrete³, J. Acosta-Dibarrat¹, C. Salgado-Miranda¹

1 Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, Universidad Autónoma del Estado de México, Carretera Toluca-Atlacomulco, Estado de México, México.

2 Departamento de Salud Pública, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Guadalajara, Jalisco, México.

3 Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias, Mexico city, México.

Running title: Multi-drug resistant *Salmonella* in Mexico

*Correspondence

Martín Talavera-Rojas, Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México, Carretera Toluca-Atlacomulco, Km 15.5, Código Postal 50200, Toluca, Estado de México, México.

E-mail: talaverarojas@gmail.com

This article has been accepted for publication and undergone full peer review but has not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process, which may lead to differences between this version and the Version of Record. Please cite this article as doi: 10.1111/jam.13615

This article is protected by copyright. All rights reserved.

21/5/2019

Gmail - Manuscript submitted to Journal of Applied Microbiology - JAM-2019-0915



Dr. Martin Talavera <talaverarojas@gmail.com>

Manuscript submitted to Journal of Applied Microbiology - JAM-2019-0915

1 mensaje

Applied Microbiology <onbehalfof@manuscriptcentral.com>

21 de mayo de 2019, 14:31

Responder a: jamlam@wiley.com

Para: talaverarojas@gmail.com, mtr0035@yahoo.com.mx

Cc: saul_holic@hotmail.com, talaverarojas@gmail.com, mtr0035@yahoo.com.mx, soriano@uaemex.mx, elisa.cabrera@academicos.udg.mx, jeannbarba@gmail.com, jesusvn1@yahoo.com.mx, jpacosta00@hotmail.com, salgadamiranda@uaemex.mx

21-May-2019

Dear Dr. Talavera-Rojas

The following manuscript has been successfully submitted to Journal of Applied Microbiology.

Manuscript ID: JAM-2019-0915

Title: ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF A LYTIC BACTERIOPHAGE AGAINST MULTIDRUG-RESISTANT *Salmonella enterica* SEROTYPES FROM MEXICO

Authors: Aguilar-Montes de Oca, Saul; Talavera-Rojas, Martin; Soriano-Vargas, Edgardo; Cabrera Diaz, Elisa; Barba-León, Jeannette; Vazquez-Navarrete, Jesus; Acosta-Dibarrat, Jorge; Salgado-Miranda, Celene

If there are any errors in the manuscript details above or in your contact details, please contact us at jamlam@wiley.com.

Your manuscript will now be checked for compliance with the guidelines to authors, and you will be contacted if further information is required. Once the submission is confirmed as complete, the Chief Editor will then assign the manuscript to a handling Editor, who assesses the manuscript for suitability in the journal. At this screening stage a decision to reject or to go to full review is made. This step ensures a rapid rejection of unsuitable manuscripts for the journal, and authors should not expect full comments if papers are rejected at this stage. Manuscripts that go to full review are assigned a minimum of two reviewers. Following the return of two reports, the handling Editor provides a report to the Chief Editor, who takes the decision to accept, revise or reject the manuscript.

You can keep track of your manuscript by logging on to ScholarOne Manuscripts at:
<https://mc.manuscriptcentral.com/appliedmicrobiology>

The summary status of your manuscript will be displayed in your Author Centre. Should you have any queries please contact jamlam@wiley.com, using your Manuscript ID as a reference.

Co-authors: Please contact me at jamlam@wiley.com as soon as possible if you disagree with being listed as a co-author for this manuscript. As co-author, you will not be contacted again during the review process of this manuscript; all further correspondence will be sent to Dr. Martin Talavera-Rojas.

Thank you for your submission to Journal of Applied Microbiology.

Kind regards

Ms. Emma Stephens
Journal of Applied Microbiology

AISLAMIENTOS BACTERIANOS

Se trabajó con 243 aislamientos, los cuales estaban distribuidos en 34 serovares y 10 serogrupos. Los serovares más frecuentes fueron *Salmonella* Typhimurium (17.7%), seguido de *Salmonella* Anatum (7%), *Salmonella* Agona (5.8%), *Salmonella* Infantis (5.8%), *Salmonella* London (5.8%) y *Salmonella* Grupo B (5.3%) (Tabla 9).

Tabla 9. Aislamientos empleados (n=243)

<i>Salmonella</i> serovars	No. (%) of isolates	Origin*
Adelaide	1 (0.4)	GB
Agona	14 (5.8)	GB, CL, SW
Albany	3 (1.2)	GB, CL
Anatum	17 (7.0)	GB, CL, SW
Azteca	2 (0.8)	GB, CL
Braenderup	2 (0.8)	GB
Brandenburg	4 (1.6)	GB
Bredeney	7 (2.9)	GB, CL, SW
Cannstatt	1 (0.4)	GB
Derby	7 (2.9)	GB
Duesseldorf	1 (0.4)	CL
Enteritidis	6 (2.5)	CL, SW
Give	4 (1.6)	GB
Havana	8 (3.3)	GB
Infantis	14 (5.8)	GB, CL, SW
Javiana	1 (0.4)	CL
Kentucky	2 (0.8)	GB
Lockleaze	2 (0.4)	GB
London	14 (5.8)	CL, SW
Manhattan	1 (0.4)	CL
Montevideo	2 (0.8)	GB, CL
Muenchen	6 (2.5)	GB, CL
Muenster	1 (0.4)	GB
Panama	5 (2.1)	GB
Reading	2 (0.8)	GB, SW
Rissen	4 (1.6)	GB
Saintpaul	5 (2.1)	GB, CL
Senftenberg	3 (1.2)	SW
Sinstorf	6 (2.5)	GB
Tennessee	1 (0.4)	SW
Typhi	3 (1.2)	BV
Typhimurium	43 (17.7)	GB, CL, SW, BV, PY
Urbana	1 (0.4)	CL
Worthington	2 (0.8)	GB
Serogroups		

Group B	13 (5.3)	GB
Group B monophasic	2 (0.8)	SW
Group C1	3 (1.2)	GB, CL
Group D	3 (1.2)	CL
Group E1	6 (2.5)	GB
Group E1 monophasic	8 (3.3)	GB
Group G1	1 (0.4)	GB
Group G2	2 (0.8)	GB
Group G2 monophasic	1 (0.4)	GB
G18	1 (0.4)	GB
NT †	8 (3.3)	GB, SW, BV, CL
Total	243 (100)	

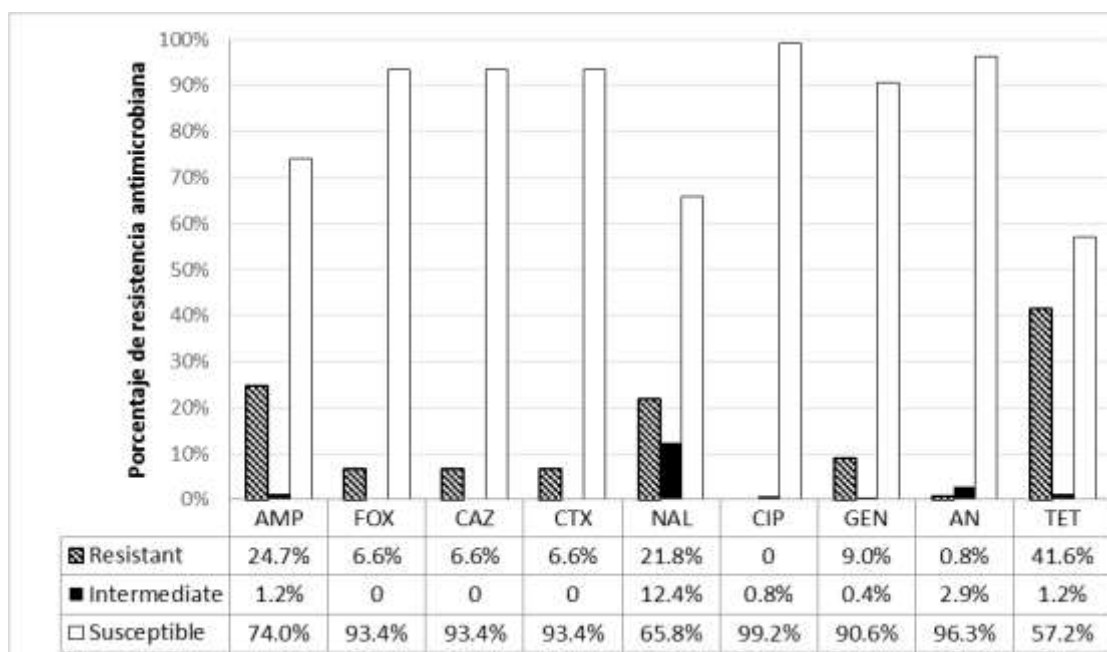
*GB, carne molida; CL aislamientos clínicos; SW, cerdo; BV, bovinos; PY, aves.

†NT: No tipificable.

SENSIBILIDAD *in vitro*

Los 243 aislamientos fueron revisados en cuanto a su susceptibilidad a 9 antimicrobianos. Se observó una mayor resistencia a TET (41.6%), seguido de AMP (24.7%), NAL (21.8%), GEN (9%), CTX, CAZ y FOX con el mismo porcentaje (6.6%), los menores índices de resistencia se observaron para AK (0.8%), mientras que para CIP sólo se observaron aislamientos con susceptibilidad intermedia (0.8%) (Figura 10). Después de la clasificación de los aislamientos se seleccionaron 16 aislamientos que presentaban fenotípicamente multirresistencia y que incluía resistencia a antibióticos β -lactámicos (específicamente a las cefalosporinas CTX, CAZ y FOX). La prueba para la detección de ESBL mostró un perfil diferente al establecido por el CLSI al presentar resistencia a CAZ y CTX, aún en combinación con CLA. Un total de 10 patrones de multirresistencia fueron identificados entre los 16 aislamientos, el patrón predominante fue CTX-CAZ-FOX-AMP-NA-GEN-TE (Tabla 10).

Figura 10. Frecuencia de resistencia antimicrobiana en aislamientos de *Salmonella enterica* (n=243) de México. Antimicrobianos: AMP, ampicilina; FOX, cefoxitina; CAZ, ceftazidima; CTX, cefotaxima; NAL, ácido nalidíxico; CIP, ciprofloxacino; GEN, gentamicina; AK, amikacina.



DETECCIÓN DE GENES DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA

Los 16 aislamientos multirresistentes fueron positivos para el gen *bla_{CMY}*, mientras que tres aislamientos presentaron co-presencia con el gen *bla_{TEM}*. Ninguno de los aislamientos fue positivo para *bla_{SHV}* o genes *qnr*.

Figura 11. Detección de los genes *bla_{TEM}* y *bla_{CMY}*. Gel de agarosa (2%); M, marcador de peso molecular, Carril 1 Control negativo (*S. Typhimurium* ATCC 14028), Carril 2 *E. coli bla_{TEM}*+ y *E. coli bla_{CMY}*+, Carril 3 al 7 Aislamientos *Salmonella enterica* (Fuente: datos originales).

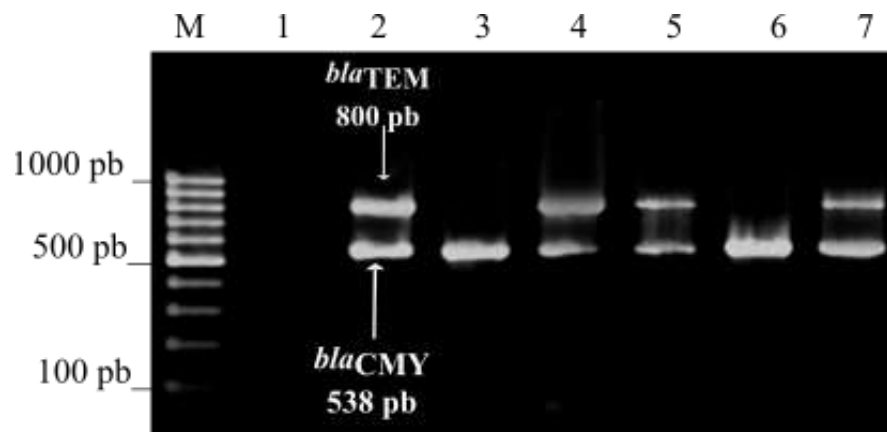


Figura 12. Detección de los genes *qnr*. Gel de agarosa (2%); M, marcador de peso molecular, Carril 1 Control negativo (*S. Typhimurium* ATCC 14028), Carril 2 *E. coli qnrB+* y *E. coli qnrS+*, Carril 3-6 Aislamientos *Salmonella enterica* (Fuentes: datos originales).

