



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS
NATURALES

DETECCIÓN DE GENES DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS
EN BACTERIÓFAGOS

T E S I S

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

PRESENTA:

M V Z. JUAN MARTÍN TALAVERA GONZÁLEZ

Toluca, México Mayo de 2017



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS
NATURALES

DETECCIÓN DE GENES DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS
EN BACTERIÓFAGOS

T E S I S

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

PRESENTA:

M V Z. JUAN MARTÍN TALAVERA GONZÁLEZ

Comité tutorial:

Dr. Martín Talavera Rojas

Dr. Jorge Pablo Acosta Dibarrat

Dra. Nydia Edith Reyes Rodríguez

Toluca, México Mayo de 2017

DETECCIÓN DE GENES DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN BACTERIÓFAGOS

Talavera GJM, Talavera RM, Acosta DJP, Reyes RNE

RESUMEN

La terapia con antibióticos representa uno de los avances médicos más importantes del siglo XX y es un recurso valioso para el combate de enfermedades causadas por bacterias. Sin embargo, este uso terapéutico no ha sido utilizado de forma correcta ya que en años recientes han aparecido bacterias multiresistentes en diversos ambientes. Esta resistencia se genera por mutaciones puntuales generando genes que confieren esta capacidad resistente a los antibióticos como los betalactámicos, quinolonas, etc. La prevalencia de estos genes ha sido descrita tanto en bacterias como en bacteriófagos, al ser elementos genéticos móviles tienen la capacidad de contener y transferir por medio de la transducción estos genes entre bacterias patógenas y comensales. El objetivo de este estudio es determinar la presencia de los genes *qnrA*, *qnrB* y *blaTEM*, en el ADN fágico. En este trabajo se tomaron un total de 48 muestras de agua en cuatro rastros municipales (Atzacomulco, San Felipe del Progreso, El Oro e Ixtlahuaca), de las cuales se obtuvieron 19 aislamientos de *Escherichia coli* de agua residual y 18 aislamientos de alcantarilla (37 en total). Se realizó una prueba de sensibilidad in vitro encontrando que la mayor resistencia fue para la tetraciclina 32/37 (86.4%), seguido por el sulfametoxazol-trimetoprim 19/37 (51.3%), ampicilina 18/37 (48.6%), y por último el ácido nalidíxico también con 18/37 (48.6%), no se obtuvieron aislamientos resistentes a la cefotaxima; de los aislamientos obtenidos se obtuvo ADN bacteriano y ADN fágico para la detección de los genes *uidA* (se utilizó solamente para verificar género y especie), *qnrA*, *qnrB* y *blaTEM* por medio de la prueba de PCR punto final. El gen *uidA* se detectó en el 100% (37/37) de los aislamientos de *Escherichia coli*. En el ADN fágico no se detectó el gen *uidA* en ninguno de los aislamientos (0/37). Con respecto al gen *blaTEM* se detectó en 14/37 (37.8%) aislamientos en el ADN bacteriano, mientras que en el ADN fágico se obtuvo 5/37 (13.5%). En el caso del gen *qnrA* se obtuvieron 3/37 (8.1%) aislamientos que amplificaron en el ADN bacteriano y 1/3 (33.3%) para el ADN fágico. El gen *qnrB* fue encontrado en 11/37 (29.7%) aislamientos bacterianos y en 9/11 (36.3%) en el ADN fágico. Los resultados muestran que los aislamientos de *E. coli* al ser expuestos a un agente inductor de la lisogenia se obtienen fagos atemperados portadores de ARG's y que de igual forma son amplificados en los aislamientos bacterianos, esto confirma la contribución de los fagos atemperados en la movilización de ARG's sabiendo su capacidad de transducción

Palabras clave: bacteriófago, ARG's, ADN fágico, ADN bacteriano

Abstract
DETECTION OF ANTIBIOTIC RESISTANCE GENES
IN BACTERIOPHAGE

Talavera GJM, Talavera RM, Acosta DJP, Reyes RNE

ABSTRACT

Antibiotic therapy represents one of the most important medical advances of the 20th century and it's a valuable resource for combating diseases caused by bacteria. However, this therapeutic use has not been used correctly, in recent years multiresistant bacteria in various environments has been appreciated. This resistance is generated by point mutations generating genes that confer this antibiotic resistant capacity such as beta - lactams, quinolones, etc. The prevalence of these genes has been described in both bacteria and bacteriophages, these are mobile genetic elements have the capacity to contain and transfer by means of the transduction to these genes between pathogenic bacteria, and not only between these, but also between pathogenic bacteria and commensal bacteria. The objective of this study is to know the presence of the *qnrB* gene that has not been reported; and at the same time the prevalence of *blaTEM*, and *qnrA* in phagic and bacterial DNA. In this work a total of 48 water samples were taken in four municipal slaughterhouses (Atlahcomulco, San Felipe del Progreso, El Oro and Ixtlahuaca), of which 19 isolates of *Escherichia coli* sewage water and 18 sewerage isolates (37 in total) were obtained. Increased resistance to tetracycline 32/37 (86.4%), followed by sulfamethoxazol-trimethoprim 19/37 (51.3%) and finally ampicillin and nalidixic acid, having the same number of resistant isolates 18/37 (48.6%). %, no isolates resistant to cefotaxime were obtained. From the isolates that were obtained, bacterial DNA and phage DNA were extracted for the end-point PCR test for the detection of the *uidA* and *blaTEM* genes; in order to determine the presence of the *qnrA* and *qnrB* genes, a multiplex PCR was used followed by an end-point PCR. It was detected in 100% (37/37) isolates of the *uidA* gene in bacterial DNA, whereas in phage DNA was not detected in any of the isolates (0/37). With regard to the *blaTEM* gene was detected in 14/37 (37.8%) isolates in the bacterial DNA, whereas in the phage DNA was obtained a register of 5/37 (13.5%) positive isolations to the *blaTEM* gene. While 3/37 (8.1%) isolates amplified the *qnrA* gene in bacterial DNA were obtained, and 1/3 (33.3%) amplified it in phage DNA. The *qnrB* gene was found in 11/37 (29.7%) bacterial isolates and in 9/11 (36.3%) was found in phage DNA

Key words: bacteriophage, ARG's, phage DNA, bacterial DNA

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 realizar de este trabajo y así seguir formándome profesionalmente.

A mi comité tutorial: Dr. Martín Talavera Rojas, Dr. Jorge Pablo Acosta Dibarrat y Dra. Nydia Edith Reyes Rodríguez, 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)

Índice

Resumen	iv
Abstract	v
Agradecimientos	vi
Índice	vii
Índice de cuadros	ix
Índice de figuras	x
I. Introducción	1
II. Revisión de literatura	3
a. Descubimiento de las bacteriófagos	3
b. Uso de los bacteriófagos	5
c. Morfología	9
d. Taxonomía	10
e. Ciclos biológicos	12
f. Genes que confieren resistencia en el ADN bacteriano y fágico	17
III. Justificación	21
IV. Hipótesis	23
V. Objetivos	24
VI. Materiales y método	25
a. Muestreo	25
b. Recolección de muestras	26
c. Aislamiento bacteriológico	27
d. Pruebas de sensibilidad antimicrobiana	27
e. Extracción de ADN bacteriano	29
f. Identificación genotípica de <i>E. coli</i>	29
g. Conservación de los aislamientos bacterianos	30
h. Inducción a la lisogenia con Mitomicina C	30
i. Determinación de la efectividad fágica por spot test	30
j. Prueba de “doble capa”	31
k. Purificación de fagos	31
l. Extracción de ADN fágico	32

m. Detección de genes de resistencia antimicrobiana en el ADN bacteriano y fágico	32
n. Conservación de fagos	33
VII. Resultados	34
a. Artículo enviado	34
a. Aislamiento bacteriológico	56
b. Pruebas de sensibilidad	56
c. Extracción de ADN bacteriano y fágico; e identificación genotípica de <i>E. coli</i> , y efectividad de las nucleasas	58
d. Extracción de ADN fágico y efectividad de las nucleasas	60
e. Amplificación de genes de resistencia antimicrobiana en el ADN bacteriano y fágico	61
VIII. Discusión	67
IX. Conclusiones	72
X. Sugerencias	73
XI. Literatura revisada	74

Índice de cuadros

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de los bacteriófagos	11
Cuadro 2. Antimicrobianos empleados y criterios de interpretación	28
Cuadro 3. Primers empleados para la identificación genotípica de <i>E. coli</i>	29
Cuadro 4. Primers empleados para la detección de genes de resistencia en el ADN bacteriano y fágico	32
Cuadro 5. Aislamientos obtenidos en cada uno de los rastros muestreados en la zona norte del Estado de México	34
Cuadro 6. Sensibilidad antimicrobiana de los aislamientos de <i>Escherichia coli</i> obtenidos de los rastros municipales de la zona norte del Estado de México	35
Cuadro 7. Procedencia de los aislamientos resistentes	37
Cuadro 8. Procedencia de los aislamientos de <i>Escherichia coli</i> que fueron confirmados a través de la amplificación del gen <i>uidA</i>	38
Cuadro 9. Procedencia de los aislamientos bacterianos que amplificaron el gen <i>bla_{TEM}</i> y su patrón de resistencia	39
Cuadro 10. Relación de patrón de resistencia a la ampicilina (AM) entre los aislamientos bacterianos y fágicos que amplificaron el gen <i>bla_{TEM}</i>	40
Cuadro 11. Procedencia de los aislamientos bacterianos que amplificaron el gen <i>qnrA</i> y su patrón de resistencia	41
Cuadro 12. Relación de patrón de resistencia a la ampicilina (AM) entre los aislamientos bacterianos y fágicos que amplificaron el gen <i>qnrA</i>	42
Cuadro 13. Procedencia de los aislamientos bacterianos que amplificaron el gen <i>qnrB</i> y su patrón de resistencia	43
Cuadro 14. Relación de patrón de resistencia a la ampicilina (AM) entre los aislamientos bacterianos y fágicos que amplificaron el gen <i>qnrB</i>	44

Índice de figuras

Figura 1. Morfotipos de los bacteriófagos	10
Figura 2. Morfología de las familias de bacteriófagos	10
Figura 3. Ciclos biológicos de los bacteriófagos	12
Figura 4. Proceso de transducción	17
Figura 5. Muestras recolectadas	26
Figura 6. Halo de inhibición en el método de difusión con sensidiscos	28
Figura 7. Lectura e interpretación de la actividad de Mitomicina C	30
Figura 8. Observación de la actividad fágica	31
Figura 9. Banda diagnóstica del gen <i>uidA</i>	38
Figura 10. Banda diagnóstica del gen <i>bla_{TEM}</i> en aislamientos bacterianos	39
Figura 11. Banda diagnóstica del gen <i>bla_{TEM}</i> en aislamientos fágicos	40
Figura 12. Banda diagnóstica del gen <i>qnrA</i> en aislamientos bacterianos	41
Figura 13. Banda diagnóstica del gen <i>qnrA</i> en aislamientos fágicos	42
Figura 14. Banda diagnóstica del gen <i>qnrB</i> en aislamientos bacterianos	43
Figura 15. Banda diagnóstica del gen <i>qnrB</i> en aislamientos fágicos	44

I. Introducción

La terapia con antibióticos representa uno de los avances médicos más importantes del siglo XX y es un recurso valioso para el combate de enfermedades infecciosas causadas por bacterias. Sin embargo este uso terapéutico ha sido asociado con la aparición de bacterias resistentes a antibióticos (Marti *et al.*, 2014).

Reconocido como un problema global, la resistencia a antibióticos incrementa la mortalidad en humanos y animales, de igual manera aumenta el costo de tratamiento de enfermedades ya que estas cepas bacterianas se pueden diseminar rápidamente gracias a la migración humana y a la gran industrialización alimentaria y animal (WHO, 1996; Colomer-Lluch *et al.*, 2011). La resistencia a los antibióticos β -lactámicos es una de la mas reportada mundialmente en bacterias Gram negativas debido a que son uno de los antibióticos mas utilizados en el tratamiento de un gran numero de enfermedades infecciosas. En México, Aguilar-Montes de Oca *et al.* (2015) encontraron una resistencia de 32% a la ampicilina en aislamientos de *E. coli* obtenidos en rastros del Estado de México y Jalisco; de igual manera en México, Fuentes *et al.* (2013), reportaron una resistencia de 88.8% a la ampicilina en aislamientos de *E. coli* que se obtuvieron en rastros Tipo de Inspección Federal. Por otro lado, la resistencia a las quinolonas ha ido en aumento debido al uso excesivo y en ocasiones incontrolado; en un estudio realizado en Túnez por Kilani *et al.* (2015) reportaron una resistencia al ácido nalidíxico de 64% en aislamientos de *E. coli* obtenidos en heces de aves en produccion.

Así mismo, las bacterias contienen genes de resistencia a antibióticos (ARG`s por sus singlas en inglés) los cuales pueden ser adquiridos y transferidos mediante elementos genéticos móviles (MGE`s por sus siglas en inglés) como lo son los bacteriófagos (Brabban *et al.*, 2005; Colomer-Lluch *et al.*, 2011). Han sido varios los reportes donde sugieren que los fagos juegan un rol como vectores, los cuales; pueden movilizar los ARG`s entre bacterias patógenas y/o comensales por medio de la transducción generalizada transfiriendo cualquier porción del genoma bacteriano del huesped donador hacia el receptor; experimentalmente los fagos lisogénicos que portan algunos ARG`s han sido inducidos al ciclo lítico por medio de la mitomicina C, ciprofloxacina, H₂O₂, rayos UV ó EDTA siendo capaces de transmitir estos genes entre bacterias (Brabban *et al.*, 2005; Balcazar, 2014; Colomer-Lluch *et al.*, 2014a).

Iversen *et al.* (2015) estudiaron el fenómeno de la transducción y reportan que 39% de cepas de *E. coli* comensales tomadas de muestras fecales de niños de aproximadamente 5 años de edad fueron susceptibles a la infección lisogénica por el

fago ϕ 734, transfiriendo el gen *Stx 2* proveniente de la cepa virulenta O103:H5 de *E. coli*. En otro estudio los genes *bla_{TEM}* y *bla_{CTX-M}* que confieren resistencia a ampicilina fueron aislados de partículas fágicas y posteriormente fueron transferidos hacia las cepas WG5 y C600 de *E. coli*, estas no contenían ningún gen que confiriera resistencia, el resultado fue que estas cepas adquirieron esos genes y se hicieron resistentes (Colomer-Lluch *et al.*, 2011)

A partir de 1998 cuando se encontró el primer gen *qnrA1*, varios genes que confieren resistencia a las quinolonas han sido descritos, no solo en el ADN bacteriano, sino también en el fágico (Colomer-Lluch *et al.*, 2014a; Colomer-Lluch *et al.*, 2014b). Como se sabe, las quinolonas son antibióticos usados comúnmente tanto en la clínica veterinaria como en la humana (Colomer-Lluch *et al.*, 2014b), sin embargo la resistencia a estos antimicrobianos ha aumentado dramáticamente a nivel mundial debido al uso indiscriminado (Kilani, 2015). Colomer-Lluch *et al.* (2014a) detectaron una prevalencia de 71.4% del gen *qnrA* en el ADN fágico presente en agua residual de granjas animales; Quirón *et al.* (2009) reportaron una prevalencia de 63.8% del gen *bla_{TEM}* y 42.5% del gen *qnrA*, esta prevalencia se obtuvo de muestras de heces humanas procedentes de un hospital de Barcelona, los pacientes tenían un rango de edad desde 6 meses hasta los 102 años. Calero-Cáseres y Muniesa *et al.* (2016), compararon diferentes tratamientos de desinfección utilizados en plantas tratadoras de agua para uso urbano y reportan una disminución de CG/mL del gen *bla_{TEM}* en el ADN fágico usando cloro, sin embargo no se elimina en su totalidad pasando de 3.15 a 2.96 log₁₀ CG/mL., el riesgo se hace más presente cuando los fagos atemperados encuentran a un receptor transmitiendo este ARG. El entendimiento de los mecanismos de resistencia a antimicrobianos puede servir al desarrollo de estrategias efectivas para la reducción de este fenómeno (Balcazar, 2014). Por lo tanto, este trabajo tiene como objetivo colaborar en la comprensión del rol que juegan los bacteriófagos en la propagación de ARG's determinando la prevalencia de los genes *bla_{TEM}*, *qnrA* y *qnrB* en el ADN bacteriano y fágico recolectado a partir de agua residual, agua potable y alacantarillas en rastros de la zona centro-norte del Estado de México.

II. Revisión de la literatura

Los bacteriófagos conocidos también como fagos (del griego *phagein* que significa “comer”) (Madigan *et al.*, 2004) son los virus más abundantes en todo el ambiente (agua, suelo y aire) (Kutateladze y Adamia, 2010) con una estimación total de población de 10^{30} a 10^{32} (Balcazar, 2014) y están presentes desde hace 3 billones de años (Sulakuelidze, 2011); se estima que, por cada bacteria, existen 10 partículas de bacteriófagos (Skurnik y Strauch, 2006). Existe un gran debate entre diversos autores acerca del descubrimiento de los bacteriófagos, algunos consideran a Twort como quien los aisló por primera vez, aunque nunca lo logró comprobar, es por eso que otros autores consideran a Félix d’Herelle como el descubridor “oficial”, y quien bautizara a estos entes con el nombre de bacteriófagos que literalmente significa “comedores de bacterias” (Weinbauer, 2004). Su actividad fágica es muy específica, atacan solo a bacterias sin afectar a otra microflora ó células animales y vegetales; en las bacterias se replican y producen nuevas partículas fágicas (Gil *et al.*, 2008)

Estos pueden ser clasificados de acuerdo a su morfología, su contenido genético (DNA y RNA), sus hospederos específicos, lugar donde viven (virus marino y otros hábitats) y su ciclo de vida (lítico ó lisogénico) (Wittebole *et al.*, 2014)

Descubrimiento de bacteriófagos

Existen registros del año 1896 donde el químico inglés Ernest Hankin publicó un artículo en *Annales de l’Institut Pasteur* titulado: “*L’action bactericide des eaux de la Jumna et du Gange, sur le microbe de cholera*” (Abedon *et al.*, 2011) este artículo menciona que el agua de los ríos Ganges y Jumna, en la India, tenía una acción bactericida y que se mantenía aún cuando ésta pasara por un filtro de porcelana y que desaparecía si se hervía. Además, Hankin estudió este efecto bactericida en bacterias como el *Vibrio cholerae* (Fernández *et al.*, 2004).

En 1915, William Twort, un microbiólogo británico se enfocó en la investigación de la vacuna de la viruela, esta investigación la realizó en placas de agar; sin embargo, solo crecían cosas que contaminaban las bacterias observando unos misteriosos puntos transparentes resultado de zonas de bacterias muertas. Por otra parte, identificó que estas zonas eran transmisibles y específicas para el tipo de bacterias que estaban contaminando sus placas. Para este fenómeno propuso las siguientes posibles explicaciones:

- * Puede ser una manifestación inusual del ciclo de vida de la bacteria.
- * Es una enzima producida por la propia bacteria para protegerse.

* Es un virus ultramicroscópico.

Sin embargo, incapaz de rechazar o soportar cualquiera de estas tres hipótesis por la falta de recursos optó por dejar su estudio (Wittebole *et al.*, 2014; Qadir, 2015; Keen, 2015).

Paralelamente y de forma independiente en 1915, el canadiense Félix d'Herelle, un profesor de la Universidad de Yale y miembro del Instituto Pasteur, miró por primera vez entidades capaces de destruir bacterias similares a las que describió Twort, pero la diferencia fue que d'Herelle estuvo convencido que había descubierto un nuevo tipo de virus que infectaba bacterias. (Gaviria *et al.*, 2012; Keen, 2015). Este descubrimiento se realizó en heces de pacientes recuperados de Shigelosis, al microbio que aisló le denominó anti-shiga, que posteriormente los nombró bacteriófagos, él agregó este microbio a un cultivo del bacilo Shiga y observó que mató y lisó a este bacilo; además inoculó este microbio en animales de laboratorio como tratamiento para la Shigelosis (Atterbury, 2009; Wittebole, 2014) Este hallazgo lo publicó en el año de 1917, posteriormente estudió fagos que combatían a la disenteria, tifoidea y pasteurelisis (Ackerman *et al.*, 1982). Otra aportación de d'Herelle fue que ayudó en el desarrollo de centros de terapia fágica en países como Estados Unidos de América, Francia y en la Unión de Repúblicas Socialistas Soviéticas (URSS) (Qadir, 2015).

Muchos científicos líderes como Bordet y Gratia argumentaron fuertemente en contra de la hipótesis sugerida por d'Herelle, estos mencionan que el efecto bactericida era el resultado de una enzima (Atterbury, 2009).

