



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO**

**DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES**

**PREVALENCIA DE GENES DE RESISTENCIA EN BACTERIÓFAGOS Y  
AISLAMIENTOS DE *E. coli* EN AVES DE CORRAL EN EL CENTRO-NORTE  
DEL ESTADO DE MÉXICO**

**T E S I S**

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

**PRESENTA:**

**M. en C. JUAN MARTÍN TALAVERA GONZÁLEZ**

**Toluca, México 2020**



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO**

**DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES**

**PREVALENCIA DE GENES DE RESISTENCIA EN BACTERIÓFAGOS Y  
AISLAMIENTOS DE *E. coli* EN AVES DE CORRAL EN EL CENTRO-NORTE  
DEL ESTADO DE MÉXICO**

**T E S I S**

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

**PRESENTA:**

**M. en C. JUAN MARTÍN TALAVERA GONZÁLEZ**

**COMITÉ DE TUTORES:**

**Director de tesis:**

**Dr. Martín Talavera Rojas**

**Co-Directores de tesis:**

**Dr. Edgardo Soriano Vargas**

**Dr. Jesús Vázquez Navarrete**

**Toluca, México 2020**

## Dedicatorias

## RESUMEN.

La epidemiología de patógenos multirresistentes portadores de ARG's es extremadamente compleja, ya que están vinculados a múltiples factores abióticos y bióticos (humanos, animales domésticos y de vida silvestre). En el presente estudio se recolectaron 197 aislamientos de *Escherichia coli* de pollos, pavos y patos de un total de 322 muestras procedentes de unidades de producción de traspatio en la zona norte del Estado de México, México. Se registraron 108/197 (54.8%) aislamientos multirresistentes. 80.7% de los aislamientos presentaron resistencia a ampicilina (AM), 64.4% a tetraciclina (TE), 56.3% a carbenicilina (CB) y 26.9% a ácido nalidíxico (NA) y trimetoprim-sulfametoxazol (SXT). Además, 56.3% de los aislamientos presentaron el gen *bla<sub>TEM</sub>*, 20.8%, 19.2%, 7.6% y 10.1% el *tetB*, *tetA*, *sullI* y *sullII* respectivamente, 9.6% *qnrA* y 5.5% el *qnrB*. Para la transducción *in vitro* se utilizaron bacteriófagos portadores de ARG's recolectados de aislamientos de *E. coli* multirresistentes de aves silvestres procedentes de la Ciénega Chimalipan de Lerma. El gen *qnrA* fue transducido a 5/13 (38.4%) cepas de *E. coli*, el *tetB* a 3/13 (23%) y, *bla<sub>TEM</sub>* y *sullIII* a 2/13 (15.3%). Se reporta la frecuencia de genes de resistencia vinculados a resistencia fenotípica en aves domésticas y por primera vez se realiza la transducción de ARG's de cepas de *E. coli* aislada de aves silvestres a cepas de *E. coli* aisladas de aves domésticas, con esto, se logra determinar el posible rol de los bacteriófagos en la transmisión de factores de resistencia.

**PALABRAS CLAVE:** aves de traspatio, resistencia antimicrobiana, bacteriófagos, transducción, aves silvestres

## ABSTRACT

The transmission of multi-drug resistant pathogens and antimicrobial-resistant genes is an arising problem with multiple factors involved (humans, domestic animals, wildlife). The objective of this study was to investigate the presence of *E. coli* isolates with different antimicrobial resistance genes from backyard poultry and demonstrate the *in vitro* transduction phenomenon of these ARGs between phages from migratory wild-birds and poultry *E. coli* isolates. In this study, we collected 197 *E. coli* isolates from chicken, turkeys, and ducks in backyard production units (northern region of the State of Mexico). Isolates were resistant to ampicillin (80.7%), tetracycline (64.4%), carbenicillin (56.3%), and nalidixic acid and trimethoprim-sulfamethoxazole (both, 26.9%). Moreover, *bla*<sub>TEM</sub> (56.3%), *tetB* (20.8%), *tetA* (19.2%), *sulI* (7.6%), *sulIII* (10.1%), *qnrA* (9.6%) and *qnrB* (5.5%) genes were found. *In vitro* transduction employing phages from migratory wild birds sampled in the wetland Chimaliapan (State of Mexico) was worked out. It was possible to transduce *qnrA*, *tetB*, *bla*<sub>TEM</sub> and *sulIII* genes to *E. coli* isolates from poultry. This is the first report that describes the transduction of antimicrobial resistance genes from phages of migratory wild birds to poultry and suggests the possible transmission in backyard production units.

**KEYWORDS:** backyard poultry, antimicrobial resistance, bacteriophages, transduction, wild birds

## **Agradecimientos**

Al proyecto de investigación titulado: “Estudio antigénico e inmunogénico de *avibacterium paragallinarum* de la serovariedad c-1 prevalente en la avicultura de México”, con la clave 3784/2014/CID.

Al Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal (CIESA) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, por permitir la realización de este trabajo y así seguir formándome profesionalmente.

A mi comité tutorial: Dr. Martín Talavera Rojas, Dr. Edgardo Soriano Vargas y Dr. Jesús Vázquez Navarrete por brindarme su admirable asesoría y ser guías en mi formación profesional.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la beca otorgada para la realización de esta investigación.

Al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales (PCARN)

## CONTENIDO

TÍTULO	i
DEDICATORIAS	ii
RESUMEN	iii
ABSTRACT	iv
AGRADECIMIENTOS	v
CONTENIDO	vi
ÍNDICE DE CUADROS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ABREVIATURAS	x
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	3
1. IMPORTANCIA DE LA AVICULTURA EN MÉXICO	3
2. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE <i>Escherichia coli</i>	3
3. <i>E. coli</i> MULTIRRESISTENTE PORTADORA DE ARG's EN AVES DE PRODUCCIÓN Y SILVESTRES	8
4. GENES DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN ADN FÁGICO	17
5. TRANSDUCCIÓN	20
6. BACTERIÓFAGOS	24
III. JUSTIFICACIÓN	35
IV. HIPÓTESIS	38
V. OBJETIVOS	39
VI. MATERIAL Y MÉTODOS	41
1. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS	41
2. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>E. coli</i>	42
3. SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA	43
4. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE DNA BACTERIANO Y FÁGICO	43
5. DETECCIÓN DE GENES DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS	44

6. AISLAMIENTOS FÁGICO CON IDENTIFICACIÓN SIMULTÁNEA EN CEPAS RECEPTORAS	44
7. PURIFICACIÓN Y AMPLIFICACIÓN FÁGICA	45
8. TITULACIÓN DE LISADOS FÁGICOS	45
9. SELECCIÓN DE AISLAMIENTOS DONANTES Y RECEPTORES	45
10. TRANSDUCCIÓN <i>in vitro</i>	46
VII. RESULTADOS	47
VIII. DISCUSIÓN	57
IX. CONCLUSIONES	65
X. SUGERENCIAS	66
XI. LITERATURA REVISADA	67

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1	Serotipos mas comunes de <i>E. coli</i> causante de diarrea en humanos	4
Cuadro 2	Genes de resistencia a los antibióticos reportados en aislamientos de <i>E. coli</i>	9
Cuadro 3	Estudios sobre la presencia de <i>E. coli</i> en aves de producción	11
Cuadro 4	Frecuencia de <i>E. coli</i> multirresistente aislada en países europeos	12
Cuadro 5	Niveles de resistencia (%) de <i>E. coli</i> de gaviotas en países Europeos	14
Cuadro 6	Estudios sobre la presencia de <i>E. coli</i> en aves silvestres	16
Cuadro 7	Ejemplos de bacteriófagos portadores de factores de virulencia y bacterias objetivo	24
Cuadro 8	Productos fágicos comercializados en la actualidad	27
Cuadro 9	Clasificación taxonómica de los bacteriófagos	29
Cuadro 10	Secuencia de oligonucleótidos utilizados en este trabajo para la detección de ARG's	44
Cuadro 11	Número de aislamientos de <i>E. coli</i> obtenidos en Atlacomulco, Jocotitlán, El Oro e Ixtlahuaca de pollos, pavos y patos (%)	50
Cuadro 12	Características de las aves silvestres muestreadas en este estudio	50
Cuadro 13	Número total de aislamientos de <i>Escherichia coli</i> resistentes a antibióticos en los municipios de Atlacomulco, Jocotitlán, El Oro e Ixtlahuaca	51
Cuadro 14	Relación genotípica y fenotípica entre aislamientos de <i>E. coli</i> de especies de aves domésticas en los municipios de Atlacomulco, Jocotitlán, El Oro e Ixtlahuaca de pollos, pavos y patos	52
Cuadro 15	Pruebas de sensibilidad y frecuencia de ARG's encontrados en aislamientos de <i>E. coli</i> de aves silvestres.	54
Cuadro 16	Perfil genotípico y fenotípico de los aislamientos de origen fágica.	55
Cuadro 17	Rango de infección y transducción de ARG's y resistencia fenotípica en aves de corral	55
Cuadro 18	Rango de infección y transducción de ARG's y resistencia fenotípica en aves silvestres	56

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Representación esquemática del mecanismo de patogénesis de EPEC	5
Figura 2	Representación esquemática del ingreso de Sxt a <i>E. coli</i>	6
Figura 3	Representación esquemática de la acción de las enterotoxinas producidas por ETEC	7
Figura 4	Representación esquemática de la patogénesis de EAEC	7
Figura 5	Representación esquemática de la patogénesis de EIEC	8
Figura 6	Ejemplos de patógenos asociados a enfermedades transmitidos por aves silvestres	13
Figura 7	Diversidad de ARG's en especies de aves silvestres	15
Figura 8	Número de copias del gen <i>bla<sub>TEM</sub></i> (CG/ml) en agua residual en ADN fágico y bacteriano	17
Figura 9	Densidad del gen <i>qnrA</i> (CG/ml) en ADN fágico en agua residual animal	18
Figura 10	Proporción de cada ARG en ADN fágico y ADN bacteriano	18
Figura 11	Densidad de PFU en heces de especies animales	19
Figura 12	Fuente de aislamiento y presencia de ARG's en ADN fágico	20
Figura 13	Transferencia de ADN entre bacterias vía fágica	21
Figura 14	Interacciones entre profagos y <i>Salmonella</i> spp.	22
Figura 15	Análisis genómico de ST398	23
Figura 16	Representación esquemática de un fago portador de Stx y amplificación de la toxina <i>shiga</i> en bacterias comensales	23
Figura 17	Representación esquemática de la cabeza, cola y placa basal de un fago <i>Myoviridae</i>	28
Figura 18	Ciclos biológicos de los bacteriófagos	30
Figura 19	Representación esquemática de la adsorción del bacteriófagos a la célula hospedadora	31
Figura 20	Inserción del ADN fágico al hospedador	31
Figura 21	Esquema del genoma fágico de lambda	33
Figura 22	Representación esquemática del ensamblaje del fago	33
Figura 23	Representación esquemática del modo de acción de las proteínas líticas derivadas de los fagos	34
Figura 24	Ubicación de la Ciénega de Chimaliapan y comunidades que la rodean	42
Figura 25	Pruebas de sensibilidad de los aislamientos de <i>E. coli</i> recolectados de aves silvestres y de traspatio	43

## ABREVIATURAS

ARG's	Genes de resistencia los antibióticos
ECEP	<i>Escherichia coli</i> enteropatógena
ECET	<i>Escherichia coli</i> invasiva
ECEI	<i>Escherichia coli</i> shigatoxigénica
ECST	<i>Escherichia coli</i> agregativa
ECEA	<i>Escherichia coli</i> difusa
ECAD	<i>Escherichia coli</i> adherente difusa
ECAI	<i>Escherichia coli</i> adherente invasora
VTEC	Verotoxigénica <i>Escherichia coli</i>
HUS	Síndrome urémico hemolítico
ESBL's	Beta-lactamasas de espectro extendido
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
PCR	Reacción en cadena de polimerasa
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standard Institute</i>
AM	Ampicilina
SXT	Trimetoprim-sulfametoxasol
NA	Ácido nalidíxico
TET	Tetraciclina
CB	Carbenicilina
GE	Gentamicina
MGE's	Elementos genéticos móvil
PFU	Unidades formadoras de placa
OMS	Organización Mundial de la Salud

## I. INTRODUCCIÓN.

La terapia con antibióticos representa uno de los avances mas importantes y representativos del siglo XX, sin embargo, también ha traído problemas en la agricultura y en salud humana y animal (Balcazar, 2014). Tan solo durante los años 2000 – 2015, el uso de los antibióticos, en los humanos, aumentó 65% y la industria animal consumió 130, 000 toneladas en 2013 (Marcelino *et al.*, 2019).

La resistencia a los antibióticos es considerada como uno de los grandes retos de la medicina y nuestra civilización. Es comparado con el terrorismo y con el calentamiento global. Actualmente provoca, aproximadamente, 700,000 muertes anualmente a nivel mundial, y si no es controlada, se estima que podría alcanzar 10 millones de muertes para el 2050, superando las muertes causadas por cáncer (Górski *et al.*, 2016).

*Escherichia coli* es una bacteria ubicua presente en el intestino de múltiples especies animales y humanos como microorganismo comensal, sin embargo, cepas patógenas altamente resistentes causantes de colibacilosis aviar han sido descritas en aves de producción y silvestres migratorias. Diversos factores provocan que, propietarios de granjas de producción avícola de traspatio, hagan uso inadecuado de antibióticos empleándolos como promotores de crecimiento o profilaxis causando una presión selectiva de la microbiota intestinal y en consecuencia la aparición de bacterias multirresistentes con presencia de ARG's y/o factores de virulencia (van den Bogaard *et al.*, 2001). Dichos microorganismos, son eliminados diariamente vía heces fecales contribuyendo a la contaminación de ambientes acuáticos tales como ríos, lagunas o ciénegas, los cuales son sitios de convivencia de multiples especies animales, entre las que destacan las aves silvestres migratorias que son consideradas como vectores en la diseminación de patógenos potenciales portadores de diversos factores de virulencia y ARG's (Alcalá, 2015).

Marcelino *et al.*, (2019) determinó, en aves silvestres, genes de resistencia a los antibióticos que son compartidos comúnmente, entre bacterias, por medio de elementos genéticos

móviles (MGE, por sus siglas en inglés) como los bacteriófagos atemperados (Colomer-Lluch *et al.* 2011).

Diversos autores mencionan que los bacteriófagos atemperados juegan un rol muy importante en la portación y diseminación de genes que confieren resistencia a antibióticos convencionales y factores de virulencia por medio del fenómeno de transducción. Este fenómeno puede alterar fisiológicamente la bacteria a través de la conversión lisogénica provocando que esta gane factores de virulencia y ARG's potencializando su patogenicidad (Colomer-Lluch *et al.* 2014a; Colomer-Lluch *et al.* 2014b; Colomer-Lluch *et al.* 2011b).

En el presente estudio se describe la frecuencia, patrón de resistencia y genes de resistencia a los antibióticos de cepas de *E. coli* procedentes de aves de corral y aves silvestres, además, el aislamiento de bacteriófagos y su potencial en la diseminación de genes de resistencia asociados con resistencia fenotípica.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 1. Importancia de la avicultura en México.

La producción avícola de traspatio es una actividad de apoyo para la economía familiar y adquiere importancia, principalmente, en zonas rurales y peri-urbanas de México, ya que se realiza en patios de los hogares con el aprovechamiento de aves como pollos, pavos y patos, se debe considerar que, a nivel nacional, la carne de pollo aporta 39% de proteína en el sector pecuario (Cuca-García *et al.*, 2015; UNA, 2018).

En México, la producción avícola tuvo una participación de 63.3% en la producción pecuaria nacional en 2018, además hubo una producción de 3, 470, 706 toneladas de carne de pollo con un valor de 94, 878 millones de pesos y 10, 741 toneladas de pollo de pavo con valor de 870 millones de pesos (UNA, 2018).

En 2018, el Estado de México aportó con el 4% en la producción de carne de pollo a nivel nacional y la República Mexicana ocupó el sexto lugar en el consumo y séptimo lugar en la producción mundial de carne de pollo con una participación de 3.8%; además hubo un aproximado de 32.51 kg de consumo de carne de pollo per cápita (UNA, 2018; Gobierno de México, 2020)

### 2. Características generales de *Escherichia coli*

*Escherichia coli* es un bacilo Gram negativo de la familia Enterobacteriaceae. Es un microorganismo oxidasa negativo, catalasa positivo, anaerobio facultativo, fimbriado, móvil por flagelos y crece preferentemente a una temperatura de 37° C (Rodríguez-Angeles, 2002).

Se le considera un microorganismo de flora normal, pero hay cepas que pueden ser patógenas y causar daño produciendo diferentes cuadros clínicos, entre ellos diarrea. Así

mismo se ha asignado una serotipificación por medio de los antígenos “O” (antígenos somático), “H” (antígeno flagelar) y “K” (antígeno capsular) (Cuadro 1) (Rodríguez-Angeles, 2002).

ETEC	EIEC	EPEC	EAEC	STEC
O6:H-	O28ac:H-	O18	O3:H2	O1:MN
O6:H16	O29:H-	O26:H-	O15:H18	O1:H1
O8:H-	O112ac:H-	O26:H11	O44:H18	O1:H2
O11:H27	O124:H-	O55:H-	O77:H18	O1:H20
O15:H11	O124:H7	O55:H6	O86:H-	O1:HNT
O20:H-	O124:H30	O55:H7	O111:H21	O2:H1
O25:H-	O135:H-	O86:H-	O127:H2	O2:H2:K1
O27:H-	O143:H-	O86:H34	ONT:H10	O2:H6
O27:H7	O144:H-	O111:H-		O2:H7
O27:H20	O152:H-	O111ab:H2		O2:H27
O80	O167:H5	O119:H6	O4:H40	O27:H-
O85:H7		O125ac:H21	O5:H-	O39:H4
O114:H21		O126:H-	O5:H16	O39:H8
O115:H21		O126:H2	O6:H-	O45:H-
O126:H9		O126:H27	O6:H1	O45:H2
O128ac:H27		O127:H21	O6:H29	O45:H7
O139		O128ab:H2	O8:H-	O50:H-
O148:H28		O128:H12	O8:H14	O55:H-
O149:H4		O142:H6	O8:H21	O55:H6
O149:H10		O158:H23	O9ab:H-	O55:H7
O153:H45			O11:H49	O55:H10
O159:H-			O14:H-	O55:H?
O159:H4			O15:H-	O60:H-
O159:H20			O15:H27	O65:H16
O166:H27			O16:H-	O70:H11
O167:H5			O16:H6	O73:H34
O169:H41			O17:H18	O75:H-
O173:H-			O18:H-	O75:H5
			O18:H?	O76:H19
			O20:H7	O79:H7
			O21:H5	O80:H-
			O22:H-	O82:H-
			O22:H1	O82:H8
			O22:H8	O83:H1
			O22:H40	O84:H2
				O117:H-
				O163:H19
				O126:H27
				OR:H-
				OR:H20
				OR:H21
				O141:H-
				O144:H-
				O145:H-
				O145:H16
				O145:H25
				O145:H28
				O146:H-
				O146:H21
				O146:H28
				O150:H10
				O153:H2
				O153:H25
				O154:H-
				O157:H-
				O157:H7
				O161:H-

ETEC *E. coli* enterotoxigénica  
EIEC *E. coli* enteroinvasiva  
NT: no tipificable. EPEC *E. coli* enteropatógena  
EAEC *E. coli* enteroagregativa  
R: rugosa  
STEC *E. coli* productora de toxina shiga

Cuadro 1. Serotipos mas comunes de *E. coli* causante de diarrea en humanos (Tomado y modificado de Rodríguez-Angeles, 2002).

Se han descrito 6 patotipos de *E. coli* involucrados en procesos diarreicos, mediante la identificación de factores de virulencia y mecanismos de patogenicidad. *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterotoxigénica (ECET), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* shigatoxigénica (ECST), *E. coli* enteroagregativa (ECEA), *E. coli* adherente difusa (ECAD) y *E. coli* adherente invasora (ECAI) (Farfán-García, 2016).

- *E. coli* enteropatógena (EPEC)

Las cepas EPEC tienen la capacidad de causar diarrea e incapacidad para producir toxinas Shiga y enterotoxinas termolábiles (LT) o termoestables (ST). EPEC se subclasifica en EPEC típico (tEPEC), las cuales tienen los genes *eae* para la intimina y el plásmido EAF que codifica para el Bfp; y EPEC atípico (aEPEC) que sólo presentan los genes *eae* (Gomes *et al.*, 2016; Rodríguez-Angeles, 2002).

La patogénesis de EPEC inicia cuando esta se adhiere al enterocito por medio de un flagelo y por el pili tipo IV (BFP). El sistema de secreción (T3SS) inyecta la proteína EspF que se dirige al nucléolo donde bloquea el proceso del ARNr. Map que induce la formación de filopodios; Tir se une a la intimina (proteína de la membrana externa de la bacteria) para que se active Arp 2/3, mediador de la polimerización de actina. La unión Tir-Intimina finalmente provoca la reorganización de la actina, alterando la morfología y formando las lesiones de adhesión y borrado (A/E) (Figura 1) (Farfán-García *et al.*, 2016).

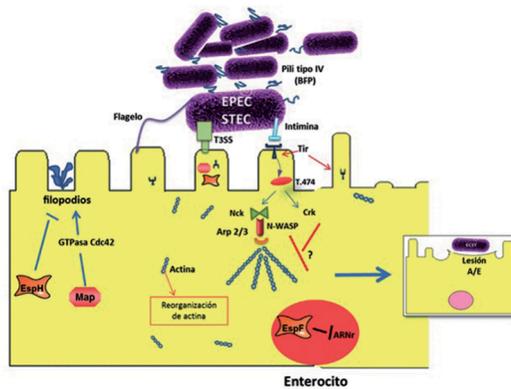


Figura 1. Representación esquemática del mecanismo de patogénesis de EPEC (Tomado y modificado de Farfán-García *et al.*, 2016)

- *E. coli* enterohemorrágica (productora de toxina shiga) (EHEC/STEC)

EHEC / STEC representan un grupo bien conocido de patógenos transmitidos por los alimentos distribuidos en todo el mundo. Se caracteriza por producir toxinas Shiga (Stx) por lo que se les denomina shigatoxigénicas. También se han descrito como *E. coli* enterohemorrágica (EHEC)) y *E. coli* verotoxigénica (VTEC) debido a la producción de una toxina con efecto citotóxico sobre las células vero. Causan una amplia gama de infecciones, desde diarrea leve y casi inexistente hasta manifestaciones más graves, como colitis hemorrágica (HC) y el desarrollo de un síndrome potencialmente mortal conocido como síndrome urémico hemolítico (HUS) (Rodríguez-Angeles, 2002).

El ingreso a la célula y la distribución a diferentes órganos son mediados por tres mecanismos diferentes:

➤ Macropinocitosis. Factores como EspP estimulan la reorganización de actina en ausencia de receptores Gb3, que permiten la entrada de Stx al enterocito por medio de macropinocitosis (MPC) y se desplaza dentro de la célula por transcitosis para llegar a la circulación.

➤ Transcitosis. Mediante vesículas, la toxina pasa de un espacio extracelular a otro facilitando la propagación de la toxina hacia las células endoteliales del intestino y cerebro que expresan Gb3

➤ Endocitosis. Stx viaja hasta encontrar el receptor Gb3 y penetra por medio de endocitosis, Stx se dirige al ARNr para bloquear la síntesis de proteínas y producir la muerte celular (Figura 2) (Farfán-García *et al.*, 2016).