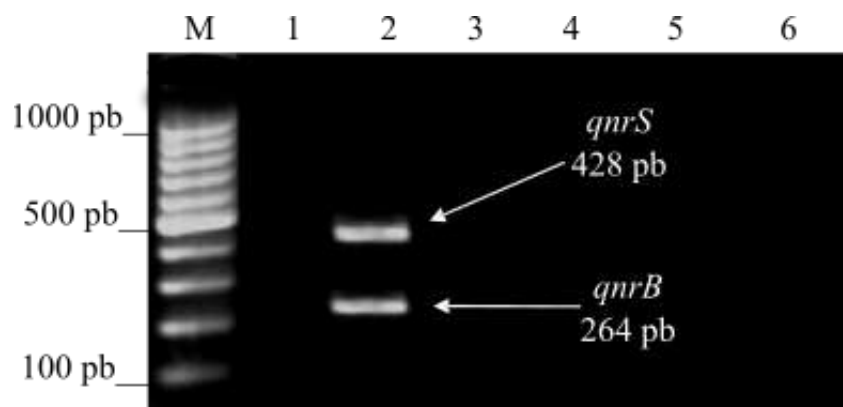


Tabla 10. Perfil fenotípico y genotípico de aislamientos multirresistentes

Serovares de <i>Salmonella</i>	Número de aislamientos	Origen*	Perfil fenotípico	Perfil genotípico
Typhimurium	3	PY	CTX-CAZ-FOX-AMP-NA-GEN-TE	<i>bla</i> _{CMY} , <i>bla</i> _{TEM} [±]
Bredeney	1	SW		
NT [†]	1	SW		
Typhimurium	1	GB	CTX-CAZ-FOX-AMP-NA-TE	<i>bla</i> _{CMY}
Typhimurium	1	SW	CTX-CAZ-FOX-AMP-TE	<i>bla</i> _{CMY}
Typhimurium	2	SW	CTX-CAZ-FOX-AMP-GEN-TE	<i>bla</i> _{CMY}
London	1	SW		
Infantis	1	CL	CTX-CAZ-FOX-AM-NA	<i>bla</i> _{CMY}
Typhimurium	1	CL	CTX-CAZ-AM-NA-GE-KA [‡] -TE	<i>bla</i> _{CMY}
Typhimurium	1	CL	CTX-CAZ-FOX-AM-NA-CIP [‡] -GE-TE	<i>bla</i> _{CMY}
Urbana	1	CL	CTX-CAZ-AM-KA	<i>bla</i> _{CMY}
NT [†]	1	CL	CTX-CAZ-FOX-AMP-NA-CIP [‡]	<i>bla</i> _{CMY}
Group B	1	GB	CTX-CAZ-FOX-AM-NA-GEN-KA [‡] -TE	<i>bla</i> _{CMY}

*GB, carne molida; CL aislamientos clínicos; SW, porcinos; BV, bovinos; PY, aves.

± 3 aislamientos de *Salmonella* Typhimurium presentaron el gen *bla*_{TEM}.

[†] NT: No tipificable.

[‡] Resistencia intermedia.

ELECTROFORESIS EN GEL DE CAMPOS PULSADOS

Los 16 aislamientos multirresistentes fueron seleccionados para estudiar su relación genotípica mediante PFGE y posteriormente se realizó el dendograma correspondiente (Figura 13 y 14).

Figura 13. Imagen de un gel de PFGE. Se observa el patrón genotípico generado por la enzima de restricción XbaI. Los carriles encerrados en el marco rojo corresponden a la cepa control *Salmonella* Braenderup H8912. En el margen izquierdo se observa el peso molecular de las bandas generadas por esta cepa (Fuente: datos originales).

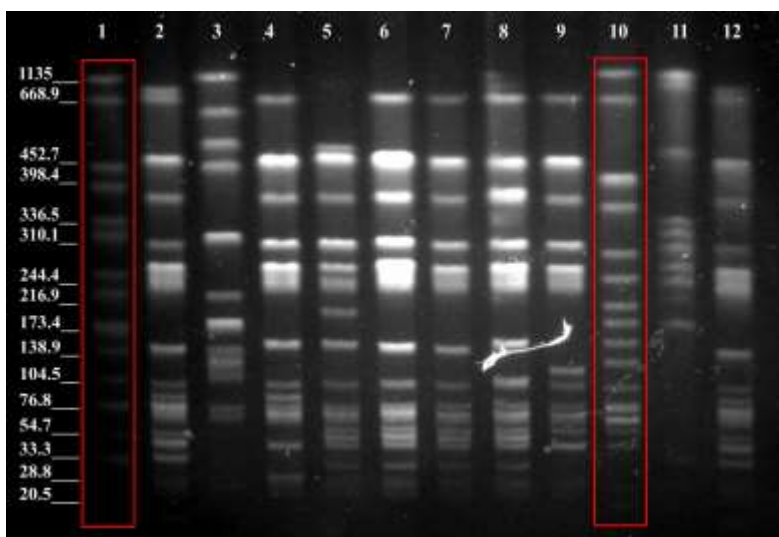
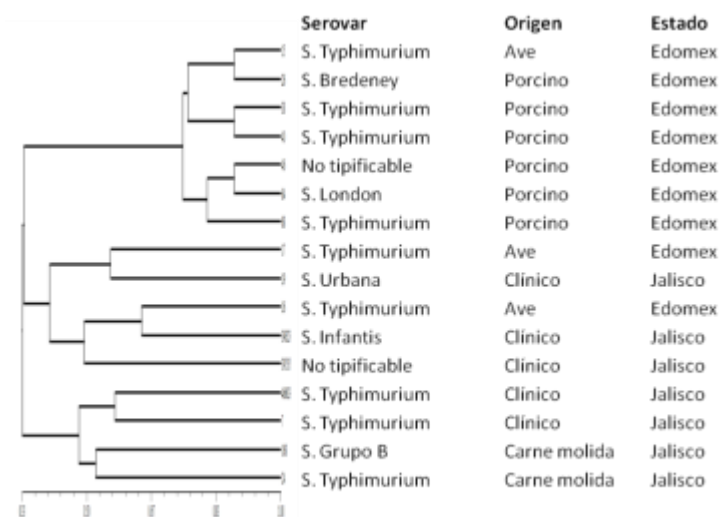


Figura 14. Dendograma representando la relación genética entre los aislamientos de *Salmonella enterica*



AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE LOS BACTERIÓFAGOS

Durante el procesamiento de muestras de aguas residuales se obtuvieron tres bacteriófagos, no obstante, solamente uno mostró la mayor capacidad lítica contra los aislamientos MDR, siendo capaz de lisar 13 de los 16 aislamientos (Tabla 11), sin observarse diferencia del serovar o el origen, dicho bacteriófago se le asignó el nombre de PHA17 y fue seleccionado para continuar con su caracterización.

Tabla 11. Actividad lítica del fago PHA17 contra aislamientos de *Salmonella enterica* MDR

Serovar	Origen	Actividad lítica*
Typhimurium	Ave	+
Typhimurium	Ave	+
Typhimurium	Ave	-
Bredeney	Porcino	+
Typhimurium	Porcino	+
Typhimurium	Porcino	+
London	Porcino	+
Non-typeable	Porcino	+
Typhimurium	Porcino	+
Group B	Carne molida	+
Typhimurium	Carne molida	-
NT	Aislamiento clínico	+
Infantis	Aislamiento clínico	+
Urbana	Aislamiento clínico	-
Typhimurium	Aislamiento clínico	+
Typhimurium	Aislamiento clínico	+

*(+). Presencia de actividad lítica, (-) Ausencia de actividad lítica.

†No tipificable

DETERMINACIÓN *in vitro* DEL RANGO DE HOSPEDEROS

Se encontró que el fago PHA17 no causó lisis en las cepas empleadas de diferente especie bacteriana y fue específico para el género *Salmonella*, fue capaz de lisar 92 (42%) de un total de 219 aislamientos (Tabla 12).

Tabla 12. Perfil de susceptibilidad de los aislamientos de *Salmonella enterica* al bacteriófago

PHA17

Bacteria	Lisis (Susceptibles/No.total de aislamientos)
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0/1
<i>S. Typhimurium</i> ATCC14028	1/1
<i>A. hydrophila</i> ATCC7966	0/1
<i>L. monocytogenes</i> BAA-751	0/1
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	0/1
Serovares de <i>Salmonella</i>	
Agona	6/12
Albany	3/3
Anatum	3/16
Azteca	2/2
Branderup	2/5
Brandenburg	2/3
Bredeney	3/7
Cannstatt	0/1
Derby	4/7
Duesseldorf	1/1
Enteritidis	4/5
Give	0/2
Havana	4/8
Infantis	2/11
Javiana	1/1
Kentucky	1/1
Lockleaze	0/2
London	0/14
Manhattan	1/1
Montevideo	0/2
Muenchen	5/5
Muenster	0/1
Panama	4/5
Reading	2/2
Rissen	0/3
Saintpaul	1/5
Senftenberg	0/4
Sinstorf	0/6
Tennessee	0/1
Typhi	3/3
Typhimurium	27/40
Urbana	0/1
Worthington	0/2
Parcialmente serotipificadas	
Grupo B	2/8
Grupo B monofásica	0/2
Grupo C1	1/3
Grupo D	3/3
Grupo E1	0/6

Grupo E1 monofásica	0/5
Grupo G2	1/2
Grupo G2 monofásica	0/1
G18	0/1
NT†	4/6
Total de aislamientos susceptibles	92/219

†NT, no tipificable.

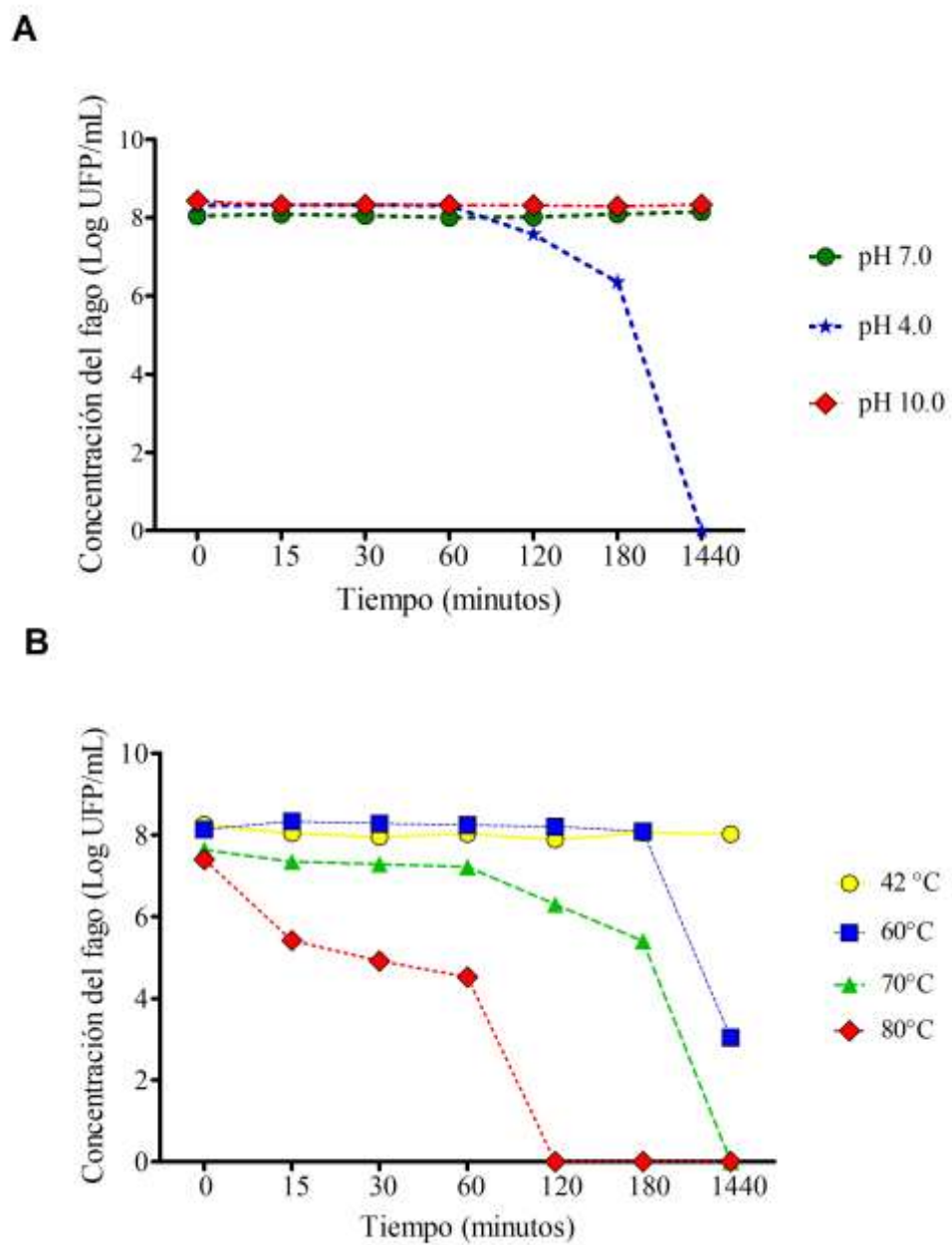
EFFECTO DE LA TEMPERATURA EN EL BACTERIÓFAGO PHA17

Se observó que el fago PHA17 fue estable a una temperatura de 42 y 60 °C hasta por 24 h (1440 min), mientras que para 70 °C PHA17 fue detectable por un periodo de 3 h (180 min), finalmente PHA17 sólo permaneció viable por 1 h (60 min) a 80 °C (Figura 15).

EFFECTO DEL pH EN EL BACTERIÓFAGO PHA17

El bacteriófago PHA17 fue estable a un pH de 7.0-10.0 por 24 h (1440 min), en contraste, se observó que PHA17 sólo permaneció viable por 3 h (180 min) con un pH de 4.0, mientras que no se pudo detectar UFP en un pH de 2.0 (información no graficada) (Figura 15).

Figura 15. A) Efecto del pH en la viabilidad del bacteriófago PHA17. B) Efecto de la temperatura en la viabilidad del bacteriófago PHA17.