Posteriormente Félix d'Herelle estableció su propio laboratorio, "*Laboratoire du Bactériophage*", dirigido por Theodore Mazore, el cual produjo sus primeros cocteles fágicos comerciales: Bacté-Coli-Phage, Bacté-Intesti-Paghe, Bacté-Dysentérie-Phage, Bacté-Pyo-Phage, Bacté-Rhino-Phage y Bacté-Staphy-Paghe (Abedon *et al.*, 2011; Qadir, 2015).

En 1919 d'Herelle realizó su primer terapia fágica oral, la cual fue exitosa, en el Hospital des Enfants Malades en París, Francia; esta terapia se aplicó en un niño de 12 años, quien padecía de disenteria; d'Herelle repitió este éxito con tres pacientes mas quienes mejoraron notablemente en 24 horas (Kutateludze y Adamia, 2010; Atterbury, 2009; Abedon *et al.*, 2011).

Uso de bacteriofagos después de su descubrimiento.

Décadas de 1920's y 1930's

Durante estas décadas, algunas empresas en Estados Unidos de América, Francia y Alemania manufacturaron preparaciones fágicas, algunas de estas empresas como Eli

Lilly Company produjo preparaciones fágicas para uso humano: “Ento-lysate, Neiso-lysate, Colo-lysate y Staphylo-lysate” para combatir *E. coli*, *Streptococcus* y *Staphylococcus* entre otros, otras empresas como Squibb & Sons y Abbott Laboratories también manufacturaron productos fágicos para combatir *Staphylococcus* spp. Los productos de estas tres empresas se empleaban para tratar infecciones letales en heridas de personas diabéticas, infecciones del trato respiratorio y muchas otras infecciones crónicas (Merril *et al.*, 2003; Qadir, 2015).

En estas mismas décadas Larkum reportó el tratamiento de 208 pacientes con furunculosis crónica, el 78% de estos pacientes mejoró con el tratamiento de fagos; MacNeal y colaboradores reportaron resultados positivos en el tratamiento con cocteles fágicos de 500 pacientes con infecciones causadas por *Staphylococcus*. (Abedon *et al.*, 2011).

A pesar de que d’Herelle llevó a cabo pruebas de tratamientos con bacteriófagos, fue hasta 1921 en Bélgica cuando se publicó el primer artículo del uso de fagos. En este artículo Bruynoghe y Maisin, reportan el tratamiento de furúnculos cutáneos con inyección de fagos específicos contra *Staphylococcus*, esta inyección se colocó cerca de la base de los furúnculos describiendo una mejoría clínica en 48 horas con una reducción de dolor, hinchazón y fiebre (Wittebole *et al.*, 2014; Atterbury, 2009; Abedon *et al.*, 2011).

Otra terapia con bacteriófagos que aplicó d’Herelle fue en Egipto en el año 1926 al tratar 4 pacientes con plaga bubónica, dicha terapia fue un éxito, y disminuyó la tasa de mortalidad del 30% al 0% en hospitales (Atterbury, 2009). En el mismo año, Bordet y Bail confirmaron erróneamente que la capacidad de reproducción de fagos dentro de las bacterias, argumentando que se necesita la inserción de su material genético en la unidad hereditaria de la bacteria (Wittebole *et al.*, 2014).

Otra aportación de d’Herelle en el año de 1926 fue el uso de bacteriófagos para tratar tifosis aviar, de igual forma los usó para tratar conejos con *Shigella*. Después de este uso de terapia fágica de d’Herelle en animales, Dyle intentó la aplicación de una terapia de fagos para el tratamiento de la tifosis aviar *in vitro* pero esta fue en vano; poco después, volvieron a fallar otro tratamiento experimental *in vivo* para tratar la infección por *Streptococcus* (Abedon *et al.*, 2011).

Décadas de 1930’s y 1940’s

Después del éxito de d’Herelle, en 1930, empresarios y médicos comenzaron a ofrecer productos fágicos falsos, estos argumentaban que eran efectivos contra enfermedades virales, incluso, para combatir algunas enfermedades bacterianas sin tener los fagos

específicos para dichos patógenos (Atterbury, 2009). En dicho año Georgi Eliava y Felix d'Herelle establecieron el Instituto Tbilisi de Bacteriófagos, Microbiología y Virología en la URSS, aunque en 1990 se cambió el nombre a Instituto Eliava. Incluso, en la actualidad este instituto produce fagos para el tratamiento y profilaxis de diversas infecciones, estas preparaciones fágicas pueden ser aplicadas por diferentes rutas: oral (líquido y tabletas), local (cremas), rectales, aerosoles e intravenosos. Por otra parte la literatura científica Sovietica solo había dado a conocer sus investigaciones en el idioma ruso, pero, recientemente el Instituto Eliava publicó un artículo en el idioma inglés donde describe casos con tratamientos de fagos combinados con antibióticos (Merril *et al.*, 2003; Kutateludze y Adamia, 2010).

Un año después de que d'Herelle descubriera a los bacteriófagos publicó muchos ensayos de las experiencias adquiridas en todo el mundo en una serie de libros, describió la primera terapia fágica intravenosa para el tratamiento de cólera y *Streptococcus* en la India realizada por Asheshov y Gratia respectivamente (Wittebole *et al.*, 2014; Merrill *et al.*, 2003; Abedon *et al.*, 2011).

El año de 1936 fue demasiado productivo en cuestión de investigaciones, algunos ejemplos son los siguientes: Mikeladze describió el tratamiento con fagos de 21 pacientes enfermos de fiebre tifoidea, observando una reducción de mortalidad de 15.6% a 4.8%; Tsouloukidze trató 20 pacientes que se sometieron a una cirugía a los que se les administró Bacté-Pyo-Phage y Bacté-Intesti-Phage, la cual fue cerrada completamente sin drenarse observando una reducción de la mortalidad en 60%; Gougerot y Peyre trataron pústulas usando la terapia fágica, al día siguiente ellos observaron la disminución de tamaño, y a las 48 horas las lesiones secaron y desaparecieron (Abedon *et al.*, 2011). Tres años posteriores a estas terapias fágicas, Ellis y Delbruck confirmaron que los fagos eran capaces de infectar y de replicarse dentro de las bacterias hasta que la progenie viral lisa la célula y se difunden en el ambiente (Atterbury, 2009).

Con la invención del microscopio electrónico, en 1940, Ruska fue el primero en describir a los fagos como partículas en forma de espermatozoides adheridas a la membrana de bacterias (Wittebole *et al.*, 2014); en este mismo año, Delbruck, demostró que no solo un fago puede infectar a una bacteria sino que simultáneamente varias partículas fágicas pueden matar a su hospedero sin la replicación (lisis desde afuera) (Atterbury, 2009). En 1941, Luria y Anderson visualizaron diferentes tipos de fagos y describieron que todos tenían una estructura en común: cabeza y cola. Además describieron diferentes tipos de etapas de la lisis fágica: adsorción, daño hacia la bacteria y la formación de nuevos fagos (Wittebole *et al.*, 2014).

Con el descubrimiento de los antibióticos, la segunda guerra mundial y factores como: el fracaso en la selección de fagos contra la bacteria, algunas mutaciones en bacteriófagos, fracaso por la neutralización del pH gástrico, y la presencia de toxinas en preparaciones fágicas, entre otras, provocaron la disminución de la investigación del tratamiento fágico en el Oeste. Sin embargo, la investigación de preparaciones fágicas para implementar la terapia continuaron en varios institutos de Europa del Este y la antigua Unión Soviética (Wittebole *et al.*, 2014). Los institutos más importantes fueron el Instituto Bacteriofágico en Tbilisi, Georgia y la Academia Polaca de Científicos en Wroclaw, Polonia. Las preparaciones fágicas en dichos institutos eran usadas para combatir patógenos bacterianos en dermatología, oftalmología, ginecología, pediatría, gastroenterología, urología y neumología (Kutateludze y Adamia, 2010; Atterbury, 2009).

Décadas de 1950's a 1980's

Comienzan las investigaciones en animales, implementando la terapia fágica. Terneros, corderos y ratas fueron infectados con *E. coli* causante de diarrea fatal y algunas aves se infectaron con *S. typhimurium* causando infección sistémica fatal. Smith y Huggins demostraron que una inyección de un fago fue más efectiva que múltiples inyecciones de antibióticos (cloranfenicol, tetraciclinas, etc.) en una rata inoculada con *E. coli* vía intramuscular (Qadir, 2015).

En 1959, el lisado fágico "STAPHYLOCO" fue aprobado en Estados Unidos de América para el uso terapéutico en humanos, se podía administrar por diferentes rutas: intranasal (aerosol), tópica, oral, subcutánea e incluso intravenosa. La eficacia de la terapia fágica por este lisado fue demostrada en un ensayo clínico, donde 607 pacientes se les implementó este lisado al no responder al tratamiento con antibióticos, los resultados fueron reportados como: 80% de recuperación, 18% solo mejorado y 2% sin cambios. La producción de este lisado fágico fue suspendido en 1990 y solo fue aprobado para aplicaciones veterinarias (Kutateludze y Adamia, 2010).

El Instituto Pasteur en Francia realizaba preparaciones fágicas hasta 1974, estas eran utilizadas para combatir patógenos como *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *E. coli*, etc. para combatir infecciones de piel, septicemias, osteomielitis, infecciones por quemaduras e infecciones del tracto urinario (Kutateludze y Adamia, 2010). En este mismo año, en Rusia, Sakandeldze reportó el tratamiento con fagos de 236 pacientes

contra *Streptococcus* y *Staphylococcus* con una efectividad del 92% (Merril *et al.*, 2003).

En la década de 1980's, varios autores volvieron a utilizar animales como modelos de experimentación, los cuales incluían ratas, pollos, conejos, terneros y corderos a los que se les inoculaban patógenos como *E. coli*, *Staphylococcus* y *Enterococos* resistentes a vancomicina provocando infección sistémica, infección del SNC, pulmón, tracto urinario, hueso, piel e infección secundaria a quemadura; las vías que estos autores manejaron para el tratamiento fágico fue la inyección intraperitoneal, administración oral, intragástrica, tópica, subcutánea, inyección intramuscular y administración intranasal (Wittebole *et al.*, 2014).

Kochetkova *et al.* (1980) trataron heridas postcirugía a 65 pacientes en riesgo de contraer alguna infección debido a *Pseudomonas* y *Staphylococcus* con una efectividad del 82% en el tratamiento (Merril *et al.*, 2003).

Décadas de 1990's a la actualidad

Perepanova y colaboradores, en Rusia, trataron 46 pacientes con una inflamación urogenital aguda y crónica provocada por los patógenos *E. coli* y *Staphylococcus* los resultados fueron favorables, 92% sanaron en casos de inflamación aguda y 84% en inflamación crónica (Merril *et al.*, 2003).

Durante el año 2001 se llevó a cabo la conferencia de la Fundación de Investigación de Astra Zeneca en Estados Unidos de América; Schoolnik, describió el motivo por el que se interesó en la microbiología argumentando lo siguiente: "Mi madre, en 1948 padecía tifoidea y aunque estaba tratándose con antibióticos no mejoraba, mi padre leyó en J. Bacteriology que se había descubierto un fago que eliminaba *Salmonella typhi*. Mi padre trató a mi madre en un hospital con este fago, al siguiente día ella se había recuperado" (Abedon *et al.*, 2011). Se trataron con fagos a 8 pacientes (niños y adultos) con fibrosis quística para combatir infecciones secundarias, la vía de administración fue por nebulizador en repetidas ocasiones durante 6-10 días, simultáneamente los pacientes fueron tratados con antibióticos y vitaminas causando una disminución de bacterias en todos los pacientes. Estos resultados fueron presentados en la Conferencia Internacional Fágica en Tbilisie, Georgia (2008); 32ª Conferencia Europea de Fibrosis Quística en Francia (2009) y en la Conferencia Internacional de Virus en Francia en 2010 (Kutateludze y Adamia, 2010).

Durante el año 2009, una compañía privada llamada Biocontrol Limited realizó una serie de ensayos clínicos en 24 voluntarios con otitis crónica en Londres monitoreando la replicación fágica en los pacientes tratados, observaron que los fagos no se presentaban en el organismo después de la eliminación de la bacteria objetivo (Kutateludze y Adamia, 2010). El producto fágico llamado “Intestiphage” está disponible al público sin necesidad de receta en Georgia y Rusia; este coctel contiene 20 diferentes fagos que combaten bacterias patógenas gastrointestinales. Un segundo coctel disponible para el público llamado “Pyophage” y contiene fagos contra *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas* y *E. coli*, son usados rutinariamente para combatir infecciones en heridas (Abedon *et al.*, 2011). Ackerman ha analizado 30,000 publicaciones que tratan temas de fagos entre 1965-2010. Lo que representa el estudio de 40 áreas geográficas distintas en el mundo (Wittebole *et al.*, 2014).

Morfología

Los bacteriofagos pueden ser muy complejos, pero se componen principalmente de las siguientes estructuras:

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 (Guttman *et al.*, 2005; Fernández *et al.*, 2004; Prescott *et al.*, 2004; Wittebole *et al.*, 2014).

Existe diferencia morfológica entre fagos, un ejemplo es que los fagos T1, T5 y lambda tienen colas sin vaina, que carecen de placa basal y terminan en fibras del tallo rudimentaria. Los colifagos T3 y T7 tienen colas cortas no contráctiles y sin fibras del tallo (figura 1) (Prescott *et al.*, 2004).

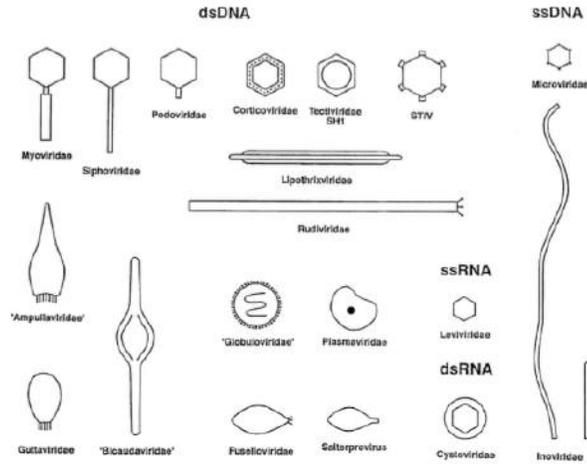


Fig. 1. Morfotipos de los bacteriófagos (Tomado de Ackermann, 2007)

Taxonomía

Al menos 5568 fagos han sido examinados, esto se ha realizado con microscopía electrónica desde 1959; donde el 96.2% (5360) de los fagos estudiados presentan cola y están asignados al único orden definido, el orden *Caudovirales* y conforman tres familias: *Myoviridae* (24.5%), *Siphoviridae* (61%) y *Podoviridae* (14%) (Ackermann, 2005; Ackermann, 2007). En la figura 2 se muestra la morfología de las familias de los bacteriófagos

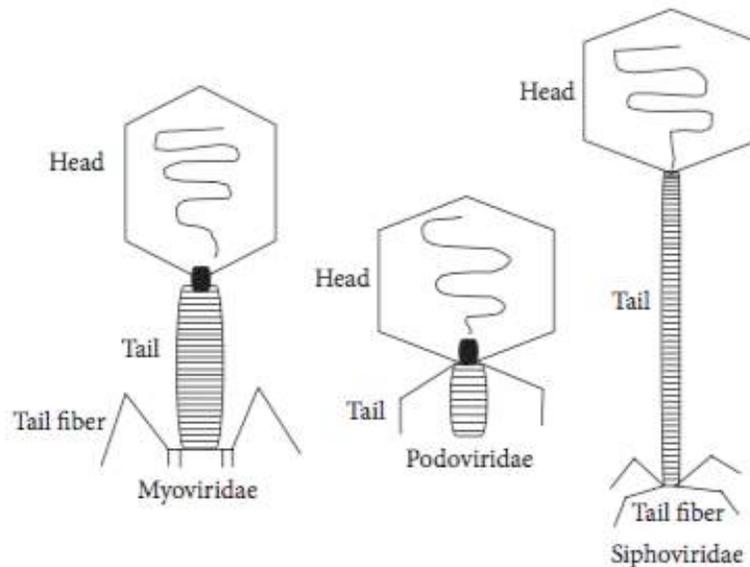


Fig. 2. Morfología de las familias de bacteriófagos (Tomado de Elbreki, 2014)

Wittebole *et al.*, (2014) argumentaron que se han descubierto y descrito morfológicamente más de 6000 bacteriófagos. Los fagos del orden *Caudovirales* se caracterizan por poseer ADN de doble cadena; y el 3.7% restante (208 fagos) son polihedricos, filamentosos o pleomórficos y abarcan 17 familias (cuadro 1) (Ackermann, 2005; Ackermann, 2007).

Cuadro 1. 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	λ
	<i>Podoviridae</i>			Cola corta	T7
No asignado	<i>Microviridae</i>	Polihedros	ADN de una cadena		Φ X174
	<i>Corticoviridae</i>		ADN de doble cadena	Cápside compleja, lípidos	PM2
	<i>Tectiviridae</i>			Vesícula lipídica interna	PRD1
	<i>Grupo SH1</i>			Vesícula lipídica interna	SH1
	<i>Grupo STV1</i>				STIV
	<i>Leviviridae</i>		ARN de una cadena	Semejante a poliovirus	MS2
	<i>Cystoviridae</i>		ARN de doble cadena	Formado por lípidos	Φ 6
	<i>Inoviridae</i>	Filamentosos	ADN de una cadena	Filamentos grandes	fd
	<i>Lipothrixviridae</i>		ADN de doble cadena	Formado por lípidos	TTV1
	<i>Rudiviridae</i>			Semejante a TMV	SIRV-1
	<i>Plasmaviridae</i>	Pleomórficos	ADN de doble cadena	Sin cápside, y con lípidos	L2
	<i>Fuselloviridae</i>			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

(International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), 2014; Ackermann, 2001; Ackermann, 2007).

Los fagos exclusivos de *Salmonella* abarcan 3 familias del orden *Caudovirales*, de las cuales la familia *Myoviridae* contienen 43 fagos correspondientes al 24%, la familia *Siphoviridae* contiene 59 fagos correspondientes al 33%, la familia *Podoviridae* contiene 59 fagos correspondientes al 33% y 16 fagos filamentosos e isométricos que corresponden al 9% (Ackermann, 2007).

Ciclos biológicos.

Los fagos se pueden dividir en dos grupos según el tipo de infección, uno de ellos son los fagos líticos o virulentos, los cuales destruyen a la célula huésped por medio de la lisis (Madigan *et al.*, 2004), estos fagos llevan a cabo el ciclo lítico, donde toda la maquinaria metabólica de la bacteria es “secuestrada” para replicar y transcribir el ADN fágico, además de producir nueva progenie (Spricigo, 2011), algunos de los fagos virulentos estudiados más a fondo son los fagos “T” par como ejemplo: T2 y T4 (Morse y Meitzner, 2011; Refardt, 2011; Hooton *et al.*, 2011).

Los otros son los fagos atemperados que llevan a cabo el ciclo biológico lisogénico, en donde estos infectan a la bacteria incorporando su material genético dentro del genoma bacteriano generandose un profago, este genoma viral se replica en sincronía con el cromosoma celular siempre que los genes que controlan el ciclo lítico no se expresen. Sin embargo, si estos genes son inactivados o inhibidos, el profago produce nuevos viriones y lisis de la célula hospedadora (Madigan *et al.*, 2004; Balcazar, 2014; Refardt, 2011; Dini, 2011; Hooton *et al.*, 2011). En la figura 3 se representa los ciclos lítico y lisogénico de los bacteriófagos

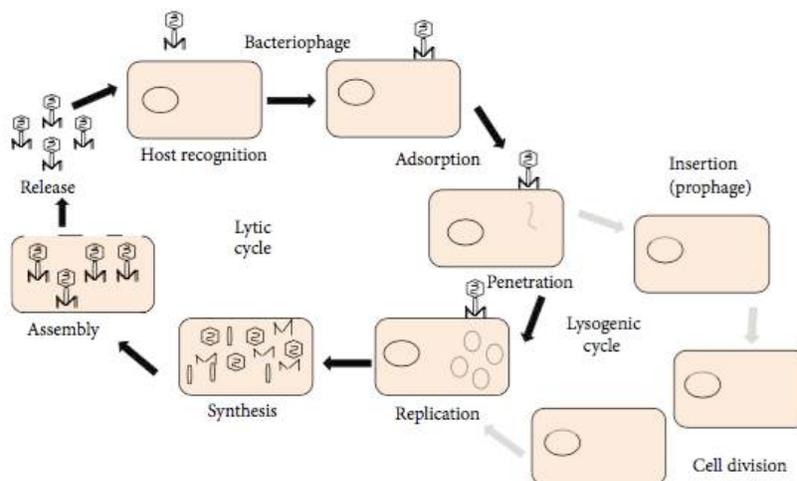


Figura 3. Ciclos biológicos de los bacteriófagos (Tomado De Elbreki, 2014)

Las etapas de replicación de los fagos son:

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

Comienza cuando las fibras del tallo hacen contacto con los receptores adecuados mediante sus adhesinas; sólo el bacteriófago T4 tiene casi 20 proteínas diferentes en su tallo. A medida que más fibras del tallo contactan con los receptores, la placa basal se asienta en la superficie. Los bacteriófagos no se unen al azar a la superficie de la célula huésped; por el contrario, se fijan a receptores específicos. Los receptores de la superficie de la célula son componentes normales del hospedador, tales como proteínas, carbohidratos, glicoproteínas, lípidos y lipoproteínas; estos determinan qué células serán susceptibles de ser infectadas (Shin *et al.*, 2012; Prescott *et al.*, 2004).