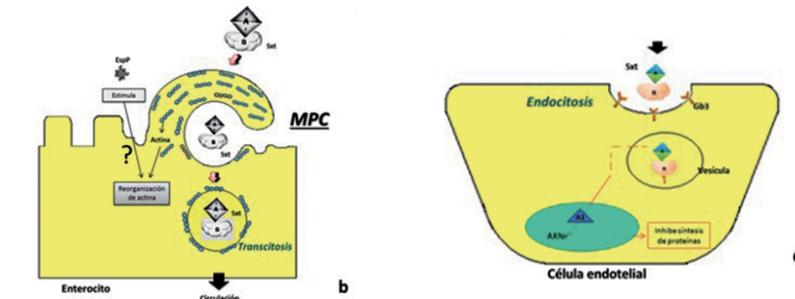


Figura 2. Representación esquemática del ingreso de Stx a *E.coli*. b) Macropinocitosis y transcitosis; c) Endocitosis (Tomado y modificado de Farfán-García *et al.*, 2016)

- *E. coli* enterotoxigénica (EPEC)

EPEC representa una de las causas más comunes de diarrea en países en desarrollo y en viajeros a estas regiones. Es una carga económica para los granjeros y la industria, ya que es un patógeno importante para pollos de engorde, cerdos, ganado y otros animales de granja. Para la adherencia de EPEC a las células epiteliales, la bacteria expresa la EtpA, para permitir la adhesión de EPEC a los enterocitos por Tia y TibA. El principal factor de virulencia de EPEC es la secreción de enterotoxinas termoestables (ST) y termolábiles (LT). La LT ingresa al citoplasma y se une a la guanina (Gs), inhibe la actividad de GTPasa y activa la adenilatociclasa. Estas reacciones estimulan la secreción de cloruro y demás electrolitos a través del canal regulador. Las ST aumenta el GMP cíclico donde se produce el mismo efecto de la LT (Figura 3) (Gomes *et al.*, 2016; Farfán-García *et al.*, 2016).

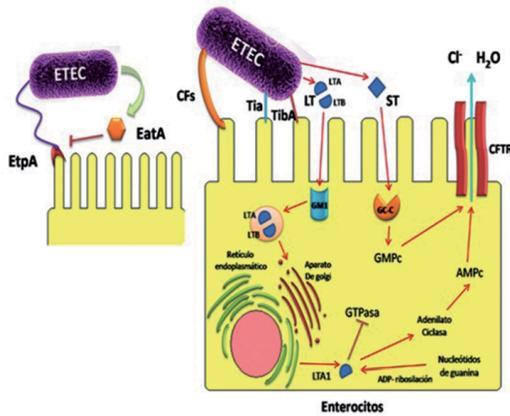


Figura 3. Representación esquemática de la acción de las enterotoxinas producidas por ETEC (Tomado y modificado de Farfán-García *et al.*, 2016)

- *E. coli* enteroagregativa (EAEC)

Causa diarrea aguda o persistente, tanto en niños como en adultos, en países en vías de desarrollo y se identifica con frecuencia en cuadros diarreicos de personas de países industrializados y en pacientes infectados por VIH. La diarrea causada por EAEC es acuosa, a menudo con presencia de moco, con o sin sangre y dolor abdominal, vómitos y fiebre baja.

La patogénesis de esta bacteria involucra fimbrias AAF y las proteínas Hra-1 y Tia. EAEC presenta el factor EAST1, que altera el transporte de iones e induce una variedad de SPATEs (citotóxicos). Pic (grupo no citotóxicos) es una proteasa que incrementa el moco y que auto-aglutina bacterias en el epitelio intestinal, otra es Pet, la cual se une a la al complejo de Golgi, bloquea su función y causa el redondeamiento de la célula (Figura 4) (Gomes *et al.*, 2016; Farfán-García *et al.*, 2016).

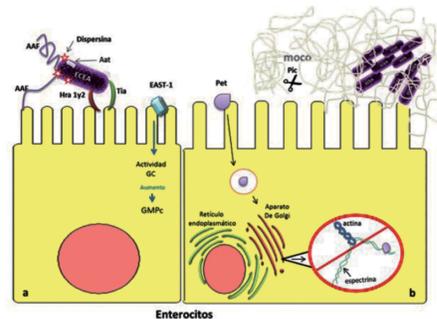


Figura 4. Representación esquemática de la patogénesis de EAEC (Tomado y modificado de Farfán-García *et al.*, 2016)

- *E. coli* enteroinvasiva (EIEC)

Los síntomas característicos en personas infectadas por EIEC son diarrea acuosa, con sangre, moco y dolor abdominal, pero en algunos casos sólo se presenta diarrea.

EIEC invade inicialmente las células M y en una vacuola fagocítica por transcitosis la bacteria atraviesa la barrera epitelial e invade los macrófagos. Posteriormente, la bacteria ingresa a las células intestinales mediante el reconocimiento de los receptores CD44 y  $\alpha 5\beta 1$ . Después de su multiplicación en el citoplasma, se desplaza lateralmente entre una y otra célula. Adicionalmente, VirA, localizada en un extremo de la bacteria, favorece la generación de protuberancias y permite el traspaso a las células proximales. Además EIEC, por medio del pili tipo 1, reconoce el receptor de la célula CEACAM6 e invade (Figura 5).

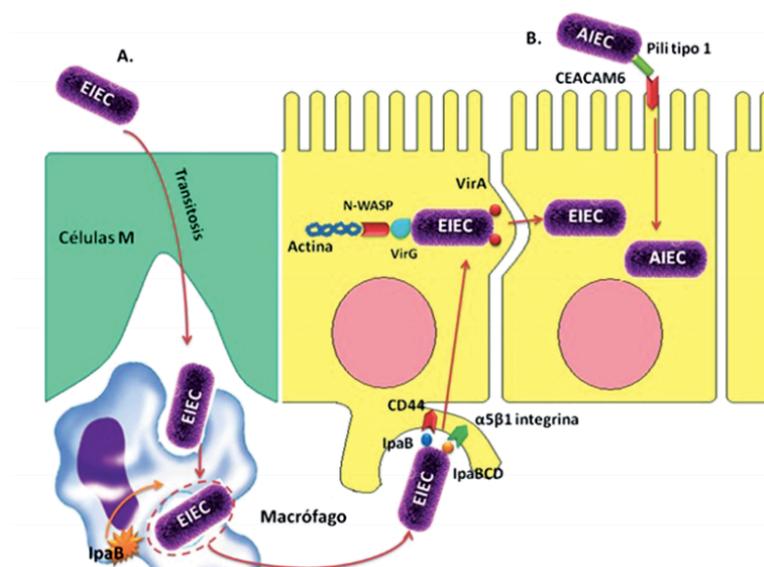


Figura 5. Representación esquemática de la patogénesis de EIEC (Tomado y modificado de Farfán-García *et al.*, 2016)

### 3. *E. coli* multirresistente portadora de ARG's en aves de producción y silvestres.

*Escherichia coli* es generalmente considerado como un comensal beneficioso del tracto gastrointestinal de los animales, sin embargo existen estudios donde este microorganismo es la mayor causa de colibacilosis en la producción avícola y aves silvestres (Cuadro 2)

Cuadro 2. Genes de resistencia a los antibióticos reportados en aislamientos de *E. coli* (Tomado y modificado de Poirel *et al.*, 2018)

Clase de antibióticos	Gen	Fuente	Región geográfica
Beta-lactámicos	<i>bla<sub>CTX-M-1</sub></i>	Aves de corral	Suecia, Gran Bretaña, Suiza y Alemania
	<i>bla<sub>CTX-M-14</sub></i>	Aves de corral	China
	<i>bla<sub>CTX-M-15</sub></i>	Aves de corral	Nigeria
	<i>bla<sub>SHV-12</sub></i>	Aves de corral y aves silvestres	España y Alemania
	<i>bla<sub>CMY-2</sub></i>	Aves silvestres, aves de corral y carne de pollo	Dinamarca, Suecia, Reino Unido, EUA, España, Alemania, Francia, Portugal, Suiza, Austria, Brasil, China y Túnez
Aminoglucósidos	<i>armA</i> , <i>rmtD</i> , <i>rmtE</i> y <i>rmtB</i>	Aves de corral enfermas	China
Fluoroquinolonas y quinolonas	<i>qnrB6</i> , <i>qepA</i> , <i>qnrB19</i> y <i>qnrS1</i>	Aves de corral	China
Fosfomicina	<i>fosA3</i>	Carne de pollo	China
Tetraciclinas	<i>tetE</i> , <i>tetD</i> , <i>tetM</i> , <i>tetA</i> , <i>tetG</i> y <i>tetC</i>	Pollos de engorda	Irán
	<i>tetA</i> y <i>tetB</i>	Gallinas	Suiza
	<i>tetA</i> , <i>tetB</i> y <i>tetC</i>	Ganso, pato, pavos y pollos	EUA
	<i>tetA</i>	Aves silvestres y aves de corral	España y Alemania
Fenicoles	<i>catA</i> y <i>cmlA1</i>	Aves de corral	Alemania
	<i>catA1</i> , <i>catA2</i> y <i>cmlA</i>	Pollos	Egipto
	<i>floR</i>	Pollos enfermos	EUA
Sulfonamidas	<i>sul1</i>	Aves de corral enfermas	EUA
	<i>sul2</i>	Aves de corral	Nigeria y Alemania
	<i>sul3</i>	Aves de corral	Alemania
Trimetoprim	<i>dfrA1</i> , <i>dfrA5</i> , <i>dfrA12</i> , <i>dfrA14</i> y <i>dfrA16</i>	Pollos	España
	<i>dfrA1</i> , <i>dfrA12</i> y <i>dfrA14</i>	Aves de corral	Lituania
Colistina	<i>mcr-1</i>	Aves de corral y carne de pollos	China, Korea del Sur, Italia,
	<i>mcr-13</i>	Aves de corral	China
	<i>mcr-18</i>	Aves de corral	Brunei

- *E. coli* en aves de producción

Un estudio realizado en China, Xie *et al.*, 2014 aislaron *Escherichia coli* en pollos con cuadros septicémicos; además reportaron una resistencia fenotípica mayor a 76% a quinolonas de segunda a tercera generación. Por otra parte, encontraron una frecuencia menor a 9% de genes relacionados a la resistencia a quinolonas.

Por otra parte, algunos resultados han demostrado que el tracto intestinal de aves clínicamente sanos pueden ser reservorios de *E. coli* patógena. Costa *et al.*, 2009 aislaron *Escherichia coli* productora de beta-lactamasas de espectro extendido en heces fecales de aves aparentemente sanos en Portugal, además reportaron que dichos aislamientos amplificaron diversos ARG's relacionados con resistencia fenotípica. Otro estudio similar realizado en Egipto reporta el aislamiento de *E. coli* en pollos de engorda con múltiples ARG's y resistencia fenotípica a 3 grupos de antibióticos (Moawad *et al.*, 2018).

Estudios sugieren que *E. coli* se puede encontrar en carne de pollo de engorda, múltiples hallazgos demuestran una contaminación asociada con operaciones destacando la necesidad de programas de monitoreo y prevención en operaciones integradas. Seo y Lee (2019), reportaron el aislamiento de *E. coli* en carne de pollo empaquetada en Korea, dichos aislamientos mostraron genes de resistencia hacia antibióticos  $\beta$ -lactámicos y quinolonas mediada por plásmidos.

Otro estudio fue realizado en Georgia por Glenn *et al.*, (2012) quienes aislaron *E. coli* de carne de canales de aves de corral, en este estudio reportan la presencia de ARG's quienes confieren resistencia al grupo de tetraciclinas, sulfonamidas, fenicoles y  $\beta$ -lactámicos (Cuadro 3).

Cuadro 3. Estudios sobre la presencia de *E. coli* en aves de producción.

Especie animal (no. de aislamientos de <i>E. coli</i> )	Resistencia a los antibióticos (%)	Frecuencia de ARG (%)	Tipo de muestra	Lugar	País	Referencia
Pollo de engorda con cuadros septicémicos (111)	Ofloxacin (99.1), ciprofloxacina (93.6), levofloxacina (91.8), norfloxacina (90) y gatifloxacina (76.5).	<i>qnrS</i> (8.1), <i>qnrB</i> (0.9) y <i>qnrA</i> (0%)	Heces fecales	Granjas de producción	Hebei, China	Xie <i>et al.</i> , 2014
Pollo de engorda (34)	Estreptomicina (76.4), tetraciclina (97), ácido nalidixico (88.2), trimetoprim-sulfametoxazol (64.7), cloranfenicol (17.6), gentamicina (11.7) y ciprofloxacina (52.9)	<i>bla<sub>TEM-52</sub></i> (76.4), <i>tetB</i> (55.8), <i>tetA</i> (50), <i>sull</i> (23.5), <i>sul2</i> (55.8) y <i>sul3</i> (11.7)	Heces fecales	Matadero	Portugal	Costa <i>et al.</i> , 2009
Pollo de engorda (17)	Tetraciclina (82.3), penicilina (47), trimetoprim-sulfametoxazol y estreptomicina (41.1), levofloxacina (17.6) y cloranfenicol (35.2)	<i>qnrS</i> (23.5), <i>tetA</i> (35.2), <i>bla<sub>TEM</sub></i> (76.4), <i>sull</i> (29.4), <i>sul2</i> (58.8) y <i>sul3</i> (47)	Cloacales	Granjas de producción	Egipto	Moawad <i>et al.</i> , 2018
Pollo de engorda (14)	Tetraciclina (78.5), cloranfenicol (64.2), gentamicina (42.8), trimetoprim-sulfametoxazol (71.4) y cefalotina (92.8)	<i>qnrS</i> (50), <i>qnrB</i> (42.8), <i>bla<sub>CTX-M-14</sub></i> (21.4) y <i>bla<sub>TEM-1</sub></i> (57.1)	Carne de pollo empacada	--	Korea	Seo y Lee 2019
Aves de corral (32)	Ceftiofur (81.2), ciprofloxacina (3.1), gentamicina y kanamicina (68.7, cada uno), ácido nalidixico (37.5) y trimetoprim (53.1)	<i>tetA</i> (100), <i>tetB</i> (18.7), <i>sull</i> (78.1), <i>sullI</i> (93.7), <i>flo</i> (87.5) y <i>bla<sub>TEM</sub></i> (65.6)	--	--	Georgia	Glenn <i>et al.</i> , 2012

En las últimas décadas, los pollos de engorda han aumentado su relevancia como productores de carne para consumo humano. El uso de antibióticos en esta especie, generalmente, se administra a toda la parvada como terapia, profilaxis y/o promotores de crecimiento; sin embargo, el uso inadecuado de antimicrobianos puede resultar en el surgimiento de bacterias multirresistentes (Balcazar, 2014).

En 2016, se vendieron 106 toneladas de sustancias activas de antibióticos para su uso en aves de corral. Este número representa el 20% de todos los antibióticos veterinarios y un consumo anual promedio de 47 mg de ingredientes activos por kilogramo de pollo producido. En el cuadro 4 se muestra la frecuencia de *E. coli* multirresistente aislada en países europeos (Roth *et al.*, 2019).

Antibiotic class	Compound	PL	GB	DE	FR	ES	Average
Number of isolates		173	190	177	188	171	
Aminoglycosides	Gentamicin	10	7	7	3	36	13
β-lactam cephalosporines	Cefotaxime	3	0	1	4	9	3
	Ceftazidime	3	0	1	2	8	3
β-lactam penicillines	Ampicillin	91	67	56	56	63	67
Diaminopyrimidines	Trimethoprim	62	43	38	47	37	45
Fenicols	Chloramphenicol	25	4	10	7	17	13
Fluoroquinolone	Ciprofloxacin	90	22	60	36	91	60
Macrolides	Azithromycin	5	0	2	0	11	4
Polimyxmins	Colistin	3	0	4	3	1	2
Quinolone	Nalidixic acid	78	21	45	34	88	53
Sulfonamides	Sulfamethoxazole	71	53	47	55	50	55
Tetracyclines	Tetracycline	73	44	28	62	61	54
	Tigecycline	2	0	0	0	0	0

PL—Poland, GB—United Kingdom, DE—Germany, FR—France, ES- Spain.

Cuadro 4. Frecuencia de *E. coli* multirresistente aislado en países europeos (Tomado y modificado de Roth *et al.*, 2019).

- *E. coli* en aves silvestres

Las aves silvestres son conocidas por ser un reservorio potencial de bacterias patógenas. Se sabe que pueden transmitir cerca de 40 enfermedades al ganado y humanos. Recientes estudios han demostrado que algunas especies de aves silvestres pueden adaptarse fácilmente a grandes urbes, además, de que las operaciones agrícolas son altamente atractivos para estas por la disponibilidad de alimento y agua (Figura 6, Figura 20) (Gaukler *et al.*, 2009).

---

<b>Viral diseases</b>
Avian paramyxovirus /Newcastle disease
Anatid herpesvirus/duck plague
West Nile virus
Avian influenza virus/AI/AIV
<b>Bacterial diseases</b>
Gastrointestinal
<i>Salmonella</i>
<i>Escherichia coli</i>
<i>Vibrio cholera</i>
<i>Pasteurella multocida</i> /avian cholera
<i>Campylobacter</i> – <i>Helicobacter</i>
<i>Yersinia</i>
<i>Clostridium botulinum</i> /avian botulism
<i>Brachyspira</i>
Respiratory
<i>Chlamydomphila psittaci</i> /chlamydiosis, ornithosis or psittacosis
Systemic
<i>Borrelia</i> /Lyme disease and borreliosis
Antimicrobial resistance
<b>Unicellular endoparasites</b>
<i>Cryptosporidium</i>
<i>Giardia</i>
<i>Microsporidium</i>

---

Figura 6. Ejemplos de patógenos asociados a enfermedades transmitidos por aves silvestre (Tomado y modificado de Elmberg *et al.*, 2017)

Existe evidencia en la que demuestran que las aves silvestres son portadoras de *Escherichia coli* portadoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido y clonas relacionadas con aislamientos clínicos en personas con infección del tracto urinario y urosepsis. Diversos autores concluyen que las  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (ESBL's) han sido introducidas a un ecosistema o lugar por aves silvestres migratorias (Bonnedahl *et al.*, 2014).

Así mismo, en un estudio realizado en España reportaron el aislamiento de cepas de *E. coli* multirresistentes a diferentes grupos de antibióticos procedentes de 15 especies de aves silvestres localizadas en un centro de recuperación de vida silvestre. Además, mencionan el aislamiento de cepas clonas entre diferentes especies de aves silvestres migratorias y que han sido reportadas en muestras clínicas humanas (Alcalá *et al.*, 2016).

El rol que juegan las aves silvestres migratorias como portadoras y diseminadoras globales de bacterias multirresistentes fue evaluado en gaviotas de nueve países europeos (Stedt *et al.*, 2014) (Cuadro 5).

	Nalidixic acid	Streptomycin	Tetracycline	Ampicillin	Chloramphenicol	Cefadroxil	Tigecycline	Nitrofurantoin	Mecillinam	Trimethoprim/sulfamethoxazole
Denmark	0.0	3.1	1.0	6.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.1
England	5.9	10.3	27.9	33.8	2.9	1.5	0.0	0.0	1.5	10.3
Ireland	0.8	0.8	2.7	1.9	0.4	0.8	0.0	0.4	0.4	0.8
Latvia, Daugava	21.4	21.4	29.0	29.9	10.3	1.8	0.0	4.0	0.4	17.4
Latvia, Kaitene	0.0	1.7	0.0	1.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Netherlands, Borsele	2.2	9.6	15.3	13.5	0.4	0.4	0.0	0.0	0.4	5.7
Netherlands, Rotterdam	5.7	7.9	12.3	8.8	2.6	0.9	0.0	0.0	0.0	5.7
Poland	3.4	3.4	6.0	6.0	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.9
Portugal, Lagos	12.0	9.4	18.3	15.7	3.7	3.1	0.0	1.0	0.0	8.4
Portugal, Portimao	8.6	14.8	25.9	17.3	4.9	0.0	0.0	0.0	2.5	12.3
Spain, Empordia	32.1	27.4	34.5	39.3	10.7	3.6	0.0	0.0	1.2	15.5
Spain, Mazzaron	36.9	28	52	44.9	20.4	11.1	0	1.3	0.4	29.8
Spain, Malaga	30.8	21.7	37.5	42.5	16.7	10.8	3.3	0.0	0.8	16.6
Sweden	2.9	6.9	10.3	13.7	2.9	2.3	0.0	0.0	0.0	4.6

Cuadro 5. Niveles de resistencia (%) de *E. coli* de gaviotas en países Europeos (Tomado y modificado de Stedt *et al.*, 2014).

Aunque las aves silvestres tienen poco o nulo contacto con agentes antimicrobianos, pueden infectarse por bacterias multirresistentes a través de la interacción con animales domésticos y humanos, este hecho es muy importante para la salud pública y veterinaria, ya que diversos reportes mencionan que la microbiota intestinal de aves silvestres puede contener *E. coli* multirresistente.

Un estudio realizado por Borges *et al.*, (2016) en Brasil, reportaron el aislamiento de *E. coli* portadora de múltiples genes de virulencia procedente de diversas especies de aves silvestres que se encontraban en un hospital veterinario de fauna silvestre, además mencionan que las aves silvestres pueden actuar como reservorio y diseminador de *E. coli* patogénica extra-intestinal pudiendo transmitirla a humanos (Stedt *et al.*, 2014).

En diversos estudios se ha mostrado que las aves silvestres que tienen algún tipo de contacto con actividades antropogénicas muestran una frecuencia alta de ARG's. Un estudio realizado por Marcelino *et al.*, (2019) reportaron que aves silvestres que se alimentan en lagunas cercanas a plantas tratadoras de agua residual tuvieron una diversidad y abundancia de ARG's, así como una cantidad significativa de clases de antibióticos a los que estos genes confieren resistencia (Figura 7).

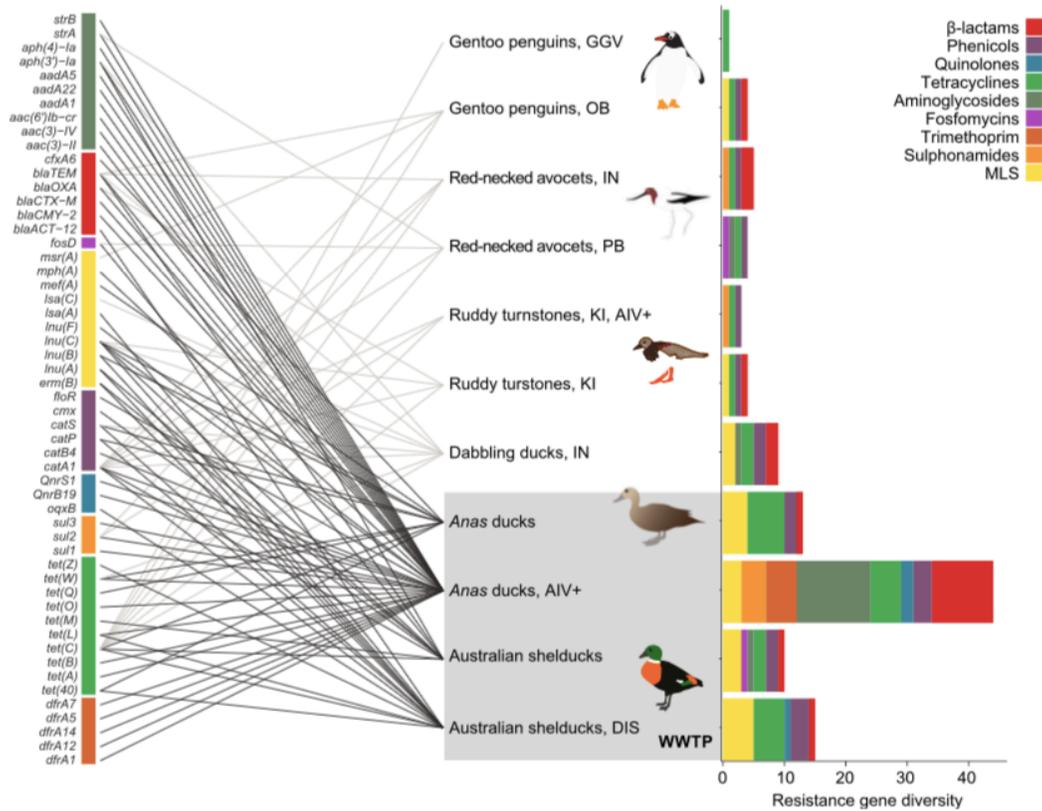


Figura 7. Diversidad de ARG's en especies de aves silvestres (Tomado y modificado de Marcelino *et al.*, 2019)

Las aves silvestres sinantrópicas portadoras de *E. coli* multirresistente con ARG's representan un peligro potencial para la salud animal y humana ya que estas cepas pueden transmitirlas a vías fluviales y otras fuentes ambientales a través de sus depósitos fecales (Cuadro 6) (Guenther *et al.*, 2010).