VIII. DISCUSIÓN

En México la presencia de *Salmonella enterica* en alimentos de origen vegetal y animal continúa siendo una amenaza para la Salud Pública, en el caso particular de productos cárnicos el riesgo de exposición a *Salmonella* es alto si consideramos que el ganado constituye un reservorio importante de éste y otros patógenos transmitidos por alimentos que pueden contaminar la canal durante su procesamiento, además, la probabilidad de que haya contaminación cruzada con otros tipos de carnes (aves y cerdo), o la falta de sanidad del personal que manipula los alimentos, equipo, utensilios y el área de almacenamiento de los alimentos en carnicerías o supermercados también constituyen riesgos que deben ser considerados (Carrasco *et al.* 2012; Gonzales-Barron *et al.* 2014). Nuestro estudio mostró que a pesar de pasar varios años *Salmonella enterica* sigue estando presente en los tres principales tipos de carne que se consumen (ave, cerdo y bovino) en México, lo que sugiere que no ha sido posible erradicar o limitar este microorganismo en el ganado; de la misma manera, su presencia en carne molida puede reflejar un manejo inadecuado de los productos cárnicos.

La información en México respecto a la presencia de *Salmonella enterica* en animales productores de alimentos o en productos cárnicos es limitada, se observó un número ligeramente mayor de publicaciones investigando su presencia en carne de bovino en comparación con la carne de cerdo o aves. Una investigación realizada en un rastro tipo inspección federal (TIF) encontró una frecuencia de 52.5% (de 1695 muestras) de *Salmonella enterica* en bovinos, los serotipos más frecuentes fueron *Salmonella* Anatum, Montevideo, Tennessee, Kentucky, Muenster, Give, Reading, Mbandaka, Meleagridis y Fresno, los primeros siete serovares listados, también fueron encontrados en este trabajo; desafortunadamente la investigación no incluyó el perfil de resistencia antimicrobiana para realizar una comparación (Narvaez-Bravo *et al.* 2013).

Otro trabajo realizado en el Estado de Hidalgo encontró *Salmonella* con una frecuencia de 21.1% de un total de 441 muestras de alimentos crudos (carne, vegetales y queso) en supermercados y tiendas minoristas. En las muestras de carne de diferentes especies, no se

encontró muestras positivas en pescado, seguido de carne de bovino (15.1%), cerdo (17.3%) y con mayor frecuencia en pollo (35.3%), sin embargo, en la investigación no se determinaron los serovares específicos (Miranda *et al.* 2009).

En este trabajo *Salmonella* Typhimurium fue el serovar más frecuente (17.7%) (Tabla 8), este resultado concuerda con publicaciones previas donde este serovar ha sido el agente causal de diferentes brotes epidémicos y en algunos casos algunos aislamientos multirresistentes han sido implicados (Laufer *et al.* 2014; Andino y Hanning 2015). La diseminación exitosa de este serotipo podría deberse al complejo repertorio de genes que están involucrados en la colonización de sus hospederos, algunos de ellos permitiendo el establecimiento de *Salmonella* Typhimurium en diferentes especies de animales productores de alimentos, posteriormente, existe la posibilidad de que el intestino humano sea colonizado a través de la cadena alimenticia para finalmente, desarrollar la aptitud de determinadas cepas que le permitan ser predominantes en la población humana de una zona geográfica en particular, por ejemplo, la emergencia de *Salmonella* Typhimurium genotipo ST213 en México (Chaudhuri *et al.* 2013; Wiesner *et al.* 2016).

Un hallazgo interesante en este estudio fue la presencia de *Salmonella* Typhi en 3 muestras obtenidas de canales de bovino; este serovar es un patógeno cuyo rango de hospedero se restringe al ser humano solamente y es el agente causal de la fiebre tifoidea, su presencia en un producto cárnico puede deberse a una contaminación ocasionada por el personal que manipula los alimentos pues *Salmonella* Typhi puede estar presente en portadores asintomáticos y ser transmitido a los alimentos debido a las escasas medidas higiénicas durante su manipulación (Gebreyesus *et al.* 2014).

Generalmente en la información que se ha publicado respecto a la presencia de *Salmonella enterica* en productos cárnicos en México sólo se incluye información generada a nivel local y no se le da seguimiento a través de los años, por lo tanto es difícil obtener una visión acertada de la distribución y prevalencia de este patógeno. Esta información es necesaria para proponer medidas que permitan controlar la diseminación de *Salmonella* y la contaminación cruzada, así como saber si estos enfoques han sido exitosos o necesitan

mejorarse. La generación o adaptación de un sistema de vigilancia nacional como el empleado en otros países, por ejemplo, la red de vigilancia activa de enfermedades transmitidas por los alimentos (FoodNet, USA), podría ser adecuado para poder monitorear de manera constante la presencia de este patógeno en diferentes alimentos.

Por otra parte, las cefalosporinas de tercera generación, aminoglucósidos y quinolonas que fueron utilizadas en este trabajo han sido categorizadas como “de importancia crítica” para la medicina humana por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Collignon *et al.* 2009), la susceptibilidad *in vitro* superior al 90% para estos antibióticos (excepto NAL) indica que tienen una efectividad aun aceptable, sin embargo, es probable que el porcentaje de resistencia antimicrobiana pueda incrementarse debido a la intervención de elementos genéticos móviles como plásmidos, transposones e integrones y llegar al ser humano a través de alimentos de origen animal. En China un estudio encontró porcentajes de resistencia de 10%, 39% y 40% para CTX, CIP y GEN en 82 aislamientos de *Salmonella enterica* obtenidos de carne de cerdo y aves, mientras que en este trabajo los porcentajes fueron de 6.6%, 0% y 9.0% para estos mismos antibióticos, observándose un porcentaje de resistente antimicrobiana mucho mayor en ese país asiático (Figura 10) (Lin *et al.* 2015).

Para el tratamiento de infecciones de *Salmonella* MDR se recomienda el uso de fluoroquinolonas y cefalosporinas de tercera generación, sin embargo, se han observado aislamientos que presentan resistencia a estos antibióticos, como se ha constatado en este trabajo (Tabla 10), por lo que otros antibióticos alternativos se están empleando, uno de estos es la azitromicina, cuya eficacia tanto en pruebas *in vitro* como *in vivo* ya ha sido evaluada en otros países (Dolecek *et al.* 2008; Sjölund-Karlsson *et al.* 2011). Aunque en el presente trabajo no se uso dicho antibiótico se realizó una búsqueda de literatura pero no se encontró información con respecto a su empleo o susceptibilidad de *Salmonella* hacia la azitromicina en México.

En cuanto a la detección de genes de resistencia a los antimicrobianos, un estudio realizado en México encontró que de 112 microorganismos (*Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* and *Enterobacter cloacae*) que presentaban genes para ESBL, 36 de estos también

presentaban genes PMQR (*qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *aac(6')-Ib-cr* and *qepA*) (Silva-Sánchez *et al.* 2013). La presencia de genes que codifican para ESBL y PMQR en aislamientos clínicos puede llevar al fracaso o alargar la terapia antimicrobiana.

El trabajo de Zaidi *et al.*, 2007 ha mostrado que el gen *bla_{CMY}* está ampliamente difundido en México; en el presente trabajo este gen estuvo presente en aislamientos provenientes de cerdos, aves, carne molida y casos clínicos, lo cual, corrobora lo establecido por los autores. Adicionalmente, también se encontró este gen en *Salmonella* Bredeney, Infantis, London, Urbana y *Salmonella* Grupo B (Tabla 10). Esto podría indicar una diseminación de elementos genéticos móviles entre diferentes serovares de *Salmonella*, aunque quizá con menor frecuencia en comparación con *Salmonella* Typhimurium.

Actualmente existen diferentes programas de vigilancia que monitorean constantemente los índices de resistencia antimicrobiana de diferentes patógenos transmitidos por alimentos, por ejemplo, el Sistema de Monitorio de Resistencia Antimicrobiana (NARMS, por sus siglas en inglés) de Estados Unidos, o el Sistema de Vigilancia de la Resistencia Antimicrobiana Veterinario Japonés (JVARMs, por sus siglas en inglés) de Japón. En México, la red de información nacional y la cooperación internacional ha hecho mayores progresos en comparación con el monitoreo de patógenos transmitidos por alimentos; no obstante, la mayoría de la información está relacionada con patógenos nosocomiales del grupo ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y especies del género *Enterobacter*), mientras que microorganismos como *E. coli* y *Salmonella enterica* no son monitoreados de manera constante. Una excepción es el Sistema integrado de vigilancia de la cadena alimentaria (IFCSs, por sus siglas en inglés) establecido en 4 Estados de la República Mexicana (Zaidi *et al.* 2008), el cual se centra en aislamientos de *Salmonella enterica* tanto de origen humano y animal e incluye información sobre su prevalencia en alimentos y el estatus de la resistencia antimicrobiana.

La última parte de la caracterización de los aislamientos de *Salmonella* MDR fue la generación de un dendograma a partir de las imágenes de PFGE, observándose clados que

se separaron de manera evidente según la entidad federativa a la que pertenecían, con la excepción de algunos aislamientos. Los aislamientos del Estado de México mostraron una mayor similitud genética entre los genotipos obtenidos aun a pesar de ser de diferente serovar o provenir de diferente especie animal, mientras que la mayoría de aislamientos de Jalisco se agruparon en otro grupo con una mayor distancia genética entre ellos, lo que podría sugerir una mayor diversidad de genotipos no relacionados presente en las muestras provenientes de carne molida y los aislamientos clínicos (Figura 11). En el caso del Estado de México la frecuencia de genotipos similares o relaciones a nivel de rastro puede indicar la transferencia de *Salmonella enterica* entre diferentes especies de animales productores de alimentos antes del sacrificio, en contraste, la diversidad observada en los aislamientos de la carne molida podría reflejar una contaminación cruzada durante el manejo subsecuente del producto cárnico con otros tipos de carnes o diferentes fuentes de contaminación. El dendograma no mostró un vínculo entre los aislamientos multirresistentes de origen humano y animal, aun así esta posible conexión puede estar presente entre los aislamientos restantes, y de encontrarse similitudes mediante PFGE, esta podría ser complementada con algún otro método de subtipificación como el análisis multilocus de número variable de repeticiones en tandem (MLVA) (Soyer *et al.* 2010).

En el caso de los bacteriófagos se emplearon aguas residuales ya que este medio provee fagos de manera relativamente fácil y con un amplio espectro de hospederos. La adaptabilidad de los fagos podría deberse a la interacción que tienen en este medio ambiente particular donde hay una amplia variedad de posibles hospederos, incluyendo patógenos presentes en poblaciones animales y humanas que son transportados en las aguas residuales (Jurczak-Kurek *et al.* 2016). Algunas investigaciones previas han empleado aguas residuales para aislar bacteriófagos que tienen como objetivo diferentes serovares de *Salmonella*. Akhtar *et al.* (2014) encontraron 59 fagos capaces de lisar diferentes aislamientos de *Salmonella* Typhimurium, Newport, Saintpaul, Enteritidis, Heidelberg and Tennessee, la mayoría de estos serovares fueron similares a los empleados en este trabajo (Cuadro 10), sin embargo, sólo el 25% de estos fagos reportados fueron capaces de lisar 2 o más serovares; en comparación, el fago PHA17 que aislamos puede lisar al menos 22 serovares (excluyendo los que fueron serotipificados parcialmente y aislamientos no

tipificables) (Tabla 2). Otro trabajo con aguas residuales encontró dos fagos activos contra 6 aislamientos de *Salmonella* Typhimurium, Saintpaul y Enteritidis, pero no contra los serovares Infantis, Menston o aislamientos de *Escherichia coli* (Carey-Smith *et al.* 2006). Estas investigaciones resaltan la presencia de fagos líticos potencialmente útiles contra *Salmonella*, sin embargo, en muchos casos se observa que el número de aislamientos empleados fue relativamente pequeño, por lo que podrían estarse omitiendo otros serovares y no revelaría el espectro real del fago.

En México, López-Cuevas *et al.* (2011) describieron cuatro fagos provenientes de heces de diferentes animales contra una colección relativamente grande de aislamientos de *Salmonella* (243 aislamientos distribuidos en 19 serovares), *E. coli* O157:H7 y *Citrobacter freundii*. Los autores encontraron que los fagos afectaban al 70% de los aislamientos, dicho porcentaje fue empleado para basarnos en nuestra hipótesis la cual estimó que los fagos que se aislaran podrían lisar al menos al 50% de los aislamientos (el porcentaje en este trabajo se disminuyó considerando diferencias entre ambos estudios), no obstante encontramos que el fago PHA17 exhibió un espectro lítico menor (42% de 213 aislamientos), esta diferencia puede deberse al origen de las muestras (aguas residuales vs heces de animales), origen de los aislamientos de *Salmonella* y los serovares empleados (sólo 9 serovares fueron similares en ambos estudios) (Tabla 10), finalmente, el enfoque hacia los aislamientos MDR, lo cual pudo haber ocasionado que se omitieran otros fagos, no obstante, PHA17 mostró un efecto lítico consistente en aislamientos MDR y otros más, sin importar si eran de diferente región o tipo de muestra (Tabla 9), lo cual cumple con el objetivo de esta investigación.

Los 5 serovares de *Salmonella* más frecuentes en México tanto de muestras de humanos como de otro origen son Typhimurium, Enteritidis, Derby, Agona y Anatum (Gutiérrez-Cogco *et al.* 2000), PHA17 fue efectivo contra estos serovares, aunque no todos los aislamientos fueron susceptibles. En el caso de *Salmonella* Typhi se encontró que los tres aislamientos empleados fueron susceptibles al fago PHA17, lo cual muestra su capacidad para afectar a *Salmonella* tifoidea y no tifoidea, esta característica ha sido observado en otros bacteriófagos (Capparelli *et al.* 2010). Adicionalmente, PHA17 mostró actividad lítica

contra serovares no tipificables lo cual sugiere la posibilidad de un mayor rango de hospederos contra los cuales pudiera ser empleado.