Existen estudios recientes donde se ha demostrado que los receptores de *Salmonella enterica* corresponden a: proteínas flagelares como FliC, FljB y FliK; proteínas integrales de membrana como OmpC, BtuB, TolC, FhuA; y glicolípidos como antígeno-O y antígeno Vi. Los receptores llevan a cabo funciones normales de la célula. Por ejemplo, el receptor OmpC tiene una función osmoregulatoria y son utilizados por fagos Gifsy y T4-like; BtuB tiene la función de captación de la vitamina B12 y es utilizado por fagos T5-like y FhuA, tiene la función de transporte de proteínas (Chaturongakul y Ounjai, 2014).

En ausencia del receptor, el virus no puede adsorberse, y en consecuencia no puede infectar. Si el receptor se altera, el hospedador puede hacerse resistente a la infección vírica. Sin embargo, también pueden surgir mutantes del virus capaz de adsorberse a hospedadores resistentes. Además, algunos bacteriófagos son capaces de utilizar más de un receptor, de manera que la pérdida de uno no impide generalmente la fijación (Madigan *et al.*, 2004; Dini, 2011)

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

Una vez que el bacteriófago está firmemente fijado a los receptores de la bacteria, la placa basal se asienta en la superficie celular; es entonces cuando la acción de la lisozima origina la formación de un orificio, posteriormente la vaina se reorganiza de tal manera que se contrae, los fagos T-par pasan de una conformación en cilindros de 24 anillos a otra de 12 anillos de longitud, haciéndose más corta y más 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, además algunas proteínas protegen al material genético fágico de los mecanismos de restricción de la célula huésped (Spricigo, 2011; Madigan *et al.*, 2004; Prescott *et al.*, 2004; Bertin *et al.*, 2011).

3. Síntesis del ácido nucleico y de proteínas.

La síntesis del ácido nucleico y de proteínas se divide según el ciclo biológico, lítico ó lisogénico. En el caso del ciclo lítico, los bacteriófagos T-par después de la adsorción y penetración del material genético del fago T-4, se detiene la síntesis de ADN, ARN y proteínas del hospedador, y la célula se ve obligada a sintetizar los componentes virales. La ARN polimerasa de *E. coli* comienza a sintetizar ARNm a los dos minutos. Este ARN y los demás ARN tempranos dirigen la síntesis de los factores proteicos y las enzimas necesarias para tomar el control de la célula hospedadora y fabricar los ácidos nucleicos virales. Enzimas tempranas específicas del virus degradan el ADN de la célula hospedadora, deteniendo simultáneamente la expresión génica y proporcionando los nucleótidos para la síntesis de ADN, que comienza a los 4-5 minutos (Prescott *et al.*, 2004).

La expresión de genes víricos sigue una secuencia perfectamente ordenada gracias a las modificaciones de la ARN polimerasa y cambios en el factor sigma. Los promotores tempranos son leídos directamente por la ARN polimerasa del hospedador y requieren la función del factor sigma celular. Uno de los genes tempranos sintetizados, *motA*, estimula la transcripción de algunos genes tardíos modificando la ARN polimerasa del hospedador y la producción del factor sigma gp55. Este factor sigma ayuda a la ARN polimerasa a unirse a promotores tardíos para así transcribir genes tardíos; activación que se produce unos 10-12 minutos tras la infección. Las proteínas tempranas y medianas son enzimas implicadas en la síntesis del ADN y en la transcripción. Las proteínas tardías son las proteínas de la cabeza y de la cola, y enzimas relacionadas con la liberación de las partículas de fagos maduros (Madigan *et al.*, 2004).

El T-4 codifica más de 250 proteínas, y casi la cuarta parte participan en la síntesis del ADN, varias de estas son también nucleasas que destruyen el ADN del hospedador para obtener los bloques y construir el ADN vírico; además produce 20 nuevas proteínas, estas incluyen enzimas para la síntesis de la base inusual hidroximetilcitosina (HMC) en vez de citosina y para su glucosilación; de igual manera produce enzimas para la síntesis del ADN específico del T-4 (Madigan *et al.*, 2004; Prescott *et al.*, 2004).

Una vez que se ha sintetizado el ADN del T-4, sufre un proceso de modificación llamada glucosilación adicionando glucosa a las HMC, estas protegen el ADN del T-4 del ataque de las endonucleasas de *E. coli*, denominadas enzimas de restricción; sin

embargo, se conocen sistemas de restricción que actúan sobre ADN modificado (Madigan *et al.*, 2004).

En el ciclo biológico lisogénico, como se había visto anteriormente, se requieren fagos atemperados; uno de los fagos atemperado mejor estudiados es el lambda, que es específico de *E. coli* y el P22, específico de *Salmonella enterica* serovariedad *Typhimurium* (Madigan *et al.*, 2004).

El ADN del fago lambda al igual que el fago P22 es bicatenario y lineal con extremos cohesivos (segmentos monocatenarios de 12 nucleótidos de longitud que tienen secuencias de bases complementarias por lo que pueden aparearse entre sí). Debido a estos extremos cohesivos, el genoma lineal se circulariza inmediatamente después de la inyección, en caso del fago lambda, la ligasa de *E. coli* sella los extremos complementarios, formándose un círculo cerrado (Kropinske *et al.* 2007)

Una vez circularizado el fago, comienza la producción de ARN, usando la ARN polimerasa del hospedador comenzando en algunos promotores, dos de los cuales llamados PL (promotor izquierdo) y PR (promotor derecho) comienzan a transcribir en ambas direcciones, cabe resaltar que el fago lambda y el P22 siguen el mismo patrón de dirección (Madigan *et al.*, 2004).

Éstos producen transcritos cortos que son traducidos para dar los productos proteicos Cro y N en caso de lambda; Cro y gp24 en caso de P22; estas proteínas son antiterminadoras y permite a la ARN polimerasa transcribir mas allá haciendo mas largos los transcritos de PL y PR. Estos largos ARNm se traducen en más proteínas, que incluyen los productos de los genes CIII y CII en lambda; y CII y c2 en P22 (Prescott *et al.*, 2004).

El antiterminador Cro no es completamente efectivo, produciendose una pequeña cantidad de la proteína Q en lambda y gp23 en P22. Si su concentración se hace lo suficientemente alta, permitirá 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). Al mismo tiempo que la proteína gp23 ha alcanzado estos niveles, la proteína Cro ha alcanzado tambien niveles que le permiten bloquear 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 CII y c2. Estas proteínas se necesitan para entrar en el ciclo lisogénico y, por

lo tanto, cuando Cro se sintetiza en grandes cantidades, lambda queda irrevocablemente dirigido al ciclo lítico. 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).

Para que se establezca la lisogenia, deben producirse dos sucesos:

Debe impedirse la producción de las proteínas tardías mediante la síntesis del producto del gen *cI* para lambda y de la proteína *c2* para P22. Este producto se localiza entre PL y PR, sin embargo, requiere otro promotor llamado PE (promotor del establecimiento de la lisogenia) el cual debe ser activado por la proteína *cII*; pero generalmente esta proteína es inestable ya que puede ser degradada por una proteasa celular; sin embargo, esta proteína puede ser estabilizada por la proteína *CIII*. Si la proteína *CII* resulta estabilizada, activará PE y se producirá la proteína represora. El represor se une a OL y OR, como lo hace la proteína Cro, pero, en orden opuesto, cuando esto ocurre, cesa la síntesis de proteínas tardías, y no puede entrar en el ciclo lítico.

Debe integrarse al cromosoma del hospedador donde el *attP* del fago reconoce el IHF (factores de integración del hospedador) para poder integrarse (Prescott *et al.* 2004).

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 (Kropinske *et al.*, 2007).

4. Ensamblaje de las subunidades estructurales y empaquetamiento del ácido nucleico para originar nuevas partículas víricas.

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 del tallo. La procápside del fago se construye de forma independiente a partir de más de 10 proteínas, y a continuación 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 una proteína portal especial. Esta proteína forma parte de una estructura 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. (Madigan *et al.*, 2004; Prescott *et al.*, 2004).

5. Liberación de los viriones maduros de la célula.

Una vez ensamblado el fago, este codifica proteínas líticas, la holina y endolisina, la primera provoca una lesión en la membrana que permite que la endolisina, otra proteína lítica, ataque el peptidoglicano de la célula hospedadora y así pueda liberarse para que se ancle a otra bacteria objetivo, en caso de los bacteriófagos lisogénicos puedan realizar la transducción (figura 4).

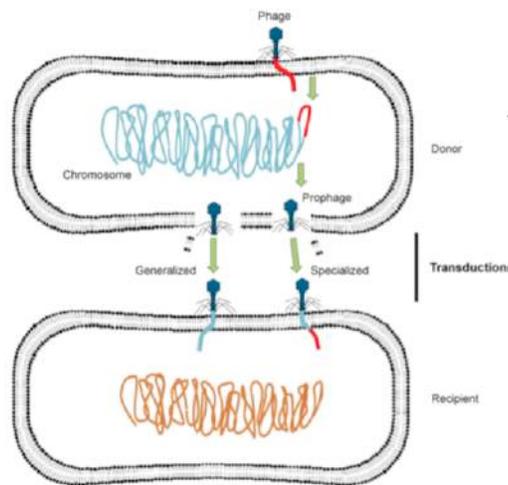


Fig. 4. Proceso de transducción (Tomado de Balcazar, 2014)

Genes que confieren resistencia en el ADN bacteriano y fágico

La terapia con antibióticos representó la defensa primaria contra enfermedades bacterianas durante el siglo XX y al mismo tiempo representa uno de los avances más importantes del mismo siglo. Sin embargo, este uso terapéutico ha sido asociado al desarrollo de bacterias resistentes a antibióticos que afectan tanto a los seres humanos como a los animales (Balcazar, 2014). Desafortunadamente el uso inapropiado y excesivo de estos antibióticos tiene como consecuencia que bacterias resistentes a los antibióticos puedan contaminar el alimento de origen animal destinado al consumo humano, es por eso que, en Estados Unidos de América, el uso de los antibióticos ha sido limitado sólo para aplicaciones terapéuticas, y su uso como promotores de crecimiento ha sido prohibido (Hooton *et al.*, 2011; Jassim y Limoges, 2014).

Con la rápida diseminación de bacterias patógenas multiresistentes a los antibióticos, la industria alimentaria, animal y farmacéutica se han interesado en encontrar una alternativa que reprima la actividad de estas bacterias; en años recientes el interés por la aplicación de bacteriófagos como agentes para un biocontrol ha aumentado

considerablemente. Estos han sido reconocidos como una posible alternativa en la tradicional terapia antibiótica en salud animal, como biocontrol en alimentos y como una herramienta para la detección de bacterias patógenas (Zinno *et al.*, 2014; Hooton *et al.*, 2011; Shin *et al.*, 2012; Kutateludze y Adamia, 2010; Jassim y Limoges, 2014).

En la actualidad, el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) estima que aproximadamente el 70% de las cepas bacterianas patógenas que causan infecciones en hospitales son resistentes al menos a uno de los antibióticos más usados para tratar alguna enfermedad. Cada año en Estados Unidos de Norteamérica, cerca de 2 millones de personas son infectadas por bacterias resistentes a antibióticos y cerca de 23,000 personas mueren a causa de estas infecciones. (Jassim y Limoges, 2014; Kutateludze y Adamia, 2010).

La preocupación ha aumentado debido a la aparición de cepas multirresistentes que se han estado presentando desde hace más de 50 años, pero fue desde 1989 que se empezaron a aislar de muestras clínicas de humanos en el Reino Unido, es por eso que la aplicación de bacteriófagos pueden ayudar a prevenir enfermedades transmitidas por alimentos causadas por patógenos como *E. coli* (Zinno *et al.*, 2014; Varela, 2013).

E. coli es un bacilo Gram negativo considerado como habitante natural de la flora intestinal, pero existen cepas que son patógenas tanto para el ser humano como para los animales (Angeles, 2002). Se ha desarrollado una clasificación de *E. coli* de acuerdo a la expresión de factores de patogenicidad, de adherencia, capsulares, entre otras, actualmente se han identificado seis categorías o patotipos: *E. coli* enterotoxigénica (ECET), *E. coli* enteropatógena (ECEP), *E. coli* enteroinvasiva (ECEI), *E. coli* enterohemorrágica (ECEH), *E. coli* enteroagregativa (ECEA) y *E. coli* enteroadherente (ECDA) (Vidal *et al.*, 2007).

Escherichia coli es un agente patógeno que causa infecciones intestinales y extraintestinales debido a sus factores de patogenicidad y de adherencia. Para el tratamiento de estas infecciones son utilizados los antibióticos beta-lactámicos y las quinolonas, pero debido al uso inadecuado de estos antimicrobianos, *E. coli* ha generado y adquirido genes que le confieren resistencia a los mismos (Aguilar-Montes de Oca *et al.*, 2015)

Debido a que una de las formas de adquirir esta infección es a través del consumo de agua o alimentos contaminados con excremento de animales portadores (Reyes-Rodríguez *et al.*, 2013) ha surgido la necesidad de estudiar el ecosistema acuático para saber la prevalencia de genes que le dan resistencia a esta bacteria contra los antibióticos. Hamelin *et al.* (2007) obtuvieron una prevalencia de 11% de resistencia a

la tetraciclina; Ibrahim *et al.* (2014), lograron obtener una prevalencia del 70% de resistencia a ampicilina, estas muestras fueron obtenidas en un ambiente acuático cercano a un hospital en Iraq.

En un estudio realizado en Aguascalientes se tomaron 150 muestras de un río principal de este estado, logrando obtener 11 aislamientos (7.3%) resistentes a la pefloxacina (Ramirez *et al.*, 2013). Recientemente Aguilar-Montes de Oca *et al.* (2014) tomaron muestras en rastros municipales del Estado de México y Jalisco, obteniendo 32% de los aislamientos totales resistentes a la ampicilina y 64% al ácido nalidíxico.

Como se mencionó anteriormente, los bacteriófagos son una de las causas por las que las bacterias pueden adquirir genes que les confieren resistencia contra los antibióticos usados con frecuencia, es por esto que en los últimos años se ve tomado el interés por saber los genes presentes en su genoma. Colomer *et al.* (2014b) detectaron una prevalencia de 38.9% del gen *qnrS* en muestras obtenidas en aguas residuales urbanas, mientras que para el gen *qnrA* se obtuvo el 100% de prevalencia en las muestras. En Túnez, Colomer-Lluch *et al.* (2014a) recolectaron 48 muestras provenientes de 2 rastros donde se sacrifican bovinos y aves, y de 3 plantas tratadoras de agua para su uso urbano, en este estudio reportaron una prevalencia de 95% del gen *bla_{TEM}* y 10% del gen *qnrA* en el ADN fágico.

En otro estudio realizado en un hospital ubicado en Barcelona, Quirós *et al.* (2014) obtuvieron una prevalencia de 63.8% del gen *bla_{TEM}* y 42.5% en el gen *qnrA* en el ADN fágico, se tomó un total de 80 muestras de pacientes de un rango de 6 meses a 102 años de edad, todas las muestras fueron recolectadas de heces, la alta prevalencia de estos genes indica que el riesgo de transmitirlos aumenta al estar en contacto con otros pacientes, ya que factores naturales como los rayos UV o incluso algunos antibióticos pueden activar el ciclo lítico y así realizar la transducción obteniendo nuevas generaciones de fagos que contienen estos ARG's.

Se han realizado estudios donde evalúan diferentes tipos de tratamientos de desinfección en plantas tratadoras de agua para uso urbano obteniendo resultados no muy alentadores, ya que en Barcelona, Calero-Cáseres *et al.* (2016), evaluaron la alteración de pH, radiación por UV, diferentes temperaturas y la cloración, estos como tratamientos de desinfección en plantas tratadoras de agua, obteniendo una leve disminución de CG/mL. del gen *bla_{TEM}* en el ADN fágico, el tratamiento con cloro fue el más efectivo pasando de 3.15 a 2.96 log₁₀ CG/mL. Esto indica que los tratamientos comunmente utilizados para la desinfección no dañan la cápside de los fagos atemperados, estos al sobrevivir y contener ARG's pueden transmitirlos a un receptor y generar una multirresistencia

Colomer *et al.* (2011) realizaron otro estudio donde recolectaron muestras de una planta tratadora de agua residual en Madrid y lograron detectar que todas contenían bacteriófagos amplificando el gen *mecA* y el gen *bla_{TEM}* que confiere resistencia a la ampicilina.

III. Justificación

Uno de los problemas a los que se ha enfrentado el ser humano a lo largo de la historia es el combate a las bacterias que poseen factores de resistencia a los antibióticos y que son causa de enfermedades que en ocasiones causan la muerte. Un ejemplo claro de este fenómeno es que 22 años después del uso de la penicilina se detectó un *Staphylococcus* resistente a este antibiótico, otro ejemplo es la introducción de Ceftarolina en el 2010 y fue en el 2012 cuando se volvió a detectar otro *Staphylococcus* resistente al antibiótico (Hede, 2014).

La aparición de resistencia a antibióticos es modulada por eventos de mutación, recombinación y/o transferencia horizontal de genes, una vez ocurrido uno de estos eventos, las bacterias son sometidas a una selección natural y son distribuidos geográficamente a nivel mundial por la migración y/o industrialización (Colomer-Lluch *et al.*, 2014a ; Colomer-Lluch *et al.*, 2011).

Dentro del fenómeno de resistencia a los antibióticos se encuentran los bacteriófagos que son capaces de transferir de manera horizontal algunos genes de resistencia, esto por medio del fenómeno llamado transducción (Blahova *et al.*, 1993), algunos autores sugieren que esta transferencia no solo se realiza entre bacterias patógenas haciéndolas mas virulentas, sino que también se observa una alta proporción de bacterias comensales susceptible a la infección por fagos que contienen factores de virulencia y ARG's (Iversen *et al.*, 2015), el problema se agrava cuando estas son aisladas en hospitales incrementando el riesgo para la salud humana e incluso animal (Colomer-Lluch *et al.*, 2011).

En diversos estudios se han detectado algunos genes como *qnrS*, *qnrA*, *bla_{TEM}*, *pse-1*, *STR*, *tet* capaces de conferir resistencia a las bacterias hacia los antibióticos como quinolonas, beta-lactámicos, aminoglucósidos y tetracilina en el ADN bacteriano y fágico; según evidencias antes mencionadas estos fagos atemperados pueden transferir estos genes tanto a bacterias comensales como a cepas patógenas como *E. coli* enterohemorrágica causante del síndrome urémico hemolítico, colitis hemorrágica y diarrea (Colomer-Lluch *et al.*, 2014a; Colomer-Lluch *et al.*, 2014b; Colomer-Lluch *et al.*, 2011; Iversen *et al.*, 2015).

Estos genes de resistencia han sido detectados en bacterias presentes en rastros y plantas procesadoras de alimentos en el Estado de México, convirtiendo la resistencia a antibióticos en un problema de salud pública y animal. Por lo que es necesario conocer y estudiar la distribución de los fagos en el medio ambiente y/o en aguas residuales ya que evidencias anteriores muestran el rol que juegan en la naturaleza

portando y transfiriendo algunos genes resistentes a los antibióticos entre las bacterias patógenas y/o comensales (Colomer-Lluch *et al.*, 2014b; Aguilar-Montes de Oca *et al.*, 2015; Varela *et al.*, 2013; Reyes-Rodríguez *et al.*, 2013; Fuentes *et al.*, 2013).

IV. Hipótesis

Existe una prevalencia menor al 50% de los genes *bla*_{TEM}, *qnrA* y *qnrB* en el ADN fágico y ADN bacteriano de *Escherichia coli* aislada en rastros de la zona del norte del Estado de México.

V. Objetivos

Objetivo general.

- Determinar la prevalencia de los genes *bla*_{TEM}, *qnrA* y *qnrB* que confieren resistencia bacteriana a los antibióticos betalactámicos y quinolonas en el ADN fágico procedente de *Escherichia coli* aislada de agua potable, agua residual y rejillas en rastros de la zona centro-norte del Estado de México.

Objetivos específicos.