Cuadro 6. Estudios sobre la presencia de *E. coli* en aves silvestres

Especie animal (no. de aislamientos de <i>E. coli</i> )	Resistencia a los antibiótico (%)	Frecuencia de ARG (%)	Grupo filogenético (%)	Tipo de muestra	Lugar	País	Referencia
Gaviotas (137) <sup>a</sup>	Ampicilina (45), tetraciclina (7.3), Trimetoprim/sulfametoxazol (4.4), estreptomycin (3.6), ácido nalidíxico (2.9) y cloranfenicol (0.7)	<i>BlactX-M-14</i> , 15 y 27  <i>bla<sub>TEM-1</sub></i> y 19	--	Heces fecales	Vertedero	Alaska	Bonnedahl <i>et al.</i> , 2014
Aves silvestres (16) <sup>b</sup>	tetraciclina (75), ácido nalidíxico (87.5), sulfonamida (62.5), cloranfenicol (50) y gentamicina (18.7)	<i>tetB</i> (25), <i>tetA</i> (50), <i>sul1</i> (25), <i>sul2</i> (6.2), <i>sul3</i> (37.5), <i>qnrS1</i> (6.2) y <i>cmlA</i> (25)	A (18.7), B1 (50), B2 (6.2) y D (25)	Cloacales	Centro de Recuperación de Fauna Silvestre (CRFS)	España	Alcalá <i>et al.</i> , 2016
Aves silvestres (19)	Tetraciclina y ácido nalidíxico (52.6, cada uno), trimetoprim-sulfametoxazol y kanamicina (36.8, cada uno), gentamicina (21) y ceftriaxona (10.5)	<i>iss</i> (94.7), <i>fyuA</i> (47.4), <i>iutA</i> (10.5), <i>iroN</i> (42.1) y <i>ompT</i> (47.4)	A (5.2), B1 y B2 (42.1, cada uno) y D (10.5)	Heces fecales y orofaringe	Hospital Veterinario de vida silvestre	Brasil	Borges <i>et al.</i> , 2016
Aves silvestres (15)	Tetraciclina y estreptomycin (46.6), cloranfenicol (26.6), gentamicina (13.3), ampicilina y amoxicilina (60, cada uno)	<i>tetB</i> (93.3), <i>tetA</i> (100), <i>strA</i> (86.6), <i>strB</i> (20) y <i>sul2</i> (80)	A (26.6), Bi (6.6), B2 (46.6) y D (20)	cloacales	Aves capturadas para identificación	Alemania	Guenther <i>et al.</i> , 2010

<sup>a</sup> Solo se tomaron en cuenta los 33 aislamientos de *E. coli* productora de β-lactamasas de espectro extendido

<sup>b</sup> Se estudiaron 9 especies de aves silvestres y se consideraron solo los aislamientos resistentes a cefotaxima

#### 4. Genes de resistencia a antibióticos en ADN fágico.

Recientemente se ha incrementado la evidencia de la presencia de ARG's en el ADN fágico en diferentes ecosistemas y países:

- Fagos ambientales.

Múltiples ARG's como *qnrS*, *bla<sub>TEM</sub>*, *qnrA* y *mecA* han sido reportados en fagos aislados en plantas tratadoras de agua residual y aguas residuales humanas y animales.

Un estudio realizado en Madrid (Colomer *et al.*, 2011), demuestra una frecuencia alta de ARG's en fagos aislados de plantas tratadoras de agua residual para uso urbano; lograron detectar, , bacteriófagos con los genes *mecA* y el gen *bla<sub>TEM</sub>* (Figura 8).

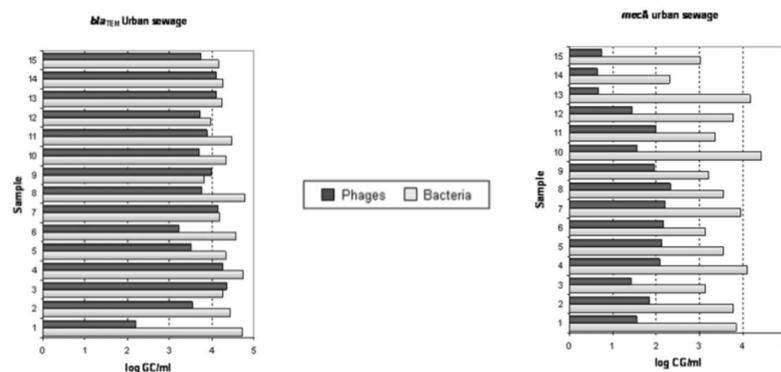


Figura 8. Número de copias del gene *bla<sub>TEM</sub>* (CG/mL) en agua residual urbana en DNA fágico y bacteriano (Tomado y modificado de Colomer *et al.*, 2011).

El agua residual animal es otro ambiente en el que, diversos estudios, han reportado la presencia de fagos portadores del gen *qnrA* con una prevalencia de 71.4%. Diversos estudios concluyen que los fagos portadores de ARG's juegan un rol muy importante en la movilización de estos en el medio ambiente (Figura 9) (Colomer *et al.*, 2014b).

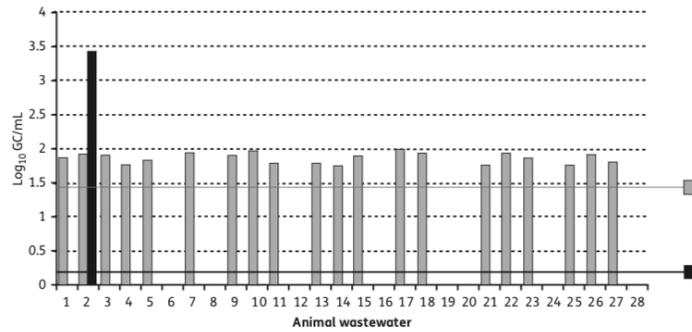


Figura 9. Densidad del gen qnrA (CG/mL) en DNA fágico en agua residual animal (Tomado y modificado de Colomer *et al.*, 2014b).

Un estudio realizado en Barcelona reporta que diversos métodos de desinfección (alteración de pH, radiación por UV, variación de temperatura y la cloración) en plantas tratadoras de agua residual no son efectivos para fagos revelando que la cloración fue el método mas efectivo para la disminución de 3.15 a 2.96 log<sup>10</sup> CG/mL del gen *bla<sub>TEM</sub>* en el ADN fágico (Calero-Cáseres *et al.*, 2016).

- Fagos en heces humanas y animales.

La presencia de fagos portadores de ARG's en heces humanas y animales representa un riesgo eminente de transmitirlos directa o indirectamente a semejantes. Un estudio realizado en Barcelona, Quirós *et al.* (2014) recolectaron, de un hospital, 80 muestras de pacientes de entre un rango de 6 meses a 102 años de edad; reportaron una prevalencia considerable de diversos ARG's en el ADN fágico (Figura 10).

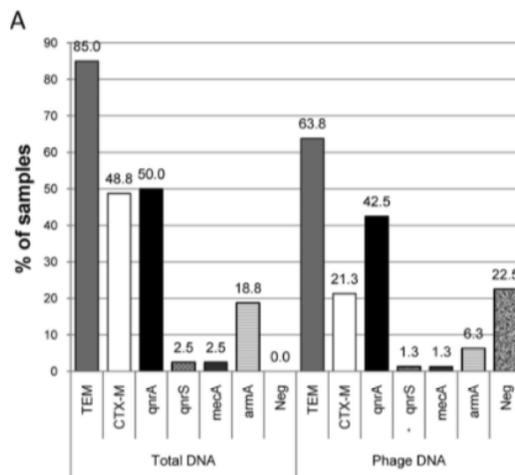
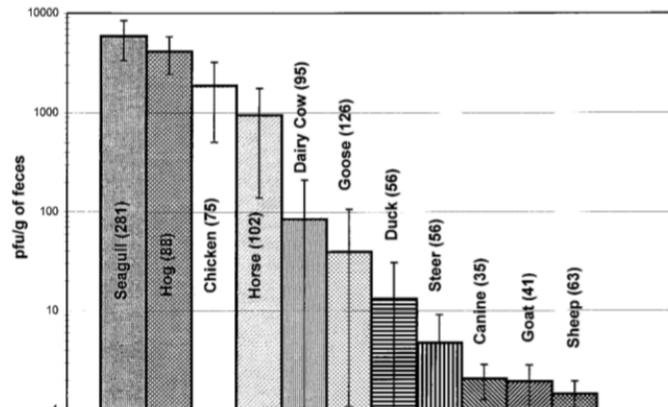


Figura 10. Proporción de cada ARG en ADN fágico y bacteriano (Tomado y modificado de Quirós *et al.*, 2014)

Calci *et al.*, 1998, demostraron la existencia de bacteriófagos en heces fecales de multiples especies de animales, sin embargo no mencionan la presencia de ARG's. Los resultados de este estudio demostraron que en áreas afectadas, son los residuos de heces fecales animales y humanos los principales mecanismos de la diseminación de bacteriófagos (Figura 11)

Figura 11. Densidad de PFU en heces de especies animales (Tomado y modificado de Calci *et al.*, 1998)



Los fagos integrados, o no, en bacterias pueden ser consumidos accidentalmente creando un ciclo de diseminación exponencial (Quirós *et al.*, 2014; Kobayashi *et al.*, 2009).

- Profagos.

Se le conoce como profago a la estancia del ADN vírico en el genoma bacteriano y su presencia ha sido preocupantemente descrita en multiples estudios, ya que, debido a la capacidad de conversión lisogénica puede provocar la aparición de nuevos patógenos y en consecuencia de nuevas enfermedades, posiblemente, mortales (Diene *et al.* 2017; Shousa *et al.*, 2015).

Un estudio realizado por Anand *et al.*, 2016, revelaron la presencia de multiples ARG's aislados de ADN fágico que se encontraba en diferentes familias de bacterias. Las bacterias fueron aisladas de diferentes fuentes (Figura 12).

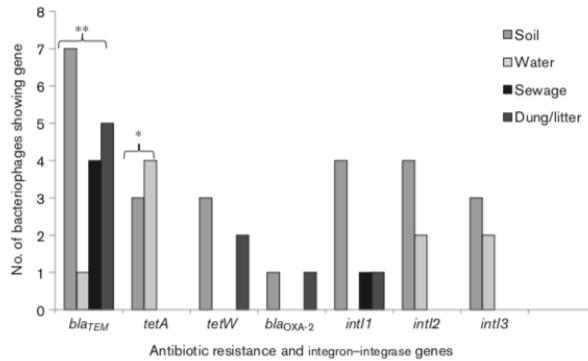


Figura 12. Fuente de aislamiento y presencia de ARG's en ADN fágico (Tomado y modificado de Anand *et al.*, 2016)

## 5. Transducción.

La transducción es el proceso mediante el cual, los bacteriófagos transfieren DNA bacteriano de un hospedador a otro.

Se han reconocidos dos tipos de transducción (Figura 13):

- Transducción especializada. Este proceso ocurre, frecuentemente, durante la lisogenia. El profago toma el cromosoma (regiones específicas) bacteriano adyacente al sitio de anclaje y lo almacena en su cápside. Durante el próximo ciclo de infección, los fagos atemperados pueden inducer un cambio en el fenotipo del hospedador a través de la conversión lisogénica (Balcazar, 2014; Shousa *et al.*, 2015).
- Transducción generalizada. El fago toma, al azar, una porción genómica del hospedador (donante) y la puede transferir a una bacteria recipiente (Balcazar, 2014).

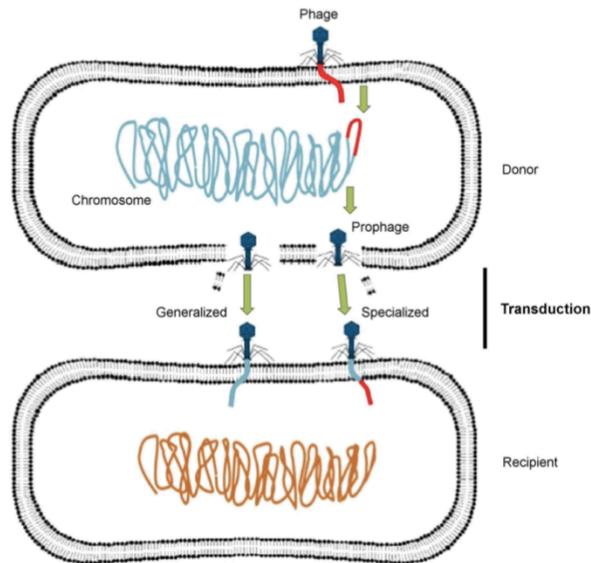


Figura 13. Transferencia de ADN entre bacterias vía fágica (Tomado y modificado de Balcazar, 2014)

La conversión lisogénica se define como un proceso por el cual una bacteria, que se encuentra en estado lisogénico, expresa los genes que el bacteriófago porta. El proceso de conversión influye en las siguientes condiciones:

- Expresión de genes profágicos en estado lisogénico. Al momento en que el ADN fágico se interna en el cromosoma bacteriano adquiere el nombre de profago, este comienza a expresar genes antirepresores y represores que van a definir el futuro de su ciclo biológico (ciclo lisogénico o lítico).
- Resistencia fágica y fisiológica. Los profagos pueden expresar genes que evitan la superinfección (infección de fagos a bacterias lisogenizadas), de igual manera pueden modificar proteínas como LPS que, generalmente, usan los bacteriófagos para realizar el proceso de adsorción.

- Genes de virulencia. Los profagos pueden modificar proteínas de la membrana externa de la bacteria que usan como factores de virulencia, por ejemplo, profagos localizados en *Salmonella* pueden modificar las proteínas de adherencia (Figura 14) (Wahl *et al.*, 2018).

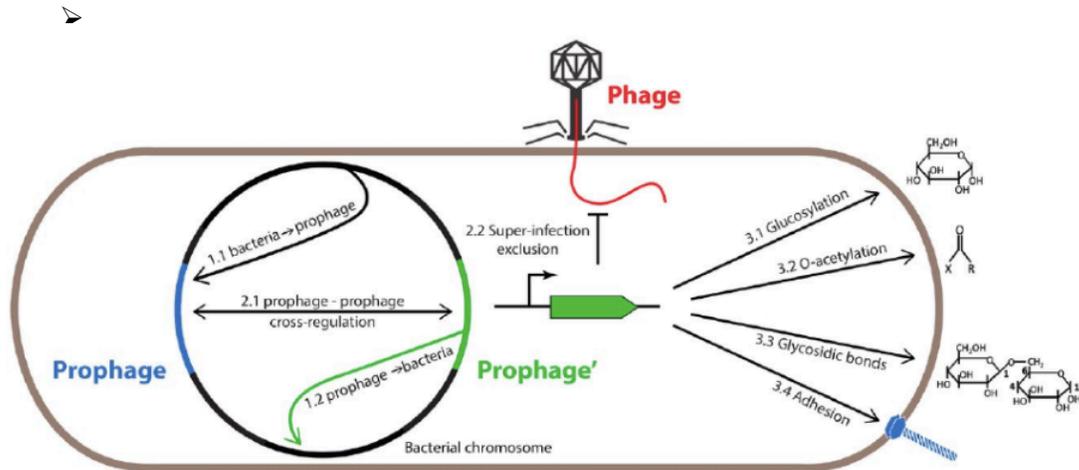


Figura 14. Interacciones entre profagos y *Salmonella spp* (Tomado y modificado de Wahl *et al.*, 2018).

En un estudio realizado en Suiza, reportaron el aislamiento de *Staphylococcus aureus* ST398 portadores de múltiples profagos. La caracterización de profagos reveló la presencia de 44 factores de virulencia.

Además, se desarrolló un árbol filogenético en el que aislamientos de *Staphylococcus aureus* de animales portadores de profagos tienen una estrecha relación con aislamientos clínicos humanos. Los autores sugieren que los bacteriófagos y la lisogenia ha jugado un rol muy importante en elevar la habilidad de ST398 para causar infecciones humanas (Figura 15) (Diene *et al.*, 2017).

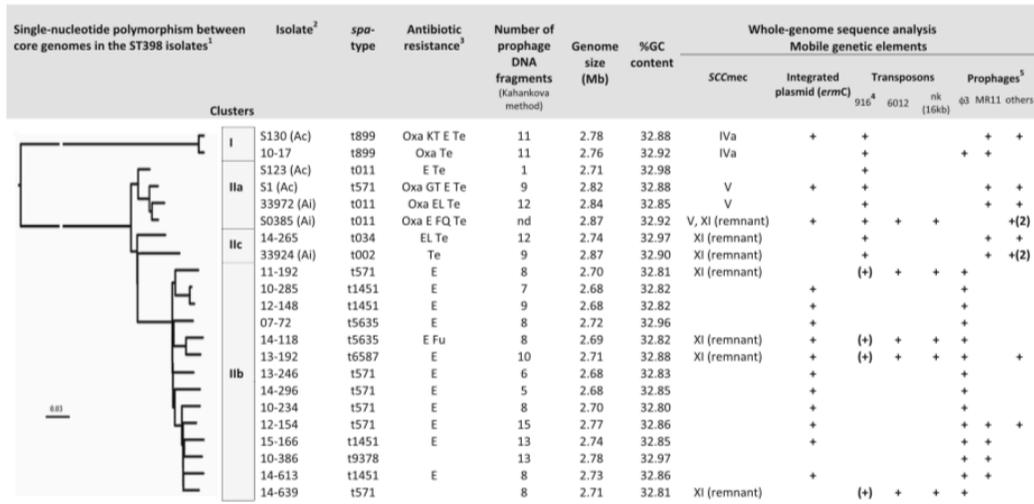


Figura 15. Análisis genómico de ST398 (Tomado y modificado de Diene *et al.*, 2017)

Otro estudio realizado por Iversen *et al.*, (2015), reportó que una alta proporción de *E. coli* comensales aisladas de niños saludables fueron lisogenizadas por el fago  $\phi$ 734 portador de Stx2 y aislado de O103:H25 causante de un brote en 2006 que afectó a niños con HUS. Además, 33% de las cepas lisogenizadas mostraron conversión lisogénica al producir altos niveles de fagos cuando entraron al ciclo lítico espontáneamente (Figura 16).

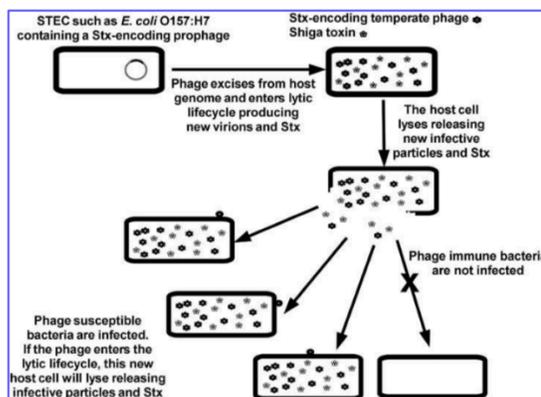


Figura 16. Representación esquemática de un fago portador de Stx y amplificación de toxina shiga en bacterias comensales (Tomado y modificado de Brabban *et al.*, 2015).

En Austria, Shousha *et al.*, (2015), aislaron bacteriófagos procedentes de *E. coli* resistentes a antibióticos en carne de pollo. Los bacteriófagos fueron capaces de transducir la resistencia fenotípica a cepas de referencia de *E. coli*. En el cuadro 7 se muestran algunos ejemplos de bacteriófagos, los cuales, infectaron a una amplia variedad de bacterias y transdujeron diversos factores de virulencia.

<i>Virulence factor (gene)</i>	<i>Example bacteriophage(s)</i>	<i>Bacterial host(s)</i>	<i>Reference</i>
Shiga toxin 1 (Stx1)	H-19B, VT2-Sakai	<i>Escherichia coli</i> <i>Shigella dysenteriae</i> <i>Shigella</i> spp.	De Grandis <i>et al.</i> , 1987; Makino <i>et al.</i> , 1999
Shiga toxin 2 (Stx2)	933W, $\phi$ 3538 VT1-Sakai	<i>Escherichia coli</i> <i>Shigella dysenteriae</i> <i>Shigella</i> spp.	Plunkett <i>et al.</i> , 1999; Schmidt <i>et al.</i> , 1999; Yokoyama <i>et al.</i> , 2000
Cholera toxin ( <i>ctxAB</i> )	CTX $\phi$	<i>Vibrio cholerae</i> <i>Shigella dysenteriae</i> <i>Shigella</i> spp.	Faruque <i>et al.</i> , 1998; Mekalanos <i>et al.</i> , 1997; Waldor <i>et al.</i> , 1997
Type III effector protein SopE	SopE $\phi$	<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium	Hapfelmeier <i>et al.</i> , 2004; Miroid <i>et al.</i> , 1999
Cytotoxin Exofoliative toxin A Exotoxin A (erythrogenic toxin) Enterotoxin A Enterotoxin P	$\phi$ CTX $\phi$ MU50A, $\phi$ ETA T12 $\phi$ 13, $\phi$ 315	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Streptococcus pyrogenes</i> <i>Streptococcus pyrogenes</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	Nakayama <i>et al.</i> , 1999 Yamaguchi <i>et al.</i> , 2000 Weeks and Ferretti, 1984 Betley and Mekalanos, 1985; Casman, 1965; Coleman <i>et al.</i> , 1989
Botulinum toxin C	c-st, CE $\beta$	<i>Clostridium botulinum</i>	Eklund <i>et al.</i> , 1971; Tsuzuki <i>et al.</i> , 1990
Botulinum toxin D	d16 $\phi$	<i>Clostridium botulinum</i>	Eklund <i>et al.</i> , 1972; Sunagawa <i>et al.</i> , 1992

Cuadro 7. Ejemplos de bacteriófagos portadores de factores de virulencia y bacterias objetivo (Tomado y modificado de Brabban *et al.*, 2015).

## 6. Bacteriófagos.

Los bacteriófagos son virus que infectan específicamente a bacterias. Fueron descritos, aparentemente, por primera vez en 1896 por Ernest Hankin quien publicó el artículo “L’action bactéricide des eaux de la Jumma et du Gange sur le microbe du choléra” donde menciona la acción y el poder bactericida del agua de estos ríos ubicados en la India, además, se percató que esta acción se podía observar solo si se filtraba y no se hervía el agua de estos ríos. Sin estar seguro del causal de la acción bactericida, propuso beber agua filtrada de estos ríos para contrarrestar los brotes de cólera, autores coinciden que esta fue la primera vez en que se planteó la utilización de una terapia fágica y concuerdan en que

el agente que ocasionaba la disminución de bacterias eran los bacteriófagos. Recientemente, se han realizado estudios en el río Ganges reportando el aislamiento de fagos que combaten a *Escherichia* spp. Hoy en día, los habitantes que dependen de este río lo consideran sagrado con propiedades especialmente curativas. Después de la publicación realizada por Ernest Hankin, existen aproximadamente unos 23 reportes donde describen una actividad lítica ligada, presuntivamente, a los bacteriófagos (Khairnar, 2016; Abedon *et al.*, 2011a; Hankin, 1896; Landes Bioscience, 2011; Sulakvelidze *et al.*, 2001; Tiwari *et al.*, 2014; Roy y Yusuf, 2013; Sharp, 2001).

Posteriormente Frederick William Twort, a los 16 años, emigró a la ciudad de Londres donde laboró en el laboratorio del hospital St. Thomas obteniendo una extensa experiencia en la manipulación de bacterias. Después de ocho años se trasladó al laboratorio de William Bulloch, y en 1905 dio a conocer una tinción nombrada “tinción Gram-Twort”. Posteriormente, en 1909 ocupó el cargo oficial de director del Instituto Brown donde se brindaba servicios de medicina veterinaria y en el cual realizó diversas investigaciones en bioquímica microbiana. En 1915, publicó el artículo: An investigation on the nature of ultra-microscopic viruses, en la revista The Lancet, donde describe la contaminación de colonias de *Micrococcus* por unas manchas de actividad lítica y con aspecto transparente-vidrioso. En el artículo, Twort planteó tres posibles causas por las que aparecían las enigmáticas manchas: 1) posible manifestación inusual del ciclo de vida de la bacteria, 2) autodestrucción bacteriana por enzimas y, 3) virus ultramicroscópico. Twort no pudo afirmar, ni rechazar ninguna de sus hipótesis a causa de los recortes financieros provocados por el inicio de la primera guerra mundial (Duckworth, 1976; Keen, 2014; Twort, 1915; Thomas, 2014; Wittebole *et al.*, 2014).

En 1917, cuando la guerra aún continuaba, Félix Hubert d’Herelle reportó a la academia francesa unas manchas con características similares a las que había observado Twort en 1915. En este reporte se afirmaba que las manchas eran causadas por virus, a los que bautizó como bacteriófagos. A pesar de que por mucho tiempo d’Herelle estuvo portando la capa y estandarte del descubrimiento de los bacteriófagos usándolos como herramienta terapéutica, se le negó el crédito absoluto del hallazgo debido a que Twort mandó dos notas

a la revista *The Lancet*, mencionando que él había sido el primero en observar las manchas transparentes. Muchos autores sugieren que d'Herelle no fue absolutamente honesto cuando negó conocimiento alguno de los trabajos realizados anteriormente por Twort. Por todo esto, la comunidad científica adoptó el nombre de “fenómeno de Twort - d'Herelle” y más tarde como el “fenómeno del bacteriófago” (Sulakvelidze *et al.*, 2001; Duckworth, 1976; Twort, 1921; Twort, 1925).