Otro criterio que se debe incluir cuando se seleccionan los bacteriófagos es su viabilidad en condiciones adversas a las cuales van a estar sometidos según sea la aplicación que se les vaya a dar. El fago PHA17 mostró ser viable hasta por 24 h en un rango de pH de 7.0-10.0 sin que se observaran pérdidas en la concentración del fago, en el caso del pH 4.0 se observó una reducción logarítmica de 1.95 a las tres horas, mientras que a las 24 h no se detectaron UFP, finalmente a pH 2.0 no fue posible aislar UFP lo que demuestra su susceptibilidad a un pH bajo (información no mostrada) (Figura 12). Estos resultados concuerdan con otros estudios que han aislados fagos contra diferentes serovares de *Salmonella*, por ejemplo, en un estudio los bacteriófagos fueron inactivados después de una hora de incubación a un pH de 3.0, y en otra investigación no se pudo detectar a los fagos después de 15 min a un pH de 2.0 (Zhang *et al.* 2015; Thung *et al.* 2017). Por otra parte, Litt y Jaroni (2017) encontraron bacteriófagos contra *E. coli* O157:H7 viables a un pH de 1.0 hasta por 24 h. Los resultados sugieren que PHA17 podría ser adecuada para ciertas circunstancias en donde se aplique de manera directa en superficies o alimentos con un pH entre 4.0 a 10.0. La inactivación del bacteriófago debido a un pH ácido ha sido un problema para seleccionar o emplear bacteriófagos, por ejemplo, en alimentos con un bajo pH o en la administración oral cuando se emplean en fagoterapia debido al pH del tracto gastrointestinal. Se han implementado diferentes metodologías para abordar este problema, incluyendo la encapsulación o la modificación genética para incrementar el tiempo y UFP tanto *in vitro* como *in vivo* (Nobrega *et al.* 2016; Colom *et al.* 2017).

En cuanto a la viabilidad a diferentes temperaturas PHA17 mostró ser viable durante 24 h a 42°C en un rango de 42 a 70 °C durante tres horas (a 70°C se observó una reducción logarítmica de 2.23) y fue detectado todavía a 80°C (con una reducción logarítmica de 2.88). En general, se observó una mejor viabilidad a altas temperaturas que con respecto al pH bajo. En cuanto a la resistencia a la temperatura se ha observado que los fagos pueden desarrollar resistencia a las temperaturas altas debido a mutaciones o interacciones

Entre las limitaciones que presentó este trabajo está el hecho de que en varios casos sólo se contaba con un aislamiento para algunos serovares (Tabla 8) por lo que se no se puede aseverar si tiene la capacidad de lisar más aislamientos del mismo serovar; otro aspecto a considerar es que además de el pH y la temperatura se debe incluir otros factores como exposición a radiación ultravioleta, salinidad, inactivación por desinfectantes, etc.

IX. CONCLUSIONES

Se analizó un total de 243 aislamientos de *Salmonella enterica*. La colección se conformo de 34 serovares y 10 serogrupos provenientes del Estado de México y Jalisco.

Se encontraron porcentajes elevados de resistencia antimicrobiana para TET, AMP y NAL, mientras que para CIP, GE, FOX, CAZ y CTX fue menor al 10% del total de los aislamientos

Se encontró el gen *bla_{CMY}* en los 16 aislamientos que presentaron MDR adicionalmente, tres aislamientos provenientes de aves presentaron también el gen *bla_{TEM}*. Ninguno de los aislamientos presento los genes *qnr*.

El perfil de PFGE reveló una relación genética más cercana entre los aislamientos de *Salmonella enterica* del Estado de México en comparación con los provenientes de Jalisco.

El bacteriófago PHA17 tuvo capacidad lítica contra 92 de 219 (42%) aislamientos, además, de 13 de 16 aislamientos de *Salmonella enterica* MDR.

PHA17 fue estable en un rango de pH 4.0, 7.0 y 10.0 durante al menos 3 h. No se detectaron UFP en un pH de 2.0.

El bacteriófago PHA17 fue capaz de sobrevivir por tres horas en un rango de temperatura de 42 °C a 70 °C.

X. SUGERENCIAS

Realizar de manera periódica muestreos para la detección de *Salmonella* en alimentos de origen animal.

Realizar estudios de resistencia antimicrobiana centrándose en antibióticos prioritarios para la salud humana y veterinaria.

Buscar los genes relacionados con los perfiles fenotípicos de resistencia antimicrobiana.

Investigar el estado actual de la resistencia antimicrobiana de *Salmonella* hacia la azitromicina.

Analizar la relación genética entre los aislamientos de *Salmonella* mediante PFGE de muestras que procedan de diferentes especies de animales productores de alimentos u otro origen.

Ampliar la búsqueda de bacteriófagos en aguas residuales de diferentes ríos u otras fuentes como heces fecales de diferentes especies.

Buscar bacteriófagos capaces de afectar diferentes especies o serovares (*Salmonella* no tifoidal y tifoidal).

Determinar la viabilidad de los bacteriófagos ante diferentes condiciones para considerar su área de aplicación.

Realizar la secuenciación del genoma de los bacteriófagos.

XI. LITERATURA REVISADA

1. Ackermann, H. W. (2003) Bacteriophage observations and evolution. *Res Microbiol* **154**, 245–251.
2. Ackermann, H. W. (2007) 5500 Phages examined in the electron microscope. *Arch Virol* **152**, 227–243.
3. Ackermann, H. W. and Prangishvili, D. (2012) Prokaryote viruses studied by electron microscopy. *Arch Virol* **157**, 1843–1849.
4. Adriaenssens, E. M. and Rodney Brister, J. (2017) How to name and classify your phage: An informal guide. *Viruses* **9**, 1–9.
5. Agbaje, M., Begum, R. H., Oyekunle, M. A., Ojo, O. E. and Adenubi, O. T. (2011) Evolution of *Salmonella* nomenclature: A critical note. *Folia Microbiol (Praha)* **56**, 497–503.
6. Aguilar-Montes de Oca, S. (2014) Resistencia a β -lactámicos y quinolonas en aislamientos de *Escherichia coli* obtenidos de canales de bovinos en el Estado de México. Tesis de Maestría, FMVZ, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, México.
7. Akhtar, M., Viazis, S. and Diez-Gonzalez, F. (2014) Isolation, identification and characterization of lytic, wide host range bacteriophages from waste effluents against *Salmonella enterica* serovars. *Food Control* **38**, 67–74.
8. Aksyuk, A. A., Leiman, P. G., Kurochkina, L. P., Shneider, M. M., Kostyuchenko, V. A., Mesyanzhinov, V. V. and Rossmann, M. G. (2009) The tail sheath structure of bacteriophage T4: A molecular machine for infecting bacteria. *EMBO J* **28**, 821–829.
9. Alam, M., Farzana, T., Ahsan, C. R., Yasmin, M. and Nessa, J. (2011) Distribution of coliphages against four *E. coli* virotypes in hospital originated sewage sample and a sewage treatment plant in Bangladesh. *Indian J Microbiol* **51**, 188–193.
10. Andino, A. and Hanning, I. (2015) *Salmonella enterica*: Survival, colonization, and virulence differences among serovars. *Sci World J* **2015**, 1–16.
11. Andres, D., Gohlke, U., Broeker, N. K., Schulze, S., Rabsch, W., Heinemann, U., Barbirz, S. and Seckler, R. (2013) An essential serotype recognition pocket on phage P22 tailspike protein forces *Salmonella enterica* serovar Paratyphi A O-antigen

- fragments to bind as nonsolution conformers. *Glycobiology* **23**, 486–494.
12. Avila-Vega, D. E., Álvarez-Mayorga, B., Arvizu-Medrano, S. M., Pacheco-Aguilar, R., Martínez-Peniche, R. and Hernández-Iturriaga, M. (2014) Microbiological profile and incidence of *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* on hydroponic bell peppers and greenhouse cultivation environment. *J Food Prot* **77**, 1904–1910.
 13. Bartual, S. G., Otero, J. M., Garcia-Doval, C., Llamas-Saiz, A. L., Kahn, R., Fox, G. C. and Raaij, M. J. van (2010) Structure of the bacteriophage T4 long tail fiber receptor-binding tip. *Proc Natl Acad Sci* **107**, 20287–20292.
 14. Bertozzi Silva, J., Storms, Z. and Sauvageau, D. (2016) Host receptors for bacteriophage adsorption. *FEMS Microbiol Lett* **363**, 1–11.
 15. Bigwood, T., Hudson, J. A., Billington, C., Carey-Smith, G. V. and Heinemann, J. A. (2008) Phage inactivation of foodborne pathogens on cooked and raw meat. *Food Microbiol* **25**, 400–406.
 16. Bryson, A. L., Hwang, Y., Sherrill-Mix, S., Wu, G. D., Lewis, J. D., Black, L., Clark, T. A. and Brushman, F. D. (2015) Covalent modification of bacteriophage T4 DNA inhibits CRISPR- Cas9. *MBio* **6**, 1–9.
 17. Cabrera-Diaz, E., Barbosa-Cardenas, C. M., Perez-Montaña, J. A., González-Aguilar, D., Pacheco-Gallardo, C. and Barba, J. (2013) Occurrence, serotype diversity, and antimicrobial resistance of *Salmonella* in ground beef at retail stores in Jalisco State, Mexico. *J Food Prot* **76**, 2004–2010.
 18. Capparelli, R., Nocerino, N., Iannaccone, M., Ercolini, D., Parlato, M., Chiara, M. and Iannelli, D. (2010) Bacteriophage therapy of *Salmonella enterica*: A fresh appraisal of bacteriophage therapy. *J Infect Dis* **201**, 52–61.
 19. Carey-Smith, G. V., Billington, C., Cornelius, A. J., Hudson, J. A. and Heinemann, J. A. (2006) Isolation and characterization of bacteriophages infecting *Salmonella* spp. *FEMS Microbiol Lett* **258**, 182–186.
 20. Carrasco, E., Morales-Rueda, A. and García-Gimeno, R. M. (2012) Cross-contamination and recontamination by *Salmonella* in foods: A review. *Food Res Int* **45**, 545–556.
 21. Cattoir, V., Poirel, L., Rotimi, V., Soussy, C. J. and Nordmann, P. (2007) Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance *qnr* genes in ESBL-

- producing enterobacterial isolates. *J Antimicrob Chemother* **60**, 394–397.
22. Chaudhuri, R. R., Morgan, E., Peters, S. E., Pleasance, S. J., Hudson, D. L., Davies, H. M., Wang, J., Diemen, P. M. van, *et al.* (2013) Comprehensive assignment of roles for *Salmonella* Typhimurium genes in intestinal colonization of food-producing animals. *PLoS Genet* **9**, 1–11.
 23. Chibani-chennoufi, S., Dillmann, M., Marvin-guy, L., Rami-shojaei, S., Bru, H. and Brüssow, H. (2004) Lactobacillus plantarum bacteriophage LP65 : a new member of the SPO1-like genus of the family Myoviridae. *J Bacteriol* **186**, 7069–7083.
 24. CLSI (2012) *Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests*. CLSI, Wayne, PA, USA.
 25. CLSI (2015) *M100-S25 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. CLSI, Wayne, PA.
 26. Collignon, P. C., Conly, J. M., Andremont, A., McEwen, S. A., Aidara-Kane, A., Griffin, P. M., Agerso, Y., Dang Ninh, T., *et al.* (2009) World Health Organization ranking of antimicrobials according to their importance in Human Medicine: A critical step for developing risk management strategies to control antimicrobial resistance from food animal production. *Clin Infect Dis* **63**, 1087–1093.
 27. Colom, J., Cano-Sarabia, M., Otero, J., Arriñez-Soriano, J., Cortés, P., MasPOCH, D. and Llagostera, M. (2017) Microencapsulation with alginate/CaCO₃: A strategy for improved phage therapy. *Sci Rep* **7**, 1–10.
 28. Dallenne, C., Costa, A. da, Decré, D., Favier, C. and Arlet, G. (2010) Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important β -lactamases in *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother* **65**, 490–495.
 29. Dolecek, C., La, T. T. P., Rang, N. N., Phuong, L. T., Vinh, H., Tuan, P. Q., Du, D. C., Bay, N. T. B., *et al.* (2008) A multi-center randomised controlled trial of gatifloxacin versus azithromycin for the treatment of uncomplicated typhoid fever in children and adults in Vietnam. *PLoS One* **3**, 1-11.
 30. Edgar, R., Friedman, N., Shahar, M. M. and Qimron, U. (2012) Reversing bacterial resistance to antibiotics by phage-mediated delivery of dominant sensitive genes. *Appl Environ Microbiol* **78**, 744–751.
 31. Evilevitch, A., Lavelle, L., Knobler, C. M., Raspaud, E. and Gelbart, W. M. (2003)