- Determinar la resistencia fenotípica de aislamientos de *E. coli* procedentes de agua potable, agua residual y rejillas de rastros de la zona centro-norte del Estado de México.
- Determinar la presencia de fagos atemperados en aislamientos de bacterias *E. coli* procedentes de agua potable, agua residual y rejillas de rastros de la zona centro-norte del Estado de México.
- Determinar la prevalencia de los genes *bla*_{TEM}, *qnrA* y *qnrB* en el ADN bacteriano.
- Determinar la prevalencia de los genes *bla*_{TEM}, *qnrA* y *qnrB* en el ADN fágico.

VI. Materiales y métodos

Muestreo

Se consideraron 7 rastros municipales en la zona norte del Estado de México con una prevalencia de los genes *bla_{TEM}*, *qnrA* y *qnrB* en el ADN fágico de 30%; el número de rastros a muestrear se determinó empleando un tipo de muestreo probabilístico de juicio o de criterio recolectando las muestras en el lugar donde existe mayor probabilidad de encontrar la variable de interés. Se consideró la siguiente fórmula para tener la certeza de 95% de encontrar al menos un caso positivo en el lugar de estudio:

$$n = \left\lceil 1 - (1 - \alpha)^{1/E} \right\rceil \left\lceil N - (E - 1)/2 \right\rceil$$

Donde:

n= Muestra

α = Es el nivel de confianza (0.95)

N= Total del número de individuos en la población

E= Es el número de individuos afectados (0.40 x 7= 2.8)

Sustituyendo:

$$n = \left\lceil 1 - (1 - 0.95)^{1/2.8} \right\rceil \left\lceil 7 - (2.8 - 1)/2 \right\rceil$$

$$n = \left\lceil 1 - (0.05)^{1/2.8} \right\rceil \left\lceil 7 - (1.8)/2 \right\rceil$$

$$n = \left\lceil 1 - (0.05)^{0.357} \right\rceil \left\lceil 6.1 \right\rceil = \left\lceil 0.65 \right\rceil \left\lceil 6.1 \right\rceil = 3.9$$

Por lo tanto, se requiere evaluar a por lo menos 4 rastros municipales para encontrar al menos un caso positivo, con 95% de confianza. Los rastros que se eligieron fueron de Atlacomulco, San Felipe del Progreso, El Oro e Ixtlahuaca.

Se desarrollaron las siguientes preguntas abiertas para recolectar información general y específica, estas preguntas se aplicaron en forma de cuestionario y fue dirigido al encargado del lugar:

Nombre y fecha.

¿Desde que año está en funcionamiento el rastro municipal?

¿Cuántos empleados laboran en el rastro?

¿En qué días se realiza en sacrificio de animales?

¿Cuáles son los días con mayor actividad de sacrificio?

¿Cuántos animales se sacrifican por día?

¿Cuáles son las especies que se sacrifican en el rastro?

¿Qué especie se sacrifica con mayor frecuencia? (Jaramillo y Martínez, 2010).

Recolección de muestras

La toma de muestras se realizó utilizando equipo de protección personal (botas, guantes, overol y cubre boca); antes de colocarse los guantes, las manos se lavaron adecuadamente y se secaron con toallas de papel desechables (Bravo, 2006).

Para la toma de la muestra de agua residual procedente del desague del rastro se sumergió el tubo estéril con el cuello dirigido hacia abajo procurando no tomar la muestra de la superficie o del fondo del desague, se llenó y se tapó adecuadamente todo en base a la NOM-230-SSA1-2002. En caso de la toma de muestras del alcantarillado, se realizó con la ayuda de un hisopo estéril, este se frotó sobre las orillas de la superficie de la alcantarilla, posteriormente se depositó en un tubo con agua peptonada y se tapó adecuadamente. Las muestras de agua potable se obtuvieron directamente de la llave de agua, esta se dejó abierta durante 30 segundos y posteriormente se depositó 2mL en un tubo estéril con agua peptonada, por último, se tapó adecuadamente. Las muestras se tomaron después del proceso de sacrificio. Se realizaron 4 repeticiones del proceso de recolección de muestras en cada una de las unidades de estudio (Varela, 2013).

Todas las muestras se depositaron en un termo con geles refrigerantes para mantener una temperatura adecuada de 5 ± 2 °C hasta al arribo al Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal (CIESA) de la FMVZ-UAEM donde se procesaron antes de las 2 horas posteriores a la obtención de estas (figura 5)



Figura 5. Muestras recolectadas (Fuente: dato original)

Aislamiento bacteriológico

Todas las muestras fueron preincubadas durante un periodo de 3 horas a una temperatura de 37 °C.

Posteriormente, con una asa bacteriológica se recolectó una gota de cada una de las muestras antes mencionadas y se realizó un estriado en agar MacConkey, se sometió a un proceso de incubación en la estufa bacteriológica durante 24±2 horas con una temperatura de 37 °C. Una vez concluido el proceso de incubación, se identificaron y se recolectaron de 3-4 colonias sospechosas de *E. coli* y se re-sembraron en agar MacConkey para realizar su purificación, se sometieron a un periodo de incubación a una temperatura de 37 °C durante un periodo de 24±2 horas (Hamelin *et al.*, 2007). Se recolectaron las colonias sospechosas de *E. coli* del preaislamiento y se sometieron a pruebas bioquímicas (TSI, LIA, SIM y Citrato de Simmons), finalmente se confirmaron con una prueba de PCR amplificando el gen *uidA* el cual codifica para la enzima beta-glucuronidasa y es específico para *E. coli* (Aguilar-Montes de Oca *et al.*, 2015; Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 2005).

Pruebas de sensibilidad antimicrobiana

La resistencia a los agentes antimicrobianos se realizó mediante el método de difusión con discos en agar Mueller-Hinton (MH) de acuerdo a los lineamientos del CLSI (2012a). Se incubó el aislamiento a estudiar en agar TSA durante 24±2 horas con una temperatura de 37 °C, posterior a esto, con la ayuda de un asa bacteriológica se recolectó una porción de la bacteria y se depositó en caldo Muller-Hinton, se homogenizó hasta que alcanzó un valor de 0.5 en la escala de McFarland lo que equivale aproximadamente a 1 a 2 x 10⁸ unidades formadoras de colonias (UFC). Terminado este paso se sumergió un hisopo de algodón en esta mezcla y se eliminó el exceso de líquido en las paredes del tubo de ensayo, luego se procedió a inocular en la superficie de la placa con medio Mueller Hinton asegurandose que cubra el total del diámetro de esta y se dejó secar de 2-3 minutos. La cepa control de *E. coli* que se utilizó fue ATCC® 25922; finalmente con la ayuda de una pinza estéril o dispensador se colocaron los sensidiscos con agentes antimicrobianos con las siguientes concentraciones: ampicilina 10µg (AM), amikacina 30µg (AK), carbenicilina 100µg (CB), gentamicina 10µg (GE), cefalotina 30µg (CF), cefotaxima 30µg (CFX), netilmicina 30µg (NET), ciprofloxacina 5µg (CPF), norfloxacina 10µg (NOF), cloranfenicol 30µg (CL), Trimetoprim-sulfametoxazol 25µg (SXT), nitrofurantoina 300µg (NF), ácido nalidixico 30µg (NA) y tetraciclina 30µg (TE); posterior a esto se incubaron a por un periodo de 24 horas a una temperatura de 37 °C (CLSI 2012a) (figura 6)



Figura 6. Halo de inhibición en el método de difusión con sensibiliscos (Fuente: dato original)

La lectura de la sensibilidad se realizó de acuerdo a los lineamientos del CLSI (2015) midiendo el diámetro del halo de inhibición en mm. Los aislamientos se clasificaron en resistentes (R), intermedios (I) y sensibles (S) (cuadro 2)

Cuadro2. Antimicrobianos empleados y criterios de interpretación

Agente antimicrobiano	Abreviación	Contenido del sensibilisco (μg)	Criterio interpretativo del diámetro del halo de inhibición (mm)		
			S	I	R
Acido nalidíxico	NA	30 μg	≥ 19	14-18	≤ 13
Ciprofloxacina	CPF	5 μg	≥ 21	16-20	≤ 15
Ampicilina	AM	10 μg	≥ 17	14-16	≤ 13
Cefotaxima	CFX	30 μg	≥ 26	23-25	≤ 22
Amikacina	AK	30 μg	≥ 17	15-16	≤ 14
Carbenicilina	CB	100 μg	≥ 23	20-22	≤ 19
Gentamicina	GE	10 μg	≥ 15	13-14	≤ 12
Cefalotina	CF	30 μg	≥ 18	15-17	≤ 14
Netilmicina	NET	30 μg	≥ 15	13-14	≤ 12
Norfloxacina	NOF	10 μg	≥ 17	13-16	≤ 12
Cloranfenicol	CL	30 μg	≥ 18	13-17	≤ 12
Trimetoprim-Sulfametoxazol	SXT	25 μg	≥ 16	11-15	≤ 10
Nitrofurantoina	NF	300 μg	≥ 17	15-16	≤ 14
Tetraciclina	TE	30 μg	≥ 15	12-14	≤ 11

(Tomado y modificado de CLSI, 2015)

Extracción de ADN bacteriano.

Para la realización de la extracción de ADN bacteriano se modificó el protocolo descrito por Ahmed *et al.* (2009), cada uno de los aislamientos se sembró en placas de TSA durante 24 horas a 37 °C antes de la extracción. Después de este tiempo, se realizó un lavado de ADN, con la ayuda de una asa bacteriológica se recolectó una colonia de la bacteria suspendiéndose en un vial de microcentrifuga con 400µl de agua libre de nucleasas y se homogenizó por completo, posteriormente se sometió a un proceso de centrifugación a 12,000 rpm durante 10 minutos, este proceso se realizó en 4 repeticiones; en el último lavado, se desechó el sobrenadante y el pellet se volvió a resuspender en 100µl de agua libre de nucleasas asegurando una completa homogeneización, posterior a esto se sometió a 3 repeticiones de shock térmico. El ADN bacteriano se almacenó a -20°C

Identificación genotípica de *E. coli*

Se realizó una prueba de PCR para corroborar la identificación fenotípica de *E. coli* utilizando la amplificación del gen *uidA*. (los primers y características se enlistan en el cuadro 3).

Se utilizó como cepa control la ATCC 25922. Las reacciones consistieron en 2.5µl de 10x PCR buffer, 2µl de 25mM MgCl₂, 0.5µl de 200mM dNTPs, 2µl de cada uno de los primers (*uidA*), 0.3µl de Taq DNA polimerasa, 3µl de ADN bacteriano y 14.7µl de agua libre de nucleasas, obteniendo un volumen final de 25µl; las condiciones para la amplificación del gen *uidA* se realizó como lo reporta Aguilar-Montes de Oca *et al.* (2015): una desnaturalización inicial a 95 °C por 3 min; 30 ciclos de 95 °C por 30s, 60 °C por 30s y 72 °C por 30s; y una extensión final a 72°C por 5 min; las reacciones se procesaron en un termociclador Multigene™ Mini Personal (Labnet International Inc., Edison, NJ, USA); posteriormente las muestras fueron conservadas a 4 °C. El producto obtenido de la amplificación fue analizado en un gel de agarosa al 2% a 110V por 30 min conteniendo 0.05mg/L de bromuro de etidio (Aguilar-Montes de Oca *et al.*, 2015).

Cuadro 3. Primers empleados para la identificación genotípica de *E. coli*

Gen	Primer	Secuencia del primer	Tamaño del fragmento (pb)	Referencia
<i>uidA</i>	UAL1939b	5'-ATGGAATTCGCCGATTTTGC-3'	187	Heijnen y
	UAL2105b	5'-ATTGTTTGCCTCCCTGCTGC-3'		Medema, 2006

Conservación de los aislamientos bacterianos.

Se preparó una mezcla de caldo TSA con glicerol en proporción 3:1, esta se sometió a esterilización y se repartieron en viales; posteriormente, se tomó una porción de un cultivo de toda la noche y se vertió en la mezcla antes mencionada, se refrigeró a una temperatura de 4 °C durante 30 min y finalmente se congeló a una temperatura de -80 °C.

Inducción a la lisogenia con Mitomicina C y obtención del lisado fágico.

Se inocularon 50 µl de la bacteria a estudiar en 5 mL. de caldo de enriquecimiento (TSA) y se incubó en baño maría durante 30 minutos, posteriormente se agregó mitomicina C en una concentración final de 0.5 µl/ml. supervisando la absorbancia a 600 nm hasta que se observó una disminución en la densidad óptica (6-8 horas) (figura 7); después de este proceso, el producto se centrifugó a 10,000 rpm durante 12 min. a 4 °C y el sobrenadante se neutralizó a un pH de 7.0, finalmente el sobrenadante se filtró con una membrana de 0.45 micras para la obtención del lisado fágico y se almacenó a 4 °C (Raya y Hébert, 2009).

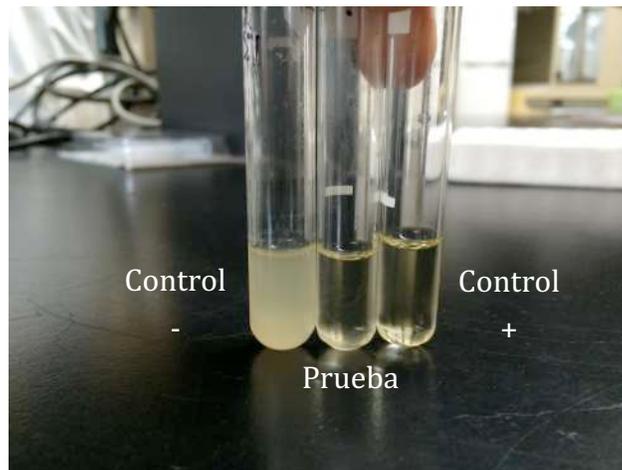


Figura 7. Lectura e interpretación de la actividad de la Mitomicina C (Fuente: dato original)

Determinación de la efectividad fágica por spot test.

Se colocó el agar blando (TSA al 5%) en baño maría hasta que estuvo en fase líquida, posteriormente se inocularon 200µl de cultivo bacteriano en fase estacionaria y se homogenizó; esta mezcla se vertió en placas de agar del mismo medio (TSA) y se distribuyó de forma uniforme en toda la placa dejándose solidificar a temperatura ambiente (aproximadamente de 10-15 minutos). Se colocó una gota de 5µl del aislado

fágico sobre el agar solidificado y se incubó durante 24 horas a 37 °C (Van y Kropinski, 2009).

Prueba de “doble capa”.

Se mezclaron 100 μ l de cultivo bacteriano con 100 μ l de lisado fágico suplementado con CaCl_2 (10mM). Este compuesto se preincubó durante 20 minutos a una temperatura de 37 °C, pasado este tiempo se mezcló con agar blando en fase líquida (TSA 5%) y se vertió en placas con agar TSA distribuyéndose de forma uniforme, se dejó solidificar a temperatura ambiente (aproximadamente de 10-15 minutos) y finalmente se incubó durante 24 horas a una temperatura de 37 °C (Dini, 2011; Van y Kropinski, 2009) (figura 8)

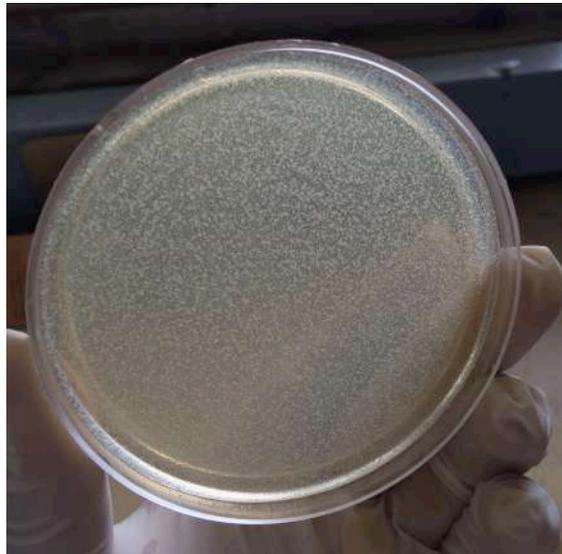


Figura 8. Observación de la actividad fágica (Fuente: dato original)

Purificación de fagos.

Se recolectaron las placas de lisis resultantes de la prueba spot test y se depositaron en 5 mL. de TSA (adicionado con CaCl_2), este compuesto se sometió a un movimiento moderado durante 20 min. para facilitar el desprendimiento de los bacteriófagos del agar blando, pasado este tiempo se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 minutos y finalmente se filtró con una membrana de 0.45 μ m. Posteriormente a esto, se realizó una prueba de doble capa con el lisado fágico obtenido anteriormente. Este pasaje de aislamiento se repitió 3 veces. Después del tercer pasaje de aislamiento, se le adicionó 4% (v/v) de cloroformo y se mantuvo en refrigeración a 4 °C (Dini, 2011; Van y Kropinski, 2009).

Extracción de ADN fágico.

Para la extracción de ADN fágico, se transfirió 1.8 mL. de lisado fágico a un tubo falcon con capacidad de 15 mL. Se agregaron 18µl de 1mg/ml de DNasa I y 8 µl de 12 mg/ml RNasa A, se mezcló y se incubó a 37 °C durante un periodo de 30 min para remover contaminación genómica bacteriana. Después de la incubación, se agregaron 46µl de SDS (20%) y 18 µl de 10 mg/ml de proteinasa K, se mezcló y se incubó durante 30 minutos a una temperatura de 37 °C. Posteriormente se alicuotaron 500 µl y se depositaron en tubos Eppendorf de 1.5 mL., a cada una de las alicuotas se le agregaron 500 µl de fenol:cloroformo:isoamil alcohol y se centrifugaron durante 5 minutos a 5,000 rpm para observar la separación de las fases y se recolectó la fase superficial, este paso se realizó en dos ocasiones (Pickard, 2009).

Después del segundo lavado se volvió a transferir la fase acuosa a tubos Eppendorf de 1.5 mL. agregándole 45 µl del acetato de sodio y 500 µl de etanol al 100%; se dejó precipitar a temperatura ambiente y se centrifugó a 14,000 rpm durante 20 minutos y se lavó el pellet de ADN con etanol a 70% en dos ocasiones. Por último se resuspendió el ADN fágico en 200 µl de buffer PBS y se almacenó en refrigeración a 4 °C (Juan, 2009).

Detección de genes de resistencia antimicrobiana en el ADN bacteriano y fágico.

Para todos los aislamientos se utilizó PCR de punto final en un termociclador Multigene™ Mini Personal (Labnet International Inc., Edison, NJ, USA) para la detección de los genes *bla_{TEM}*, *qnrA* y *qnrB* amplificando los oligonucleotidos que se muestran en el cuadro no. 4

Cuadro. 4. Primers empleados para la detección de genes de resistencia antimicrobiana en el ADN bacteriano y fágico

Primer	Secuencia de oligonucleotidos 5'----3'	Gen	Tamaño del fragmento (pares de bases)	Referencia
MultiTSO-T_for	CATTTCGGTGTCCGCTTATTC	<i>bla_{TEM}</i>	800	Dallenne <i>et al</i> (2010)
MultiTSO-T_rev	CGTTCATCCATAGTTGCCTGAC			
QnrAm_F	AGAGGATTTCTCACGCCAGG	<i>qnrA</i>	580	Bergiante <i>et al</i> (2016):
QnrAm_R	TGCCAGGCACAGATCTTGAC			
QnrBm_F	GGMATHGAAATTCGCCACTGa	<i>qnrB</i>	264	Bergiante <i>et al</i> (2016):
QnrBm_R	TTTGCYGYCGCCAGTCGAAa			

Sustituciones de bases nitrogenadas. ^a M= A o C; H= A o C o T; Y = C o T.

Detección del gen *bla*_{TEM}.

Un total de ADN bacteriano o fágico (3µl) fue sometido a la reacción de PCR en un volumen final de 25µl conteniendo 5µl 10x de buffer, 200 µM de cada desoxirribonucleótidos trifosfato, 1mM de MgCl₂, 1µl de cada grupo de primers y 1.25U de *Taq* polimerasa (Promega, USA).

Las condiciones para la amplificación del gen *bla*_{TEM} se realizó como lo reporta Dallene *et al.* (2010): una desnaturalización inicial a 94 °C por 10 min; 30 ciclos de 94 °C por 40s, 60 °C por 40s y 72 °C por 1min; y una extensión final a 72 °C por 7min

Detección de los genes *qnrA* y *qnrB*.

Se utilizó PCR múltiple para confirmar la presencia de los genes de resistencia antimicrobiana *qnrA* y *qnrB*. La reacción con un volumen final de 25µl contiene 5µl 10x de buffer, 200µM de cada desoxirribonucleótidos trifosfato, 1mM de MgCl₂, 1µl de cada grupo de primers, 3µl de ADN (bacteriano o fágico) y 1.25U de *Taq* polimerasa (Promega, USA).

Para la amplificación de los genes *qnrA* y *qnrB* se utilizaron las condiciones que reporta Bergiante *et al.* (2016): una desnaturalización inicial a 95°C por 10min; 25 ciclos de 95 °C por 45s, 58 °C por 45s y 72 °C por 15s; y una extensión final a 72 °C por 3min.