En la actualidad, compañías internacionales comercializan productos fágicos aprobados por la USDA y bajo el status de Generally Recognized As Safe (GRAS) de la FDA que son usados como agentes desinfectantes en alimentos procesados (Aminov *et al.*, 2017; Kutter *et al.*, 2015). Además, Microgen, una compañía farmacéutica rusa, produce una amplia variedad de preparaciones fágicas disponibles para médicos y farmacias locales y su venta online para la distribución en cualquier país (Cuadro 8) (Abedon *et al.* 2011b; Brüssow H 2017; Clark JR 2015)

Cuadro 8. Productos fágicos comercializados en la actualidad.

Compañía	Producto (bacteria objetivo)	Uso
Intralytix, Inc. Baltimore, MD USA	ListShield™ ( <i>Listeria monocytogenes</i> )	Control de patógenos bacterianos en instalaciones de procesamiento de alimentos listos para el consumo humano
	EcoShield™ ( <i>Escherichia coli</i> O157:H7)	
	SalmoFresh™ ( <i>Salmonella</i> spp)	
	ShigaShield™ ( <i>Shigella flexneri, sonnei</i> and <i>dysenteriae</i> )	
	Ecolicide® ( <i>Escherichia coli</i> O157:H7)	Control de patógenos bacterianos en alimentos para mascotas
	SalmoLyse® ( <i>Salmonella</i> spp)	
	ListPhage® ( <i>Listeria monocytogenes</i> )	
Omnilytics™ Sandy, Utah USA	Agriphage™ ( <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>Vesicatoria</i> or <i>Pseudomonas syringae</i> )	Control de infección bacteriana en tomates y pimienta
Microgen	Dysentery polyvalent bacteriophage ( <i>Shigella flexneri</i> serovariedades 1, 2, 3, 4 y 6 and <i>Shigella sonnei</i> )	Tratamiento y profilaxis de la disentería bacterial.
	Intesti-bacteriophage ( <i>Shigella</i> spp, <i>Salmonella</i> spp, <i>E. coli</i> , <i>Proteus</i> spp, <i>Enterococcus</i> , <i>Staphylococcus</i> and <i>P. Aeruginosa</i> )	Tratamiento y profilaxis de enfermedades del tracto gastrointestinal.
	<i>E. coli</i> – <i>Proteus</i> bacteriophage ( <i>Proteus</i> spp and <i>E. coli</i> )	Tratamiento y profilaxis de enfermedades del tracto respiratorio, sépticas, supurativas inflamatorias (recién nacidos) e infecciones quirúrgicas, genitourinarias y enterales.
	<i>Streptococcus</i> bacteriophage ( <i>Streptococcus</i> )	
	<i>E. coli</i> bacteriophage ( <i>E. coli</i> enterotoxigénica)	Tratamiento y profilaxis de enfermedades del tracto respiratorio, sépticas, supurativas inflamatorias (recién nacidos) e infecciones quirúrgicas, genitourinarias y enterales; conjuntivitis postraumática
	Complex bacteriophage ( <i>Staphylococcus</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Proteus</i> spp, <i>Streptococcus</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Klebsiella</i> spp and <i>E. coli</i> )	
	Sextaphag® polyvalent pyobacteriophage ( <i>Staphylococcus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Proteus</i> spp, <i>P. aeruginosa</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> and <i>E. coli</i> enteropatógena)	
<i>Klebsiella</i> purified polyvalent bacteriophage ( <i>Klebsiella</i> spp)	Tratamiento y profilaxis de enfermedades del tracto gastrointestinal, inflamatorias (recién nacidos), supurativas e infecciones quirúrgicas y genitourinarias; conjuntivitis postraumática	
Microcos Wageningen, The Netherlands	PhageGuard Listex, antes Listex™ ( <i>Listeria</i> spp)	Eliminación bacteriana en productos alimenticios (meat, poultry, fish, seafood, cheese, fruits, vegetables y plantas procesadoras de alimentos)
	PhageGuard S, antes Salmonalex™ ( <i>Salmonella</i> spp)	

## Morfología de los bacteriófagos

Los bacteriófagos están constituidos por una molécula de ácido nucleico, poseen un tamaño que varía entre 20 a 200 nanómetros y participan activamente en la vida de las bacterias codificando la producción de enzimas y de toxinas, así como en la transferencia de genes entre bacterias. Estos están constituidos por:

- Cabeza. También se le llama cápside y puede ser de forma icosaédrica o helicoidal. Contiene la información genética del fago ya sea ADN o ARN.
- Cola. Consiste en un tubo hueco central y está constituida por un collar que la une a la cabeza, además de una vaina que rodea al tubo, está compuesta por glicoproteínas, tiene la capacidad de contraerse al momento de la inyección del material genético del fago.
- Placa basal. Esta placa es hexagonal y tiene un gancho y unas fibras del tallo articulada en cada ángulo; las fibras son las encargadas de la interacción con la pared celular de la bacteria (Figura 17) (Guttman *et al.*, 2005; Fernández *et al.*, 2004; Prescott *et al.*, 2004; Wittebole *et al.*, 2014).

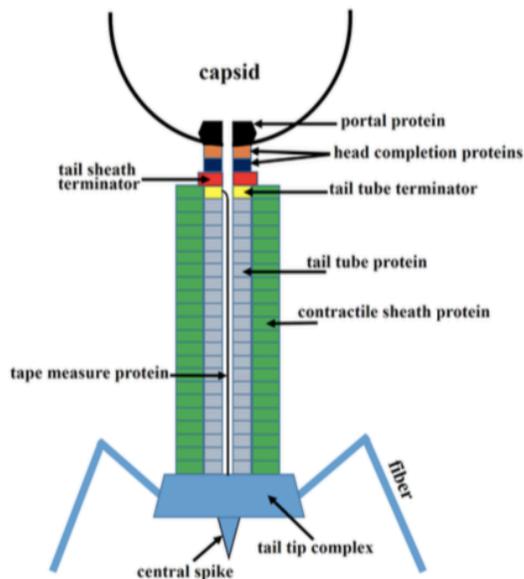


Figura 17. Representación esquemática de la cabeza, cola y placa basal de un fago *Myoviridae* (Tomado y modificado de Fokine y Rossmann, 2014)

Desde 1959, al menos 5568 bacteriófagos han sido examinados. Evidencia microscópica electrónica revela que 96.2% (5360) de los fagos tienen cola y están asignados al orden *Caudovirales* que conforman tres familias: *Myoviridae* (24.5%), *Siphoviridae* (61%) y *Podoviridae* (14%). El 3.7% restante (208 fagos) son polihedricos, filamentosos o pleomórficos y abarcan 17 familias (Cuadro 9) (Wittebole *et al.*, 2014; ICTV, 2014; Ackermann, 2001; Ackermann, 2005; Ackermann, 2007).

Cuadro 9. Clasificación taxonómica de los bacteriófagos.

ORDEN	FAMILIA	FORMA	ACIDO NUCLEICO	PARTICULARIDADES	EJEMPLO
<i>Caudovirales</i>	<i>Myoviridae</i>	Fagos con cola	ADN de doble cadena	Cola contráctil	T4
	<i>Siphoviridae</i>			Cola larga no contráctil	$\lambda$
	<i>Podoviridae</i>			Cola corta	T7
	<i>Microviridae</i>		ADN de una cadena		$\Phi$ X174
	<i>Corticoviridae</i>	Polihedros	ADN de doble cadena	Cápside compleja, lípidos	PM2
	<i>Tectiviridae</i>			Vesícula lipídica interna	PRD1
	Grupo <i>SHI</i>			Vesícula lipídica interna	SH1
	Grupo <i>STV1</i>				STIV
	<i>Leviviridae</i>			ARN de una cadena	Semejante a poliovirus
		<i>Cystoviridae</i>		ARN de doble cadena	Formado por lípidos
No asignado	<i>Inoviridae</i>		ADN de una cadena	Filamentos grandes	fd
	<i>Lipothrixviridae</i>	Filamentosos	ADN de doble cadena	Formado por lípidos	TTV1
	<i>Rudiviridae</i>			Semejante a TMV	SIRV-1
	<i>Plasmaviridae</i>			Sin cápside, y con lípidos	L2
	<i>Fuselloviridae</i>	Pleomórficos	ADN de doble cadena	En forma de limón	SSV1
	<i>Salterprovirus</i>			En forma de limón	His1
	<i>Guttaviridae</i>			En forma de gota	SNDV
	<i>Ampullaviridae</i>			En forma de botella	ABV
	<i>Bicaudaviridae</i>			Dos colas	ATV
	<i>Globuloviridae</i>		Semejante a paramyxovirus	PSV	

### Ciclos biológicos.

Una de las clasificaciones de los bacteriófagos se refiere al tipo de ciclo biológico que desarrolla:

✓ **Lítico.** Se refiere al proceso mediante el cual, los bacteriófagos, destruyen a la célula huésped por medio de lisis. Toda la maquinaria metabólica de la bacteria es “secuestrada” para replicar y transcribir el ADN fágico. Los fagos mas estudiados son los “T” par (T2, T4, etc.) (Morse y Meitzner, 2011; Refardt, 2011; Hooton *et al.*, 2011).

✓ Lisogénico. Los bacteriófagos infectan a la bacteria, incorporando su material genético en el genoma bacteriano generando un profago. Este genoma viral se replica en sincronía con el cromosoma bacteriano (Madigan *et al.*, 2004; Balcazar, 2014; Refardt, 2011; Dini, 2011; Hooton *et al.*, 2011). En la figura 18 se representa el ciclo lítico y lisogénico de los bacteriófagos.

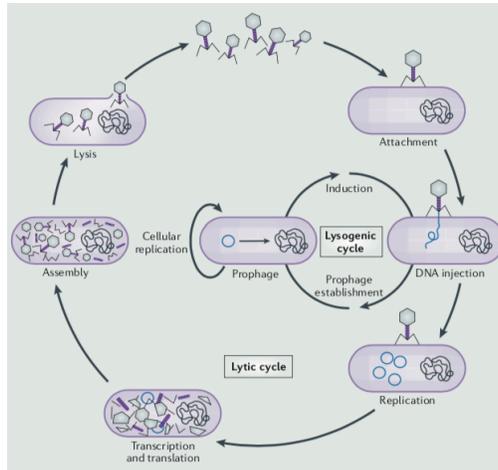


Figura 18. Ciclos biológicos de los bacteriófagos (Tomado y modificado de Salmond y Fineran, 2015)

En cada uno de los ciclos biológicos, el proceso de infección y replicación se lleva a cabo por etapas:

1. Unión o fijación (adsorción) del virus a una célula huésped

Las fibras del tallo hacen contacto con receptores específicos mediante sus adhesinas provocando que la placa basal asiente en la superficie. Los receptores componentes normales del hospedador, tales como proteínas, carbohidratos, glicoproteínas, lípidos y lipoproteínas, si el receptor se altera, el hospedador puede hacerse resistente a la infección vírica, sin embargo, algunos bacteriófagos son capaces de utilizar más de un receptor (Figura 19) (Madigan *et al.*, 2004; Dini, 2011; Shin *et al.*, 2012; Prescott *et al.*, 2004).

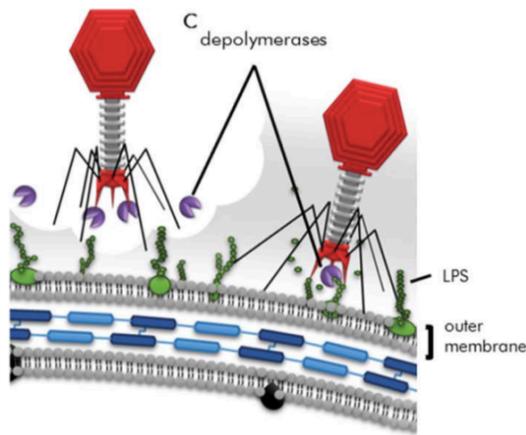


Figura 19. Representación esquemática de la adsorción del bacteriófago a la célula hospedadora (Tomado y modificado de Roach y Donovan, 2015)

## 2. Penetración (inyección) del material genético del fago.

La lisozima origina la formación de un orificio, posteriormente la vaina se reorganiza de tal manera que se contrae, haciéndose más corta y ancha, y es entonces cuando el tubo central es empujado a través de la pared celular bacteriana. Finalmente, el ADN es extruido de la cabeza, pasa a través del tubo del tallo penetrando en la célula huésped (Figura 20) (Spricigo, 2011; Madigan *et al.*, 2004; Prescott *et al.*, 2004; Bertin *et al.*, 2011).

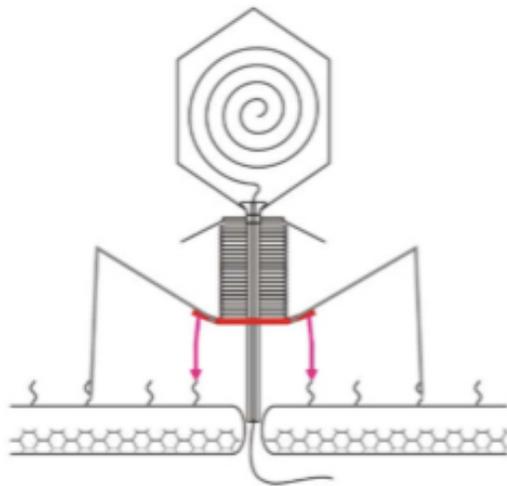


Figura 20. Inserción del ADN fágico al hospedador (Tomado y modificado de Leiman *et al.*, 2010)

## 3. Síntesis del ácido nucleico y de proteínas

Para que se lleve a cabo el ciclo lisogénico es necesario que participen los fagos atemperados como es el caso de lambda, específico para *E. coli* (Figura 21).

El ADN del fago lambda se circulariza inmediatamente después de la inyección, debido a que la ligasa de *E. coli* une los extremos cohesivos. Una vez circularizado el fago, el ARN polimerasa del hospedador, inicia la producción de ARN vírico comenzando en el promotor

PL (promotor izquierdo) y PR (promotor derecho) que transcribe en ambas direcciones. Estos promotores producen las proteínas antiterminadoras Cro y N, las cuales, permiten a la ARN polimerasa transcribir las proteínas CIII y CII (Madigan *et al.*, 2004; Kropinski *et al.* 2007).

El antiterminador Cro produce la proteína Q, la cual permite la transcripción de proteínas tardías (proteínas de la cabeza y de la cola, y enzimas relacionadas con la liberación de las partículas de fagos maduros de la célula). Posteriormente, la proteína Cro bloquea la transcripción a partir de PL y PR mediante la unión a OL (operón izquierdo) y OR (operón derecho). Una vez que PL y PR están bloqueados, no se sintetizan más proteínas CIII y CII, las cuales, son necesarias para entrar al ciclo lisogénico. El bloqueo de estos promotores provoca el mecanismo de replicación mediante círculo rodante. En este mecanismo se produce un corte de una cadena, generando una cola de cadena sencilla y puede convertirse en cadena doble mediante la síntesis de una cadena complementaria, posteriormente son cortados en fragmentos adecuados por una DNAsa (Madigan *et al.*, 2004; Prescott *et al.*, 2004).

Por otra parte, para que se active el ciclo lisogénico de lambda se requiere que la proteína CII active PE (promotor del establecimiento de lisogenia) y que este se una a OL y OR para dar lugar a síntesis de la proteína *cl*, la cual, va a cesar la producción de proteínas tardías. Una vez ocurrido esto, la sección *attP* del fago reconoce el IHF (factores de integración del hospedador) para poder unirse al genoma bacteriano. La proteína excisiona permite la liberación del profago y cuando se somete a la luz ultravioleta o a los rayos X entra en el ciclo biológico lítico (Kropinski *et al.*, 2007; Prescott *et al.* 2004).

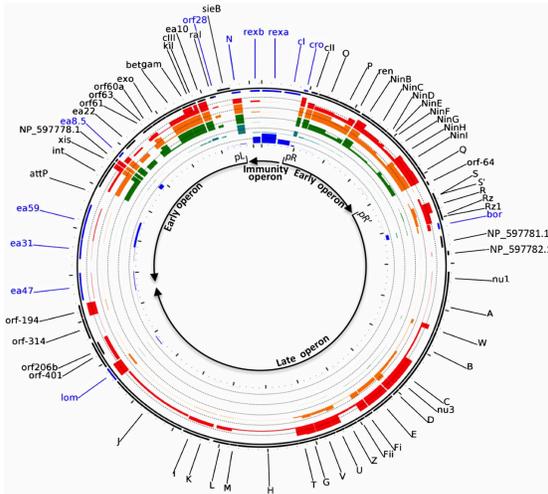


Figura 21. Esquema del genoma fágico de lamda (Tomado y modificado de Liu *et al.*, 2013)

#### 4. Ensamblaje y empaquetamiento del ácido nucleico.

Todas las proteínas necesarias para el ensamblaje de fagos se sintetizan de forma simultánea. Cuando se ha finalizado la placa basal, se construye sobre ella el tubo del tallo y se ensambla la vaina alrededor de este. La procápside del fago se construye de forma independiente, la cual, se combina espontáneamente con el conjunto ensamblado del tallo. En la base de la procápside, en su punto de unión con la cola, se localiza la proteína portal que ayuda a iniciar el ensamblaje de la cabeza, una vez ensamblada las moléculas de ADN se empaquetan dentro. Las fibras del tallo se unen a la placa basal una vez que se han unido la cabeza y cola (Figura 22) (Madigan *et al.*, 2004; Prescott *et al.*, 2004).

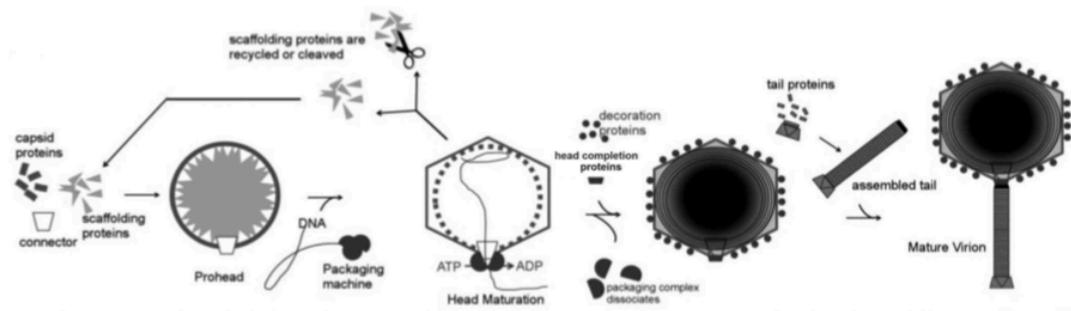


Figura 22. Representación esquemática del ensamble del fago (Tomado y modificado de Fokine y Rossmann, 2014)

## 5. Liberación de viriones maduros

Una vez que los bacteriófagos estén en una etapa madura (ensamblaje completo), este puede codificar y liberar la holina y endolisina (proteínas líticas), la primera provoca una lesión en la membrana citoplasmática, permitiendo que la endolisina se ancle y destruya el peptidoglicano de la célula hospedadora (figura 23) (Elbreki *et al.*, 2014).

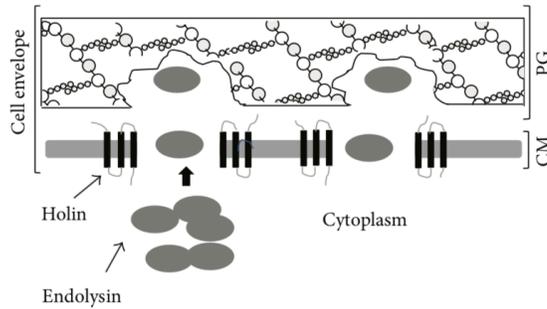


Figura 23. Representación esquemática del modo de acción de las proteínas líticas derivadas de bacteriófagos. Membrana citoplasmática (CM) y peptidoglicano (PG). (Tomado y modificado de Elbreki *et al.*, 2014).

## JUSTIFICACIÓN

El descubrimiento de los antibióticos representa uno de los avances científicos más importantes y relevantes del siglo pasado, estos han sido usados en el tratamiento de enfermedades en la medicina veterinaria y humana. Sin embargo, su uso injustificado al emplearse como promotores de crecimiento y aditivos alimenticios para una mayor ganancia de peso en la industria cárnica ha provocado un desarrollo y prevalencia acelerada de bacterias multirresistentes (Saliu *et al.* 2017).

La Organización Mundial de la Salud ha puesto a la familia *Enterobacteriaceae* productoras de beta-lactamasas (ESBL) como prioridad crítica para la supervisión de resistencia antibacteriana (WHO, 2017), debido al aumento de su prevalencia en aislados clínicos, animales de compañía y de corral; así mismo destacando a la gran porción poblacional afectada por la resistencia a las cefalosporinas de última generación (Parker *et al.*, 2016)

Las aves de corral se han visto afectadas por la multirresistencia al registrar pérdidas económicas considerables en la industria cárnica (Koga *et al.* 2015; Brower *et al.* 2017; El-Shazly *et al.* 2017; Pavlickova *et al.* 2015), cabe señalar que los productos cárnicos derivados de estas aves representan, mundialmente, la segunda fuente de alimento más común (35.2%) solo por debajo de los de cerdo (36.3%) (Saliu *et al.* 2017). A pesar de que los grupos filogenéticos de *E. coli* reportados con más frecuencia en aves de corral y aves en producción convencional son A y B1, los cuales son considerados comensales; también han sido reportados los grupos B2 y D, que son ligados a actividad patógena, estos con menos frecuencia (Koga *et al.* 2015; El-Shazly *et al.* 2017; Pavlickova *et al.* 2015).

En múltiples reportes muestran que la carne de pollo es la principal fuente de contaminación por *E. coli* y *Salmonella* portadoras de genes de resistencia y factores de virulencia comparada con carne de bovino y porcino. Estos patógenos pueden ser transmitidos a humanos (Overdevest *et al.* 2014; Hiroi *et al.* 2012; Koga *et al.* 2015). En estudios recientes han reportado que la resistencia más frecuente es hacia la tetraciclina y ampicilina, seguida por ácido nalidíxico y trimetoprim-sulfametoxazol (Koga *et al.* 2015;

Pavlickova *et al.* 2015; Brower *et al.* 2017; El-Shazly *et al.* 2017). Además, una resistencia cada vez mas frecuente hacia las cefalosporinas de tercera generación en granjas de producción convencionales (Koga *et al.* 2015).

Algunos genes que confieren resistencia a los antibióticos (*bla<sub>TEM</sub>*, *qnrA*, *qnrB*, *tet*, *sul*) son ampliamente descritos en la producción avícola a nivel mundial aumentando la preocupación debido a las pérdidas económicas y a su potencial de transmisión (Mo *et al.* 2016; Xie *et al.* 2014; van Hoek *et al.* 2016). En los últimos años se ha registrado un incremento de la prevalencia de *E. coli* productora de beta-lactamasas de espectro extendido entre los aislamientos en granjas de producción avícola aumentando la preocupación en esta industria, ya que implica fallas en el tratamiento de enfermedades provocadas por su mecanismo de resistencia (Li *et al.* 2016). Diferentes tipos de beta-lactamasas de espectro extendido han sido reportadas, el tipo CTX-M representa un problema emergente en la salud pública, comenzando a ser considerado como “CTX-M pandémico” (Costa *et al.* 2009).

La resistencia bacteriana se desarrolla por varios mecanismos: (i), por cambios dentro del genoma bacteriano (mutaciones); (ii), por interacciones bacterianas (formación de biofilms); y (iii), por la adquisición de nuevos genes a través de una transferencia horizontal mediada por bacteriófagos atemperados (Shousha *et al.* 2015).

En múltiples estudios demuestran la capacidad que tienen los fagos atemperados en transferir genes de resistencia a los antibióticos y factores de virulencia provocando que bacterias ganen patogenicidad (Iversen *et al.* 2015; Shousha *et al.* 2015). Estos fagos atemperados, en su mayoría, han sido aislados de plantas tratadoras de agua; sin embargo, en estudios recientes lo han aislado en granjas de producción animal (avícola, porcina y bovina) (Colomer-Lluch *et al.* 2011a).