- Osmotic pressure inhibition of DNA ejection from phage. *Proc Natl Acad Sci* **100**, 9292–9295.
32. Fluit, A. C. (2005) Towards more virulent and antibiotic-resistant *Salmonella*? *FEMS Immunol Med Microbiol* **43**, 1–11.
 33. Fokine, A., Leiman, P. G., Shneider, M. M., Ahvazi, B., Boeshans, K. M., Steven, A. C., Black, L. W., Mesyanzhinov, V. V., *et al.* (2005) Structural and functional similarities between the capsid proteins of bacteriophages T4 and HK97 point to a common ancestry. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 7163–7168.
 34. Fokine, A. and Rossmann, M. G. (2014) Molecular architecture of tailed double-stranded DNA phages. *Bacteriophage* **4**, e28281.
 35. Fokine, A., Zhang, Z., Kanamaru, S., Bowman, V. D., Aksyuk, A. A., Arisaka, F., Rao, V. B. and Rossmann, M. G. (2013) The molecular architecture of the bacteriophage T4 neck. *J Mol Biol* **425**, 1731–1744.
 36. Galarce, N. E., Bravo, J. L., Robeson, J. P. and Borie, C. F. (2014) Bacteriophage cocktail reduces *Salmonella enterica* serovar Enteritidis counts in raw and smoked salmon tissues. *Rev Argent Microbiol* **46**, 333–337.
 37. García, P., Martínez, B., Obeso, J. and Rodríguez, A. (2008) Bacteriophages and their application in food safety. *Lett Appl Microbiol* **47**, 479–485.
 38. Gebreyesus, A., Adane, K., Negash, L., Asmelash, T., Belay, S., Alemu, M. and Saravanan, M. (2014) Prevalence of *Salmonella* Typhi and intestinal parasites among food handlers in Mekelle University student cafeteria, Mekelle, Ethiopia. *Food Control* **44**, 45–48.
 39. Gómez-Aldapa, C. A., Rangel-Vargas, E. and Castro-Rosas, J. (2013) Frequency and correlation of some enteric indicator bacteria and *Salmonella* in ready-to-eat raw vegetable salads from mexican restaurants. *J Food Sci* **78**, 1201–1207.
 40. Gonzales-Barron, U., Piza, L., Xavier, C., Costa, E. and Cadavez, V. (2014) An exposure assessment model of the prevalence of *Salmonella* spp. along the processing stages of brazilian beef. *Food Sci Technol Int*, 1–11.
 41. Gragg, S. E., Loneragan, G. H., Nightingale, K. K., Brichta-Harhay, D. M., Ruiz, H., Elder, J. R., Garcia, L. G., Miller, M. F., *et al.* (2013) Substantial within-animal diversity of *Salmonella* isolates from lymph nodes, feces, and hides of cattle at

- slaughter. *Appl Environ Microbiol* **79**, 4744–4750.
42. Guenther, S., Herzig, O., Fieseler, L., Klumpp, J. and Loessner, M. J. (2012) Biocontrol of *Salmonella* Typhimurium in RTE foods with the virulent bacteriophage FO1-E2. *Int J Food Microbiol* **154**, 66–72.
43. Gutiérrez-Cogco, L., Montiel-Vázquez, E., Aguilera-Pérez, P. and González-Andrade, M. C. (2000) *Salmonella* serotypes identified in mexican health services. *Salud Publica Mex* **42**, 490–495.
44. Hatfull, G. F. (2015) Dark matter of the biosphere: the amazing world of bacteriophage diversity. *J Virol* **89**, 8107–8110.
45. Hooton, S. P. T., Atterbury, R. J. and Connerton, I. F. (2011) Application of a bacteriophage cocktail to reduce *Salmonella* Typhimurium U288 contamination on pig skin. *Int J Food Microbiol* **151**, 157–163.
46. Hungaro, H. M., Mendonça, R. C. S., Gouvêa, D. M., Vanetti, M. C. D. and Pinto, C. L. de O. (2013) Use of bacteriophages to reduce *Salmonella* in chicken skin in comparison with chemical agents. *Food Res Int* **52**, 75–81.
47. Hur, J., Jawale, C. and Lee, J. H. (2012) Antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from food animals: A review. *Food Res Int* **45**, 819–830.
48. Issenhuth-Jeanjean, S., Roggentin, P., Mikoleit, M., Guibourdenche, M., Pinna, E. De, Nair, S., Fields, P. I. and Weill, F. X. (2014) Supplement 2008-2010 (no. 48) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. *Res Microbiol* **165**, 526–530.
49. Jiménez, M., Martínez-Urtaza, J., Rodríguez-Alvarez, M. X., Leon-Felix, J. and Chaidez, C. (2014) Prevalence and genetic diversity of *Salmonella* spp. in a river in a tropical environment in Mexico. *J Water Health* **12**, 874–884.
50. Jurczak-Kurek, A., Gašior, T., Nejman-Faleńczyk, B., Bloch, S., Dydecka, A., Topka, G., Necel, A., Jakubowska-Deredas, M., *et al.* (2016) Biodiversity of bacteriophages: morphological and biological properties of a large group of phages isolated from urban sewage. *Sci Rep* **6**, 34338.
51. Krupovic, M., Dutilh, B. E., Adriaenssens, E. M., Knezevic, P., Ackermann, H. W., Barylski, J., Brister, J. R., Clokie, M. R. C., *et al.* (2016) Taxonomy of prokaryotic viruses: 2016 update from the ICTV bacterial and archaeal viruses subcommittee. *Arch Virol* **162**, 1153–1157.

52. Laufer, A. S., Grass, J., Holt, K., Whichard, J. M., Griffin, P. M. and Gould, L. H. (2014) Outbreaks of *Salmonella* infections attributed to beef – United States, 1973–2011. *Epidemiol Infect* **143**, 2003–2013.
53. Lavigne, R., Seto, D., Mahadevan, P., Ackermann, H. W. and Kropinski, A. M. (2008) Unifying classical and molecular taxonomic classification: analysis of the *Podoviridae* using BLASTP-based tools. *Res Microbiol* **159**, 406–414.
54. Leverentz, B., Conway, W. S., Alavidze, Z., Janisiewicz, W., Fuchs, Y., Camp, M. J., Chighladze, E. and Sulakvelidze, A. (2001) Examination of bacteriophage as a biocontrol method for *Salmonella* on fresh-cut fruit: A model study. *J Food Prot* **64**, 1116–1121.
55. Lin, D., Chen, K., Chan, E. W. and Chen, S. (2015) Increasing prevalence of *Salmonella* strains harboring multiple PMQR elements but not target gene mutations. *Nat Publ Gr* **5**, 1–8.
56. Lindmark, H., Harbom, B., Thebo, L., Andersson, L., Hedin, G., Osterman, B., Lindberg, T., Andersson, Y., *et al.* (2004) Genetic characterization and antibiotic resistance of *Campylobacter jejuni* isolated from meats, water, and humans in Sweden. *J Clin Microbiol* **42**, 700–706.
57. Litt, P. K. and Jaroni, D. (2017) Isolation and physiomorphological characterization of *Escherichia coli* O157:H7-infecting bacteriophages recovered from beef cattle operations. *Int J Microbiol* **2017**, 1–12.
58. Lopes, A., Tavares, P., Petit, M.-A., Guérois, R. and Zinn-Justin, S. (2014) Automated classification of tailed bacteriophages according to their neck organization. *BMC Genomics* **15**, 1027.
59. López-Cuevas, O., Castro-del Campo, N., León-Félix, J., González-Robles, A. and Chaidez, C. (2011) Characterization of bacteriophages with a lytic effect on various *Salmonella* serotypes and *Escherichia coli* O157. *Can J Microbiol* **57**, 1042–1051.
60. López-Cuevas, O., Castro-Del Campo, N., León-Félix, J., Valdez-Torres, B. and Chaidez, C. (2012) Evaluation of bacteriophage av-08 for simultaneous biocontrol of *Salmonella montevideo* and *Escherichia coli* O157: H7 in experimentally contaminated chicken skin. *J Food Saf* **32**, 305–310.
61. Lowy, F. (2003) Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *J*

- Clin Invest* **111**, 1265–1273.
62. Mahony, J., Alqarni, M., Stockdale, S., Spinelli, S., Feyereisen, M., Cambillau, C. and Sinderen, D. Van (2016) Functional and structural dissection of the tape measure protein of lactococcal phage TP901-1. *Sci Rep* **6**, 1–10.
 63. Miranda, J. M., Mondragón, A. C., Martinez, B., Guarddon, M. and Rodriguez, J. A. (2009) Prevalence and antimicrobial resistance patterns of *Salmonella* from different raw foods in Mexico. *J Food Prot* **72**, 966–971.
 64. Modi, R., Hirvi, Y., Hill, A. and Griffiths, M. W. (2001) Effect of phage on survival of *Salmonella* enteritidis during manufacture and storage of cheddar cheese made from raw and pasteurized milk. *J Food Prot* **64**, 927–33.
 65. Narvaez-Bravo, C., Miller, M. F., Jackson, T., Jackson, S., Rodas-Gonzalez, A., Pond, K., Echeverry, A. and Brashears, M. M. (2013) *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 Prevalence in cattle and on carcasses in a vertically integrated feedlot and harvest plant in Mexico. *J Food Prot* **76**, 786–795.
 66. Nobrega, F. L., Costa, A. R., Santos, J. F., Siliakus, M. F., Lent, J. W. M. Van, Kengen, S. W. M., Azeredo, J. and Kluskens, L. D. (2016) Genetically manipulated phages with improved pH resistance for oral administration in Veterinary Medicine. *Sci Rep* **6**, 1–12.
 67. Norrby, S. R., Nord, C. E. and Finch, R. (2005) Lack of development of new antimicrobial drugs: a potential serious threat to public health. *Lancet Infect Dis* **5**, 115–119.
 68. O’Flaherty, S., Ross, R. P. and Coffey, A. (2009) Bacteriophage and their lysins for elimination of infectious bacteria: *FEMS Microbiol Rev* **33**, 801–819.
 69. O’Mahony, J., Fenton, M., Henry, M., Sleator, R. D. and Coffey, A. (2011) Lysins to kill - a tale of viral weapons of mass destruction. *Bioeng Bugs* **2**, 306–308.
 70. Paul, J. H., Sullivan, M. B., Segall, A. M. and Rohwer, F. (2002) Marine phage genomics. *Comp Biochem Physiol - B Biochem Mol Biol* **133**, 463–476.
 71. Pell, L. G., Liu, A., Edmonds, L., Donaldson, L. W., Howell, P. L. and Davidson, A. R. (2009) The X-ray crystal structure of the phage λ tail terminator protein reveals the biologically relevant hexameric ring structure and demonstrates a conserved mechanism of tail termination among diverse long-tailed phages. *J Mol Biol* **389**, 938–

- 951.
72. Perez-Montaña, J. A., Gonzalez-Aguilar, D., Barba, J., Pacheco-Gallardo, C., Campos-Bravo, C. A., Garcia, S., Heredia, N. L. and Cabrera-Diaz, E. (2012) Frequency and antimicrobial resistance of *Salmonella* serotypes on beef carcasses at small abattoirs in Jalisco State, Mexico. *J Food Prot* **75**, 867–873.
 73. Pérez Pulido, R., Grande Burgos, M. J., Gálvez, A. and Lucas López, R. (2016) Application of bacteriophages in post-harvest control of human pathogenic and food spoiling bacteria. *Crit Rev Biotechnol* **36**, 851–861.
 74. Perri, G. Di and Bonora, S. (2004) Which agents should we use for the treatment of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*? *J Antimicrob Chemother* **54**, 593–602.
 75. Petsong, K. and Vongkamjan, K. (2015) Applications of *Salmonella* bacteriophages in the food production chain, in *Battle Against Microb. Pathog. Basic Sci. Technol. Adv. Educ. Programs Vol. 1*, (Méndez-Vilas A., ed), pp. 275–283. FORMATEX RESEARCH CENTER, Spain.
 76. Quesada, A., Reginatto, G. A., Español, A. R., Colantonio, L. D. and Burrone, M. S. (2016) Resistencia antimicrobiana de *Salmonella* spp. aislada de alimentos de origen animal para consumo humano. *Rev Peru Med Exp Salud Publica* **33**, 32–44.
 77. Quiroz-Santiago, C., Rodas-Suárez, O. R., Carlos R, V., Fernández, F. J., Quiñones-Ramírez, E. I. and Vázquez-Salinas, C. (2009) Prevalence of *Salmonella* in vegetables from Mexico. *J Food Prot* **72**, 1279–1282.
 78. Rao, V. B. and Black, L. W. (2010) Structure and assembly of bacteriophage T4 head. *Virology* **7**, 356.
 79. Raya, R. R., Oot, R. A., Moore-Maley, B., Wieland, S., Callaway, T. R., Kutter, E. M. and Brabban, A. D. (2011) Naturally resident and exogenously applied T4-like and T5-like bacteriophages can reduce *Escherichia coli* O157:H7 levels in sheep guts. *Bacteriophage* **1**, 15–24.
 80. Realpe-Quintero, M., Barba-León, J., Pérez-Montaña, J. A., Pacheco-Gallardo, C., González-Aguilar, D., Dominguez-Arias, R. M. and Cabrera-Diaz, E. (2018) Genetic diversity and antimicrobial resistance of *Salmonella* serotypes recovered throughout the beef production chain and from patients with salmonellosis. *PeerJ* **6**, e5482.