Todos los productos de PCR se corrieron en un gel de agarosa al 2% a 75V por 1h y posteriormente fueron teñidos con bromuro de etidio (0.05mg/L) y se examinaron en un transluminador de UV (Bergiante *et al.*, 2016).

Conservación de fagos.

En un criovial con tapa de rosca se adicionaron 0.15 volúmenes de glicerol a 0.85 volúmenes de lisado fágico, esta mezcla se congeló y se conservó a -70 °C por tiempo indefinido. El lisado fágico que se utilizó en las cepas se almacenó a una temperatura de 1-4 °C sin la presencia de glicerol (duración de 6-12 meses) Fernández *et al.*, 2004).

VII. Resultados

Artículo enviado

De: "Water Science and Technology" <em@editorialmanager.com>
Fecha: 11 de mayo de 2017, 23:20:42 GMT-5
Para: "Martin Talavera-Rojas" <talaverarojas@gmail.com>
Asunto: Submission Confirmation for Detection of bacteriophages carrying antibiotic resistance genes in wastewater, potable water and sewers from slaughterhouses of the north central zone of the State of Mexico
Responder a: "Water Science and Technology" <wstem@iwap.co.uk>

Dear Dr Talavera-Rojas,

Your submission entitled "Detection of bacteriophages carrying antibiotic resistance genes in wastewater, potable water and sewers from slaughterhouses of the north central zone of the State of Mexico" has been received and will now be peer reviewed for possible publication in the journal Water Science and Technology

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Editorial Manager as an author. The URL is <http://wst.edmgr.com/>.

You will be notified of the reference number assigned to your submission within two weeks.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

The Editorial Office
Water Science and Technology

Detection of bacteriophages carrying antibiotic resistance genes in wastewater, potable water and sewers from slaughterhouses of the north central zone of the State of Mexico

Juan Martín Talavera-González¹, Jorge Acosta-Dibarrat¹, Nydia Edith Reyes-Rodríguez², Celene Salgado-Miranda¹, Martín Talavera-Rojas^{1*}.

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

² Instituto de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Tulancingo de Bravo, C. P. 43600, Hidalgo, México

*Correspondencia del autor: Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, Carretera Panamericana Toluca-Atlacomulco, Km 15.5, C. P. 50200 Toluca, Estado de México, México. Telefonos: (722)2965555 y 2968980. E-mail: talaverarojas@gmail.com

Abstract

Antibiotic resistance genes (ARG's) have been described mainly in bacteria; however, in tempered phage the studies have been short. In this study the prevalence of *qnrB*, *qnrA* and

*bla*_{TEM} genes in *Escherichia coli* strains and in temperate phages obtained by induction of the lytic cycle in such isolates was determined. 48 samples of potable water, wastewater and sewers were collected from slaughterhouses in the State of Mexico, obtaining 37 isolates of *E. coli*. The highest resistance founded was for tetracycline 32/37 (86.4%), followed by trimethoprim-sulfamethoxazol 19/37 (51.3%) and finally ampicillin and nalidixic acid with the same number of isolates 18/37 (48.6%). The prevalence of the *bla*_{TEM} gene in bacterial isolates was 37.8%, while in the phage was 3.5%. The genes *qnrA* and *qnrB* were respectively found in 8.1% and 29.7% in bacterial isolates, whereas they were obtained in 2.7% and 24.3% in phages isolates respectively. The results show that the ARG's present in bacterial isolates are related in the phage DNA, which indicates the significant role in the propagation of ARG's in the studied slaughterhouses. Understanding mechanisms of resistance to antimicrobials will allow effective measures to be taken to reduce this phenomenon.

Key words : Antibiotic resistance, bacteriophages, *Escherichia coli*, genes

Introduction

Antibiotic therapy represents one of the most important medical advances of the 20th century and is a valuable resource for combating infectious diseases caused by bacteria. However, its therapeutic use has been associated with the emergence of antibiotic resistant bacteria (Balcazar 2014). Recognized as a global problem, antibiotic resistance increases mortality from bacterial diseases caused by these agents in humans and animals; Generating an increase in the cost of treatments due to the rapid dissemination of the

strains by human migration and the great industrialization in both food and animal. This resistance can be caused by the presence of ARG's which can be acquired and transferred by mobile genetic elements (MGE's) such as bacteriophages (Colomer-Lluch *et al.* 2011). Several reports suggest that phage play an important role as vectors, experimentally lysogenic phage carrying some ARG's or virulence factors have been induced to the lytic cycle by agents such as Mitomycin C or H₂O₂ and by others that are commonly used in the food industry such as Sodium Citrate and EDTA; when induced, phage are able to mobilize these ARG's and virulence factors among pathogenic bacteria, even transferring them to commensal bacteria by means of transduction (Balcazar 2014; Colomer-Lluch *et al.* 2014a; Iversen *et al.* 2015).

A recent study demonstrated the presence of high levels of the *bla*_{TEM}, *qnrA* and *qnrB* genes in the phage genome, this confers resistance to β -lactam antibiotics and quinolones. Phages were isolated from samples taken from wastewater treatment plants and from major rivers of cities with extensive anthropogenic action (Colomer-Lluch *et al.* 2011, 2014a).

Temperate bacteriophages with the presence of ARG's have been found mostly in aquatic environments but have also been reported in faecal samples obtained from hospitals of clinically healthy patients. This suggests that phage can be present in all environments without being detected in safety programs, which can cause a phage conversion in susceptible hosts as commensal bacteria (Quirós *et al.* 2014; Iversen *et al.* 2015).

Similarly, a recent study compared the effectiveness of different disinfection methods in wastewater treatment plants for bacterial and phage elimination. This study showed that none of these methods were able to completely eliminate temperate bacteriophages, which represents a public health problem since these phages contained at least one ARG's in their genome. The problem is aggravated when the surviving phage find a host and transmit the

ARG's (Calero-Cáceres & Muniesa 2016). The set of studies performed in temperate bacteriophages not only show the presence of ARG's that has claimed the lives of thousands of people and caused millionare losses worldwide but also the contribution of phages in the propagation of ARG's in the environment. Therefore, this work aims to collaborate in the understanding of the role of bacteriophages in the propagation of ARG's by determining the prevalence of the genes *bla*_{TEM}, *qnrA* and *qnrB* in bacterial and phage DNA collected from isolates of strains of *E. coli* from potable water, wastewater and sewers in slaughterhouses in the north central zone of the State of Mexico.

Material and Methods

Collection of samples

A probabilistic trial or criterion sampling was carried out, where 48 samples from four municipal slaughterhouses (SLH1, SLH2, SLH3 and SLH4) were collected from the north central zone of the State of Mexico (Jaramillo & Martínez 2010). 16 of these samples were taken from potable water (AP), used for carcasses washing. 16 of wastewater (AR) from a post-wash of carcasses, and 16 of sewers (AC) seated in the area of the sacrifice. The collection was after the slaughter of the animals, performing four replicates in each trail (Varela-Guerrero *et al.* 2013).

Sampling was performed based on official regulations (NOM-230-SSA1-2002), all samples were collected and deposited in tubes with sterile peptone water; in the case of wastewater and potable water, 10 mL of sample was taken; while a swab was used for the sewer, which was rubbed on the edges of the cover surface (Secretaría de Salud 2002). All samples were transported in refrigeration to the Food Safety Laboratory at the Center for Research and

Advanced Studies in Animal Health of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny at the Autonomous University of the State of Mexico for processing.

Bacteriological isolation

All samples were preincubated at 37 °C for 3 ± 1 h. Subsequently, they were inoculated on MacConkey agar plates and incubated at 37 °C for 24 h. The *E. coli* suspect colonies were selected for standard biochemical tests (TSI, LIA, SIM and Simmons Citrate) and confirmed by a PCR endpoint test amplifying the *uidA* gene, which encodes the β-glucuronidase enzyme (Aguilar *et al.* 2015).

Antimicrobial sensitivity

The test was performed using the disk diffusion method according to the CLSI guidelines (2012). The antimicrobials used were: ampicillin (AM), 10 µg; amikacin (AK), 30 µg; carbenicillin (CB), 100 µg; gentamicin (GE), 10 µg; cephalothin (CF), 30 µg; cefotaxime (CFX), 30 µg; netilmocin (NET), 30 µg; ciprofloxacin (CPF), 5 µg; norfloxacin (NOF), 10 µg; chloramphenicol (CL), 30 µg; Trimethoprim-sulfamethoxazol (SXT), 25 µg; nitrofurantoin (NF), 300 µg; nalidixic acid (NA), 30 µg and tetracycline (TE), 30 µg. The interpretation of the results was done according to the CLSI (2015) guidelines: resistant ^(a), intermediate resistance ^(b), or sensitive ^(c). *E. coli* strain ATCC 25922 was used as a control.

Genotypic identification of *E. coli*

A PCR test was performed to corroborate the phenotypic identification of *E. coli* with the amplification of the *uidA* gene, using primers UAL1939b 5'-ATGGAATTTCCGCCGATTTTGC-3' and UAL2105b 5'-ATTGTTTGCTCCCTGCTGC-3' in a Multigene™ Mini Personal

thermocycler (Labnet International Inc., Edison, NJ, USA). Reactions with a final volume of 25 μL consisted of: 2.5 μL 10x PCR buffer, 2 μL of 25 mM MgCl_2 , 0.5 μL of 200 mM dNTPs, 2 μL of each of the above primers, 0.3 μL (5 U/ μL) Taq DNA polymerase (Promega, USA), 3 μL of bacterial DNA and 12.7 μL of nuclease-free water. The initial denaturation step was performed for 3 minutes at 95 $^\circ\text{C}$, followed by 30 cycles of amplification: denaturation for 30 seconds at 95 $^\circ\text{C}$, alignment at 60 $^\circ\text{C}$ for 30 seconds and elongation for 30 seconds at 72 $^\circ\text{C}$; the final elongation was at 72 $^\circ\text{C}$ for 5 minutes. Subsequently, the sample was preserved at 4 $^\circ\text{C}$. The product obtained from the amplification was analyzed on a 2% agarose gel containing 0.05 mg/L of ethidium bromide and runned at 110 V for 30 min. (Aguilar *et al.* 2015).

Phage isolation

Each of the *Escherichia coli* isolates were inoculated into TSA broth in a ratio of 1:100 and incubated for 30 min. in a water bath at 37 $^\circ\text{C}$. Subsequently, they were treated with mitomycin C (final concentration 0.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$) by measuring the absorbance at 600 nm every hour for 6-8 hours or until a decrease in optical density was observed. They were centrifuged at 10,000 rpm. for 10 minutes. The supernatant was adjusted to pH 7.0 and finally filtered through a 0.22 μm membrane. Its lytic activity was verified by spot test method and double layer test using soft agar (Raya & Hébert 2009).

Extraction and purification of phage and bacterial DNA

The phenol-chloroform method was used to obtain phage DNA. The phage lysate was treated with DNase (1 mg/mL) and RNase (12.5 mg/mL) incubated for 30 min. at a temperature of 37 $^\circ\text{C}$ to remove genomic contaminants outside the phage. Subsequently, it

was washed with SDS (20%) by adding proteinase K (10 mg/mL) (Pickard 2009). To confirm the elimination of bacterial DNA and the presence of phage DNA, an endpoint PCR test was runned using the amplification of the *uidA* gene as a negative control (Colomer-Lluch *et al.* 2014a). For the extraction of bacterial DNA, the methodology proposed by Ahmed *et al.* (2009) was followed. The concentration and purity of the extracted phage and bacterial DNA were determined using a spectrometer (Quawell q500).

Detection of antibiotic resistance genes

All bacterial and phage isolates were examined by PCR endpoint for the detection of the *qnrA*, *qnrB* and *bla*_{TEM} genes using a Multigene™ Mini Personal Thermocycler (Labnet International Inc., Edison, NJ, USA).

a) Detection of the *bla*_{TEM} gene

The 37 bacterial and phage isolates were used for the detection of the *bla*_{TEM} gene. A PCR test was performed to confirm the presence of the *bla*_{TEM} gene using the MultiTSO-F for 5'-CATTTCGGTGTCGCCCTTATTC-3' and MULTITSO-T rev 5'-CGTTCATCCATAGTTGCCTGAC-3' primers. Reactions with a final volume of 25 µL consisted of: 3 µL of bacterial or phage DNA, 5 µL 10x buffer, 0.5 µL of 200 mM DNTPs, 2 µL of 25 mM MgCl₂, 1 µL of each primer group and 0.3 µL (5 U/µL) DNA Taq polymerase (Promega, USA). The conditions for detection of the *bla*_{TEM} gene were performed as reported by Dallene *et al.* (2010); an initial denaturation at 94 °C for 10 min; 30 cycles of 94 °C for 40s, 60 °C for 40s and 72 °C for 1 min; and a final elongation at 72 °C for 7 min in a Multigene™ Mini Personal Thermocycler (Labnet International Inc., Edison, NJ, USA). The products were examined on a UV

transilluminator after being run on a 2% agarose gel at 75 V for 1 h and stained with ethidium bromide (0.05 mg/L).

b) Detection of *qnrA* and *qnrB* genes

A multiple PCR was used to confirm the presence of the *qnrA* and *qnrB* genes. The primers QnrAm_F 5'-AGAGGATTTCTCACGCCAGG-3' and QnrAm_R 5'-TGCCAGGCACAGATCTTGAC-3' were used for the *qnrA* gene; and the primers QnrBm_F 5'-GGMATHGAAATTCGCCACTG-3' and QnrBm_R 5'-TTTGCYGYCGCCAGTCGAA-3' (M= A or C; H= A or C or T; Y = C or T). The reaction with a final volume of 25 µL consisted of: 5 µL 10x buffer, 0.3 µL of 200 mM DNTPs, 2.5 µL of 25 mM MgCl₂, 1 µL of each primer group, 3 µL of DNA (bacterial or phage) and 0.3 µL (5 U/µL) Taq DNA polymerase (Promega, USA). For the amplification of the *qnrA* and *qnrB* genes the conditions reported by Kraychete *et al.* (2016) were used; an initial denaturation at 95 °C for 10 min; 25 cycles of 95 °C for 45 s, 58 °C for 45 s and 72 °C for 15 s; and a final elongation at 72 °C for 3 min.

Results

Of the 48 samples collected, 37 (77%) isolates of *Escherichia coli* were obtained; of which, 13/37 (35.1%) were from SLH1; whereas from SLH2, SLH3 and SLH4, 8/37 (21.6%) were isolated in each one. Similarly, it should be noted that 19 (51.3%) isolates from wastewater were obtained, followed by 18 (48.6%) from sewers. No isolates from potable water was obtained (Table 1).

Slaughterhouse /	SLH1	SLH2	SLH3	SLH4	Total (%)
Origin of the sample					
AR	7	4	4	4	19/37 (51.3%)
AC	6	4	4	4	18/37 (48.6%)
AP	0	0	0	0	0
Total (%)	13/37 (35.1%)	8/37 (21.6%)	8/37 (21.6%)	8/37 (21.6%)	

AR = Wastewater, AC = Sewer, AP = Potable Water.

Table 1. List of isolates collected in the municipal slaughterhouses of the north central zone of the State of Mexico and their origin.

The highest resistance to antibiotics was for tetracycline (TE) with 32/37 (86.4%), 1/37 (2.7%) had intermediate resistance and 4/37 (10.8%) isolates were sensitive. For chloramphenicol (CL) 23/37 (62.1%) isolates with resistance were found, 1/37 (2.7%) with intermediate resistance and 13/37 (35.1%) were sensitive. At third place, trimethoprim-sulfamethoxazol (SXT) was found to have 19/37 (51.3%) isolates with resistance, while 18/37 (48.6%) showed sensitivity. In the case of ampicillin (AM) 18/37 (48.6%) resistant isolates were obtained, 3/37 (8.1%) showed intermediate resistance and 16/37 (43.3%) were sensitive. Finally for nalidixic acid (NA) 18/37 (48.6%) isolates with resistance were found, 10/37 (27%) had intermediate resistance and 9/37 (24.3%) were sensitive. No isolates resistant to cefotaxime (CFX) were obtained (Table 2).

Antib	SLH1			SLH2			SLH3			SLH4		
	AR	AC	Total (%)	AR	AC	Total (%)	AR	AC	Total (%)	AR	AC	Total (%)
AM	4	3	7/18 (38.8)	0	2	2/18 (11.1)	4	1	5/18 (27.7)	2	2	4/18 (22.2)
AK	0	0	0/1 (0)	0	0	0/1 (0)	1	0	1/1 (100)	0	0	0/1 (0)
CB	4	3	7/19 (36.8)	2	2	4/19 (21)	3	1	4/19 (21)	2	2	4/19 (21)
GE	1	1	2/5 (40)	0	0	0/5 (0)	2	1	3/5 (60)	0	0	0/5 (0)
CF	0	1	1/5 (20)	1	0	1/5 (20)	1	0	1/5 (20)	1	1	2/5 (40)
CFX	0	0	0/0 (0)	0	0	0/0 (0)	0	0	0/0 (0)	0	0	0/0 (0)
NET	0	0	0/1 (0)	0	0	0/1 (0)	0	0	0/1 (0)	1	0	1/1 (100)
CPF	0	0	0/3 (0)	1	1	2/3 (66.6)	1	0	1/3 (33.3)	0	0	0/3 (0)
NOF	0	1	1/3 (33.3)	1	0	1/3 (33.3)	1	0	1/3 (33.3)	0	0	0/3 (0)
CL	7	3	10/23 (43.4)	4	3	7/23 (30.4)	1	1	2/23 (8.6)	2	2	4/23 (17.3)
SXT	7	4	11/19 (57.8)	1	3	4/19 (21)	1	0	1/19 (5.2)	2	1	3/19 (15.7)
NF	0	1	1/6 (16.6)	2	0	2/6 (33.3)	1	0	1/6 (16.6)	2	0	2/6 (33.3)
NA	1	2	3/18 (16.7)	2	3	5/18 (27.7)	2	4	6/18 (33.3)	3	1	4/18 (22.2)
TE	7	5	12/32 (37.5)	3	4	7/32 (21.8)	3	3	6/32 (18.7)	3	4	7/32 (21.8)

Antib = Antibiotic, AR = Wastewater, AC = Sewer.

Table 2. Pattern of antibiotic resistance, wastewater and sewers obtained from municipal slaughterhouses in the north central zone of the State of Mexico.

Of the bacterial isolates resistant to ampicillin (AM), the *bla*_{TEM} gene was present in 55.5% (10/18), while isolates with intermediate resistance were observed in one of three; and finally it was observed in 18.75% (3/16) of sensitive isolates. In total, 37.8% (14/37) of bacterial isolates with the presence of the *bla*_{TEM} gene were obtained. 18 isolates resistant to nalidixic acid (NA) were obtained, of which, 11.1% (2/18) amplified the *qnrA* gene, and

27.7% (5/18) the *qnrB* gene; 10 isolates with intermediate resistance to this same antibiotic were recorded, where 10% (1/10) presented the *qnrA* gene while 40% (4/10) amplified the *qnrB* gene; of the nine isolates sensitive to nalidixic acid (NA) none presented the *qnrA* gene, while 22.2% (2/9) of these amplified the *qnrB* gene. A total of 8.1% (3/37) of bacterial isolates that had the *qnrA* gene were obtained, while 29.7% (11/37) of the isolates amplified the *qnrB* gene.

A pool of bacteriophages from each of the bacterial isolates was obtained for the detection of the *bla*_{TEM}, *qnrA*, *qnrB* genes; all bacterial isolates presented tempered phages.

Of the 14 bacterial isolates with the presence of the *bla*_{TEM} gene, 5 (35.7%) phage isolates were obtained that amplified this gene. These bacterial isolates from which the phage were collected showed resistance to ampicillin (AM). Similarly, of the three bacterial isolates that presented the *qnrA* gene, only one phage isolate (33.3%) was obtained that recorded the same gene, this bacterial isolate from which the phage were collected showed resistance to nalidixic acid. 11 bacterial isolates were obtained with the presence of the *qnrB* gene, from which four (36.3%) phages isolates were observed to amplify the same gene. Three of these bacterial isolates, from which the phages were obtained, were resistant to nalidixic acid and one presented intermediate resistance (Table 3).

Resistance to antibiotics	No. Of Isolates	Resistance genes found in bacterial DNA	Resistance genes found in phage DNA
AM ^a	7	<i>bla</i> _{TEM} (7)	<i>bla</i> _{TEM} (4)
AM ^c	2	<i>bla</i> _{TEM} (2)	-
NA ^a	3	<i>qnrB</i> (3)	<i>qnrB</i> (2)
NA ^b	3	<i>qnrA</i> (1), <i>qnrB</i> (2)	-
NA ^c	1	<i>qnrB</i> (1)	-
AM ^a , NA ^a	1	<i>bla</i> _{TEM} (1), <i>qnrA</i> (1), <i>qnrB</i> (1)	-
AM ^a , NA ^c	1	<i>bla</i> _{TEM} (1), <i>qnrB</i> (1)	-
AM ^a , NA ^b	1	<i>bla</i> _{TEM} (1), <i>qnrB</i> (1)	<i>bla</i> _{TEM} (1)
AM ^b , NA ^a	1	<i>bla</i> _{TEM} (1), <i>qnrA</i> (1), <i>qnrB</i> (1)	<i>qnrA</i> (1), <i>qnrB</i> (1)
AM ^c , NA ^b	1	<i>bla</i> _{TEM} (1), <i>qnrB</i> (1)	<i>qnrB</i> (1)

^a = resistant, ^b = intermediate resistance, ^c = sensitive (CLSI, 2015).