Por lo tanto, es de suma importancia comprender el rol de bacteriófagos en la diseminación de genes de resistencia a los antibióticos entre aislamientos obtenidos de aves de corral con

el propósito de desarrollar mecanismos de alerta temprana en la prevención de enfermedades altamente contagiosas y así mantener una buena salud ambiental.

## **HIPÓTESIS**

Existe una prevalencia menor al 30% de los genes *bla*TEM, *sull*, *sulll*, *tetA*, *tetB*, *qnrA* y *qnrB* en el ADN fágico y ADN bacteriano de *Escherichia coli* aislada de aves de corral y silvestres de la zona centro-norte del Estado de México.

## OBJETIVOS

Objetivo general.

- Determinar la prevalencia de los genes *bla*<sub>TEM</sub>, *sulI*, *sulIII*, *tetA*, *tetB*, *qnrA* y *qnrB* que confieren resistencia bacteriana a los antibióticos betalactámicos, sulfamidas, tetraciclinas y quinolonas en bacteriófagos y aislamientos de *Escherichia coli* provenientes de aves de corral de la zona centro-norte del Estado de México.

Objetivos específicos.

- Determinar la resistencia fenotípica de aislamientos de *E. coli* recolectados de aves de corral de la zona centro-norte del Estado de México, México.
- Determinar la resistencia fenotípica de aislamientos de *E. coli* recolectados de aves silvestres migratorias de la ciénega Chimaliapan del Municipio de Lerma del Estado de México, México.
- Determinar la prevalencia de los genes *bla*<sub>TEM</sub>, *sulI*, *sulIII*, *tetA*, *tetB*, *qnrA* y *qnrB* en aislamientos de *E. coli* recolectados de aves de corral de la zona centro-norte del Estado de México, México.
- Determinar la prevalencia de los genes *bla*<sub>TEM</sub>, *sulI*, *sulIII*, *tetA*, *tetB*, *qnrA* y *qnrB* en aislamientos de *E. coli* recolectados de aves silvestres migratorias de la ciénega Chimaliapan del Municipio de Lerma del Estado de México, México.
- Evaluar la presencia de bacteriófagos atemperados en aislamientos de *E. coli* recolectados de aves silvestres migratorias de la ciénega Chimaliapan del Municipio de Lerma del Estado de México, México.
- Determinar la prevalencia de los genes *bla*<sub>TEM</sub>, *sulI*, *sulIII*, *tetA*, *tetB*, *qnrA* y *qnrB* en bacteriófagos recolectados de aislamientos de *E. coli* provenientes de aves silvestres migratorias de la ciénega Chimaliapan del Municipio de Lerma del Estado de México, México.
- Evaluar la transducción y lisogenización de bacteriófagos en aislamientos de *E. coli* recolectados de aves de corral de la zona centro-norte del Estado de México, México.

- Evaluar la transducción y lisogenización de bacteriófagos en aislamientos de *E. coli* recolectados de aves silvestres migratorias de la ciénega Chimaliapan del Municipio de Lerma del Estado de México, México.

## MATERIAL Y MÉTODOS.

### 1. Recolección de muestras

- **Aves de corral.**

Se realizó un muestreo estratificado simple considerando cada municipio como un estrato, para el cálculo del tamaño de muestra se consideró una población infinita y una prevalencia estimada de 0.30, un nivel de confianza de 0.95 y un error estimado de 0.05, obteniendo una  $n=322$ .

Se recolectaron 322 muestras cloacales de aves domésticas aparentemente sanas (pavos, pollos y patos) de unidades de producción ubicadas en áreas rurales y peri-urbanas de los municipios de la zona norte del Estado de México, México (Atlacomulco, El Oro, Jocotitlán e Ixtlahuaca).

Las unidades de producción no cuentan con medidas de bioseguridad adecuadas, algunas aves muestreadas se encuentran en jaula y otras se encuentran libres conviviendo y compartiendo comederos y bebederos con diferentes especies de animales (cerdos, cabras, borregos, vacas lecheras, caninos, caballos, palomas silvestres, y ganado de carne). El fin zootécnico de las aves muestreadas son para consumo familiar y económico (venta).

- **Aves silvestres.**

Setenta y tres muestras cloacales de aves silvestres fueron donadas por cazadores durante los meses de julio a diciembre de 2017 y de enero a marzo de 2018. Las muestras pertenecían a 9 especies de patos: *Anas crecca* (6), *Mareca americana* (5), *Anas diazi* (6), *Mareca strepera* (12), *Anas acuta* (4), *Spatula discors* (10), *Oxyura jamaicensis* (2), *Spatula clypeata* (13), *Spatula cyanoptera* (3), y sin identificación (3). La cacería se realizó en la ciénega Chimaliapan o Laguna Lerma perteneciente al complejo de los humedales de Lerma localizado en el Municipio de Lerma del Estado de México, México (9°14'N, 99°30'W).

Esta área se encuentra como sitio RAMSAR de Importancia Internacional (RAMSAR) y es una escala geográfica de aves silvestres migratorias procedentes de Norteamérica durante el periodo otoño – invierno. Además, se encuentra rodeada, principalmente, de áreas rurales donde se lleva a cabo la agricultura para la obtención de alimento destinado a diferentes especies animales y humano (Figura 24) (Hernández-Colina *et al.*, 2018).

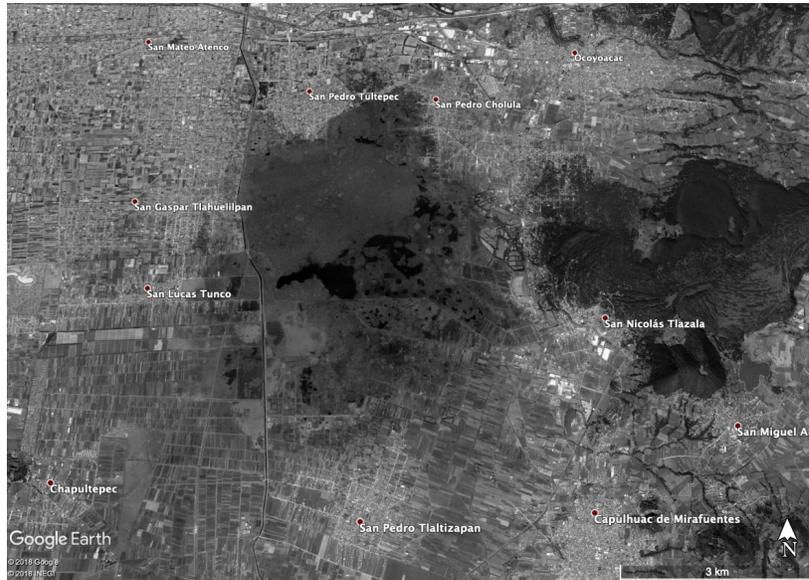


Figura 24. Ubicación de la Ciénega de Chimaliapan y comunidades que la rodean (Tomada y modificada de Google Earth)

## 2. Aislamiento e identificación de *Escherichia coli*.

Las muestras fueron depositadas individualmente mediante hisopos estériles en tubos con medio de transporte de Stuart, mantenidas a 4°C hasta su arribo al laboratorio. Posteriormente, usando agar MacConkey fueron seleccionadas las colonias de *E. coli* sospechosas y se sometieron a pruebas bioquímicas (LIA, Citrato de Simmons, TSI y SIM). La identificación genotípica se realizó mediante una PCR de punto final para la amplificación del gen *uidA*, el cual codifica para la enzima beta-glucuronidasa y es específico para *E. coli* (Cuadro 1) (Aguilar-Montes de Oca *et al.*, 2015; Heijnen and Medena 2006).

### 3. Sensibilidad antimicrobiana

Mediante el método de difusión en disco Kirby-Bauer se realizó la prueba de sensibilidad siguiendo los lineamientos del Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI, 2012). Los antimicrobianos usados fueron: ampicilina (AM) 10 µg, amikacina (AK) 30 µg, carbenicilina (CB) 100 µg, gentamicina (GE) 10 µg, cefalotina (CF) 30 µg, cefotaxima (CFX) 30 µg, netilmocina (NET) 30 µg, ciprofloxacina (CPF) 5 µg, norfloxacina (NOF) 10 µg, cloranfenicol (CL) 30 µg, Trimetoprim-sulfametoxazol (SXT) 25 µg, nitrofurantoina (NF) 300 µg, ácido nalidixico (NA) 30 µg y tetraciclina (TE) 30 µg. La cepa de *E. coli* ATCC 25922 fue usada como control. La interpretación de los resultados se hizo de acuerdo a los lineamientos del CLSI (2012). Los aislamientos fueron clasificados como multirresistentes cuando mostraron resistencia a  $\geq 3$  antibióticos (Figura 25) (CLSI 2015).



Figura 25. Pruebas de sensibilidad de los aislamientos de *E. coli* recolectados de aves silvestres y de traspatio (Fuente: dato original)

### 4. Estracción y purificación de ADN bacteriano y fágico

Para la extracción de DNA bacteriano se usó la metodología propuesta por Ahmed *et al.*, (2009). El método de fenol-cloroformo fue usado para obtener DNA fágico. El lisado fágico fue tratado con DNasa (1 mg/ml) y RNasa (12.5 mg/ml) y fue incubado durante 30 min. a una temperatura de 37°C para remover posibles contaminantes. Posteriormente, fue lavado con SDS (20%) y se agregó proteinasa K (10 mg/ml) (Pickard, 2009). Para confirmar la eliminación de DNA bacteriano y la presencia de DNA fágico, se realizó un PCR amplificando el gen *uidA* como control negativo (Colomer-Lluch *et al.*, 2014a). Por

medio de un espectrofotómetro nanodrop Quawell q5000 con una absorbancia de 260nm, se uso  $\pm 2\mu\text{l}$  de muestra bacteriana y fágica para determinar la pureza (el radio resultante de 260/280 fue de 1.83) y concentración de 65  $\eta\text{g}/\mu\text{l}$  de DNA.

## 5. Detección de genes de resistencia a antibióticos

La detección de genes se realizó mediante una PCR de punto final en las cepas donantes, receptoras y aislamientos fágicos. Para su amplificación se usaron los oligonucleotidos y condiciones enlistadas en el cuadro 10. Todas las muestras se examinaron, mediante una PCR multiple para detectar los genes que confieren resistencia a quinolonas (*qnrA* y *qnrB*), tetraciclinas (*tetA* y *tetB*) y sulfonamidas (*sull* y *sullI*); además, una PCR simple para detectar *bla<sub>TEM</sub>*. Los productos se corrieron en un gel de agarosa al 2% a 75V por 1h y posteriormente teñidos con bromuro de etidio (0.05mg/L) y se examinaron en un transluminador UV.

Cuadro 10. Secuencia de oligonucleotidos utilizados en este trabajo para la detección de ARG's

Gen	Oligonucleotidos	Secuencia de oligonucleotidos	Tamaño del fragmento (pb)	Referencia
<i>bla<sub>TEM</sub></i>	MultiTSO-T_for MultiTSO-T_rev	5'-CAT TTC CGT GTC GCC CTT ATT C-3' 5'-CGT TCA TCC ATA GTT GCC TGA C-3'	800	Dallenne <i>et al.</i> , (2010)
<i>qnrA</i>	QnrAm_F QnrAm_R	5'-AGA GGA TTT CTC ACG CCA GG-3' 5'-TGC CAG GCA CAG ATC TTG AC-3'	580	Kraychete <i>et al.</i> , (2016)
<i>qnrB</i>	QnrBm_F QnrBm_R	5'-GGM ATH GAA ATT CGC CAC TG-3' <sup>a</sup> 5'-TTT GCY GYY CGC CAG TCG AA-3' <sup>a</sup>	264	
<i>tetA</i>	<i>Tet (A) -F</i> <i>Tet (A) -R</i>	5'-GTG AAA CCC AAC ATA CCC C-3' 5'-GAA GGC AAG CAG GAT GTA G-3'	888	Hedayatianfard <i>et al.</i> , (2014)
<i>tetB</i>	<i>Tet (B) -F</i> <i>Tet (B) -R</i>	5'-CCT TAT CAT GCC AGT CTT GC-3' 5'-ACT GCC GTT TTT TCG CC-3'	774	
<i>sull</i>	Sul 1-F Sul 1-B	5'-CGG CGT GGG CTA CCT GAA CG-3' 5'-GCC GAT CGC GTG AAG TTC CG-3'	433	Kern <i>et al.</i> , (2002)
<i>sullI</i>	Sul 2-F Sul 2-B	5'-GCG CTCA AGG CAG ATG GCA TT-3' 5'-GCG TTT GAT ACC GGC ACC CGT-3'	293	
<i>uidA</i>	UAL1939b UAL2105b	5'-ATGGAATTCGCCGATTTTGC-3' 5'-ATTGTTTGCCTCCCTGCTGC-3'	187	Heijnen y Medema, 2006

Sustituciones de bases nitrogenadas. <sup>a</sup>M= A o C; H= A o C o T; Y = C o T.

## 6. Aislamiento fágico con identificación simultánea en cepas receptoras

El aislamiento fágico se realizó con variantes del protocolo descrito por Sekulović and Fortier, 2016. Alicuotas de cada una de las cepas donadoras fueron diluidas en una

proporción 1:10, posteriormente se sembraron en placas de agar TSA y se incubaron por 3 – 4 hrs. a una temperatura de 37°C. Posteriormente, las bacterias fueron expuestas a radiación UV (320nm) durante 10 – 15 segundos con un transluminador, inmediatamente se virió agar blando con la cepa receptora en fase de crecimiento exponencial y se incubó por 24 hrs. a 37°C.

## **7. Purificación y amplificación fágica**

Una vez identificada la cepa receptora se realizaron tres rondas de purificación para eliminar posibles contaminantes. Usando la punta de una pipeta se recolectan las zonas de lisis y se transfieren a tubos con caldo TSA suplementado con 10mM de MgCl<sub>2</sub> y CaCl<sub>2</sub>. Después de tres horas a temperatura ambiente se filtra, y este se coloca en diluciones seriales (hasta 10<sup>-4</sup>) conteniendo 0.5 ml. de caldo TSA. Posteriormente, en agar blando (semisólido), se mezcla la dilución obtenida con la cepa receptora identificada y se coloca en placas de agar TSA las cuales se incubaron a 37°C por 24 hrs. El procedimiento de purificación se repite dos rondas más (Sekulović and Fortier, 2016). Después de la última ronda, se realizaron dos fases de amplificación según el protocolo descrito por Fortier and Moineau (2009).

## **8. Titulación de lisados fágicos**

Se prepararon diluciones seriales (10<sup>-1</sup> a 10<sup>-6</sup>) para cada lisado fágico. En agar blando se mezcló 1ml. de la cepa receptora con 10 µl de lisado fágico y se diseminó en placas de agar TSA, se dejó solidificar a temperatura ambiente. Después de la incubación a 37°C durante 24 hrs., se contabilizaron las unidades formadoras de placas (PFU) por mililitro con la siguiente fórmula: número de placas X factor de dilución (Sekulović and Fortier, 2016). El rango de títulos obtenidos fueron de: 3.8 x10<sup>5</sup> – 6.7 x10<sup>6</sup> PFU/ml.

## **9. Selección de aislamientos donantes y receptores**

- Aves de corral.

Fueron elegidos trece aislamientos de *E. coli* ausentes de ARG's y resistencia fenotípica procedentes de aislamientos de aves domésticas para ser receptoras: nueve pertenecen al

municipio de Ixtlahuaca (2 de pollo, 1 de pavo y 6 de pato) y cuatro a El Oro (todas de pollos).

- Aves silvestres.

Para el aislamiento fágico se seleccionaron 4 cepas bacterianas multirresistentes y con presencia de múltiples ARG's (E1, E11, E21 y E22). Además, once cepas bacterianas sin ARG's fueron elegidas para ser receptoras de bacteriófagos con ARG's.

#### **10. Transducción *in vitro*.**

Se realizó una mezcla de 10 µl de la cepa receptora con 10 µl de lisado fágico y se incubó durante 30 minutos a 37° C en reposo. Luego, a esta mezcla se agregó 2 ml de caldo TSA y se incubó por un periodo de 1 – 2 horas a 37°C con movimiento oscilatorio. Posteriormente, se realizó una centrifugación a 12,000 rpm durante 3 min., el sobrenadante se descartó y el pellet se suspendió en 150 µl de caldo Mueller – Hinton vertiéndose en agar del mismo medio (Shousha *et al.*, 2015). Posteriormente, se realizó la prueba de sensibilidad utilizando el método de difusión en disco Kirby-Bauer siguiendo los lineamientos del Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI, 2012). La interpretación de los resultados se realizaron de acuerdo a los lineamientos del CLSI (2015). A las cepas transductantes se les realizó la detección de ARG's con la metodología descrita anteriormente.

## RESULTADOS.

### Metasellos de artículos.

Artículo aceptado



REVISTA MEXICANA DE CIENCIAS PECUARIAS



[Inicio](#) [Acerca de](#) [Área personal](#) [Buscar](#) [Actual](#) [Archivos](#) [Notas al Autor](#) [Ayuda](#)

## #5378 Edición

[RESUMEN](#) [REVISIÓN](#) **[EDICIÓN](#)**

### Envío

<b>Autores/as</b>	Juan Martin Talavera-Gonzalez, Martín Talavera-Rojas, Jorge Pablo Acosta-Dibarrat, Nydia Edith Reyes-Rodriguez, Celene Salgado-Miranda
<b>Título</b>	Prevalencia de genes qnrB, qnrA y blaTEM en bacteriofagos atemperados de Escherichia coli aislados en agua residual y alcantarillas de rastros de la zona norte del Estado de México
<b>Sección</b>	Notas de investigación
<b>Editor/a</b>	Oscar Rodríguez Rivera

Artículo enviado

**Journal of Environmental Science and Health, Part B**  
**Transduction of antibiotic resistance genes in Escherichia coli isolates from wild birds of Mexico**  
 --Manuscript Draft--

<b>Full Title:</b>	Transduction of antibiotic resistance genes in Escherichia coli isolates from wild birds of Mexico
<b>Manuscript Number:</b>	JESHB-2020-0039
<b>Article Type:</b>	Original Research
<b>Keywords:</b>	migratory; bacteriophage; dissemination; wetland; pollution
<b>Manuscript Classifications:</b>	Agricultural wastes; Agrochemicals; Antibiotics; Organic matter; Risk assessment; Veterinary drugs
<b>Abstract:</b>	We described the phenotypic and genotypic antimicrobial pattern in <i>E. coli</i> isolates from wild birds in Ciénegas de Lerma, México, a wetland with high levels of pollution; additionally, bacteriophages were isolated and their transduction capacity was evaluated between these isolates. A total of 73 cloacal samples were recollected from 10 wild bird species in the wetland Ciénegas de Lerma, 24 <i>E. coli</i> isolates were obtained. Of the total isolates, 34.6% showed resistance to carbenicillin (CAR), 30.7% for ampicillin (AMP) and 15.3% for nalidixic acid (NAL), while 25% (6) were recorded as multi-resistant. From the entire collection, 33.3% of isolates were positive to bla TEM gene, 12.5% for sulII, tetA and qnrA genes, 8.3% for tetB and 4.1 for sulI and qnrB genes. Moreover, bacteriophages were identified from 4 bacterial isolates with the capacity to transfer 4 resistance genes (tetB, qnrA, sulII, and bla TEM) to 13/18 susceptible isolates. For the first time, phage transduction of antimicrobial resistance genes (ARGs) from wild birds is performed with the aim to understand and monitor the dissemination of ARGs to humans, wildlife and domestic animals.
<b>Order of Authors:</b>	Juan Martin Talavera-González Martín Talavera-Rojas Edgardo Soriano-Vargas Jesús Vázquez-Navarrete Celene Salgado-Miranda Juan Pablo Medina

Submissions Being Processed for Author **juan martin talavera**

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status
<a href="#">View Submission</a> <a href="#">Author Status</a> <a href="#">Correspondence</a> <a href="#">Send E-mail</a>	JESHB-2020-0039	Transduction of antibiotic resistance genes in Escherichia coli isolates from wild birds of Mexico	Feb 21, 2020	Apr 15, 2020	Under Review

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.

Artículo enviado.



## Canadian Journal of Microbiology

### In vitro transduction of antimicrobial resistance genes into Escherichia coli isolates from backyard poultry in Mexico

Journal:	Canadian Journal of Microbiology
Manuscript ID	cjm-2020-0280.R2
Manuscript Type:	Article
Date Submitted by the Author:	09-Oct-2020
Complete List of Authors:	Talavera-Gonzalez, Juan; Universidad Autonoma del Estado de Mexico, Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia TALAVERA-ROJAS, MARTIN; Universidad Autonoma del Estado de Mexico, Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia Soriano-Vargas, Edgardo; Universidad Autonoma del Estado de Mexico, Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, Facultad de Medicina y Veterinaria y Zootecnia VAZQUEZ-NAVARRETE, JESUS; INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES FORESTALES AGRICOLAS Y PECUARIAS, Microbiología Animal. Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad Salgado-Miranda, Celene; Universidad Autonoma del Estado de Mexico, Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Keyword:	backyard poultry, antimicrobial resistance, bacteriophages, transduction, wild birds
Is the invited manuscript for consideration in a Special Issue? :	Not applicable (regular submission)

**Author Dashboard**

- 3 Manuscripts with Decisions >
- 1 Manuscripts Awaiting Revision >
- Start New Submission >
- 5 Most Recent emails >

### Manuscripts with Decisions

ACTION	STATUS	ID	TITLE	SUBMITTED	DECISIONED
<a href="#">create a revision</a>	EA: Tryhuba, Brenda	cjm-2020-0280.R2	In vitro transduction of antimicrobial resistance genes into Escherichia coli isolates from backyard poultry in Mexico <a href="#">View Submission</a>	09-Oct-2020	10-Nov-2020
	<ul style="list-style-type: none"><li>Minor Revisions (10-Nov-2020)</li><li>Due on: 01-Dec-2020</li></ul>				
	<a href="#">view decision letter</a>				

## 1. Aislamiento e identificación de *E. coli*.

- Aves de corral.

Se obtuvieron un total de 197/322 (61.8%) aislamientos de *Escherichia coli* de aves domésticas. El número mayor de aislamientos fueron obtenidos en Atlacomulco con 73 (37%) seguido por Jocotitlán con 50 (25.3%), 44 (22.3) aislamientos fueron recolectados de El Oro y por último 30 (15.2%) de Ixtlahuaca. Del total de aislamientos, se recolectaron 160 (81.2%) de pollo, seguido de patos domésticos con 26 (13.2%) y 11 (5.6%) de pavos (Cuadro 11).

Cuadro 11. Número de aislamientos de *E. coli* obtenidos en Atlacomulco, Jocotitlán, El Oro e Ixtlahuaca de pollos, pavos y patos (%)

Municipio/especie	Pollo n= 160	Pato n=26	Pavo n=11
Atlacomulco n=73 (37)	73	--	--
Jocotitlán n=50 (25.3)	30	16	4
El Oro n=44 (22.3)	44	--	--
Ixtlahuaca n=30 (15.2)	13	10	7

- Aves silvestres.

Se obtuvieron 24/64 (37.5%) aislamientos de *Escherichia coli* procedentes de 9/10 (90%) especies de aves silvestres con capacidad migratoria larga y corta. En el cuadro 12 se muestran las características de las aves capturadas. El mayor número de aislamientos fueron obtenidos de la especie *Spatula discors*.

Cuadro 12. Características de las aves silvestres muestreadas en este estudio

Especie de ave silvestre	Promedio masa (gr)	Promedio largo de ala (mm)	Número de muestras	Número de aislamientos de <i>E. coli</i>
<i>Anas creca</i>	308.3	178.5	6 <sup>b</sup>	2
<i>Mareca americana</i>	682.2	245	5	1
<i>Anas diazi</i>	934.8	265	6 <sup>c</sup>	2
<i>Mareca strepera</i>	794.9	257	12	3
<i>Anas acuta</i>	732.5	252.7	4	3
<i>Spatula discors</i>	344.9	175.5	10 <sup>a</sup>	5
<i>Oxyura jamaicensis</i>	452	130.5	2	2
<i>Spatula clypeata</i>	513	231.5	13	3
<i>Spatula cyanoptera</i>	397.3	178.3	3	2
No identificado	409	187	3	1
TOTAL=			64	24

<sup>a</sup> Un ave presentó daño en ala y otra presentó granulomas. Se recolectaron dos aislamientos de *E. coli*

<sup>b</sup> Un ave presentó microfilaria en frotis sanguíneo y filarias en riñón. No se recolectó *E. coli*

<sup>c</sup> Un ave presentaba aerosaculitis. No se recolectó *E. coli*

## 2. Pruebas de sensibilidad y genes de resistencia.

- Aves de corral.