81. Rhoads, D. D., Wolcott, R. D., Kuskowski, M. A., Wolcott, B. M., Ward, L. S. and Sulakvelidze, A. (2009) Bacteriophage therapy of venous leg ulcers in humans: results of a phase I safety trial. *J Wound Care* **18**, 237–243.
82. Rohwer, F. and Edwards, R. (2002) The phage proteomic tree : a genome-based taxonomy for phage. **184**, 4529–4535.
83. Rossmann, M. G., Arisaka, F., Battisti, A. J., Bowman, V. D., Chipman, P. R., Fokine, A., Hafenstein, S., Kanamaru, S., *et al.* (2006) From structure of the complex to understanding of the biology. *Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr* **63**, 9–16.
84. Saenz, Y., Brinas, L., Dominguez, E., Ruiz, J., Zarazaga, M., Vila, J. and Torres, C. (2004) Mechanisms of resistance in multiple-antibiotic-resistant *Escherichia coli* strains of human, animal, and food origins. *Antimicrob Agents Chemother* **48**, 3996–4001.
85. Sánchez-Vargas, F. M., Abu-El-Haija, M. A. and Gómez-Duarte, O. G. (2011) *Salmonella* infections: An update on epidemiology, management, and prevention. *Travel Med Infect Dis* **9**, 263–277.
86. Scallan, E., Hoekstra, R. M., Angulo, F. J., Tauxe, R. V., Widdowson, M. A., Roy, S. L., Jones, J. L. and Griffin, P. M. (2011) Foodborne illness acquired in the United States-major pathogens. *Emerg Infect Dis* **17**, 7–15.
87. Sepúlveda-Robles, O., Kameyama, L. and Guarneros, G. (2012) High diversity and novel species of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages. *Appl Environ Microbiol* **78**, 4510–4515.
88. Serwer, P., Hayes, S. J., Zaman, S., Lieman, K., Rolando, M. and Hardies, S. C. (2004) Improved isolation of undersampled bacteriophages: Finding of distant terminase genes. *Virology* **329**, 412–424.
89. Shane, A. L., Roels, T. H., Goldoft, M., Herikstad, H., Hedberg, C. and Angulo, F. J. (2002) Foodborne disease in our global village: A multinational investigation of an outbreak of *Salmonella* serotype enteritidis phage type 4 infection in Puerto Vallarta, Mexico. *Int J Infect Dis* **6**, 98–102.
90. Shin, H., Lee, J. H., Kim, H., Choi, Y., Heu, S. and Ryu, S. (2012) Receptor diversity and host interaction of bacteriophages infecting *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *PLoS One* **7**, 1-11.

91. Silva-Hidalgo, G., López-Valenzuela, M., Juárez-Barranco, F., Montiel-Vázquez, E. and Valenzuela-Sánchez, B. (2014) *Salmonella* serovars and antimicrobial resistance in strains isolated from wild animals in captivity in Sinaloa, Mexico. *Jpn J Vet Res* **62**, 129–134.
92. Silva-Sánchez, J., Cruz-Trujillo, E., Barrios, H., Reyna-Flores, F., Sánchez-Pérez, A., Garza-Ramos, U., Morfin-Otero, R., Rodríguez-Noriega, E., *et al.* (2013) Characterization of plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) genes in extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* pediatric clinical isolates in Mexico. *PLoS One* **8**, 1-10.
93. Sjölund-Karlsson, M., Joyce, K., Blickenstaff, K., Ball, T., Haro, J., Medalla, F. M., Fedorka-Cray, P., Zhao, S., *et al.* (2011) Antimicrobial susceptibility to azithromycin among *Salmonella enterica* isolates from the United States. *Antimicrob Agents Chemother* **55**, 3985–3989.
94. Smith, H. W. and Huggins, M. B. (1982) Successful treatment of experimental *Escherichia coli* infections in mice using phage: its general superiority over antibiotics. *Microbiology* **128**, 307–318.
95. Smith, H. W. and Huggins, M. B. (1983) Effectiveness of phages in treating experimental *Escherichia coli* diarrhoea in calves, piglets and lambs. *Microbiology* **129**, 2659–2675.
96. Soyer, Y., Alcaine, S. D., Schoonmaker-Bopp, D. J., Root, T. P., Warnick, L. D., McDonough, P. L., Dumas, N. B., Gröhn, Y. T., *et al.* (2010) Pulsed-field gel electrophoresis diversity of human and bovine clinical *Salmonella* isolates. *Foodborne Pathog Dis* **7**, 707–717.
97. Spricigo, D. A., Bardina, C., Cortés, P. and Llagostera, M. (2013) Use of a bacteriophage cocktail to control *Salmonella* in food and the food industry. *Int J Food Microbiol* **165**, 169–174.
98. Su, L.-H. and Chiu, C.-H. (2007) *Salmonella*: clinical importance and evolution of nomenclature. *Chang Gung Med J* **30**, 210–219.
99. Su, L.-H., Chiu, C.-H., Chu, C. and Ou, J. T. (2004) Antimicrobial resistance in nontyphoid *Salmonella* serotypes: a global challenge. *Clin Infect Dis* **39**, 546–551.
100. Sulakvelidze, A. and Morris, J. G. (2001) Bacteriophages as therapeutic agents. *Ann*

- Med* **33**, 507–509.
101. Talavera-Rojas, M., Varela-Guerrero, J., Reyes-Rodríguez, N., Lagunas-Bernabe, S., Valladares-Carranza, B., Alonso-Fresan, M. and Velázquez-Ordoñez, V. (2011) Resistencia antibiótica de genotipos de cepas de *Salmonella* spp. de cerdos sacrificados en rastros del Estado de México. *Vet Méx* **42**, 269–276.
 102. Taylor, N. M. I., Prokhorov, N. S., Guerrero-Ferreira, R. C., Shneider, M. M., Browning, C., Goldie, K. N., Stahlberg, H. and Leiman, P. G. (2016) Structure of the T4 baseplate and its function in triggering sheath contraction. *Nature* **533**, 346–352.
 103. Threlfall, E. J. (2002) Antimicrobial drug resistance in *Salmonella*: problems and perspectives in food- and water-borne infections. (Special issue: Pathogenic microbes in water and food). *FEMS Microbiol Rev* **26**, 141–148.
 104. Thung, T. Y., Krishanthi Jayarukshi Kumari Premarathne, J. M., San Chang, W., Loo, Y. Y., Chin, Y. Z., Kuan, C. H., Tan, C. W., Basri, D. F., *et al.* (2017) Use of a lytic bacteriophage to control *Salmonella* Enteritidis in retail food. *LWT - Food Sci Technol* **78**, 222–225.
 105. Twest, R. and Kropinski, A. (2009) Bacteriophage enrichment from water and soil, in *Bacteriophages, Methods Protoc.*, (Kropinski M. R. J. A. C. and A. M., ed), Vol. 1, pp. 15–21. Human Press, c/o Springer Science+Business Media, LLC, New York, NY.
 106. Valpuesta, J. M., Sousa, N., Barthelemy, I., Fernández, J. J., Fujisawa, H., Ibarra, B. and Carrascosa, J. L. (2000) Structural analysis of the bacteriophage T3 head-to-tail connector. *J Struct Biol* **131**, 146–55.
 107. Varela-Guerrero, J. A., Talavera-Rojas, M., Gutiérrez-Castillo, A. del C., Reyes-Rodríguez, N. E. and Vázquez-Guadarrama, J. (2013) Phenotypic-genotypic resistance in *Salmonella* spp. isolated from cattle carcasses from the north central zone of the State of Mexico. *Trop Anim Health Prod* **45**, 995–1000.
 108. Vazquez-Garcidueñas, M. S., Romero-Perez, N. L., Figueroa-Aguilar, G. A., Jaime-Sanchez, J. L. and Vazquez-Marrufo, G. (2014) Investigation of a food-borne *Salmonella* Oranienburg outbreak in a mexican prison. *J Infect Dev Ctries* **8**, 143–153.
 109. Weinbauer, M. G. (2004) Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS Microbiol Rev* **28**, 127–181.
 110. Wiesner, M., Calva, J. J., Bustamante, V. H., Pérez-Morales, D., Fernández-Mora,

- M., Calva, E. and Silva, C. (2016) A multi-drug resistant *Salmonella* Typhimurium ST213 human-invasive strain (33676) containing the *bla*_{CMY-2} gene on an IncF plasmid is attenuated for virulence in BALB/c mice. *BMC Microbiol* **16**, 18.
111. Wittebole, X., Roock, S. De and Opal, S. M. (2014) A historical overview of bacteriophage therapy as an alternative to antibiotics for the treatment of bacterial pathogens. *Virulence* **5**, 226–235.
112. Woolston, J., Parks, A. R., Abuladze, T., Anderson, B., Li, M., Carter, C., Hanna, L. F., Heyse, S., *et al.* (2013) Bacteriophages lytic for *Salmonella* rapidly reduce *Salmonella* contamination on glass and stainless steel surfaces. *Bacteriophage* **3**, e25697, 1-6.
113. Yap, M. L., Klose, T., Arisaka, F., Speir, J. A., Veessler, D., Fokine, A. and Rossmann, M. G. (2016) Role of bacteriophage T4 baseplate in regulating assembly and infection. *Proc Natl Acad Sci* **113**, 2654–2659.
114. Zaidi, M. B., Calva, J. J., Estrada-Garcia, M. T., Leon, V., Vazquez, G., Figueroa, G., Lopez, E., Contreras, J., *et al.* (2008) Integrated food chain surveillance system for *Salmonella* spp. in Mexico. *Emerg Infect Dis* **14**, 429–435.
115. Zaidi, M. B., Leon, V., Canche, C., Perez, C., Zhao, S., Hubert, S. K., Abbott, J., Blickenstaff, K., *et al.* (2007) Rapid and widespread dissemination of multidrug-resistant *bla*_{CMY-2} *Salmonella* Typhimurium in Mexico. *J Antimicrob Chemother* **60**, 398–401.
116. Zaidi, M. B., McDermott, P. F., Fedorka-Cray, P., Leon, V., Canche, C., Hubert, S. K., Abbott, J., León, M., *et al.* (2006) Nontyphoidal *Salmonella* from human clinical cases, asymptomatic children, and raw retail meats in Yucatan, Mexico. *Clin Infect Dis* **42**, 21–28.
117. Zhang, J., Hong, Y., Fealey, M., Singh, A., Walton, K., Martin, C., Harman, N. J., Mahlie, J., *et al.* (2015) Physiological and molecular characterization of *Salmonella* bacteriophages previously used in phage therapy. *J Food Prot* **78**, 2143–9.
118. Zinno, P., Devirgiliis, C., Ercolini, D., Ongeng, D. and Mauriello, G. (2014) Bacteriophage P22 to challenge *Salmonella* in foods. *Int J Food Microbiol* **191**, 69–74.

XII. ANEXOS

ARTÍCULO ENVIADO:

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF A LYTIC BACTERIOPHAGE
AGAINST MULTIDRUG-RESISTANT *Salmonella enterica* SEROTYPES FROM
MEXICO

Saúl Aguilar-Montes de Oca¹, Martín Talavera-Rojas^{1*}, Edgardo Soriano-Vargas¹, Elisa Cabrera-Díaz², Jeannette Barba-León², Jesús Vazquez-Navarrete³, Jorge Acosta-Dibarrat¹, Celene Salgado-Miranda¹

¹Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México, Carretera Toluca-Atacomulco, Km 15.5, C.P. 50200, Toluca, Estado de México, México.

²Departamento de Salud Pública, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Guadalajara, Camino Ramón Padilla Sánchez No. 2100 C.P. 45110, Zapopan, Jalisco, México.

³Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias, Carretera México-Toluca Km. 15.5, C.P. 05110, Palo Alto, D.F., México

Running title: Lytic bacteriophage against *Salmonella* in Mexico

***Corresponding autor:** Martín Talavera-Rojas

E-mail: talaverarojas@gmail.com

ABSTRACT:

Aims: Isolate and characterize lytic bacteriophages against multi-drug resistant *Salmonella* isolates from Mexico.

Methods and results: Wastewater samples were obtained from several rivers, followed by filtration and an enrichment step with multi-drug resistant *Salmonella* serotypes in order to find lytic bacteriophages. Phage PHA17 was isolated and selected for further characterization. The lytic spectrum against a broad *Salmonella* collection (219 isolates distributed in 33 serotypes, some partially serotyped and non-typeable isolates) showed that it was able to lyse at least 42% of them, while the survivability of PHA17 at different conditions of temperature and pH revealed that it was stable at 42 °C and 60 °C for 24 h, and between pH 4.0 and 7.0 for at least 3 h.

Conclusions: Bacteriophage PHA17 showed a wide lytic spectrum against *Salmonella* isolates, whilst the survivability *in vitro* at the temperature and pH tested were similar to other studied phages that have been used as biocontrol agents.

Significance and Impact of the Study: This investigation allowed the isolation of a new bacteriophage which could be employed to develop control measures against this foodborne pathogen

KEYWORDS: bacteriophage, antimicrobial resistance, *Salmonella enterica*

INTRODUCTION:

Salmonella enterica is one of the major foodborne pathogens worldwide and in Mexico salmonellosis is considered an endemic disease. Food animals are the principal reservoirs for this pathogen, but this microorganism has also been isolated from vegetables (Quiroz-Santiago *et al.* 2009; Perez-Montaña *et al.* 2012). Some serotypes have been responsible for outbreaks in different regions of the country with a diverse degree of complications (Vazquez-Garcidueñas *et al.* 2014; Bano-Zaidi *et al.* 2018), moreover, the emergence of multi-drug resistant (MDR) isolates resilient to antimicrobial therapy was reported previously (Wiesner *et al.* 2016). This poses a challenge for the food chain and represents a public health concern. Therefore, alternative antimicrobial agents as bacteriophages and their potential application to increase food safety should be evaluated.