Table 3. Characterization of the phenotypic/genotypic relationship of the isolates obtained from municipal slaughterhouses in the north central zone of the State of Mexico.

The highest number of bacterial isolates with the presence of the three genes conferring resistance to antibiotics was recorded in SLH1 with 92.3% (12/13) of the isolates. While in SLH2 the highest number of phages isolates was recorded with the presence of the three genes, observed in 37.5% (3/8) of the isolates (Table 4).

Slaughterhouse/Origin of the sample	<i>bla_{TEM}</i>		<i>qnrA</i>		<i>qnrB</i>	
	Bacterian DNA (%)	Phage DNA (%)	Bacterian DNA (%)	Phage DNA (%)	Bacterian DNA (%)	Phage DNA (%)
SLH1 n=13	3 (23)	1 (7.6)	1 (7.6)	-	8 (61.5)	2 (15.3)
SLH2 n=8	4 (50)	1 (12.5)	1 (12.5)	1 (12.5)	1 (12.5)	1 (12.5)
SLH3 n=8	4 (50)	1 (12.5)	-	-	1 (12.5)	1 (12.5)
SLH4 n=8	3 (37.5)	2 (12.5)	1 (12.5)	-	1 (12.5)	-
Total n=37	14 (37.8)	5 (13.5)	3 (8.1)	1 (2.7)	11 (29.7)	4 (10.8)

Table 4. Distribution of the genes *bla_{TEM}*, *qnrA* and *qnrB* in the bacterial and phages isolates of the municipal slaughterhouses of the north central zone of the State of Mexico.

Discussion

In this study, a resistance of 48.6% to ampicillin was recorded with a prevalence of the *bla_{TEM}* gene of 37.8% in isolated strains of *E. coli*. In a study by Aguilar *et al.* (2015) reported a 32% resistance to this same antibiotic and a higher prevalence of the *bla_{TEM}* gene (48%) in *E. coli* isolates obtained from cattle carcasses from municipal slaughterhouses in the states of Jalisco and Mexico; the prevalence of this gene is varied and has been reported worldwide, Ouedraogo *et al.* (2016) found a prevalence of 36.3% of the *bla_{TEM}* gene in *E. coli* isolates collected from a hospital on the African continent, while Jang *et al.* (2012) found a 32.6% prevalence of this same gene in the Asian continent in some *E. coli* isolates from wastewater treatment plants. This resistance to ampicillin in slaughterhouses is probably due to the abuse of these antimicrobials, as growth promoters and prophylaxis (Varela-Guerrero *et al.* 2013). The gene *bla_{TEM}* is the most reported globally, especially in Gram negative bacteria, this is assumed because it has been found in

feces of migratory water birds, in addition to the large number of β -lactamase enzymes synthesized by bacteria. Up to now there is a register of more than 400 enzymes (Zhan *et al.* 2009).

On the other hand, in this study we found a resistance of 48.6% to nalidixic acid and a prevalence of the *qnrA* and *qnrB* gene of 8.1% and 29.7% respectively; in the study by Aguilar *et al.* (2015) reported a greater resistance to nalidixic acid with 64%, this same resistance was found by Kilani *et al.* (2015) in *E. coli* isolates collected in poultry production farms in Tunisia. Ramírez *et al.* (2013), reported a lower prevalence of the *qnrB* gene with 17.6% in *E. coli* isolates collected in the San Pedro River, one of the main animal supply rivers in Aguascalientes, Mexico; while in the study by Aguilar *et al.* (2015) did not report the prevalence of the *qnrA* gene. Although the prevalence is not high, resistance to quinolones has been increasing, this is due to its indiscriminate use in both the veterinary and the human clinic. Since the first *qnrA* gene was found in 1998, several genes have been described with the same activity of conferring resistance to bacteria against quinolones, several studies suggest that this resistance originated in aquatic environments since it is its main reservoir (Colomer- Lluç *et al.* 2014b).

Likewise, in this study, a resistance of 51.7% to trimethoprim-sulfamethoxazole and 48.6% to tetracycline was recorded in the *E. coli* collected isolates. In a study conducted in South Korea by Jang *et al.* (2012), found a 60% resistance to trimethoprim-sulfamethoxazole in *E. coli* isolates from a river; while Mokracka *et al.* (2011) reported a resistance of 73.4% to tetracycline in their *E. coli* isolates collected in wastewater treatment plants. Resistance to these antibiotics has been found to a large extent in the aquatic habitat where there is evidence of human activities as in the case of wastewater treatment plants. The high resistance found in our study may be due to the fact that they are one of the large-scale

antibiotics that are commonly used in the human and veterinary clinic to treat diarrheal and respiratory tract infections (Zhang *et al.* 2009).

A 62% resistance to chloramphenicol was recorded in this study, in this regard Fuentes *et al.* (2013), reported a similar resistance with 61.1% in *E. coli* isolates collected in federal inspection type slaughterhouses (TIF) in Mexico. No resistant isolates of cefotaxime were obtained, however, against this third-generation cephalosporin, resistance has been increasing at a global level, so in the study by Ramírez *et al.* (2013) obtained 1.33% resistance, whereas Mokracka *et al.* (2011) reported higher resistance to this same antibiotic with 12.5% in *E. coli* from wastewater treatment plants in Poland. The lifestyle of humans has led to increased resistance to antibiotics, and although the indiscriminate and unnecessary use of antibiotics is currently being controlled, several studies have reported highly virulent bacteria with a high resistance to antibiotics in various sites of anthropogenic actions (Balcazar 2014).

The high resistance to antibiotics has been described in several aquatic ecosystems where man plays a very important role in its manipulation, as in wastewater treatment plants that supply urban, rural, slaughter and hospital areas. Another factor for which resistance has increased is due to the large-scale development of antibiotics for clinical use in treating global conditions such as diarrhea in children. Even though, resistance to antibiotics is a natural phenomenon, some studies have been reported that the genetic mobile elements (MGE's), such as the bacteriophages, act as responsible for the genes transference which confer resistance to antibiotics (ARG's), both to pathogenic bacteria and to commensal bacteria (Calero-Cáceres & Muniesa 2016). In a recent study, Iversen *et al.* (2015) reported that 39.4% of commensal *E. coli* colonies were susceptible to the temperate phage that amplified the virulence Stx2 factor. The temperate bacteriophages play a very important

role in public health problems, because of their morphological structure they are very difficult to get rid of as Calero-Cáceres & Muniesa (2016) showed. In their study, driven in Barcelona, they compared different disinfection treatments in several wastewater treatment plants by measuring the prevalence of ARG's in phage DNA. The treatments they used were thermal, pH changes, UV radiation and chlorination. The results show that all the treatments that were used for disinfection do not damage the capsid of the temperate phage, with the possibility that one of these phages surviving the treatments will find a host and can transmit ARG's.

In the present study, a prevalence of 13.5% of the *bla*_{TEM} gene in the DNA of temperate phages from *E. coli* isolates is reported, whereas in a study conducted in Tunisia by Colomer-Lluch *et al.* (2014a) reported a prevalence of 86.6% of the *bla*_{TEM} gene in temperate phages from 15 environmental samples collected from wastewater on animal farms, and 100% prevalence of this gene in phage DNA from 33 samples collected from wastewater treatment plants of urban wastewater, this same prevalence was reported by Colomer-Lluch *et al.* (2011) in wastewater treatment plants in Spain. These results show that the prevalence of the *bla*_{TEM} gene in wastewater treatment plants has not decreased. Also, Quirós *et al.* (2014) collected 80 samples of human feces from 46 women and 34 men aged 6 months to 102 years old at the Saint Pau hospital in Barcelona, the prevalence reported for the *bla*_{TEM} gene was 63.8%. Possibly, the higher prevalence reported by Colomer-Lluch *et al.* (2011, 2014a) are due to the fact that the tempered phage collected come from environmental samples; Whereas, in our study, the temperate phages come from bacterial isolates.

In this study, we found a prevalence of 2.7% of the *qnrA* gene and 10.8% of the *qnrB* gene in phage DNA, whereas Colomer-Lluch *et al.* (2014b), in Spain, reported a prevalence of

71.4% of the *qnrA* gene in wastewater from animal farms and 100% in wastewater treatment plants. In addition, Colomer-Lluch *et al.* (2014a), in Tunisia, reported a prevalence of 15.1% of this same gene in a wastewater treatment plant and Quirós *et al.* (2014) reported a prevalence of 42.5% of the *qnrA* gene at Saint Pau Hospital in Barcelona. With the prevalence reported in this study and based on previous studies discussed, the presence of ARG's in the viral genome is confirmed, putting public health at risk, since they have been reported in places where their products are for human consumption.

In this study, bacterial and phage isolates with the presence of the *bla*_{TEM}, *qnrA* and *qnrB* genes show a very variable distribution, registering the presence of at least one of these genes in slaughterhouses. Although resistance to antibiotics is a natural phenomenon, it is considered to be intimately related to the indiscriminate and unnecessary use of antibiotics in veterinary clinics (Colomer-Lluch *et al.* 2011). Due to this use, one of the most susceptible habitats to acquire a great variety of ARG's is the aquatic one: wastewater treatment plants, water for agricultural use, water for slaughterhouses and other aquatic environments are where the prevalence of ARG's has been reported both in phage and bacterial DNA. Phages, since they belong to the MGE's group, play a very important role in the transfer of ARG's; Not only between pathogenic bacteria making them more virulent, but also between pathogenic bacteria and commensal bacteria present in adults and children. The understanding of antimicrobial resistance mechanisms will be useful for the development of effective strategies for the reduction of this phenomenon.

REFERENCES

- Aguilar, M.O.S., Talavera, R.M., Soriano, V.E., Barba, L.J. & Vazquez, N.J. 2015 Determination of extended spectrum β -lactamases and plasmid-mediated quinolone resistance in *Escherichia coli* isolates obtained from bovine carcasses in Mexico. *Tropical Animal Health and Production* **47** (5), 975-981. DOI: [10.1007/s11250-015-0818-3](https://doi.org/10.1007/s11250-015-0818-3)
- Ahmed, A.M., Ishida, Y. & Shimamoto, T. 2009 Molecular Characterization of antimicrobial resistance in *Salmonella* isolated from animals in Japan. *Journal of Applied Microbiology* **106** (2), 402-409. DOI: [10.1111/j.1365-2672.2008.04009.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.04009.x)
- Balcazar, J.L. 2014 Bacteriophages as Vehicles for Antibiotic Resistance Genes in the Environment. *PLoS Pathogens* **10** (7): e1004219 DOI: [10.1371/journal.ppat.1004219](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004219)
- Calero-Cáceres, W. & Muniesa, M. 2016 Persistence of naturally occurring antibiotic resistance genes in the bacteria and bacteriophage fractions of wastewater. *Water Research* **95**, 11-18. DOI: [10.1016/j.watres.2016.03.006](https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.03.006)
- 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*, 25nd 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. DOI: [10.1016/j.envint.2014.07.003](https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.07.003)
- Colomer-Lluch, M., Jofre, J. & Muniesa, M. 2011 Antibiotic Resistance Genes in the Bacteriophage DNA Fraction of Environmental Samples. *PLoS One* **6** (3): e17549 DOI: [10.1128/AAC.01684-13](https://doi.org/10.1128/AAC.01684-13)
- 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* **69** (5), 1265-1274. DOI: [10.1093/jac/dkt528](https://doi.org/10.1093/jac/dkt528)
- 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 β -lactamases in *Enterobacteriaceae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **65** (3), 490-495. DOI: [10.1093/jac/dkp498](https://doi.org/10.1093/jac/dkp498)
- Fuentes, A.R., Talavera, R.M., Vázquez, N.J., Soriano, V.E. & Gutierrez, C.A. 2013 Presence of class I integrons in *Escherichia coli* isolated from meat products in Federal Inspection Type (TIF) plants in the Estado de Mexico. *Veterinaria México* **44** (1), 23-30.
- Iversen, H., L'Ábée-Lund, T.M., Aspholm, M., Arnesen, L.P. & Lindbäck, T. 2015 Commensal *E. coli* Stx2 lysogens produce high levels of phages after spontaneous propahge induction. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **5**, 1-8. DOI: [10.3389/fcimb.2015.00005](https://doi.org/10.3389/fcimb.2015.00005)
- Jang, J., Suh, Y.S., Di, D. Y., Unno, T., Sadowsky, M. J. & Hur, H.G. 2012 Pathogenic *Escherichia coli* Strains Producing Extended-Spectrum β -Lactamases in the Yeongsan River

- Basin of South Korea. *Environmental Science & Technology* **47** (2), 1128-1136. DOI: [10.1021/es303577u](https://doi.org/10.1021/es303577u)
- Jaramillo ACJ., Martínez MJJ. 2010. *Epidemiología Veterinaria*. México: El Manual Moderno.
- Kraychete, G.B. Botelho, L.A., Campana, E.H., Picão, R.C. & Bonelli R.R. 2016 Updated multiplex PCR for detection of all six plasmid-mediated *qnr* gene families. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **60** (12), 7524-7526. DOI: [10.1128/AAC.01447-16](https://doi.org/10.1128/AAC.01447-16)
- Kilani, H., Salah, A.M., Sana, F., Mansouri, R., Sghaier, S., Ben, S.R., Jaouani, I., Douja, G., Brahim, S., Hammami, S., Ben C.N. & Boutiba-Ben, B.I. 2015 Occurrence of *bla_{CTX-M-1}*, *qnrB1* and virulence genes in avian ESBL-producing *Escherichia coli* isolates from Tunisia. *Frontiers and Cellular and Infection Microbiology* **5**(38), 1-8. doi: [10.3389/fcimb.2015.00038](https://doi.org/10.3389/fcimb.2015.00038)
- Mokracka, J., Koczura, R., Jabłońska, L. & Kaznowski A. 2011 Phylogenetic groups, virulence genes and quinolone resistance of integron-bearing *Escherichia coli* strains isolated from a wastewater treatment plant. *Antonie van Leeuwenhoek* **99** (4), 817-824. DOI: [10.1007/s10482-011-9555-4](https://doi.org/10.1007/s10482-011-9555-4)
- Ouedraogo, S.A., Sanou, M., Kissou, A., Sanou, S., Solaré, H., Kaboré, F., Poda, A., Aberkane, S., Bouzinbi, N., Sano, I., Nacro, B., Sangaré, L., Carrière, C., Decré, D., Ouégraogo, R., Jean-Pierre, H. & Godreuil, S. 2016 High prevalence of extended-spectrum β -lactamase producing *enterobacteriaceae* among clinical isolates in Burkina Faso. *BMC Infectious Diseases* **16**:326 DOI: [10.1186/s12879-016-1655-3](https://doi.org/10.1186/s12879-016-1655-3)
- Pickard, D.J. 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. DOI: [10.1007/978-1-60327-565-1_1](https://doi.org/10.1007/978-1-60327-565-1_1)
- 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* **58** (1), 606-609. DOI: [10.1128/AAC.01684-13](https://doi.org/10.1128/AAC.01684-13)
- Raya, R.R. & Hébert, EM. 2009 Isolation of Phage via Induction of Lysogens. En: *Bacteriophages. Methods and Protocols, Volume 1: Isolation, Characterization, and Interactions*, Humana Press, Volume 501 of the series Methods in Molecular Biology, Reino Unido, pp 23-32. DOI: [10.1007/978-1-60327-164-6_3](https://doi.org/10.1007/978-1-60327-164-6_3)
- Ramirez, C.F.Y., Avelar, G.F.J., Garneau, P., Márquez, D.F., Guerrero, B.A.L. & Harel, J. 2013 Presence of multi-drug resistant pathogenic Escherichia coli in the San Pedro River located in the State of Aguascalientes, Mexico. *Frontiers in Microbiology* **4** (147), 1-16 DOI: [10.3389/fmicb.2013.00147](https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00147)
- Secretaría de Salud. 2002. *Salud Ambiental. Agua para uso y consumo humano, requisitos sanitarios que se deben cumplir en los sistemas de abastecimiento públicos y*

Aislamiento bacteriológico.

De las 48 muestras recolectadas se obtuvieron 37 aislamientos (77%) de *Escherichia coli* 13/37 (35.1%) fueron procedentes del rastro de Atlacomulco, mientras que en el rastro municipal de San Felipe del Progreso se obtuvieron 8/37 (21.6%) aislamientos, en el rastro municipal de El Oro se registraron 8/37 (21.6%) aislamientos, y por último se obtuvieron 8/37 (21.6%) aislamientos en el rastro municipal de Ixtlahuaca. Todos los aislamientos fueron identificados como *Escherichia coli* por pruebas bioquímicas convencionales (TSI, LIA, SIM y Citrato de Simmons) y por PCR del gen *uidA*.

Se obtuvieron 19/37 (51.3%) aislamientos procedentes de agua residual, mientras que en el alcantarillado se obtuvieron 18/37 (48.6%) aislamientos y en el agua potable no se registraron aislamientos de *Escherichia coli* (Cuadro 5).

Cuadro 5. Aislamientos obtenidos en cada uno de los rastros muestreados de la zona norte del Estado de México

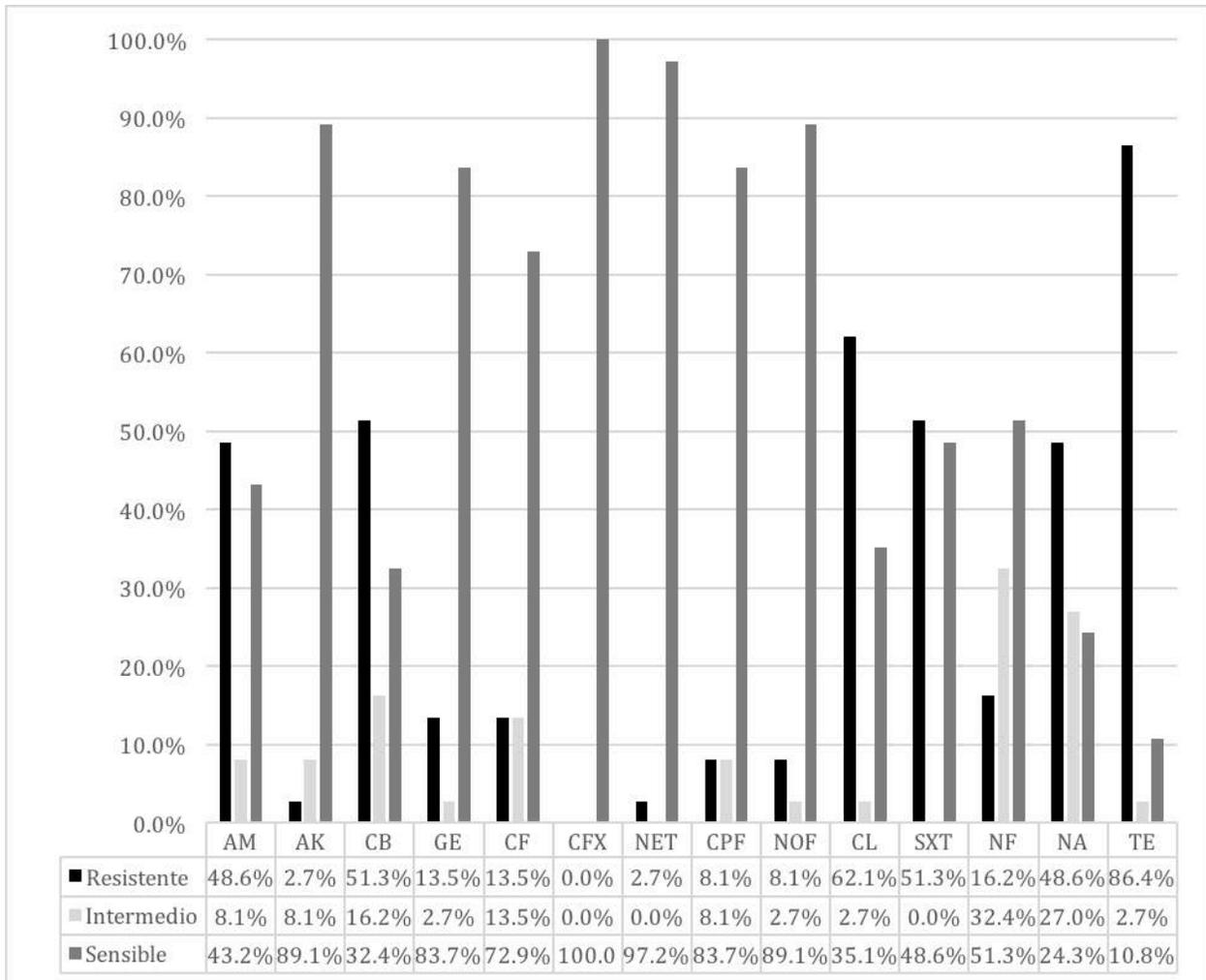
Rastro/Origen de la muestra	Atlacomulco	San Felipe del Progreso	El Oro	Ixtlahuaca	Total
Agua residual	7	4	4	4	19/37 (51.3%)
Alcantarillado	6	4	4	4	18/37 (48.6%)
Agua potable	0	0	0	0	0
Total	13/37 (35.1%)	8/37 (21.6%)	8/37 (21.6%)	8/37 (21.6%)	

Pruebas de sensibilidad.