El mayor número de aislamientos resistentes fue para AM (80.7%), seguido de TE (64.4%), CB (56.3%) y por último a NA y STX (26.9%) (Cuadro 13). Ixtlahuaca registró 20/30 (66.6%) aislamientos multirresistentes, de los cuales uno presentó resistencia a 11 antibióticos, en El Oro se obtuvieron 20/44 (45.4%) aislamientos multirresistentes de los cuales, tres fueron resistentes a 9 antibióticos, en Jocotitlán se presentaron 25/50 (50%) aislamientos multirresistentes con dos aislamientos resistentes a 9 antibióticos y en Atlacomulco se recabaron 43/73 (58.8%) aislamientos multirresistentes de los cuales cuatro presentaron resistencia a 7 antibióticos.

Cuadro 13. Número total de aislamientos de *Escherichia coli* resistentes a antibióticos en los municipios de Atlacomulco, Jocotitlán, El Oro e Ixtlahuaca

Antibiótico/Municipio	Atlacomulco n= 73 % (no.)	El Oro n= 44 % (no.)	Ixtlahuaca n= 30 % (no.)	Jocotitlán n= 50 % (no.)	Total n= 197 % (no.)
AK	13.7 (10)	4.6 (2)	6.7 (2)	-	7.1 (14)
AM	82.2 (60)	72.7 (32)	60 (18)	98 (49)	80.7 (159)
CB	45.2 (33)	43.1 (19)	63.3 (19)	80 (40)	56.3(111)
CF	5.4 (4)	11.3 (5)	26.6 (8)	6 (3)	10.1 (20)
CFX	-	-	3.3 (1)	2 (1)	1 (2)
CPF	9.5 (7)	9 (4)	43.3 (13)	12 (6)	15.2 (30)
CL	16.4 (12)	11.3 (5)	30 (9)	12 (6)	16.2 (32)
GE	5.4 (4)	-	16.6 (5)	6 (3)	6 (12)
NET	1.3 (1)	6.8 (3)	13.3 (4)	2 (1)	4.5 (9)
NF	10.9 (8)	2.2 (1)	-	4 (2)	5.5 (11)
NOF	6.8 (5)	9 (4)	46.6 (14)	14 (7)	15.2 (30)
STX	28.7 (21)	22.7 (10)	36.6 (11)	22 (11)	26.9 (53)
NA	23.2 (17)	20.4 (9)	56.6 (17)	20 (10)	26.9 (53)
TE	73.9 (54)	68.1 (30)	66.6 (20)	46 (23)	64.4 (127)
CAZ	-	-	3.3 (1)	-	0.5 (1)

Del total de los aislamientos obtenidos de pollo, se encontró 78.1% de resistencia a AM, seguido por TET con 68.75%, STX con 26.8% y 25% a NA. De los 11 aislamientos obtenidos de pavo, 100% presentó resistencia a AM, 63.6% a TET y NA, y 27.2%

resistentes a STX. De igual manera, del total de aislamientos registrados de patos 69.2% fueron resistentes a AM, 38.4% a TET, 26.9% a STX y 23% a NA.

Se identificó la presencia de genes que confieren resistencia al grupo de antibióticos de quinolonas (*qnrA* y *qnrB*), sulfonamidas (*sullI* y *sullII*), tetraciclinas (*tetA* y *tetB*) y beta-lactámicos (*bla<sub>TEM</sub>*) relacionados con con una resistencia fenotípica. Se obtuvo un total de 111/197 (56.3%) aislamientos que amplificaron el gen *bla<sub>TEM</sub>*, seguido por 49/197 (20.8%) aislamientos que presentaron el *tetB* y 39/197 (19.2%) el gen *tetA*. 20/197 (10.1%) aislamientos amplificaron *sullII* y 19/197 (9.6%) el gen *qnrA*; así mismo 15/197 (7.6%) aislamientos presentaron *sullI* y 11/197 (5.5%) registraron amplificación de *qnrB* (Cuadro 14).

Cuadro 14. Relación genotípica y fenotípica entre aislamientos de *E. coli* de especies de aves domésticas en los municipios de Atlacomulco, Jocotitlán, El Oro e Ixtlahuaca de pollos, pavos y patos

	AM	SXT	NA	TET	Atlacomulco n= 73	El Oro n= 44	Ixtlahuaca n= 30	Jocotitlán n= 50
Pollos	a	c	a	a	<i>bla<sub>TEM</sub></i> (2) <i>bla<sub>TEM</sub></i> + <i>tetB</i> (1) <i>bla<sub>TEM</sub></i> + <i>tetA</i> + <i>tetB</i> + <i>qnrA</i> + <i>qnrB</i> (2) <i>bla<sub>TEM</sub></i> + <i>tetA</i> + <i>tetB</i> + <i>qnrB</i> (1) <i>bla<sub>TEM</sub></i> + <i>qnrA</i> + <i>qnrB</i> (1)	<i>bla<sub>TEM</sub></i> (1)	<i>bla<sub>TEM</sub></i> + <i>tetA</i> + <i>tetB</i> (1) <i>bla<sub>TEM</sub></i> (1)	-
	a	a	a	a	<i>bla<sub>TEM</sub></i> + <i>tetB</i> + <i>sullI</i> (1) <i>bla<sub>TEM</sub></i> + <i>qnrA</i> + <i>sullI</i> + <i>sullII</i> (1) <i>tetA</i> + <i>tetB</i> + <i>qnrA</i> (1)	<i>bla<sub>TEM</sub></i> + <i>tetA</i> + <i>sullI</i> + <i>qnrA</i> (1) <i>bla<sub>TEM</sub></i> + <i>tetB</i> + <i>sullI</i> + <i>sullII</i> + <i>qnrA</i> (1) <i>tetA</i> + <i>qnrA</i> (1) <i>bla<sub>TEM</sub></i> + <i>tetB</i> + <i>sullI</i> + <i>qnrA</i> (1) <i>bla<sub>TEM</sub></i> + <i>sullII</i> + <i>qnrA</i> (2) <i>bla<sub>TEM</sub></i> + <i>tetA</i> + <i>tetB</i> + <i>sullI</i> (1) <i>tetB</i> + <i>sullI</i> (1)	<i>bla<sub>TEM</sub></i> (4) <i>bla<sub>TEM</sub></i> + <i>tetA</i> + <i>qnrA</i> (1) <i>bla<sub>TEM</sub></i> + <i>tetA</i> + <i>tetB</i> (1) <i>bla<sub>TEM</sub></i> + <i>tetB</i> (1)	<i>bla<sub>TEM</sub></i> + <i>sullII</i> + <i>qnrB</i> (1) <i>bla<sub>TEM</sub></i> + <i>sullII</i> (2) <i>bla<sub>TEM</sub></i> + <i>qnrA</i> + <i>qnrB</i> (1) <i>bla<sub>TEM</sub></i> + <i>tetB</i> + <i>qnrB</i> (1)
	a	c	b	a	<i>bla<sub>TEM</sub></i> (1) <i>tetB</i> (1) <i>bla<sub>TEM</sub></i> + <i>tetA</i> (1) <i>bla<sub>TEM</sub></i> + <i>tetB</i> (2) <i>bla<sub>TEM</sub></i> + <i>tetA</i> + <i>tetB</i> (1)	<i>bla<sub>TEM</sub></i> + <i>tetA</i> + <i>tetB</i> (1)	<i>tetB</i> (1)	<i>bla<sub>TEM</sub></i> + <i>tetB</i> (1)
	a	a	a	c	<i>bla<sub>TEM</sub></i> + <i>qnrA</i> + <i>sullI</i> + <i>sullII</i> (1)	-	-	-
	a	c	c	a	<i>bla<sub>TEM</sub></i> (6) <i>bla<sub>TEM</sub></i> + <i>tetA</i> (2) <i>bla<sub>TEM</sub></i> + <i>tetA</i> + <i>tetB</i> (7) <i>bla<sub>TEM</sub></i> + <i>tetB</i> (2)	<i>bla<sub>TEM</sub></i> (5) <i>tetA</i> + <i>tetB</i> (1) <i>tetA</i> (1)	-	<i>bla<sub>TEM</sub></i> + <i>tetA</i> (1) <i>bla<sub>TEM</sub></i> (1) <i>tetB</i> (1)
	a	b	b	a	<i>bla<sub>TEM</sub></i> + <i>tetA</i> + <i>tetB</i> (1)	-	-	-
	a	c	c	b	<i>bla<sub>TEM</sub></i> (2)	-	-	-
	a	a	c	a	<i>bla<sub>TEM</sub></i> (1)	<i>bla<sub>TEM</sub></i> + <i>tetA</i> + <i>tetB</i> + <i>sullI</i> (1)	-	<i>bla<sub>TEM</sub></i> (1)

					<i>bla</i> <sub>TEM</sub> + <i>tetA</i> + <i>tetB</i> (1) <i>bla</i> <sub>TEM</sub> + <i>sullI</i> (1)	<i>sull</i> + <i>sullI</i> (1)		
	a	c	c	c	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> (12)	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> (4)	-	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> (4)
	a	a	b	a	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> (2) <i>bla</i> <sub>TEM</sub> + <i>tetA</i> + <i>tetB</i> (1) <i>bla</i> <sub>TEM</sub> + <i>tetB</i> + <i>sullI</i> (1) <i>bla</i> <sub>TEM</sub> + <i>tetB</i> + <i>sull</i> + <i>sullI</i> (1) <i>tetB</i> + <i>sull</i> + <i>sullI</i> (1)	-	-	-
	a	b	c	a		<i>bla</i> <sub>TEM</sub> (2)	-	
	a	c	b	b		-	-	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> (1)
	a	c	b	c		-	-	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> (1)
	b	a	b	a	<i>sull</i> + <i>sullI</i> (1)	-	-	-
	b	c	a	c	<i>qnrA</i> (1)	<i>qnrA</i> (1) <i>qnrA</i> + <i>qnrB</i> (1)	-	-
	b	c	c	a	<i>tetB</i> (1)	-	-	-
	c	c	a	a	<i>tetB</i> (1)	-	-	-
	c	a	a	a	<i>tetA</i> + <i>tetB</i> + <i>sullI</i> (1) <i>tetB</i> + <i>sull</i> + <i>sullI</i> (1) <i>tetA</i> + <i>tetB</i> + <i>qnrB</i> (1) <i>sull</i> + <i>sullI</i> + <i>qnrA</i> (1)	-	-	-
	c	c	c	a	-	<i>tetA</i> (2)		-
Pavo	a	a	a	a	-	-	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> + <i>sull</i> (1)	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> + <i>tetA</i> + <i>tetB</i> (1) <i>sullI</i> (1)
	a	a	c	c	-	-	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> + <i>sullI</i> (1)	
	a	c	a	a	-	-	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> + <i>tetB</i> (1) <i>bla</i> <sub>TEM</sub> + <i>qnrB</i> (1)	
	a	c	c	c	-	-		<i>bla</i> <sub>TEM</sub> (1)
Pato	a	c	c	a	-	-	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> + <i>tetA</i> (1)	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> + <i>tetA</i> (1)
	c	a	a	a	-	-	<i>tetA</i> + <i>tetB</i> (1)	-
	a	a	a	a	-	-	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> + <i>tetA</i> + <i>tetB</i> (1)	-
	a	c	b	a	-	-	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> + <i>tetA</i> (1)	-
	a	c	a	c	-	-	-	<i>qnrA</i> (1)
	a	c	a	a	-	-	-	<i>qnrB</i> (1)
	a	a	c	c	-	-	-	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> (1) <i>bla</i> <sub>TEM</sub> + <i>tetB</i> (1)

a= Resistente

b= Resistencia intermedia

c= Sensible

AM= ampicilina

SXT= Trimetoprim-sulfametoxazol

NA= Ácido nalidíxico

TET= tetraciclina

Los dígitos entre paréntesis representan el número de aislamientos que amplificaron los ARG's

- Aves silvestres

La mayor resistencia se presentó para carbenicilina (34.6%), seguido por ampicilina (30.7%) y ácido nalidíxico (15.3%). No se registró resistencia a netilmocina,

nitrofurantoina, cefotaxima y amikacina. 10/24 (41.6%) aislamientos presentaron resistencia al menos a 1 antibiótico, 6/24 (25%) registraron multiresistencia, 4/24 (16.6%) mostraron resistencia a 2 antibióticos y 18/24 (75%) presentaron sensibilidad.

Se registró una prevalencia de 33.3% del gen *bla<sub>TEM</sub>*, seguido por *sullI*, *tetA* y *qnrA* con 12.5% cada uno; la prevalencia de *tetB* fue 8.3% y para los genes *sull* y *qnrB* fue de 4.1% para ambos (Cuadro 15).

Cuadro 15. Pruebas de sensibilidad y frecuencia de ARG's encontrados en aislamientos de *E. coli* de aves silvestres.

Iden.	Especie	PRUEBAS DE SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA															Genes de resistencia a antibióticos						
		AK	AM	CB	CF	CFX	CPF	CL	GE	NET	NF	NOF	SXT	NA	TET	CAZ	<i>sull</i>	<i>sullI</i>	<i>tetA</i>	<i>tetB</i>	<i>bla<sub>TEM</sub></i>	<i>qnrA</i>	<i>qnrB</i>
E1 <sup>a</sup>	<i>Anas crecca</i>	S	S	R	R	S	I	S	S	S	S	S	S	R	R	R	-	-	-	+	+	+	-
E2	<i>Anas diazi</i>	S	I	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-	-	-	-	-	-
E3	<i>Mareca americana</i>	S	R	R	S	S	I	S	S	S	S	S	S	I	R	S	-	-	+	-	+	-	-
E4	No identificado	S	R	R	R	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-	-	-	+	-	-
E5	<i>Mareca strepera</i>	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-	-	-	-	-	-
E6	<i>Anas acuta</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-	-	-	-	-	-
E7	<i>Mareca strepera</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-	-	-	-	-	-
E8	<i>Spatula clypeata</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-	-	-	-	-	-
E9	<i>Spatula cyanoptera</i>	S	I	I	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	-	-	-	-	+	-	-
E10	<i>Spatula clypeata</i>	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-	-	-	-	-	-
E11 <sup>a</sup>	<i>Anas acuta</i>	S	S	I	S	S	R	S	R	S	S	R	R	R	R	S	+	+	+	-	+	+	-
E12	<i>Anas acuta</i>	S	I	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	-	-	-	-	-	-	-
E13	<i>Spatula cyanoptera</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-	-	-	-	-	-
E14	<i>Spatula discors</i>	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	-	-	-	-	-	-	-
E15	<i>Spatula discors</i>	S	S	I	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	-	-	-	-	-	-	-
E16	<i>Spatula discors</i>	S	S	I	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	-	-	-	-	-	-	-
E17	<i>Spatula discors</i>	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	-	-	-	-	+	-	-
E18	<i>Spatula clypeata</i>	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	-	-	-	-	-	-	-
E19	<i>Mareca strepera</i>	S	R	R	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	-	-	-	-	+	-	-
E20	<i>Anas crecca</i>	S	R	R	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-	-	-	+	-	-
E21 <sup>a</sup>	<i>Oxyura jamaicensis</i>	I	R	R	R	S	R	R	R	S	S	R	R	R	R	S	-	+	+	-	+	+	-
E22 <sup>a</sup>	<i>Spatula discors</i>	S	R	R	S	S	R	R	R	S	S	R	R	R	R	S	-	+	-	+	+	-	+
E23	<i>Oxyura jamaicensis</i>	S	S	I	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	-	-	-	-	-	-	-
E24	<i>Anas diazi</i>	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	-	-	-	-	-	-	-
% de resistencia		0	30.7	34.6	11.5	0	11.5	7.6	11.5	0	0	11.5	11.5	15.3	19.2	3.8							

<sup>a</sup> = Cepas bacterianas seleccionadas para la realización del aislamiento fágico

### 3. Aislamiento fágico

Los bacteriófagos fueron obtenidos de 4 aislamientos bacterianos procedentes de 4 especies de aves silvestres migratorias (*Anas crecca*, *Anas acuta*, *Oxyura jamaicensis* y *Spatula discors*) que presentaron multirresistencia y amplificación de múltiples ARG's.

En el grupo de fagos, se registró un rango de titulación de  $3.8 \times 10^5 - 6.7 \times 10^6$  PFU/ml; y se detectaron un total de 4 genes de resistencia a los antibióticos (Cuadro 16).

Cuadro 16. Perfil genotípico y fenotípico de los aislamientos de origen fágica.

Iden.	Especie	Características de aislamientos bacterianos														Características de bacteriófagos									
		PRUEBAS DE SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA												Genes de resistencia a antibióticos		Identificación	Titulación (PFU/ml)	ARG's							
AK	AM	CB	CF	CFX	CPF	CL	GE	NET	NF	NOF	SXT	NA	TET	CAZ	<i>sulII</i>				<i>sulIII</i>	<i>tetA</i>	<i>tetB</i>	<i>bla<sub>TEM</sub></i>	<i>qnrA</i>	<i>qnrB</i>	
E1	<i>Anas crecca</i>	S	S	R	R	S	I	S	S	S	S	S	R	R	R	-	-	-	+	+	+	-	T1	$4.2 \times 10^5$	<i>tetB</i>
E11	<i>Anas acuta</i>	S	S	I	S	S	R	S	R	S	S	R	R	R	R	+	+	+	-	+	+	-	T11	$6.5 \times 10^6$	<i>qnrA</i>
E21	<i>Oxyura jamaicensis</i>	I	R	R	R	S	R	R	R	S	S	R	R	R	R	-	+	+	-	+	+	-	T21	$3.8 \times 10^5$	<i>qnrA</i> y <i>sulIII</i>
E22	<i>Spatula discors</i>	S	R	R	S	S	R	R	R	S	S	R	R	R	R	-	+	-	+	+	-	+	T22	$6.7 \times 10^6$	<i>tetB</i> y <i>bla<sub>TEM</sub></i>

### 4. Transducción.

- Aves de corral.

El grupo de fagos infectó un total de 7/13 (53.8%) aislamientos, de los cuales 3 pertenecen a El Oro (pollos) y 5 a Ixtlahuaca (uno de pollo y cuatro de pato).

3/13 (23%) aislamientos bacterianos mostraron conversión lisogénica por el fago T11 al transducir el gen *qnrA*, 2/13 (15.3%) por los fagos T21 y T22 quienes transdujeron los genes *sulIII*, *qnrA* y *tetB*, *bla<sub>TEM</sub>* respectivamente, y 1/13 (7.6%) aislamientos expresó conversión lisogénica al transducir el gen *tetB* por el fago T1 (Cuadro 17)

Cuadro 17. Rango de infección y transducción de ARG's y resistencia fenotípica en aves de corral

Fagos	Resistencia fenotípica transducida	ARG's transducidos	Aislamientos infectados
T1	CB y TET	<i>tetB</i>	A1
T11	GE y NA	<i>qnrA</i>	A2, B5 y B1
T21	SXT y NA	<i>sul2</i> y <i>qnrA</i>	B2 y B3
T22	AM y TET	<i>tetB</i> y <i>bla<sub>TEM</sub></i>	A3 y B4

A1 – A3. Aislamientos bacterianos de El Oro (pollos)

B1. Aislamiento bacteriano de Ixtlahuaca de pollo y B2 – B5 aislamientos de patos.

- Aves silvestres.

El grupo de fagos lisogenizó a un total de 13/18 (72.2%) aislamientos susceptibles y a 6/9 (66.6%) especies de aves silvestres. La resistencia a NA y TET fueron transducidos a 8 aislamientos bacterianos, mientras que la resistencia a GE y AM fue transducido a 6; además, 5 aislamientos fueron susceptibles a la transducción de la resistencia a SXT y 4 a CB. Todos los bacteriófagos tuvieron la habilidad de transducir resistencia a dos antibióticos.

Un total de 11/13 (84.6%) aislamientos de *E. coli* mostraron conversión lisogénica al adoptar el gen *qnrA*, mientras que el *tetB* fue transducido a 10/13 (76.9%); *bla<sub>TEM</sub>* fue transducido a 6/13 (46.1%) y 5/13 (38.4%) aislamientos de *Escherichia coli* tuvieron conversión lisogénica cuando mostraron una transducción del gen *sul2*. Los fagos T22 y T11 tuvieron la habilidad de lisogenizar a 6/18 (33.3%) aislamientos bacterianos, seguido por T21 que lisogenizó a 5/18 (27.7%) y T1 a 4/18 (22.2%). T21 y T22 tuvieron la capacidad de transducir 2 genes de resistencia cada uno, mientras que T1 y T11 transfirieron 1 gen (Cuadro 18).

Cuadro 18. Rango de infección y transducción de ARG's y resistencia fenotípica en aves silvestres

Fagos	Resistencia fenotípica transducida	ARG's transducidos	Aislamientos infectados
T1	CB y TET	<i>tetB</i>	E1, E5, E12 y E16
T11	GE y NA	<i>qnrA</i>	E2, E8, E10, E12, E17 y E23
T21	SXT y NA	<i>sul2</i> y <i>qnrA</i>	E5, E10, E12, E15 y E23
T22	AM y TET	<i>tetB</i> y <i>bla<sub>TEM</sub></i>	E6, E8, E12, E16, E18 y E24

Las especies de ave mas susceptibles a la transducción de resistencia fenotípica y genes de resistencia fueron *Anas acuta* y *Spatula discors*, seguido por *Spatula clypeata* y *Mareca strepera*; *Anas diazi* y *Oxyura jamaicensis*.

## DISCUSIÓN.

La resistencia a los antibióticos se puede encontrar en el medio ambiente y su presencia en la naturaleza no es, necesariamente, un indicador del impacto humano, sin embargo el uso de los antibióticos en la agricultura, clínica humana y animal son el principal factor en la aparición de patógenos multirresistentes (Marcelino *et al.*, 2019; Parker, 2016; Shobrak & Abo-Amer, 2014).

En este estudio se recolectaron cepas de *E. coli*, de sitios rurales y peri-urbanos de la zona norte del Estado de México (Atacomulco, Jocotitlán, El Oro e Ixtlahuaca), 197 aislamientos de *E. coli* de aves domésticas (pollos, pavos y patos) que se encuentran en contacto directo con diferentes especies de animales y granjeros. Un estudio similar fue realizado por Okpara *et al.*, (2018) quienes registraron la presencia de este microorganismo en muestras recolectadas de pollos domésticos que se encuentran en contacto con animales y humanos en comunidades rurales y peri-urbanas de Nigeria, Armas-Freire *et al.*, (2015) reportaron 246 aislamientos de *E. coli* obtenidos de pollos domésticos en Ecuador reportando una alta frecuencia de resistencia a quinolonas. Las características de la población, la regularización deficiente en la venta de los antibióticos de importancia clínica y el acceso restringido a los servicios veterinarios puede provocar que los propietarios de los animales hagan uso inadecuado de los antimicrobianos en dosis subterapéuticas o no recetados, provocando la aparición de bacterias multirresistentes.

En diversos estudios, *Escherichia coli* es frecuentemente usado como un bioindicador de resistencia antimicrobiana como lo describe Smith *et al.*, (2007) quienes concluyeron que la administración de antibióticos puede afectar la susceptibilidad de la bacteria, Brower *et al.*, (2017) demostraron que existía una correlación significativa entre el uso de antibióticos como promotores de crecimiento y la aparición de multirresistencia. En nuestro estudio se recolectó *E. coli* con el objetivo de monitorear la multirresistencia de aves domésticas en unidades de producción de traspatio en México; en total se registraron 108/197 (54.8%) aislamientos multirresistentes, de los cuales, 91 (84.2%) fueron de pollos, 4 (3.7%) de pavos y 13 (12%) de patos; la resistencia fenotípica mostrada fue principalmente para AM (80.7%), TET (64.4%), CB (56.3%), NA (26.9%) y STX (26.9%). Tomando en cuenta que

este grupo de antibióticos son frecuentemente usados en el tratamiento de enfermedades en la producción avícola (Van Boeckel *et al.*, 2019<sup>b</sup>), múltiples estudios a nivel mundial han descrito la importancia y afectaciones a la salud humana y animal por las frecuencias altas de *E. coli* multirresistente a este mismo grupo de antibióticos (Li, *et al.*, 2016; Shecho *et al.*, 2017; van den Bogaard *et al.*, 2001).