Bacteriophages (phages) are viruses capable of lysing bacteria and are ubiquitous in nature; they can be found in different environments related to their host such as soil, sewage, water, manure, animal and farms, as well as in different food processing plant effluents (Akhtar *et al.* 2014). Although most phages are limited to certain strain or serotype of specific bacterial species, some studies have reported phages capable of infecting more than one serotype or even different bacterial genera, for example, phage SFP10 can inhibit the growth of both *Salmonella* Typhimurium and *Escherichia coli* O157:H7 (Park *et al.* 2012). Interestingly, López-Cuevas *et al.* (2011) isolated phages from poultry and cattle feces in Mexico that were also capable of lysing *Salmonella enterica* and *E. coli* O157:H7. This phenomenon could be explained by the diversity and specificity of bacterial receptors between different microorganisms (Kim and Ryu 2011; Shin *et al.* 2012). Phages showing a broad spectrum capacity against several pathogens are appropriate for either direct application to food products, or for use in phagotherapy.

In Mexico, a growing number of bacteriophages with lytic capacity against diverse pathogens are under investigation, despite this, the majority of publications are genome announcement but less information is available regarding the lytic capacity and host spectrum *in vitro* or *in vivo* conditions. This information is necessary in order to know the suitability of bacteriophages for commercial applications. Therefore, the aim of this study was to isolate, characterize and select lytic bacteriophages as potential biocontrol agents against regional MDR *Salmonella* isolates.

MATERIALS AND METHODS:

Bacterial isolates. A total of 219 *Salmonella enterica* isolates previously characterized and obtained from food animals (carcasses) and meats from two different geographical regions in Mexico were studied (swine, n = 53; poultry, n = 8 and bovine, n = 12) (Aguilar-Montes de Oca *et al.* 2018), ground beef, n = 116 (Cabrera-Diaz *et al.* 2013) and human clinical samples (n = 30) (Realpe-Quintero *et al.* 2018). In addition, one strain of the following microorganisms was used in this investigation: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966, *Listeria monocytogenes* BAA-751 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Previous to each experiment, the

strains were grown in trypticase soy broth (TSB, BIOXON, Mexico) at 37 °C (except *A. hydrophila* and *L. monocytogenes* at 25 °C) for 24 h.

Bacteriophage isolation and purification. Wastewater samples were processed according to Twest and Kropinski (2009) with slight modifications; one sample (200 mL) was collected in a sterile container from 3 different rivers located in the central region of Mexico, transported inside containers with refrigerants to the laboratory and processed within 3 h after collection. The samples were centrifuged (3,000 g x 10 min) to remove large particles and filtered through 0.20 µm pore cellulose acetate syringe filters (Corning, USA). The bacteriophage enrichment was carried out in 50-ml polypropylene conical tubes (Corning, USA) containing 10 mL of double-strength TSB supplemented with 5 mM MgSO₄ (Fermont, Mexico). A 10 mL aliquot of the filtered sample was added and then inoculated with 0.1 ml of an overnight culture containing the selected bacterial host. Enrichments were incubated at 37 °C for 24 h followed by centrifugation at 3,000 g for 10 min, afterward, the supernatants were filtered through a 0.20 µm pore syringe filter and stored at 4°C for further use. To detect the presence of the bacteriophage, loopfuls of host bacteria were spread onto trypticase soy agar (TSA, BIOXON, Mexico) plates (supplemented with 5mM MgSO₄) and 10 µl of supernatant were placed on the streaks, allowed to dry at room temperature, incubated overnight at 37 °C and observed for zones of lysis.

To purify the phages, a series of 10-fold dilutions with TSB were made from every supernatant to isolate one single well-separated plaque forming unit (PFU) using a double agar overlay plaque assay. TSA plates (supplemented with 5mM MgSO₄) and a soft overlay agar (4 g/L bacteriological agar, BIOXON, Mexico) were used. The soft agar was stored in 3 mL volumes, melted when required, and tempered to 50 °C before adding 100 µl of bacterial host and 100 of diluted supernatant that were mixed before pouring onto TSA plates, the soft agar was swirled to produce a uniform top layer and incubated at 37 °C for 24 h. An individual PFU was picked by using a sterile wire loop and suspended in TSB. The TSB tubes were kept on an orbital shaker for 20 min to allow phages get free from the agar medium and filtered through a 0.20 µm pore syringe filter (Carey-Smith *et al.* 2006).

This purification process of an individual plaque was repeated at least 3 times to ensure a pure phage stock.

High titer stocks ($\sim 10^9$ - 10^{11} PFU/mL) were prepared according to Carey-Smith *et al.* (2006) with slightly modifications; briefly, three plates (TSA+5mM MgSO₄) were overlaid with soft agar containing purified phages and bacterial host and, after incubation, those plates with confluent lysis were chosen. To recover phages, 5 mL of SM buffer (0.05 M Tris-HCl, 0.1 M NaCl, 0.008 M MgSO₄, 0.01% w/v gelatin) was added to each plate, left at room temperature for at least 1 h, and then the plates were swirled regularly. The liquid was decanted into sterile centrifuge tubes, and the soft agar overlay layer was added to the tube after scraping from the base plate. The contents were swirled for 30 min, and then the overlay was removed by centrifugation at 3,000 g for 10 min. The supernatant was then filtered (0.22 μ m) and stored at 4 °C. The stock titer was determined by an overlay assay.

Phage lytic spectrum: The host range of each purified phage was tested against 219 bacterial isolates corresponding to Gram-negative (*Salmonella enterica*, *E. coli*, and *A. hydrophila*) and Gram-positive microorganisms (*S. aureus* and *L. monocytogenes*). Susceptibility was individually tested using TSA plates that were overlaid with 0.1 mL of an exponential culture of each bacterial isolate and were allowed to dry at room temperature. Once dry, 10 μ l of each phage suspensions ($\sim 10^9$ PFU/mL) were added to bacterial lawns and incubated overnight at 37 °C; the presence of clear areas (plaque phage formation) indicated that the tested isolate was a susceptible host (Raya *et al.* 2011).

Effect of pH and temperature on the survival of isolated phages:

To evaluate the effect of pH on the survival of phages, a 100 μ l aliquot from a phage stock (initial concentration of $\sim 10^7$ - 10^8 PFU/ml) was added to 900 μ l of TSB previously adjusted to pH 2.0, 4.0, 7.0 or 10.0, using NaOH (1.0 M) (J.T. Baker, USA) or HCL (1.0 M) (Fermont, Mexico) in 1.5-ml polypropylene tubes and incubated at 37 °C. Phage concentrations were measured by standard plaque assay after 0, 15, 30, 60 120, 180 and 1440 min (Litt and Jaroni 2017; Zhang *et al.* 2015).

To evaluate the effect of temperature on the survival of phages, a 100- μ l aliquot of a phage suspension (initial concentration of $\sim 10^7$ - 10^8 PFU/ml) was added to 900 μ l of TSB in 1.5 ml polypropylene tubes and incubated at different temperatures (42, 60, 70 and 85 °C) in a dry bath. Phage concentrations were measured by standard plaque assay at 0, 15, 30, 60 120 180 1440 min (Litt y Jaroni 2017; Zhang *et al.* 2015). The phage counts obtained from both tests were transformed to \log_{10} PFU/mL and plotted with Graph Pad Prism® 5 software (GraphPad Inc., San Diego, CA, USA).

RESULTS:

Bacteriophage isolation and purification. Initially, a set of three bacteriophages was isolated, however, only one phage, named PHA17, showed the highest lytic spectrum against all *Salmonella* isolates including those MDR. Therefore, this phage was selected for further characterization (Table 2).

Phage lytic spectrum. Phage PHA17 was capable to lyse *S. Typhimurium* ATCC 14028 but not other non-salmonella strains. In case of the 219 isolates of *Salmonella enterica*, PHA17 was capable to lyse isolates from 22 serotypes, 4 serogroups and non-typeable isolates (Table 1 and Table 2)

pH effect: No loss in the initial concentration of phage PHA17 was observed at pH 4.0 and 7.0 after 24 h, in contrast, a reduction of 2 log PFU/ml was observed after 3 h at pH 10.0 and no bacteriophages were detected after 24 h. Finally, no bacteriophages were detected at pH 2.0 (Figure 1).

Temperature effect: No change in bacteriophage PHA17 concentration was observed at 42 °C and 60 °C, whilst bacteriophage titre decreased below the detection limit at 70 °C and 80 °C after 3 h (Figure 2).

DISCUSSION

We searched bacteriophages from sewage samples as this source provides easy-to-obtain and broad-spectrum phages. This adaptability could be explained due to the contact between phages and a wide variety of possible hosts, including different pathogens

gathered from farms, urban areas and hospitals, interacting in this particular environment (Jurczak-Kurek *et al.* 2016).

Previous investigations have used wastewater to isolate bacteriophages targeting different *Salmonella* serotypes, Akhtar *et al.* (2014) found 59 bacteriophages against thirty strains of *Salmonella* Typhimurium, Newport, Saintpaul, Enteritidis, Heidelberg, and Tennessee; several serotypes were similar to those included in this investigation (Table 2). However, only 25% of the phages tested in the study of Akhtar *et al.* (2014) were able to lyse two or more serotypes, in contrast, bacteriophage PHA17 isolated in this study, was able to lyse at least 22 serotypes (excluding some partially serotyped and non-typeable isolates) (Table 1). Carey-Smith *et al.* (2006) found two bacteriophages from sewage that were active against 6 isolates of *Salmonella* Typhimurium, Saintpaul and Enteritidis, but not for Infantis, Menston, or *Escherichia coli*. Although these investigations expose the presence of *Salmonella* phages in wastewater, the number of bacterial strains employed was relatively small, which would not reveal the real host spectrum.

In Mexico, López-Cuevas *et al.* (2011) tested four phages from animal feces against a large collection of *Salmonella* (243 isolates corresponding to 19 serotypes), *E. coli* O157:H7 and *Citrobacter freundii* isolates. The authors found that the bacteriophages lysed at least 70% of the isolates, in contrast, the bacteriophage PHA17 isolated in this study, displayed a minor lytic spectrum on 42% of the 219 isolates tested; this difference could be due to the origin of the phage samples (sewage vs feces), origin of *Salmonella* isolates, and the *Salmonella* serotypes used (only 9 serotypes were similar in both studies). Finally, we focused primarily on MDR isolates, which could have lead us not to consider other bacteriophages; nevertheless, phage PHA17 showed a suitable lytic effect on these isolates regardless the geographical region, their origin (poultry, swine, ground meat and clinical samples), or their high genetic diversity (Aguilar-Montes de Oca *et al.* 2018; Realpe-Quintero *et al.* 2018) (Table 2).

The *Salmonella* serotypes in Mexico differ according to geographical region, time, and methodology of the study, for example, one investigation showed that the most frequent serotypes from human and non-human samples were Typhimurium, Enteritidis, Derby, Agona and Anatum (Gutiérrez-Cogco *et al.* 2000), while another study found that in patients with diarrhea *Salmonella* serotype Typhimurium, Agona, Anatum, Adelaide and

Meleagridis were the most frequent (Zaidi *et al.* 2006), in both studies serotypes Typhimurium, Agona and Anatum were present so phage PHA17 could be able to lyse some isolates from these collections or from other studies.

Salmonella Typhi is another relevant serotype due to its risk to human health; the three isolates employed were susceptible to phage PHA17, which reveals aptitude to affect both typhoidal and non-typhoidal *Salmonella*; this characteristic has been observed in other bacteriophages (Capparelli *et al.* 2010). Another finding was the activity of phage PAH17 in non-typeable serotypes, this suggests the possibility of a broader host range for unidentified or unusual serotypes.

The *in vitro* stability at pH range 4.0-10.0 (Figure 1) suggest that phage PHA17 could be suitable for direct application on surfaces or foods; the results observed also agrees with other studies where bacteriophages were inactivated after 1h of incubation at pH 3.0, or where the phage titers were undetectable after 15 min at pH 2.0 (Thung *et al.* 2017; Zhang *et al.* 2015). Until now, the inactivation at low pH has been a problem to use selected bacteriophages in phage therapy, particularly for oral administration. Different methodologies had been developed to address this problem, including encapsulation or genetic modification to increase the time and titer that circulates through the gastrointestinal system of animals (Colom *et al.* 2017; Nobrega *et al.* 2016).

The temperature stability showed by phage PAH17 at 42 °C (Figure 2) and its ability to lyse some MDR *Salmonella* isolates obtained from poultry (Table 3) indicate that the phage could be of interest for the poultry industry. In Mexico, there is scarce information about the predominant *Salmonella* serotypes in poultry, being *Salmonella* Typhimurium and Enteritidis capable to cause disease in poultry farms, while other investigation reported *Salmonella* Albany, Enteritidis, Agona, Meleagridis, and Stanleyville from poultry meat. (Padron 1990; Mancera Martínez *et al.* 2004; Zaidi *et al.* 2006). Moreover, phage PHA17 could be further tested as a control measure to reduce *Salmonella* in food matrices since it showed activity against isolates from carcasses and ground beef of three different food animals (poultry, swine, and cattle).