La tetraciclina (TE) fue el antibiótico para el cual se registró mayor resistencia con 32/37 (86.4%), 1/37 (2.7%) obtuvo una resistencia intermedia y 4/37 (10.8%) aislamientos fueron sensibles al antibiótico; para el caso del cloranfenicol (CL) se registraron 23/37 (62.1%) aislamientos con resistencia, un aislamiento (2.7%) con resistencia intermedia y 13/37 (35.1%) aislamientos fueron sensibles; en tercer lugar se observó al trimetoprim-sulfametoxazol (SXT) donde se registraron 19/37 (51.3%) aislamientos con resistencia al antibiótico, no se obtuvieron aislamientos con resistencia intermedia, mientras que 18/37 (48.6%) aislamientos presentaron sensibilidad. En el caso de la ampicilina (AM) se obtuvieron 18/37 (48.6%) aislamientos resistentes, 3/37 (8.1%) aislamientos registraron una resistencia intermedia y 16/37 (43.3%) aislamientos fueron sensibles al antibiótico; y por último para el ácido nalidíxico

(NA) se registraron 18/37 (48.6%) aislamientos con resistencia, mientras que 10/37 (27%) aislamientos obtuvieron una resistencia intermedia y 9/37 (24.3%) aislamientos fueron sensibles a este antibiótico. Cabe mencionar que no se obtuvieron aislamientos resistentes a la cefotaxima (CFX) (cuadro 6).

Gráfica 1. Sensibilidad antimicrobiana de los aislamientos de *E. coli* obtenidos de los rastros municipales de la zona norte del Estado de México



AM, ampicilina; AK, amikacina; CB, carbenicilina; GE, gentamicina; CF, cefolatina; CFX, cefotaxima; NET, netilmicina; CPF, ciprofloxacina; NOF, norfloxacina; CL, cloranfenicol; SXT, trimetoprim-sulfametoxazol; NF, nitrofurantoina; NA, ácido nalidíxico; TE, tetraciclina

De los 32 aislamientos resistentes a la tetraciclina (TE) 12/32 (37.5%) se registraron en el rastro de Atlacomulco, 7/32 (21.8%) aislamientos se obtuvieron en el rastro de San Felipe del Progreso, 6/32 (18.7%) fueron obtenidos del rastro municipal de El Oro y

7/32 (21.8%) se registraron en el municipio de Ixtlahuaca. Se registraron 10/23 aislamientos resistentes al cloranfenicol (CL) en el rastro de Atlacomulco, en el caso del rastro de San Felipe del Progreso se obtuvieron 7/23 (30.4%) aislamientos resistentes a este antibiótico, 2/23 (8.6%) aislamientos resistentes fueron obtenidos en el rastro de El Oro y 4/23 (17.3%) aislamientos se registraron en el rastro municipal de Ixtlahuaca. Para el trimetoprim-sulfametoxazol (SXT) se registraron 11/19 (57.8%) aislamientos resistentes en el rastro de Atlacomulco, 4/19 (21%) fueron obtenidos en el rastro municipal de San Felipe del Progreso, mientras que en el rastro de El Oro de obtuvo 1/19 (5.2%) aislamiento resistente a este antibiótico y se registraron 3/19 (15.7%) aislamientos en el rastro de Ixtlahuaca. En el caso del ácido nalidíxico (NA) se obtuvieron 3/18 (16.7%) aislamientos resistentes en el rastro municipal de Atlacomulco, en el rastro de San Felipe del Progreso se obtuvieron 5/18 (27.7%), 6/18 (33.3%) aislamientos resistentes se registraron en el rastro de El Oro y 4/18 (22.2%) aislamientos se lograron obtener en el rastro de Ixtlahuaca. Por último 7/18 (38.8%) aislamientos resistentes a la ampicilina (AM) fueron registrados en el rastro municipal de Atlacomulco, en el caso del rastro de San Felipe del Progreso se obtuvieron 2/18 (11.1%) aislamientos, 5/18 (27.7%) fueron resistentes a este antibiótico en el rastro de El Oro y 4/18 (22.2%) aislamientos resistentes fueron obtenidos en el rastro de Ixtlahuaca (Cuadro 7).

Extracción de ADN bacteriano e identificación genotípica de *E. coli*

Todos los aislamientos bacterianos (37/37) fueron identificados genotípicamente a través de la amplificación del gen *uidA* (con un peso molecular de 187 pb), el cual codifica para la enzima beta-glucuronidasa. Se utilizó como control positivo la cepa *E. coli* ATCC 25922 (pozo 2) y como control negativo una cepa de *Salmonella Typhi*.

Cuadro 7. Procedencia de los aislamientos resistentes de cada uno de los rastros muestreados de la zona norte del Estado de México

Antib	Atacomulco				San Felipe del Progreso				El Oro				Ixtlahuaca			
	AR	AP	AC	Total (%)	AR	AP	AC	Total (%)	AR	AP	AC	Total (%)	AR	AP	AC	Total (%)
AM	4	0	3	7/18 (38.8)	0	0	2	2/18 (11.1)	4	0	1	5/18 (27.7)	2	0	2	4/18 (22.2)
AK	0	0	0	0/1 (0)	0	0	0	0/1 (0)	1	0	0	1/1 (100)	0	0	0	0/1 (0)
CB	4	0	3	7/19 (36.8)	2	0	2	4/19 (21)	3	0	1	4/19 (21)	2	0	2	4/19 (21)
GE	1	0	1	2/5 (40)	0	0	0	0/5 (0)	2	0	1	3/5 (60)	0	0	0	0/5 (0)
CF	0	0	1	1/5 (20)	1	0	0	1/5 (20)	1	0	0	1/5 (20)	1	0	1	2/5 (40)
CFX	0	0	0	0/0 (0)	0	0	0	0/0 (0)	0	0	0	0/0 (0)	0	0	0	0/0 (0)
NET	0	0	0	0/1 (0)	0	0	0	0/1 (0)	0	0	0	0/1 (0)	1	0	0	1/1 (100)
CPF	0	0	0	0/3 (0)	1	0	1	2/3 (66.6)	1	0	0	1/3 (33.3)	0	0	0	0/3 (0)
NOF	0	0	1	1/3 (33.3)	1	0	0	1/3 (33.3)	1	0	0	1/3 (33.3)	0	0	0	0/3 (0)
CL	7	0	3	10/23 (43.4)	4	0	3	7/23 (30.4)	1	0	1	2/23 (8.6)	2	0	2	4/23 (17.3)
SXT	7	0	4	11/19 (57.8)	1	0	3	4/19 (21)	1	0	0	1/19 (5.2)	2	0	1	3/19 (15.7)
NF	0	0	1	1/6 (16.6)	2	0	0	2/6 (33.3)	1	0	0	1/6 (16.6)	2	0	0	2/6 (33.3)
NA	1	0	2	3/18 (16.7)	2	0	3	5/18 (27.7)	2	0	4	6/18 (33.3)	3	0	1	4/18 (22.2)
TE	7	0	5	12/32 (37.5)	3	0	4	7/32 (21.8)	3	0	3	6/32 (18.7)	3	0	4	7/32 (21.8)

AR. Agua residual

AP. Agua potable

AC. Alcantarilla

Extracción de ADN fágico y efectividad de las nucleasa

Para descartar la probable contaminación de ADN bacteriano no encapsulado y confirmar la presencia de ADN fágico, las muestras se sometieron a una prueba de PCR de punto final utilizando como control negativo la amplificación del gen *uidA* (pozo 2) (Figura 9). Todas las muestras bacterianas amplificaron el gen *uidA* (Cuadro 8).

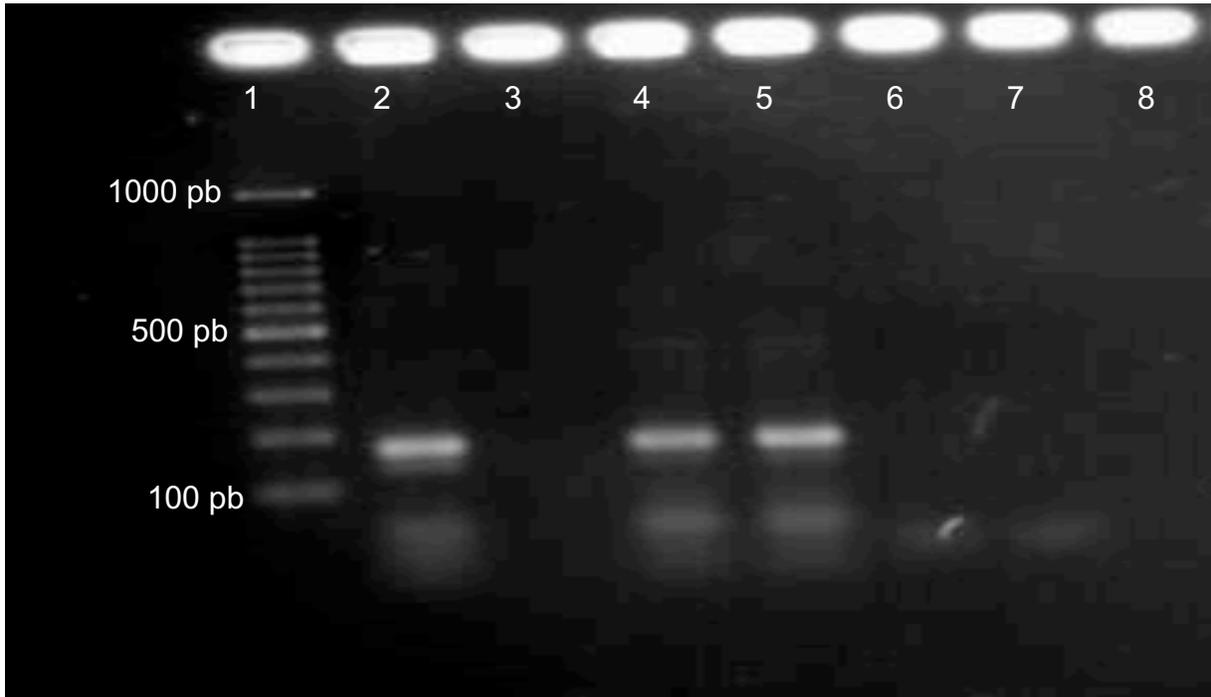
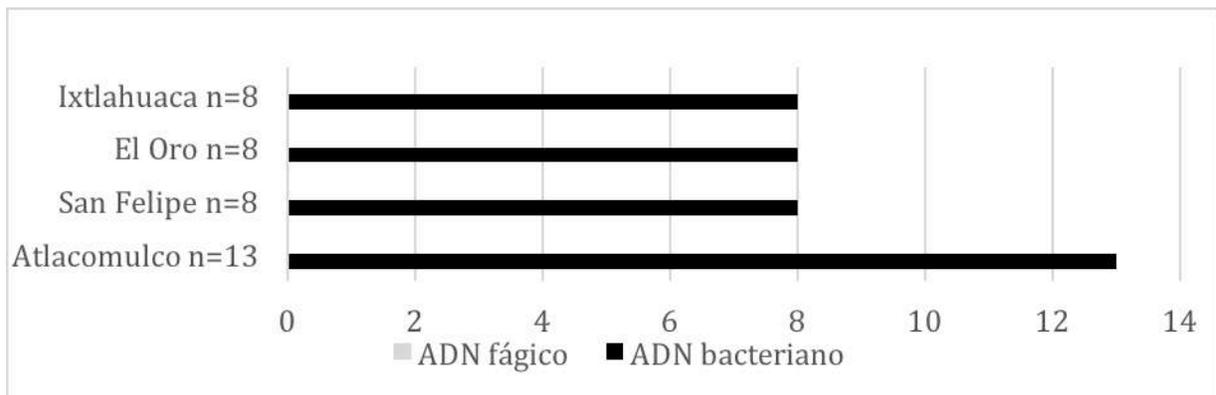


Figura 9. Banda diagnóstica del gen *uidA* en gel de agarosa al 2%. Pozos 4 y 5, aislamientos bacterianos; pozos 6 y 7, aislamientos fágicos negativos.



Cuadro 8. Procedencia de los aislamientos de *Escherichia coli* que fueron confirmados a través de la amplificación del gen *uidA*.

Amplificación de genes de resistencia antimicrobiana en el ADN bacteriano y fágico

a) Amplificación del gen *bla*_{TEM} en el ADN bacteriano

18/37 (48.6%) aislamientos presentaron resistencia a la ampicilina, y 10/18 (55.5%) amplificaron el gen *bla*_{TEM}; mientras 3/37 (8.1%) aislamientos presentaron resistencia intermedia y 1/3 (33.3%) amplificó el gen; por último, de los 16/37 (43.2%) aislamientos que fueron sensibles a la ampicilina, 3/16 (18.75%) codificaron el gen *bla*_{TEM} (Figura 10). Se tuvo un total de 14/37 (37.8%) aislamientos con la presencia del gen *bla*_{TEM}. (Cuadro 9).

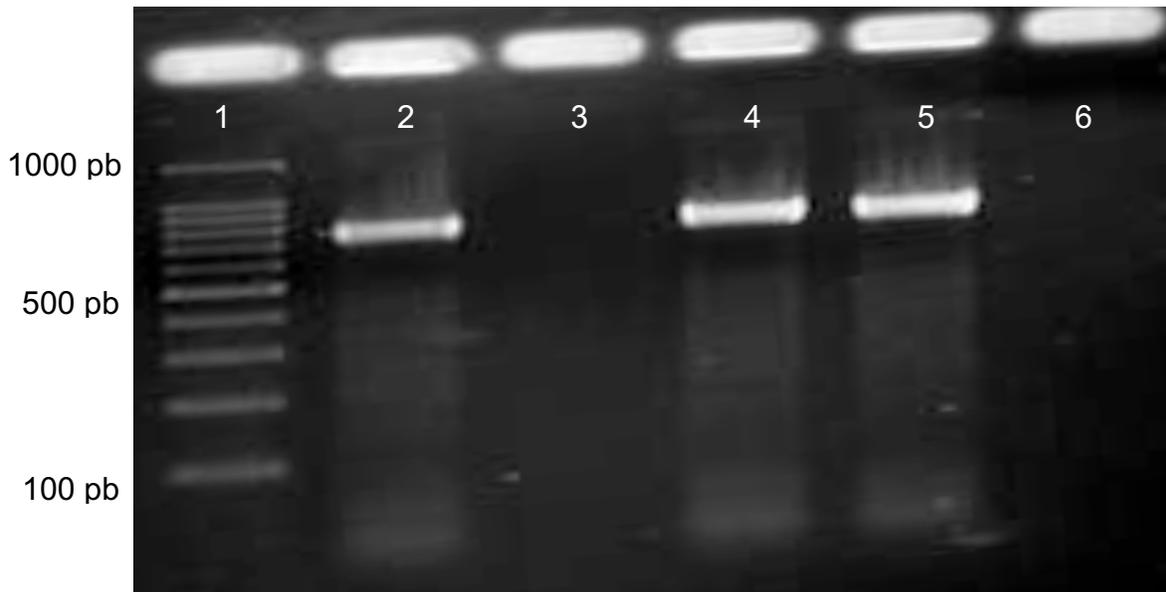
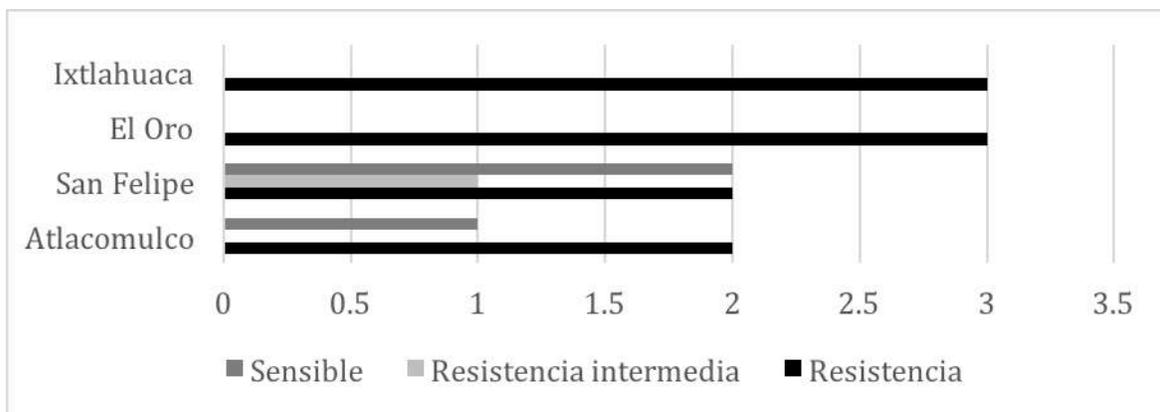


Figura 10. Banda diagnóstica del gen *bla*_{TEM} (800 pb) de aislamientos bacterianos en el gel de agarosa al 2%. Pozo1, marcador de peso molecular (100-1000); pozo 2, control positivo (Cepa *E. coli* reportada por Aguilar-Montes de Oca et al., 2015); pozo 3, control negativo (cepa *Salmonella Typhi*); pozo 4 y 5, aislamientos bacterianos positivos.



Cuadro 9. Procedencia de los aislamientos bacterianos que amplificaron el gen *bla*_{TEM} y su patrón de resistencia.

b) Amplificación del gen *bla_{TEM}* en el ADN fágico

Después de confirmar la ausencia de ADN bacteriano no empaquetado, se realizó una prueba de PCR de punto final para la amplificación del gen *bla_{TEM}* en el ADN fágico (Figura 11). Se obtuvo un registro de 5 (35.7%) aislamientos fágicos con la presencia del gen *bla_{TEM}* de los 14 aislamientos bacterianos que amplificaron este mismo gen (Cuadro 10). Todos los aislamientos bacterianos de donde se recolectaron los fagos, presentaron resistencia a la ampicilina

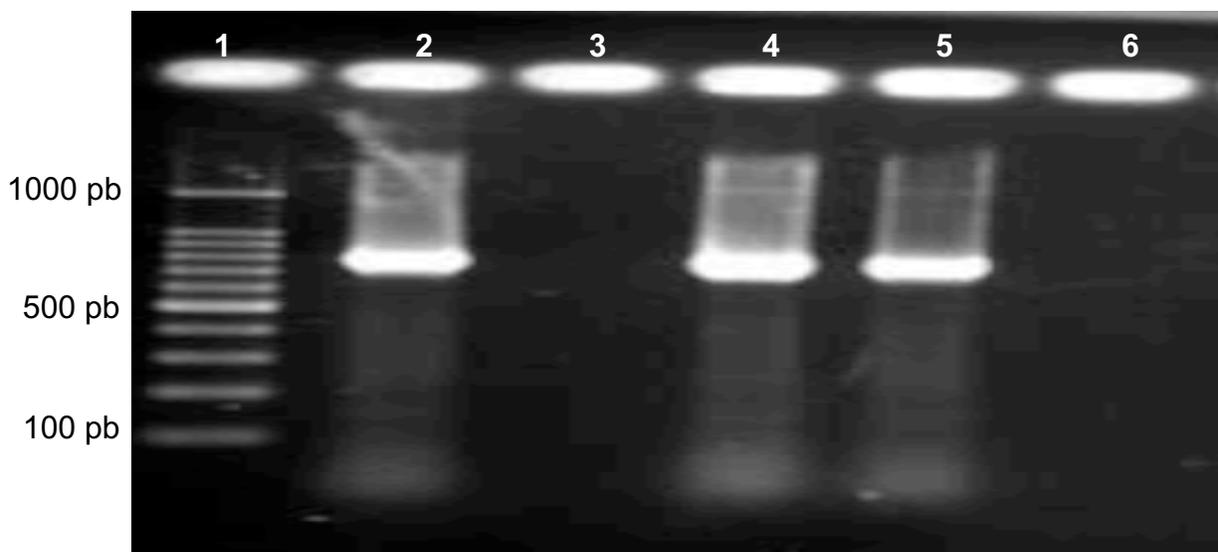


Figura 11. Banda diagnóstica del gen *bla_{TEM}* (800 pb) de aislamientos fágicos en gel de agarosa al 2%. Pozo 1, marcador de peso molecular (100-1000 pb); pozo 2, control positivo (Cepa *E. coli* reportada por Aguilar-Montes de Oca *et al.*, 2015); pozo 3, control negativo (cepa *Salmonella* Typhi); pozos 4 y 5, aislamientos fágicos positivos.