De los aislamientos totales de pato, 38.4% mostraron resistencia a TE, 26.9% a STX, 23% a NA y 69.2% a AM; en Corea del Sur, Na *et al.*, (2019), reportaron que 54% de aislamientos cloacales de *E. coli* provenientes de patos fueron multirresistentes mostrando mayor resistencia a TE (59.3%), seguido por STX (51.3%), NA (48.7%) y AM (47.8%), esta frecuencia de resistencia es alta en comparación con los obtenidos en nuestro estudio, esto se debe, probablemente, a las diferencias que existen en cada región geográfica y al tipo y métodos de uso de los antimicrobianos. Otro estudio realizado en Columbia Británica, Canada en 2019 por Agunos *et al.*, informaron la presencia de aislamientos de *E. coli* multirresistentes de pollo y pavos domésticos que presentaron resistencia a AM (57 y 43%), STX (11 y 5%), NA (12 y 4%) y TE (41 y 62%), estas frecuencias de resistencia son bajas en comparación con lo reportado en nuestro estudio: AM (78 y 100%), STX (26.8 y 27.2%), NA (25 y 63.6%) y TE (68.7 y 63.6%), de pollo y pavo respectivamente.

Las frecuencias de resistencia registradas en este estudio se deben, probablemente, a las características del perfil agropecuario en las unidades de producción (sanitización, uso de antimicrobianos específicos en etapas de producción y fin zootecnico). Los datos proporcionados por nuestro estudio pueden contribuir al seguimiento de investigaciones futuras para explorar y detectar la multirresistencia y contribuir con los objetivos de la Estrategia Nacional contra la Resistencia a los Antimicrobianos recomendada por la OMS (Agunos *et al.*, 2019).

Es bien sabido que la multirresistencia bacteriana es efectuada por el accionar de múltiples ARG's que diariamente son reportados a nivel mundial en sitios con diferentes sistemas de producción, además de características económicas y culturales particulares. En este trabajo

reportamos una frecuencia total de 56.3% del gen *bla<sub>TEM</sub>*, 19.2% de *tetA* y 9.6% de *qnrA*, Ahmed et al., (2013) reportan una frecuencia similar (57.5%, *bla<sub>TEM</sub>*; 12.3%, *tetA* y 9.5%, *qnrA*) en aislamientos de *E. coli* de pollos con cuadros septicémicos. Por otra parte, en cepas de *E. coli* recolectadas de pollos domésticos, Staji et al., (2018) reportan una frecuencia de los genes *tetB* (20%) y *sulIII* (18.1%) que, de igual manera son similares a las que nosotros reportamos (*tetB*, 20.8% y *sulIII*, 7.6%).

Con base en nuestros resultados y a evidencias reportadas globalmente, se puede concluir que las aves de traspatio (clínicamente sanas) muestreadas en nuestro estudio contienen *E. coli* comensal que juegan un rol importante como reservorio de ARG's; además, el aislamiento de este microorganismo entre poblaciones de animales domésticos representa un impacto negativo ya que coloniza el intestino de diferentes huéspedes que conviven en la misma área geográfica dando lugar a un intercambio genético que potencializa la aparición de enfermedades serias resistentes a los antibióticos que limita las posibilidades de un tratamiento exitoso (Gwidal et al., 2020; Lambrecht et al., 2019).

Por otra parte, en este estudio se recolectaron 24 aislamientos de *E. coli* (37.5%) procedentes de 9 especies de aves silvestres (familia *Anatidae*) con actividad migratoria larga y corta en la ciénega Chimaliapan en el municipio de Lerma Estado de México, México. Este lugar alberga casi 100 especies de aves silvestres migratorias y residentes, peces y aves endémicas en peligro de extinción y una amplia variedad de plantas acuáticas incluyendo especies endémicas, sin embargo existe un grado de contaminación microbiana por coliformes fecales y *Shigella*, debido a las descargas de aguas residuales humana, industriales, agrícolas y ganaderas (Aburto-Medina et al., 2015; Sedeño-Díaz & López-López, 2007; Zepeda-Gómez et al., 2012).

Se ha demostrado que el ecosistema acuático representa uno de los máximos reservorios y principales rutas de tráfico de ARG's y factores de virulencia entre la vida silvestre y humana, ya que permiten que estos persistan en aguas residuales y se propagen en el entorno (Anand et al., 2016; Muniesa et al., 2013a) reintroduciéndose en el medio ambiente a través de aves migratorias y contaminando directa e indirectamente a humanos

y otras especies animales que tienen contacto con el agua contaminada o la cadena alimentaria (Taylor *et al.*, 2011). Diversos estudios demuestran que las aves silvestres que se alimentan o están en contacto con agua contaminada son más propensas a albergar *Escherichia coli* multirresistente con una amplia variedad de factores de virulencia (*eae*, *stx1* y *stx2*) y genes que confieren resistencia a  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido y múltiples ARG's (Parker *et al.*, 2016; Elmberg *et al.*, 2017; Kuczkowski *et al.*, 2016; Rey *et al.*, 2016).

En este trabajo, los aislamientos procedentes de aves silvestres registraron una resistencia a AM de 30.7%, seguido por TET con 19.2%. Aunque el nivel de resistencia es bajo comparado con el estudio realizado por Shobrak & Abo-Amer (2014) en aves silvestres migratorias y residentes, la resistencia a este tipo de antibióticos son ordinariamente encontrados en el microbioma de aves acuáticas debido al uso común y prolongado por varios años en la clínica veterinaria. Además, en este estudio, se encontró una resistencia de 15.3% al NA y 11.5% a SXT, estos niveles de resistencia son similares a los reportados por Rey *et al.* (2016) en aves silvestres comercializadas ilegalmente en Rio de Janeiro, Brasil y en especies de aves silvestres europeas, el registro de resistencia a estos dos grupos de antibióticos es atribuida directamente a acciones antropogénicas ya que a diferencia de antibióticos producidos naturalmente como los  $\beta$ -lactámicos y tetraciclinas, estos son sintetizados químicamente. El origen de la resistencia a las quinolonas se remonta a especies bacterianas de origen acuático y a pesar de que es una droga sintética puede persistir por largos periodos de tiempo en el medio ambiente (Su *et al.*, 2017; Ahlstrom *et al.*, 2018).

Además, en el presente trabajo, se registró una frecuencia total de 33.3% a *bla*<sub>TEM</sub>, 12.5% a *sulIII*, *tetA* y *qnrA*, 8.3% a *tetB* y 4.1% a *sulI* y *qnrB* en las especies de aves silvestres muestreadas. Un estudio meta-transcriptómico realizado en Australia por Marcelino *et al.* (2019), reporta una frecuencia alta de este grupo de ARG's en aves silvestres que se alimentaban en áreas cercanas a plantas tratadoras de agua residual en comparación con aves muestreadas en una región de reserva natural, concluyendo que sitios con acción antropogénica puede contribuir a la diseminación de ARG's en especies de vida silvestre.

Sin embargo, en estudios recientes se han reportado la existencia de genes de resistencia a antibióticos en regiones remotas con nula o baja densidad poblacional como el trabajo realizado por Ahlstrom *et al.* (2018) quienes recolectaron aislamientos de *E. coli* de aves silvestres en una región de Alaska donde encontraron secuencias idénticas de bla<sub>CTX-M</sub> y bla<sub>CMY</sub> entre los mismos aislamientos, además de ser relacionadas con aislamientos humanos y animales silvestres y domésticos.

Análisis genómicos indican que una gran variedad de ARG's pueden ser transferidos via horizontal por MGE's. Se han descrito tres principales mecanismos para la transferencia horizontal de genes, la conjugación y la transformación natural son fenómenos altamente estudiados (Baron *et al.*, 2018; Dominguez *et al.*, 2017); sin embargo, varios informes han puesto de manifiesto que la transducción, juega un papel relevante en la transferencia de ARG's, siendo los bacteriofagos los protagonistas en este mecanismo de propagación de genes de resistencia (Brower *et al.*, 2017; Okpara *et al.*, 2018; Muniesa *et al.*, 2013a).

Recientemente, los bacteriófagos han retomado un auge y se han convertido en objeto de estudio para explicar y combatir el fenómeno de resistencia bacteriana debido a su abundancia y alta especificidad a bacterias diana, y ser considerados como el mayor vehiculo en la transferencia genética horizontal debido a la alta capacidad de sobrevivencia en medios naturales.

Existen diversos estudios que evidencian la presencia de fagos en ambientes naturales contaminados siendo los acuáticos su principal reservorio, pero de igual manera se han logrado aislar de multiples bacterias patógenas vinculadas con procesos de infecciones humanas y animales que han sido letales. A pesar de eso, no existe información que detalle el aislamiento fágico a partir de bacterias procedentes de aves silvestres migratorias y residentes. En nuestro estudio, a partir de los aislamientos de *E. coli* multirresistentes recolectados de 4 especies de aves silvestres migratorias en la Ciénega Chimaliapan, se obtuvieron 4 fagos que contienen 4 genes de resistencia (*tetB*, *qnrA*, *sulIII* y *bla<sub>TEM</sub>*) vinculados con resistencia fenotípica al grupo de antibióticos de tetracilinas, quinolonas y beta-lactámicos con una titulación máxima de  $6.7 \times 10^6$  (PFU/ml). Un estudio similar fue

realizado por Shousha *et al.* (2015) quienes aislaron 22 fagos de un total de 50 muestras de carne de pollo obtenida de supermercados, mercados menores y carnicerías. Calci *et al.*, (1998) midieron densidades de bacteriófagos (PFU/g) aislados de heces de animales domésticos y acuáticos, encabezando la máxima densidad en gaviotas seguido por cerdos y pollos. Por otra parte, en el estudio realizado por Ramirez-Martínez *et al.*, 2018 reportaron el aislamiento de seis familias de fagos (*Myoviridae*, *Siphoviridae*, *Podoviridae*, *Ackermannviridae*, *Inoviridae* y *Microviridae*) procedentes de heces de aves silvestres migratorias clínicamente sanas, pero no reportan la presencia de ARG's.

Múltiples estudios demuestran la presencia de bacteriófagos portadores de genes que confieren resistencia a diferentes grupos de antibióticos como a  $\beta$ -lactámicos, fluoroquinolonas, macrólidos, tetraciclinas, sulfas, etc. en diferentes hábitats (Muniesa *et al.*, 2013b). En nuestro estudio, a partir de aislamientos de *E. coli*, se obtuvieron fagos portadores de 4/7 genes de resistencia (*tetB*, *qnrA*, *sulIII* y *bla<sub>TEM</sub>*), donde *qnrA* y *tetB* fueron los más frecuentes. Según diversos autores, estos fagos juegan un rol importante en el tráfico y mantenimiento de ARG's en el medio ambiente; en un estudio realizado por Anand *et al.* (2016) en la India, obtuvieron aislamientos de *E. coli* procedentes de agua residual animal, a partir de dichos aislamientos se recolectaron fagos portadores de *bla<sub>TEM</sub>* y *tetA*. Otro estudio similar fue reportado por Colomer-Lluch *et al.* (2011a) quienes aislaron fagos con el gen *bla<sub>TEM</sub>* de aguas residuales de rastros y granjas de cerdos, aves y ganado. Wang *et al.* (2018), identificó *sulIII* en bacteriófagos recolectados de plantas tratadoras de aguas residuales municipales de China. Otro estudio realizado en 1998 por Calci *et al.*, reportan el aislamiento de fagos en heces fecales de animales domésticos (pollos, patos, caballos, vacas, etc.) y aves acuáticas (patos, gansos y gaviotas). Estudios recientes han reportado el aislamiento de fagos en patos domésticos que mantienen una convivencia con aves silvestres y en pollos domésticos clínicamente sanos (Fawaz *et al.*, 2016; Lima *et al.*, 2017).

La presencia de fagos en aves domésticas representa un problema en granjas de producción de traspatio ya que pueden llegar a infectar a bacterias de diferente género alojadas en distintas especies de animales y humanos, en un estudio realizado por Diene *et al.* (2017),

dedujeron que los profagos pueden contribuir a la aparición de enfermedades humanas al analizar secuencias genómicas de profagos integrados en cepas de *Staphylococcus aureus* ST398 en pacientes humanos con infecciones de torrente sanguíneo que mantenían un contacto directo con animales domésticos. Evidencia actual demuestra que diversos factores de virulencia y ARG's están siendo movilizados entre animales y humanos via fágica a través de la transducción.

La transducción mediada por fagos juega un rol importante en el proceso de transferencia horizontal genética provocando la aparición de nuevas cepas patógenas con un resistoma mejorado. El curso epidemiológico se agrava cuando las aves silvestres migratorias infectadas por fagos que poseen ARG's mantienen una estrecha interacción indirecta (plantas tratadoras de agua residual, mercados y pastizales) o directa (convivio entre animales domésticos) con unidades de producción de traspatio en zonas rurales o periurbanas. Cuando existe un contacto directo, las aves silvestres pueden desechar en heces fecales fagos integrados, o no, en bacterias que pueden ser consumidas por aves domesticas (patos, pollos y pavos) creando un ciclo de diseminación exponencial (Kobayashi *et al.*, 2009). Los fagos recolectados en nuestro estudio fueron capaces de infectar a un total de 13 aislamientos de *E. coli* de aves silvestres, donde el gen *qnrA* fue transducido a un total de 11 aislamientos, mientras que el gen *tetB* a 10, el gen *bla<sub>TEM</sub>* a 6 y *sullI* a 5 aislamientos. De igual manera los fagos fueron capaces de realizar conversión lisogénica en cepas de *E. coli* de pollos, pavos y patos, las cuales expresaron resistencia a 7 antibióticos (CB, TET, GE, NA, SXT y AM), además, la transducción del gen *qnrA* se llevó a cabo en 5 aislamientos bacterianos, seguido por *tetB* y *bla<sub>TEM</sub>* transducidos a 3 y *sullI* a 2 aislamientos.

Un trabajo realizado en 2015 por Shousa *et al.*, reportaron la conversión lisogénica de cepas de *E. coli* de referencia al expresar resistencia fenotípica a kanamicina, cloranfenicol, ampicilina y tetraciclina; por otra parte Iversen *et al.* (2015), mencionaron la susceptibilidad de cepas de *E. coli* comensales, recolectadas de niños y adultos al fago  $\Phi$ 734 que contiene *stx2*; además García-Aljaro *et al.* (2006), muestran la transducción de bacteriófagos de *E. coli* O2:H25 a *Shigella sonnei* reteniendo su habilidad para producir la

proteína Stx<sub>2</sub>. La facultad que tienen los fagos de retener y diseminar genes de resistencia y factores de virulencia en diferentes ambientes representa un riesgo epidemiológico para los habitantes que conviven diariamente en unidades de producción, provocando que estos sean altamente susceptibles de padecer enfermedades que podrían ser mortales.

Finalmente, este estudio destaca la necesidad urgente de monitorear los ARG's vinculados con la expresión de resistencia fenotípica y la transducción por MGE's en unidades de producción de traspatio en zonas rurales y peri-urbanas en México; de igual manera es necesario continuar con estudios genómicos y transcriptómicos para monitorear otros posibles mecanismos de diseminación de ARG's en ambientes naturales via fágica y el posible riesgo de transmisión de estos al humano y animales domesticos y silvestres en comunidades específicas.

## CONCLUSIONES

1. Se analizaron un total de 221 aislamientos de *E. coli*, de los cuales, 197 fueron de aves de corral y 24 de aves silvestres.
2. En los aislamientos de aves de corral se encontró un alto porcentaje de resistencia antimicrobiana para AM, TET y CB; mientras que, en aislamientos de aves silvestres el porcentaje fue menos a 50.
3. Se registró que 54.8% de los aislamientos de aves de corral y 25% de aves silvestres fueron multirresistentes.
4. En aislamientos de aves de corral y silvestres se identificó la presencia de genes que confieren resistencia al grupo de antibióticos de quinolonas (*qnrA* y *qnrB*), sulfonamidas (*sulI* y *sulII*), tetraciclinas (*tetA* y *tetB*) y beta-lactámicos (*bla<sub>TEM</sub>*) relacionados con una resistencia fenotípica.
5. Se aislaron 4 bacteriófagos procedentes de aislamientos de *E. coli* de aves silvestres con la presencia de 4 ARG's.
6. Los bacteriófagos transdujeron 4 genes de resistencia a los antibióticos a 7/13 aislamientos de *E. coli* de aves de corral y a 13/18 de aves silvestres.
7. 6/13 aislamientos de *E.coli* de aves de corral y 11/18 de aves silvestres mostraron conversión lisogénica.

## SUGERENCIAS.

1. Muestrear frecuentemente a aves de corral y silvestres para monitorear la movilización y detección temprana de *Escherichia coli*.
2. Realizar estudios de resistencia microbiana priorizando antibióticos de interés en salud animal y humana.
3. Investigar genes que confieren virulencia y resistencia a los antibióticos de última generación.
4. Ampliar la búsqueda de bacteriófagos lisogénicos con presencia de genes de resistencia a antibióticos y factores de virulencia en diferentes especies de animales en contacto directo con humanos.
5. Determinar la frecuencia de transducción de genes de resistencia a los antibióticos y factores de virulencia entre especies bacterianas procedentes de diversas fuentes.

## LITERATURA REVISADA.

Abedon ST, García P, Mullany P, Aminov R (2017). Editorial: Phage Therapy: Past, Present and Future. *Frontiers in Microbiology*, 8(981)

Abedon ST, Kuhl SJ, Blasdel BG, Kutter EM (2011b). Phage treatment of human infections. *Bacteriophage*, 1(2), 66-85

Aburto-Medina A, Castillo D, Ortíz I, Hernandez E, List R, Adetutu E. (2015). Microbial Community and Pollutants Survey in Sediments of Biologically Important Wetlands in Lerma, Mexico. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 31(1), 7-22

Ackermann HW. (2001). Frequency of morphological phage descriptions in the year 2000. *Archives of Virology*. 5, 843-857.

Ackermann HW. (2005). Bacteriophage Classification. En K. E. A, *Bacteriophages: Biology and Applications*. Florida, EE.UU: CRC Press.

Ackermann HW. (2007). 5500 phages examined in the electron microscope. *Archives of Virology*, 152(2), 227-243.

Aguilar-Montes de Oca S, Talavera-Rojas M, Soriano-Vargas E, Barba-León J, Vazquez-Navarrete J. (2015). Determination of extended spectrum B-lactamases and plasmid-mediated quinolone resistance in *Escherichia coli* isolates obtained from bovine carcasses in Mexico. *Trop Anim Health Prod*, 47(5), 975-981.

Agunos A, Gow SP, Léger DF, Carson CA, Deckert AE, Borman AL, Loest D, Irwin R J, Reid-Smith RJ (2019). Antimicrobial Use and Antimicrobial Resistance Indicators—Integration of Farm-Level Surveillance Data From Broiler Chickens and Turkeys in British Columbia, Canada. *Frontiers in Veterinary Science*, 6(131).

Ahlstrom CA, Bonnedahl J, Woksepp H, Hernandez J, Olsen B, Ramey AM (2018). Acquisition and dissemination of cephalosporin-resistant *E. coli* in migratory birds sampled at an Alaska landfill as inferred through genomic analysis. *Scientific Reports*. 8:7361.

Ahmed AM, Shimamoto T, Shimamoto T (2013). Molecular characterization of multidrug-resistant avian pathogenic *Escherichia coli* isolated from septicemic broilers. *International Journal of Medical Microbiology*, 303(8), 475-83.

Alcalá L, Alonso C.A, Simón C, González-Esteban C, Orós J, Rezusta A, Ortega C, Torres C (2016). Wild birds, Frequent Carriers of Extended-Spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) Producing *Escherichia coli* of CTX-M and SHV-12 Types. *Microbial Ecology*. 72, 861-869.

Aminov R, Caplin J, Cbanishvili N, Coffey A, Cooper I, De Vos D, Doškar J, Friman VP, Kurtböke I, Pantucek R, Pirnay JP, Resch G, Robde C, Sybesma W, Wittmann J. (2017). Application of bacteriophages. *Microbiology Australia*, 38(2), 63 – 66.

Anand T, Bera BCh, Vaid RK, Barua S, Riyesh T, Virmani N, Hussain M, Singh RK, Tripathi BN (2016). Abundance of antibiotic resistance genes in environmental bacteriophages. *Journal of General Virology*. 97, 3458-3466.

Armas-Freire P, Trueba G, Proaño-Bolaños C, Levy K, Zhang L, Marrs CF, Cevallos W, Eisenberg JNS (2015). Unexpected distribution of *qnrB* gene in *E. coli* isolates from different origins in Ecuador. *International Microbiology*, 18(2), 85 - 90.

Balcazar JL (2014). Bacteriophages as Vehicles for Antibiotic Resistance Genes in the Environment. *PLoS Pathogens*, 10(7), e1004219

Baron S, Le Devendec L, Touzain F, Jouy E, Lucas P, de Boisséson C, Larvor E, Kempf I (2018). Longitudinal study of *Escherichia coli* plasmid resistance to extended-spectrum cephalosporins in free-range broilers. *Veterinary Microbiology*, 216, 20-24

Bertin A, De Frutos M, Letellier L (2011). Bacteriophages-host interactions leading to genome internalization. *Current Opinion in Microbiology*. 4, 492-496.

Bonnedahl J, Hernandez J, Stedt J, Waldenström, J, Olsen B, Drobni M (2014). Extended-Spectrum  $\beta$ -lactamase-producing in *Escherichia coli* and *Klebsiella* in Gulls, Alaska, USA. *Emerging Infectious Disease*, 5, 897-899.

Borges CA, Beraldo LG, Maluta RP, Cardozo MV, Barboza KB, Guastalli EAL, Kariyawasam S, DebRoy C, Ávila FA (2016). Multidrug-resistant pathogenic *Escherichia coli* isolated from wild birds in a veterinary hospital. *Avian Pathology*, 46(1), 76-83.

Brabban AD, Hite E, Callaway TR (2005). Evolution of Foodborne Pathogens via Temperate Bacteriophage-Mediated Gene Transfer. *Foodborne Pathogens and Disease*. 4, 287-303.

Brüssow H (2017). Phage therapy for the treatment of human intestinal bacterial infections: soon to be a reality? *Expert review of gastroenterology and hepatology*, 11(9), 785-788

Calci KR, Burkhardt W, Watkins WD, Rippey SR (1998). Occurrence of Male-Specific Bacteriophage in Feral and Domestic Animal Waste, Human Feces, and Human-Associated Wastewaters. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(12), 5027-5029.

Calero-Cáseres W, Muniesa M (2016). Persistence of naturally occurring antibiotic resistance genes in the bacteria and bacteriophage fractions of wastewater. *Water Research*, 95, 11-18

Clark JR (2015). Bacteriophage therapy: history and future prospects. *Future Virology*, 10, 449-461.

CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute) (2012). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, 19th edition, Approved Standard M02-A11. Wayne, PA: CLSI.

CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute) (2015). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*, 25<sup>nd</sup> informational supplement. M100-S25. Wayne, PA: CLSI.

Colomer-Lluch M, Calero-Cáceres W, Jebri S, Hmaied F, Muniesa M, Jofre J (2014a) Antibiotic resistance genes in bacterial and bacteriophage fractions of Tunisian and Spanish wastewater as markers to compare the antibiotic resistance patterns in each population. *Environment International*, 73, 167-175.

Colomer-Lluch M, Jofre J, Muniesa M (2011). Antibiotic Resistance Genes in the Bacteriophage DNA Fraction of Environmental Samples. *PLoS One*, 6(3), e17549

Colomer-Lluch M, Jofre J, Muniesa M (2014b). Quinolone resistance genes (qnrA and qnrS) in bacteriophage particles from wastewater samples and the effect of inducing agents on packaged antibiotic resistance genes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 5, 1265-1274

Costa D, Vinue L, Poeta P, Coelho AC, Manuela MM, Sáenz Y, Somalo S, Zarazaga M, Rodrigues J, Torres C (2009). Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates in faecal samples of broilers. *Veterinary Microbiology*, 138, 339–344

Cuca-García JM, Gutiérrez-Arenas DA, López-Pérez E (2015). La avicultura de traspatio en México: Historia y caracterización. *AgroProductividad*, 8, 30-36

Dallenne C, da Costa A, Decré D, Favier C, Arlet G (2010). Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important B-lactamases in Enterobacteriaceae. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65, 490–495.