CONCLUSION

The identified and characterized bacteriophage PHA17 was efficient against a broad range of different *Salmonella* serotypes, some of them commonly associated with human clinical cases of salmonellosis. In addition, the ability of phage PHA17 to replicate in *Salmonella* isolates from different origin and different regions of Mexico could denote its suitability to be used against isolates that are circulating in the food chain and through animal or human populations. Further characterization including sequencing and genomic analysis to ensure the absence of virulence or antimicrobial resistance genes, is required. As well, testing in food matrices or animals assays are necessary to correlate the observed *in vitro* activity of phage PHA17 and determine its ability to control *Salmonella* in practical situations.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Valente Velázquez Ordoñez, Dr. Vicente Vega Sánchez and Dr. Jesús Vázquez Navarrete for providing the reference strains *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966 and *Listeria monocytogenes* BAA-751 respectively.

CONFLICT OF INTEREST

No conflict of interest is declared by the authors.

REFERENCES

- Agbaje, M., Begum, R. H., Oyekunle, M. A., Ojo, O. E. and Adenubi, O. T. (2011) Evolution of *Salmonella* nomenclature: A critical note. *Folia Microbiol (Praha)* **56**, 497–503.
- Aguilar-Montes de Oca, S., Talavera-Rojas, M., Soriano-Vargas, E., Barba-León, J., Vázquez-Navarrete, J., Acosta-Dibarrat, J. and Salgado-Miranda, C. (2018) Phenotypic and genotypic profile of clinical and animal multidrug-resistant *Salmonella enterica* isolates from Mexico. *J Appl Microbiol* **124**, 67–74.
- Akhtar, M., Viazis, S. and Diez-Gonzalez, F. (2014) Isolation, identification and characterization of lytic, wide host range bacteriophages from waste effluents against *Salmonella enterica* serovars. *Food Control* **38**, 67–74.
- Bano-Zaidi, M., Aguayo-Romero, M., Campos, F. D., Colome-Ruiz, J., Gonzalez, M. E.,

- Piste, I. M., Magaña, C. P. and Gamboa, M. G. y (2018) Typhoid fever outbreak with severe complications in Yucatan, Mexico. *Lancet Glob Heal* **6**, e1062–e1063.
- Cabrera-Diaz, E., Barbosa-Cardenas, C. M., Perez-Montaña, J. A., González-Aguilar, D., Pacheco-Gallardo, C. and Barba, J. (2013) Occurrence, serotype diversity, and antimicrobial resistance of *Salmonella* in ground beef at retail stores in Jalisco State, Mexico. *J Food Prot* **76**, 2004–2010.
- Capparelli, R., Nocerino, N., Iannaccone, M., Ercolini, D., Parlato, M., Chiara, M. and Iannelli, D. (2010) Bacteriophage therapy of *Salmonella enterica*: A fresh appraisal of bacteriophage therapy. *J Infect Dis* **201**, 52–61.
- Carey-Smith, G. V., Billington, C., Cornelius, A. J., Hudson, J. A. and Heinemann, J. A. (2006) Isolation and characterization of bacteriophages infecting *Salmonella* spp. *FEMS Microbiol Lett* **258**, 182–186.
- Colom, J., Cano-Sarabia, M., Otero, J., Arñez-Soriano, J., Cortés, P., Maspoch, D. and Llagostera, M. (2017) Microencapsulation with alginate/CaCO₃: A strategy for improved phage therapy. *Sci Rep* **7**, 1–10.
- Gómez-Aldapa, C. A., Rangel-Vargas, E. and Castro-Rosas, J. (2013) Frequency and correlation of some enteric indicator bacteria and *salmonella* in ready-to-eat raw vegetable salads from Mexican restaurants. *J Food Sci* **78**, 1201–1207.
- Gutiérrez-Cogco, L., Montiel-Vázquez, E., Aguilera-Pérez, P. and González-Andrade, M. C. (2000) *Salmonella* serotypes identified in Mexican health services. *Salud Publica Mex* **42**, 490–495.
- Jurczak-Kurek, A., Gąsior, T., Nejman-Faleńczyk, B., Bloch, S., Dydecka, A., Topka, G., Necel, A., Jakubowska-Deredas, M., *et al.* (2016) Biodiversity of bacteriophages: morphological and biological properties of a large group of phages isolated from urban sewage. *Sci Rep* **6**, 34338.
- Kim, M. and Ryu, S. (2011) Characterization of a T5-like coliphage, SPC35, and differential development of resistance to SPC35 in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **77**, 2042–2050.
- Litt, P. K. and Jaroni, D. (2017) Isolation and physiomorphological characterization of *Escherichia coli* O157:H7-Infecting bacteriophages recovered from beef cattle operations. *Int J Microbiol* **2017**, 1–12.

- López-Cuevas, O., Castro-del Campo, N., León-Félix, J., González-Robles, A. and Chaidez, C. (2011) Characterization of bacteriophages with a lytic effect on various *Salmonella* serotypes and *Escherichia coli* O157. *Can J Microbiol* **57**, 1042–1051.
- Mancera Martínez, A., Vázquez Navarrete, J. and Heneidi Zeckua, A. (2004) Phage typing of *Salmonella* Enteritidis strains isolated from poultry in Mexico. *Tec Pecu Mex* **42**, 287–294.
- Miranda, J. M., Mondragón, A. C., Martínez, B., Guarddon, M. and Rodríguez, J. A. (2009) Prevalence and antimicrobial resistance patterns of *Salmonella* from different raw foods in Mexico. *J Food Prot* **72**, 966–971.
- Nobrega, F. L., Costa, A. R., Santos, J. F., Siliakus, M. F., Lent, J. W. M. Van, Kengen, S. W. M., Azeredo, J. and Kluskens, L. D. (2016) Genetically manipulated phages with improved pH resistance for oral administration in veterinary medicine. *Sci Rep* **6**, 1–12.
- Padron, M. (1990) *Salmonella* Typhimurium outbreak in broiler chicken flocks in Mexico. *Avian Dis* **34**, 221–223.
- Park, M., Lee, J. H., Shin, H., Kim, M., Choi, J., Kang, D. H., Heu, S. and Ryu, S. (2012) Characterization and comparative genomic analysis of a novel bacteriophage, SFP10, simultaneously inhibiting both *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol* **78**, 58–69.
- Perez-Montaña, J. A., Gonzalez-Aguilar, D., Barba, J., Pacheco-Gallardo, C., Campos-Bravo, C. A., Garcia, S., Heredia, N. L. and Cabrera-Diaz, E. (2012) Frequency and antimicrobial resistance of *Salmonella* serotypes on beef carcasses at small abattoirs in Jalisco State, Mexico. *J Food Prot* **75**, 867–873.
- Raya, R. R., Oot, R. A., Moore-Maley, B., Wieland, S., Callaway, T. R., Kutter, E. M. and Brabban, A. D. (2011) Naturally resident and exogenously applied T4-like and T5-like bacteriophages can reduce *Escherichia coli* O157:H7 levels in sheep guts. *Bacteriophage* **1**, 15–24.
- Realpe-Quintero, M., Barba-León, J., Pérez-Montaña, J. A., Pacheco-Gallardo, C., González-Aguilar, D., Dominguez-Arias, R. M. and Cabrera-Diaz, E. (2018) Genetic diversity and antimicrobial resistance of *Salmonella* serotypes recovered throughout the beef production chain and from patients with salmonellosis. *PeerJ* **6**, e5482.
- Shin, H., Lee, J. H., Kim, H., Choi, Y., Heu, S. and Ryu, S. (2012) Receptor diversity and

- host interaction of bacteriophages infecting *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *PLoS One* **7**.
- Thung, T. Y., Premarathne, J. M. K. J. K., Chang, W. S., Loo, Y. Y., Chin, Y. Z., Kuan, C. H., Tan, C. W., Basri, D. F., *et al.* (2017) Use of a lytic bacteriophage to control *Salmonella* Enteritidis in retail food. *LWT - Food Sci Technol* **78**, 222–225.
- Twist, R. and Kropinski, A. (2009) Bacteriophage enrichment from water and soil, in *Bacteriophages, Methods Protoc.*, (Kropinski M. R. J. A. C. and A. M., ed), Vol. 1, pp. 15–21. Human Press, c/o Springer Science+Business Media, LLC, New York, NY.
- Vazquez-Garcidueñas, M. S., Romero-Perez, N. L., Figueroa-Aguilar, G. A., Jaime-Sanchez, J. L. and Vazquez-Marrufo, G. (2014) Investigation of a food-borne *Salmonella* Oranienburg outbreak in a Mexican prison. *J Infect Dev Ctries* **8**, 143–153.
- Wiesner, M., Calva, J. J., Bustamante, V. H., Pérez-Morales, D., Fernández-Mora, M., Calva, E. and Silva, C. (2016) A multi-drug resistant *Salmonella* Typhimurium ST213 human-invasive strain (33676) containing the *bla_{CMY-2}* gene on an IncF plasmid is attenuated for virulence in BALB/c mice. *BMC Microbiol* **16**, 18.
- Zaidi, M. B., Leon, V., Canche, C., Perez, C., Zhao, S., Hubert, S. K., Abbott, J., Blickenstaff, K., *et al.* (2007) Rapid and widespread dissemination of multidrug-resistant *bla_{CMY-2}* *Salmonella* Typhimurium in Mexico. *J Antimicrob Chemother* **60**, 398–401.
- Zaidi, M. B., McDermott, P. F., Fedorka-Cray, P., Leon, V., Canche, C., Hubert, S. K., Abbott, J., León, M., *et al.* (2006) Nontyphoidal *Salmonella* from human clinical cases, asymptomatic children, and raw retail meats in Yucatan, Mexico. *Clin Infect Dis* **42**, 21–28.
- Zhang, J., Hong, Y., Fealey, M., Singh, A., Walton, K., Martin, C., Harman, N. J., Mahlie, J., *et al.* (2015) Physiological and molecular characterization of *Salmonella* bacteriophages previously used in phage therapy. *J Food Prot* **78**, 2143–9.

Table 1. Bacterial host range for phage PHA17 isolated from sewage.

Bacteria	Lysis (No. Susceptible isolates/Total No. isolates)*
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0/1
<i>S. Typhimurium</i> ATCC14028	1/1
<i>A. hydrophila</i> ATCC7966	0/1
<i>L. monocytogenes</i> BAA-751	0/1
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	0/1
<i>Salmonella</i> serotypes	
Agona	6/12
Albany	3/3
Anatum	3/16
Azteca	2/2
Branderup	2/5
Brandenburg	2/3
Bredeney	3/7
Cannstatt	0/1
Derby	4/7
Duesseldorf	1/1
Enteritidis	4/5
Give	0/2
Havana	4/8
Infantis	2/11
Javiana	1/1
Kentucky	1/1
Lockleaze	0/2
London	0/14
Manhattan	1/1
Montevideo	0/2
Muenchen	5/5
Muenster	0/1
Panama	4/5
Reading	2/2
Rissen	0/3
Saintpaul	1/5
Senftenberg	0/4
Sinstorf	0/6
Tennessee	0/1
Typhi	3/3
Typhimurium	27/40
Urbana	0/1
Worthington	0/2
Partially serotyped	
Group B	2/8
Group B monophasic	0/2

Group C1	1/3
Group D	3/3
Group E1	0/6
Group E1 monophasic	0/5
Group G2	1/2
Group G2 monophasic	0/1
Group 18	0/1
Non-typeable	4/6
Total susceptible strains	92/219

*(-) Absence of phage plaques; (+) Presence of phage plaques.

Table 2. Lytic activity of phage PHA17 against multidrug-resistant (MDR) *Salmonella* isolates.

<i>Salmonella</i> serotype	Origin	Lytic activity*
Typhimurium	Poultry	+
Typhimurium	Poultry	+
Typhimurium	Poultry	-
Bredeney	Swine	+
Typhimurium	Swine	+
Typhimurium	Swine	+
London	Swine	+
Non-typeable	Swine	+
Typhimurium	Swine	+
Group B	Ground beef	+
Typhimurium	Ground beef	-
Non-typeable	Clinical	+
Infantis	Clinical	+
Urbana	Clinical	-
Typhimurium	Clinical	+
Typhimurium	Clinical	+

*(-) Absence of phage plaques; (+) Presence of phage plaques.

Figure 1. Effect of pH on the survivability of bacteriophage PHA17.

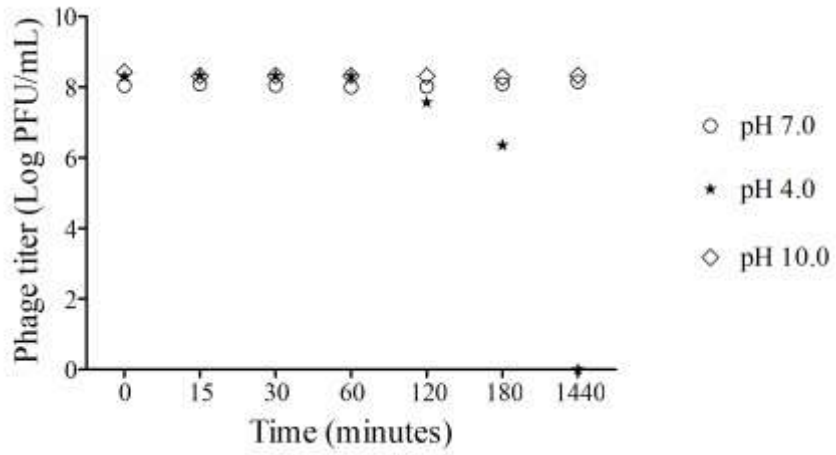


Figure 2. Effect of Temperature on the survivability of bacteriophage PHA17.