Diene SM, Corvaglia AR, François P, van der Mee-Marquet N. (2017). Prophages and adaptation of *Staphylococcus aureus* ST398 to the human clinic. *BMC Genomics*, 18(133)

Dini C. (2011). Aislamiento y caracterización molecular de bacteriófagos de bacterias enteropatógenas para biocontrol de enfermedades transmitidas por alimentos (Tesis Doctoral), Universidad Nacional de la Plata Facultad de Ciencias Exactas, Departamento de Química y Departamento de Ciencias Biológicas.

Dominguez JE, Figueroa ERA, Redondo LM, Cejas D, Gutkind GO, Chacana PA, Di Conza JA, Fernández-Miyakawa ME (2017). Plasmid-mediated colistin resistance in *Escherichia coli* recovered from healthy poultry. *Revista Argentina de Microbiología*, 49(3), 297-298

Domínguez NN (2020). Bacteriófagos. *Revista de la Facultad de Medicina Humana*. 20, 164-165

Duckworth DH (1976). Who Discovered Bacteriophage? *Bacteriology Reviews*. 40, 793-802.

Elbreki M, Ross RP, Hill C, O'Mahony J, McAuliffe O, Coffey A (2014). Bacteriophages and Their Derivatives as Biotherapeutic Agents in Disease Prevention and Treatment. *Journal of Viruses*. 2014

Elmberg J, Berg C, Lerner H, Waldenström J, Hessel R (2017). Potential disease transmission from wild geese and swans to livestock, poultry and humans: a review of the scientific literatura from a One Health perspective. *Infection Ecology & Epidemiology*, 7(1), 1300450

El-Shazly DA, Nasef SA, Mahmoud FF, Jonas D (2017). Expanded spectrum  $\beta$ -lactamase producing *Escherichia coli* isolated from chickens with colibacillosis in Egypt. *Poultry Science*, 96(7), 2375-2384

Farfán-García AE, Ariza-Rojas SC, Vargas-Cárdenas FA, Vargas-Remolina VV (2016). Mecanismos de virulencia de *Escherichia coli* enteropatógena. *Revista Chilena de Infectología*, 4, 438-450.

Fawaz, M.; Vijayakumar, P.; Mishra, A.; Gandhale, P.N.; Dutta, R.; Kamble, N.M.; Sudhakar, S.B.; Roychoudhary, P.; Kumar, H.; Kulkarni, D.D.; Raul, A.A. (2016). Duck gut viral metagenome analysis captures snapshot of viral diversity. *Gut Pathogens*. 8, 30.

Feria ATP, Sánchez-Rojas G, Ortiz-Pulido R, Bravo-Cadena J, Calixto PE, Dale JM, Duberstein JN, Illoldi-Rangel P, Lara C, Valencia-Herverth J (2013). Estudio del Cambio climático y su efecto en las aves en México: enfoques actuales y perspectivas futuras. *Huitzil. Revista Mexicana de Ornitología*. 14 (1), 47-55

Fokine, A.; Rossmann, M.G. (2014). Molecular architecture of tailed double-stranded DNA phages. *Bacteriophage*, 4(2), e28281

Fortier LC, Moineau S (2009). Phage Production and Maintenance of Stocks, Including Expected Stock Lifetimes. En: *Bacteriophages: Methods and Protocols*, Springer Science + Business, Volumen 501 of Humana Press, pp 203 – 219.

García-Aljaro C, Muniesa M, Jofre J, Blanch AR (2006). Newly identified bacteriophages carrying the stx2g Shiga toxin gene isolated from *Escherichia coli* strains in polluted waters. *FEMS Microbiology Letters*, 1, 127-135

Gaukler SM, Linz GM, Sherwood JS, Dyer NW, Bleier WJ, Wannemuehler YM, Nolan LK, Logue CM. (2009). *Escherichia coli*, *Salmonella* and *Mycobacterium avium* subsp.

*Paratuberculosis* in Wild European Starlings at a Kansas Cattle Feedlot. *Avian Diseases*. 53, 544 – 551.

Giacopello C, Foti M, Mascetti A, Grosso F, Ricciardi D, Fisichella V, Lo Piccolo F (2016). Antimicrobial resistance patterns of European wild bird species admitted in a wildlife rescue centre. *Veterinaria Italiana*. 52(2), 139 – 144.

Glenn LM, Englen MD, Lindsey RL, Frank JF, Turpin J.E, Berrang ME, Meinersmann RJ, Fedorka-Cray PJ, Frye JG (2012). Analysis of Antimicrobial Resistance Genes Detected in Multiple-Drug-Resistance *Escherichia coli* Isolates from Broiler Chicken Carcasses. *Microbial Drug Resistance*, 18(4), 453-463

Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (2019). Prevé Sader aumento en producción de carne de pollo y huevo para el 2019. Consultado 25 de junio de 2020. (Recuperado de <https://www.gob.mx/agricultura/prensa/preve-sader-aumento-en-produccion-de-carne-de-pollo-y-huevo-para-el-2019-205085#documentos>)

Gomes TAT, Elias WP, Scaletsky ICA, Guth BEC, Rodrigues JF, Piazza RMF, Ferreira LCS, Martinez MB (2016). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47, 3-30.

Górski A, Międzybrodzki R, Weber-Dąbrowska B, Fortuna W, Letkiewicz S, Rogóz P, Jończyk-Matysiak E, Dąbrowska K, Majewska J, Borysowski J (2016). Phage Therapy: Combating Infections with Potential for Evolving from Merely a Treatment for Complications to Targeting Diseases. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1515.

Guenther S, Grobbel M, Lübke-Becker A, Goedecke A, Friedrich ND, Wieler LH, Ewers C (2010). Antimicrobial resistance profiles of *Escherichia coli* from common European wild bird species. *Veterinary Microbiology*, 144, 219–225

Guttman B, Raya R, Kutter E. (2005). Basic Phage Biology. En S. A. Kutter E, *Bacteriophages: Biology and Applications*. Florida, EE. UU.: CRC Press.

Gwidal M, Awad A, El-Ashker M, Hotzel H, Monecke S, Ehricht R, Müller E, Reißig A, Barth SA, Berens C, Braun SD (2020). Microarray-based detection of resistance and virulence factors in comensal *Escherichia coli* from livestock and farmers in Egypt. *Veterinary Microbiology*, 240, 108539

Hankin ME. (1896). L'action bactéricide des eaux de la Jumna et du Gange sur le microbe du choléra. *Annales de l'Institut Pasteur*, 10, 511-523.

Hedayatianfard K, Akhlaghi M, Sharifiyazdi H (2014). Detection of tetracycline resistance genes in bacterial isolated from fish farm using polymerase chain reaction. *Veterinary Research Forum*, 5(4), 269-275

Heijnen L, Medena G. (2006). Quantitative detection of E. coli O157 and other shiga toxin producing E. coli in water samples using a culture method combined with real-time PCR. *Journal Water Health*, 4(4), 487-498.

Hernández-Colina A, Yadeun M, García-Espinosa G. (2018). Comunidad de aves acuáticas de un humedal protegido en el Estado de México, México. *Huitzil, Revista Mexicana de Ornitología*, 19(1), 85-95.

Hiroi M, Yamazaki F, Harada T, Takahashi N, Iida N, Noda Y, Yagi M, Nishio T, Kanda T, Kawamori F, Sugiyama K, Masuda T, Hara-Kudo Y, Ohashi N (2012). Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in food-producing animals. *Journal of Veterinary Medical Science*, 74, 189-195.

Hooton SP, Atterbury RJ, Connerton IF (2011). Application of bacteriophage cocktail to reduce *Salmonella Typhimurium* U288 contamination on pig skin. *International Journal of Food Microbiology*, 2, 157-163.

Hughes LA, Bennett M, Coffey P, Elliott J, Jones TR, Jones RC, Lahuerta-Marin A, McNiffe K, Norman D, Williams NJ, Chantrey J. (2009). Risk factors for the occurrence of *Escherichia coli* virulence genes *aea*, *stx1* and *stx2* in wild bird populations. *Epidemiology & Infection*, 137, 1574-1582.

ICTV (2014). Virus Taxonomy. Tomado de [ictvonline.org](http://ictvonline.org)

Iversen H, L'Abée-Lund TM, Aspholm M, Arnesen LPS, Lindbäck T (2015). Commensal *E. coli* Stx2 lysogens produce high levels of phages after spontaneous prophage induction. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 5(5).

Khairnar K (2016). Ganges: special at its origin. *Journal of Biological Research-Thessaloniki*. 23(16).

Keen EC (2014). A century of phage research: Bacteriophages and the shaping of modern biology. *Bioessays*, 37,6-9.

Kern MB, Klemmensen T, Frimodt – Møller N, Espersen F (2002). Susceptibility of Danish *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infections and bacteraemia, and distribution of *sul* genes conferring sulphonamide resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 50, 513 – 516.

Kobayashi H, Kanazaki M, Hata E, Kubo M (2009). Prevalence and Characteristic of *eae*- and *stx*-Positive Strains of *Escherichia coli* from Wild Birds in the Immediate Environment of Tokyo Bay. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(1), 292 – 295

Koga VL, Scandorieiro S, Vespero EC, Oba ., de Brito BG, de Brito KCT, Nakazato G, Kobayashi RKT (2015). Comparation of Antibiotic Resistance and Virulence Factors among *Escherichia coli* Isolated from Conventional and Free-range Poultry. *Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International*, 2015

Konicek C, Vodrázka P, Barták P, Knotek Z, Hess C, Račka K, Hess Michael and Troxler S. (2016). Detection of zoonotic pathogens in wild birds in the cross-border region Austria – Czech Republic. *Journal of Wildlife Disease*, 52(4), 850-861

Kraychete GB, Botelho LA, Campana EH, Picão RC, Bonelli RR (2016) Updated multiplex PCR for detection of all six plasmid-mediated *qnr* gene families. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(12), 7524-7526.

Kropinski, AM, Sulakvelidze, A, Konczy, Poppe C (2007). Salmonella Phages and Prophages-Genomics and Practical Aspects. En E. A. Schatten H, *Salmonella. Methods and Protocols*. New Jersey: Editorial Humana Press.

Kuczkowski M, Krawiec M, Voslamber B, Książczyk, Płoskońska-Bugla G, Wieliczko A. (2016). Virulence genes and the Antimicrobial Susceptibility of *Escherichia coli*, Isolated from Wild Waterbirds, in the Netherlands and Poland. *Vector-Borne and Zoonotic Disease*, 16(8), 528-536.

Kutter ME, Kuhl S, Abedon TS. (2015). Re-establishing a place for phage therapy in western medicine. *Future Microbiology*, 10(5), 685-688

Landes Bioscience. The bactericidal action of the waters of the Jamuna and Ganges rivers on Cholera microbes. *Ann. Inst. Pasteur*, 10: 511-523 (1896), *Bacteriophage*. 2011;1:117-126.

Lambrecht E, Van Coillie E, Van Meervenne E, Boon N, Heyndrickx M, Van de Wiele T (2019). Commensal *E. coli* rapidly transfer antibiotic resistance genes to human intestinal microbiota in the Mucosal Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem (M-SHIME). *International Journal of Food Microbiology*, 311, 108357

Leiman PG, Arisaka F, van Raaij MJ, Kostyuchenko VA, Aksyuk AA, Kanamaru, S, Rossman MG (2010). Morphogenesis of the T4 tail and tail fibers. *Virology Journal*, 7(355)

Li S, Zhao M, Liu J, Zhou, Y, Miao Z (2016) Prevalence and Antibiotic Resistance Profile of Extended-Spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* Isolated from Healthy Broilers in Shandong Province, China. *Journal of Food Protection*, 7,1169-1173.

Lima DA, Cibulski SP, Finkler F, Teixeira TF, Varela APM, Cerva C, Loiko MR, Scheffer CM, dos Santos HF, Mayer FQ, Roehle PM (2017). Fecal biome of healthy chickens reveals a large diversity of the eukaryote viral community, including novel circular ssDNA viruses. *Journal of General Virology*, 98, 690-703

Liu X, Jiang H, Gu Z, Roberts JW (2013). High-resolution view of bacteriophage lambda gene expression by ribosome profiling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 29, 11928 – 11933

Madigan TM, Martinko MJ, Parker J (2004). *Brock. Biología de los microorganismos* (10ª edición ed.). Madrid, España: Pearson Educación.

Marcelino VR, Wille M, Hurt AC, González-Acuña D, Klaassen M, Schlub TE, Eden JS, Shi M, Iredell JR, Sorrell TC, Holmes EC (2019). Meta-transcriptomics reveals a diverse antibiotic resistance gene pool in avian microbiomes. *BMC Biology*, 17(31)

Mo SS, Slettemeås JS, Berg ES, Norström M, Sunde M (2016). Plasmid and Host Strains Characteristics of *Escherichia coli* Resistant to Extended-Spectrum Cephalosporins in the Norwegian Broiler Production. *PLOS ONE*, 11(4), e0154019

Moawad AA, Hotzel H, Neubauer H, Ehrlich R, Monecke S, Tomaso H, Hafez HM, Roesler U, El-Adawy H (2018). Antimicrobial resistance in *Enterobacteriaceae* from

healthy broilers in Egypt: emergence of colistin-resistance and extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli*. *Gut Pathogens*, 10(39)

Morse SA, Meitzner TA (2011). Bases de la Microbiología. En M. A. Jawetz, *Microbiología médica*. México, D.F., México: McGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES, S.A de C.V.

Muniesa M, Colomer-Lluch M, Jofre J (2013a). Could bacteriophages transfer antibiotic resistance genes from environmental bacteria to human - body associated bacterial population? *Mobile Genetic Elements*, 3(4), e25847

Muniesa M, Colomer-Lluch M, Jofre J (2013b). Potential impact of environmental bacteriophages in spreading antibiotic resistance genes. *Future Microbiology*, 6, 739-751

Na SH, Moon DC, Choi MJ, Oh SJ, Jung DY, Sung EJ, Kang HY, Hyun BH, Lim SK (2019). Antimicrobial resistance and Molecular Characterization of Extended-Spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* Isolated from Ducks in South Korea. *Foodborne Pathogens and Disease*, 12, 799-806

Okpara EO, Ojo OE, Awoyomi OJ, Dipeolu MA, Oyekunle MA, Schwarz S. (2018). Antimicrobial usage and presence of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae in animal-rearing household of selected rural and peri-urban communities. *Veterinary Microbiology*, 218, 31-39

Overdest IT, Heck M, Van Der Zwaluw K, Huijsdens X, Van Santen M, Rijnsburger M, Eustace A, Xu L, Hawkey P, Savelkoul P, Vandenbroucke-Grauls C, Willemsen I, Van Der Ven J, Verhulst C, Kluytmans JA (2014). Extended-spectrum beta-lactamase producing *Klebsiella* spp. in chicken meat and humans: a comparison of typing methods. *Clinical Microbiology and Infection*, 20, 251-255

Parker D, Sniatynski MK, Mandrusiak D, Rubin JE (2016). Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase producing *Escherichia coli* isolated from wild birds in Saskatoon, Canada. *Letters in Applied Microbiology*, 63, 11-15

Pavlickova S, Dolezalova M, Holko I (2015). Resistance and virulence factors of *Escherichia coli* isolated from chicken. *Journal of Environmental Science and Health*, 50, 417-421.

Pickard DJ (2009) Preparation of Bacteriophage Lysate and Pure DNA. En: *Bacteriophages. Methods and Protocols, Volume 2: Molecular and Applied Aspects*, Humana Press, Volume 502 of the series Methods in Molecular Biology, Reino Unido, pp 3-9.

Poirel L, Madec JY, Lupo A, Schink AK, Kieffer N, Nordmann P, Schwarz S (2018). Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli*. *Microbiology Spectrum*, 6(4), ARBA-0026-2017

Prescott M, Harley JP, Klein DA. (2004). *Microbiología* (Quinta edición ed.). (U. I. Rasilla CG, Trad.) Madrid: The McGraw-Hill Companies, Inc.

Quirós P, Colomer-Lluch M, Martínez-Castillo A, Miró E, Argente M, Jofre J, Navarro F, Muniesa M (2014). Antibiotic Resistance Genes in the Bacteriophage DNA Fraction of Human Fecal Samples. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1, 606-609.

Ramírez-Martínez L, Loza-Rubio E, Mosqueda J, González-Garay ML, García-Espinoza G (2018). Fecal virome composition wild duck species. *PLoS ONE*, 13(11), e0206970.

RAMSAR. The Ramsar Convention Secretariat Gland, Switzerland. 2014 (Junio, 2019). Disponible en <https://www.ramsar.org/es>

Refardt D (2011). Within-host competition determines reproductive success of temperate bacteriophages. *The ISME Journal*, 9, 1451-1460.

Rey MCA, Pereira IA, Falavina REM, Prazeres RD, Siciliano S (2016). Frequency of zoonotic bacteria among illegally traded wild birds in Rio de Janeiro. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47, 882 – 888.

Roach DR, Donovan DM (2015). Antimicrobial bacteriophage – derived proteins and therapeutic applications. *Bacteriophage*, 5(3), e1062590.

Rodríguez-Angeles G (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Pública de México*, 5, 464-475.

Roth N, Käsbohrer A, Mayrhofer S, Zitz U, Hofrath C, Doming KJ (2019). The application of antibiotics in broiler production and the resulting antibiotic resistance in *Escherichia coli*: A global overview. *Poultry Science*, 4, 1791 – 1804.

Roy S (2013). Bacteriophage Therapy: Issues and Controversies. *Bangladesh Journal of Medical Microbiology*, 7:25-28.

Saliu EM, Vahjen W, Zentek J (2017). Types and prevalence of extended-spectrum beta-lactamase producing *Enterobacteriaceae* in poultry. *Animal Health Research Reviews*, 18(1), 46-57.

Salmond GPC, Fineran PC (2015). A century of the phage: past, present and future. *Nature Reviews Microbiology*, 13(12), 777-786.

Seo KW, Lee YJ (2019). Characterization of plasmid mediated quinolone resistance determinants in ciprofloxacin resistant-*Escherichia coli* from chicken meat produced by integrated broiler operations in Korea. *International Journal of Food Microbiology*, 307, 108274.

Shecho M, Thomas N, Kemal J, Muktar Y (2017). Cloacal Carriage and Multidrug Resistance *Escherichia coli* O157:H7 from Poultry Farms, Eastern Ethiopia. *Journal of Veterinary Medicine*, 2017, 8264583.

Shin H, Lee J, Kim H, Choi Y, Heu S, Ryu S (2012). Receptor Diversity and Host Interaction of Bacteriophages Infecting *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *PLoS One*, 7(8), e43392.

Sedeño-Díaz J, López-López E (2007). Water Quality in the Río Lerma, Lerma: An Overview of the Last Quarter of the Twentieth Century. *Water Resour Manage*, 21, 1797-1812

Sekulović O, Fortier LC (2016). Characterization of Functional Prophages in *Clostridium difficile*. En: *Clostridium difficile: Methods and Protocols, Volume 1: Isolation, Characterization and Interactions*, Springer Science + Business, Volumen 1476 of Methods in Molecular Biology, New York, pp 143 – 165.

Sharp R. (2001). Bacteriophages: biology and history. *Journal Chemical Technology and Biotechnology*. 76, 667-672.

Shobrak MY, Abo-Amer AE (2014). Role of wild birds as carriers of multi-drug resistant *Escherichia coli* and *Escherichia vulneris*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(4), 1199-1209.

Shousha A, Awaiwanont N, Sofka D, Smulders FJM, Paulsen P, Szostak MP, Humphrey T, Hilbert F (2015). Bacteriophages isolated From Chicken Meat and the Horizontal Transfer of Antimicrobial Resistance Genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(14), 4600-4606.

Smith JL, Drum DJV, Dai Y, Kim JM, Sanchez S, Maurer JJ, Hofacre CL, Lee MD (2007). Impact of Antimicrobial Usage on Antimicrobial Resistance in Commensal *Escherichia coli* Strains Colonizing Broiler Chickens. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(5), 1404-1414.

Spricigo DA (2011). *La desinfección basada en bacteriófagos como herramientas de biocontrol de Salmonella en alimentos*. (Tesis doctoral). Universidad Autónoma de Barcelona, Departamento de Genética y de Microbiología.

Staji H, Tonelli A, Zahraei ST, Mahdavi A, Shahroozian E, Salimi BMR, Mehdizade MS, Keywanloo M, Ahmadi HM, Emadi CH, Ashrafi TI, Atefi TE (2018). Distribution of Antibiotic Resistance Genes among the Phylogroups of *Escherichia coli* in Diarrheic Calves and Chickens Affected by colibacillosis in Tehran, Iran. *Archives of Razi Institute*, 73(2), 131-137.

Stedt J, Bonnedahl J, Hernandez J, McMahon BJ, Hasan B, Olsen B, Drobni M, Waldenström J (2014). Antibiotic resistance patterns in *Escherichia coli* from gulls in nine European countries. *Infection Ecology and Epidemiology*, 4, 21565

Su JQ, An XL, Li B, Chen QL, Gillings MR, Chen H, Zhang T, Zhu YG (2017). Metagenomics of urban sewage identifies an extensively shared antibiotic resistome in China. *Microbiome*, 5(84)

Sulakvelidze A, Alavidze Z, Morris JG (2001). Bacteriophage Therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45, 649-659.

Taylor NG, Verner-Jeffreys DW, Baker-Austin C (2011). Aquatic systems: maintaining, mixing and mobilising antimicrobial resistance? *Trends in Ecology & Evolution*, 26, 278–284.

Thomas G. (2014) Frederick William Twort: not just bacteriophage. *Microbiology Today*, 41, 70-73.

Tiwari R, Chakraborty S, Dhama K, Wani MY, Kumar A, Kapoor S. (2014). Wonder World of Phages: Potential Biocontrol Agents Safeguarding Biosphere and Health of Animals and Humans-Current Scenario and Perspectives. *Pakistan Journal Biological Science*, 17, 316-328

Twort FW. (1915). An investigation on the nature of ultra-microscopic viruses. *The Lancet*, 186, 1241-1243.

Twort FW. (1925). The discovery of the “Bacteriophage”. *The Lancet*. 205. 5303, 845.

Twort FW. (1921). The ultra-microscopic viruses. *The Lancet*. 198. 5108, 204.

Unión Nacional de Avicultores (UNA). (2018). Compendio de indicadores económicos sector avícola.

Van Boeckel TP, Browe C, Gilbert M, Grendell BT, Levin SA, Robinson TP, Teillant A, Laxminarayan R (2015). Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America USA*, 18, 5649-5654

Van Boeckel TP, Pires J, Silvester R, Zhao C, Song J, Criscuolo NG, Gilbert M, Bonhoeffer S, Laxminarayan R (2019). Global trends in antimicrobial resistance in animals in low – and middle – income countries. *Science*, 365(6459), eaaw1944.

van den Bogaard AE, London N, Driessen C, Stobberinhg EE (2001). Antibiotic resistance of faecal *Escherichia coli* in poultry, poultry farmers and poultry slaughterers. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 47, 763 – 771.

Van Hoek AHAM, Stalenhoef JE, van Duijkeren E, Franz E (2016). Comparative virulotyping of extended-spectrum cephalosporin-resistant *E. coli* isolated from broilers,

human son broilers farm and in the general population and UTI patients. *Veterinary Microbiology*, 194, 55-61

Wahl A, Battesti A, Ansaldi M (2018). Prophages in *Salmonella enterica*: a driving force in reshaping the genome and physiology of their bacterial host?. *Molecular Microbiology*, 2, 303-316.

Wang Q, Zeng X, Yang Q, Yang C (2018). Identification of a bacteriophage from an environmental multidrug-resistant *E. coli* isolates and its function in horizontal transfer of ARG's. *Science of the Total Environment*, 639, 617-623

Xie R, Huo S, Li Y, Chen L, Zhang F, Wu X (2014). Molecular epidemiological survey on quinolone resistance genotype and phenotype of *Escherichia coli* in septicemic broilers in Hebei, China. *Poultry Science*, 93, 335 – 339

WHO. (2017). *The world health report*. Geneva, Switzerland. Recuperado de who.int

Wittebole X, De Roock S, Opal SM. (2014). A historical overview of bacteriophage therapy as an alternative to antibiotics for the treatment of bacterial pathogens. *Virulence*, 5 226-235.

Zepeda-Gómez C, Lot-Helgueras A, Antonio NX, Madrigal-Uribe D (2012). Florística y Diversidad de las Ciénegas del Río Lerma Estado de México, México. *Acta Botanica Mexicana*, 98. 23-49