Patron de resistencia (no. de aislamientos)	Atacomulco		San Felipe del Progreso		El Oro		Ixtlahuaca		Total	
	ADN bacter	ADN fágico	ADN bacter	ADN fágico	ADN bacter	ADN fágico	ADN bacter	ADN fágico	ADN bacter (%)	ADN fágico (%)
Resistente (18)	2	1	2	1	3	1	3	2	10 (55.5)	5 (27.7)
Resistencia intermedia (3)	0	0	1	0	0	0	0	0	1 (33.3)	0
Sensible (16)	1	0	2	0	0	0	0	0	3 (18.7)	0
Total (37)	3	1	5	1	3	1	3	2	14 (37.8)	5 (13.5)

Cuadro 10. Relación de patrón de resistencia a la ampicilina (AM) entre los aislamientos bacterianos y fágicos que amplificaron el gen *bla_{TEM}*.

c) Amplificación del gen *qnrA* en el ADN bacteriano

18/37 (48.6%) aislamientos presentaron resistencia al ácido nalidíxico (NA), y 2/18 (11.1%) amplificaron el gen *qnrA*; mientras que 10/37 (27.0%) aislamientos presentaron resistencia intermedia y 1/10 (10%) amplificó el gen; por último, de los 9/37 (24.3%) aislamientos que fueron sensibles al ácido nalidíxico (NA), ninguno amplificó el gen (Figura 12). Se tuvo un total de 3/37 (8.1%) aislamientos con la presencia del gen *qnrA* en el ADN bacteriano (Cuadro 11).

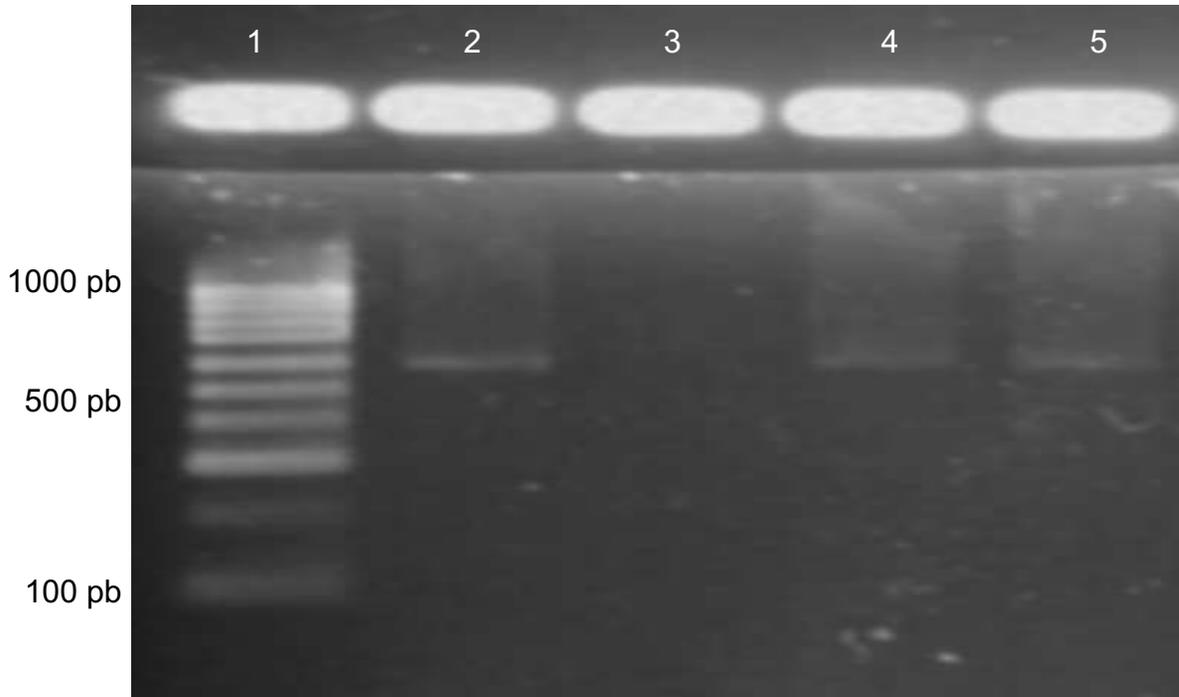
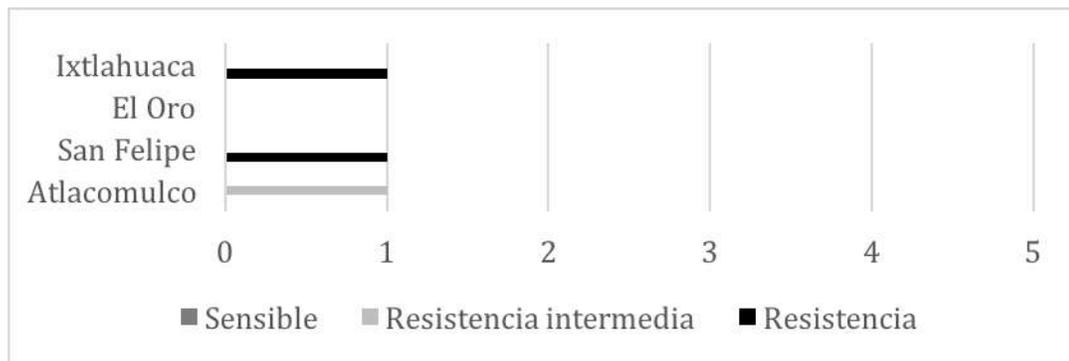


Figura 12. Banda diagnóstica del gen *qnrA* de aislamientos bacterianos en gel de agarosa al 2%. Pozo 1, marcador de peso molecular (100-1000 pb); pozo 2, control positivo (Cepa *E. coli* reportada por Aguilar-Montes de Oca *et al.*, 2015); pozo 3, control negativo (cepa *Salmonella* Typhi); pozos 4 y 5, aislamientos bacterianos positivos.



Cuadro 11. Procedencia de los aislamientos bacterianos que amplificaron el gen *qnrA* y su patrón de resistencia

d) Amplificación del gen *qnrA* en el ADN fágico

Se registró 1 (33.3%) aislamiento fágico con la presencia del gen *qnrA* (Figura 13) de los 3 aislamientos bacterianos que amplificaron este mismo gen. El aislamiento bacteriano de donde se recolectaron los fagos presentó resistencia al ácido nalidíxico (Cuadro 12).



Figura 13. Banda diagnóstica del gen *qnrA* (580 pb) de aislamientos fágicos en gel de agarosa al 2%. Pozo 1, marcador de peso molecular (100-1000 pb); pozo 2, control positivo (Cepa *E. coli* reportada por Aguilar-Montes de Oca *et al.*, 2015); pozo 3, control negativo (cepa *Salmonella Typhi*); pozos 4 y 5, aislamientos fágicos positivos.

Patrón de resistencia (no. de aislamientos)	Atlacomulco		San Felipe del Progreso		El Oro		Ixtlahuaca		Total	
	ADN bacter	ADN fágico	ADN bacter	ADN fágico	ADN bacter	ADN fágico	ADN bacter	ADN fágico	ADN bacter (%)	ADN fágico (%)
Resistente (18)	0	0	1	1	0	0	1	0	2 (11.1)	1 (5.5)
Resistencia intermedia (10)	1	0	0	0	0	0	0	0	1 (10)	0
Sensible (9)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total (37)	1	0	1	1	0	0	1	0	3 (8.1)	1 (2.7)

Cuadro 12. Relación de patrón de resistencia al ácido nalidíxico (NA) entre los aislamientos bacterianos y fágicos que amplificaron el gen *qnrA*.

e) Amplificación del gen *qnrB* en el ADN bacteriano

Se obtuvieron 18/37 (48.6%) aislamientos con resistencia al ácido nalidíxico (NA), y 5/18 (27.7%) amplificaron el gen *qnrB*; mientras que 10/37 (27.0%) aislamientos presentaron resistencia intermedia y 4/10 (40%) de ellos amplificó el gen; por último, de los 9/37 (24.3%) aislamientos que fueron sensibles al ácido nalidíxico (NA), 2/9 (22.2%) registraron una amplificación del gen *qnrB* (Figura 14). Se tuvo un total de 11/37 (29.7%) aislamientos con la presencia del gen *qnrA* en el ADN bacteriano (Cuadro 13).

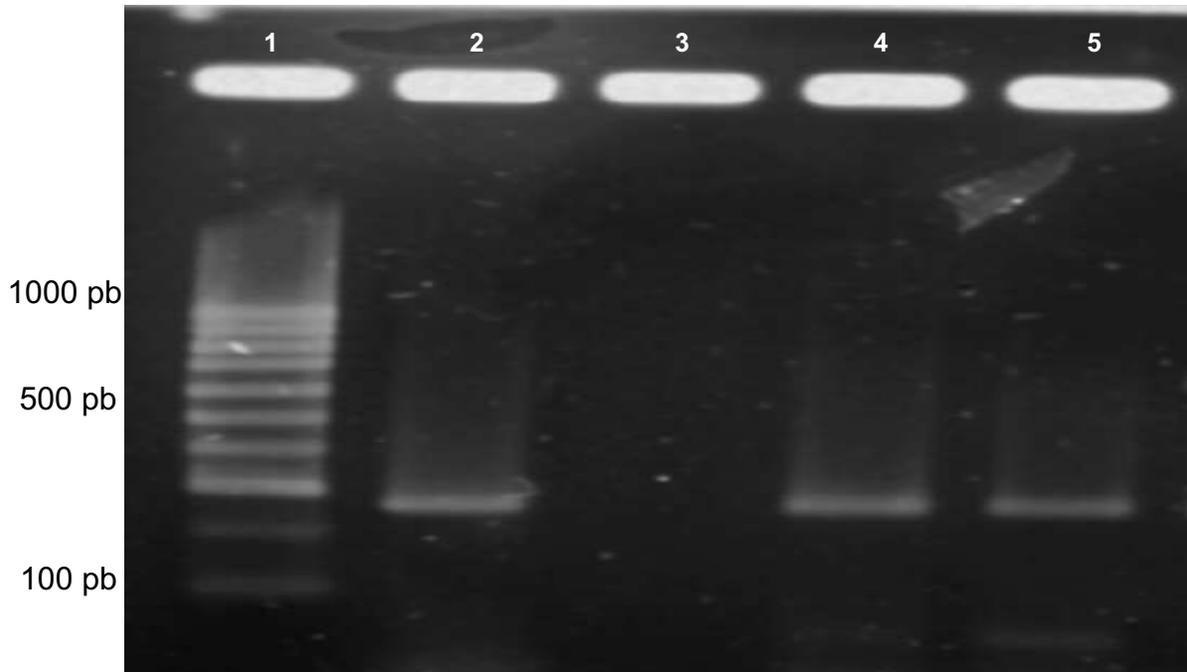
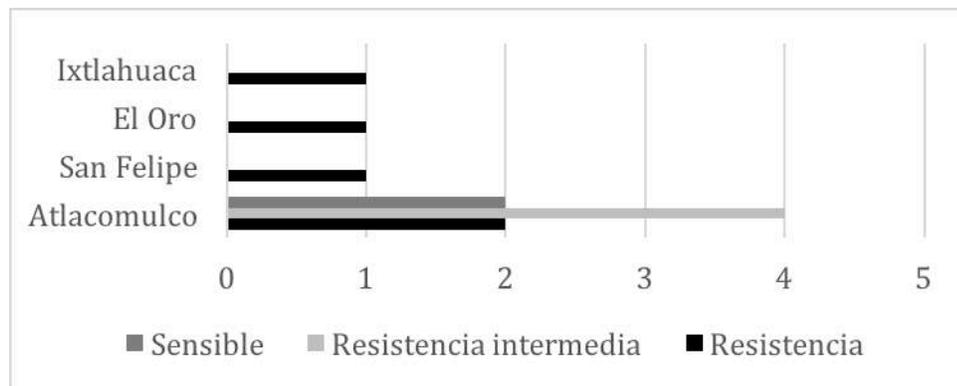


Figura 14. Banda diagnóstica del gen *qnrB* (264 pb) de aislamientos bacterianos en gel de agarosa al 2%. Pozo 1, marcador de peso molecular (100-1000 pb); pozo 2, control positivo (Cepa *E. coli* reportada por Aguilar-Montes de Oca *et al.*, 2015); pozo 3, control negativo (cepa *Salmonella* Typhi); pozos 4 y 5, aislamientos bacterianos positivos.



Cuadro 13. Procedencia de los aislamientos bacterianos que amplificaron el gen *qnrB* y su patrón de resistencia.

f) Amplificación del gen *qnrB* en el ADN fágico

Se registraron 4 (36.3%) aislamientos fágicos con la presencia del gen *qnrB* (Figura 15) de los 11 aislamientos bacterianos que amplificaron este mismo gen (Cuadro 14). 3 de estos aislamientos bacterianos de donde se obtuvieron los fagos presentaron resistencia al ácido nalidíxico y 1 presentó resistencia intermedia

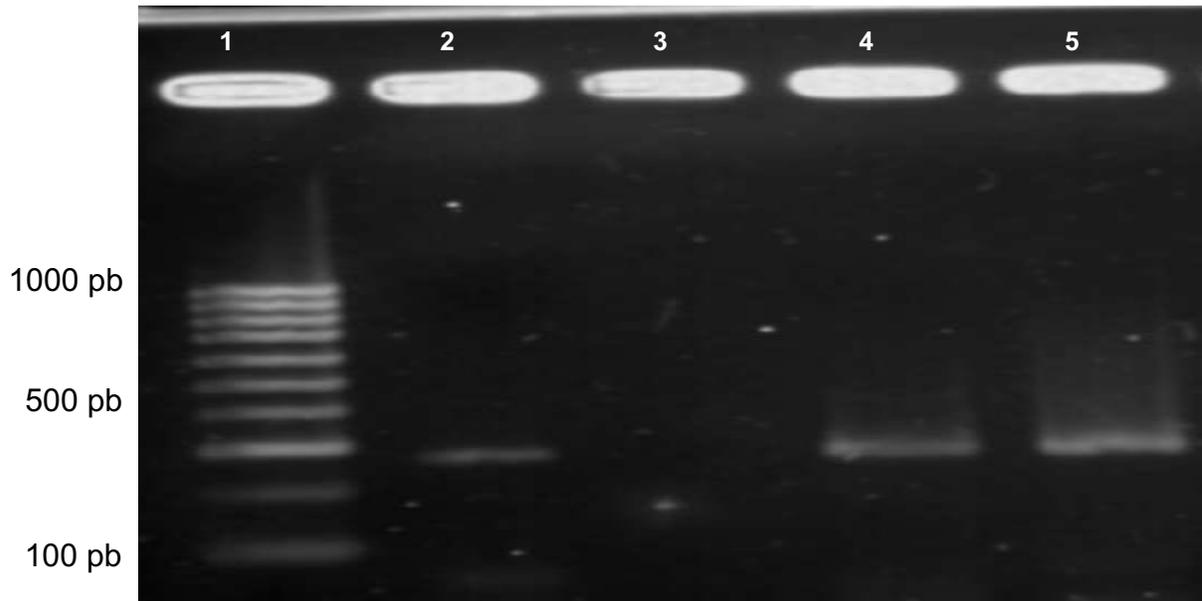


Figura 15. Banda diagnóstica del gen *qnrB* de aislamientos fágicos en gel de agarosa al 2%. Pozo 1, marcador de peso molecular (100-1000 pb); pozo 2, control positivo (Cepa *E. coli* reportada por Aguilar-Montes de Oca *et al.*, 2015); pozo 3, control negativo (cepa *Salmonella* Typhi); pozos 4 y 5, aislamientos fágicos positivos

Patron de resistencia (no. de aislamientos)	Atacomulco		San Felipe del Progreso		El Oro		Ixtlahuaca		Total	
	ADN bacter	ADN fágico	ADN bacter	ADN fágico	ADN bacter	ADN fágico	ADN bacter	ADN fágico	ADN bacter (%)	ADN fágico (%)
Resistente (18)	2	1	1	1	1	0	1	0	5 (27.7)	2 (11.1)
Resistencia intermedia (10)	4	1	0	0	0	0	0	0	4 (40)	1 (10)
Sensible (9)	2	0	0	0	0	1	0	0	2 (22.2)	1 (11.1)
Total (37)	8	2	1	1	1	1	1	0	11 (29.7)	4 (10.8)

Cuadro 14. Relación de patrón de resistencia al ácido nalidíxico (NA) entre los aislamientos bacterianos y fágicos que amplificaron el gen *qnrB*.

VIII. Discusión

El gran riesgo que tiene la salud pública debido a la gran resistencia que se ha encontrado a nivel mundial debido al uso indebido e inadecuado de los antibióticos se debe a la alta prevalencia de ARG's reportados en aislamientos bacterianos y en MGE's como lo son los bacteriófagos atemperados que han sido reportados en diversos hábitats, el problema se agrava cuando estos pueden encontrar un huésped y transmitir los ARG's (Reyes-Rodríguez *et al.*, 2013).

En este estudio se obtuvo 77% (37/48) de aislamientos de *Escherichia coli* confirmados por pruebas bioquímicas convencionales y por la amplificación del gen *uidA*, estos aislamientos fueron obtenidos a partir de agua residual y de alcantarilla procedentes de rastros municipales de la zona norte del Estado de México; en comparación con otros estudios podemos encontrar prevalencias muy variables; en España, Colomer-Lluch *et al.* (2014a) obtuvieron una prevalencia de 32.6% (15/46) de aislamientos de *E. coli* procedentes de agua residual de rastros y 67.3% (31/46) en plantas tratadoras de agua urbana, mientras que Mokracka *et al.*(2011), en Polonia, registraron 973 aislamientos de *E. coli* en plantas tratadoras de agua urbana; esta prevalencia de *E. coli* no solo se ha encontrado en estos lugares, sino de igual manera en canales de rastros de sacrificio animal ya que Aguilar-Montes de Oca *et al.*(2015) realizaron un estudio donde obtuvieron 95.4% (148/155) de aislamientos de *E. coli* en la canal de rastros municipales de los estados de Jalisco y México, de igual manera Reyes-Rodríguez *et al.*(2013) obtuvieron 50% (114/228) de aislamientos de *E. coli* en la canal de rastros municipales del Estado de México, mientras que Fuentes *et al.* (2013) reportaron una presencia de 90 aislamientos de *E. coli* en rastros de tipos TIF procedentes de canal.

Los ríos son otra fuente donde se ha reportado la presencia de *E. coli*, en el estado de Aguascalientes, Ramírez *et al.*(2013), reportaron una prevalencia de 60% (90/150) de aislamientos de *E. coli*; el problema aumenta cuando esta prevalencia se reporta en hospitales, como Ouedraogo *et al.*(2016), reportó la presencia de *E. coli* patógena altamente virulenta en 7.5% (121/1602) de las muestras recolectadas. Todos estos aislamientos de *E. coli* los reportan con al menos un gen de resistencia a los antibióticos.

En este estudio se encontró una resistencia de 48.6% al ácido nalidíxico (NA) y no fue registrado ningún aislamiento resistente a la cefotaxima (CFX). En el estudio realizado por Aguilar-Montes de Oca *et al.*(2015) reportaron una resistencia mayor al NA con 64%, esta misma resistencia la encontró Kilani *et al.* (2015) en unos aislamientos de *E.*

coli recolectados de heces de aves productoras en Túnez. En un estudio realizado por Ramírez *et al.*(2013) reportaron 1.33% de resistencia a la CFX en sus aislamientos de *E. coli* recolectados del río San Pedro, uno de los principales del estado de Aguascalientes, México, que es utilizado para el riego de sembradíos y para el abastecimiento de animales en producción (bovinos, caprinos, etc.); mientras que Mokracka *et al.* (2011) reportaron una resistencia mayor a la CFX con 12.8% en aislamientos de *E. coli* recolectados de plantas tratadoras de agua en Polonia. El estilo de vida de los seres humanos han provocado que la resistencia vaya en aumento, y aunque el uso indiscriminado e innecesario de los antimicrobianos actualmente se comienza a controlar, en diversos estudios han encontrado bacterias altamente virulentas con una gran resistencia a los antibióticos en diversos sitios de acciones antropogénicas (Colomer-Lluch *et al.*, 2011).

Para el caso de la resistencia al trimetoprim-sulfametoxazol (SXT) se identificó 51.7% de los aislamientos recolectados en este estudio y 48.6% de resistencia a la tetraciclina (TE). En un estudio realizado por Jang *et al.*(2012), encontraron una resistencia mayor a SXT con 60% en aislamientos de *E. coli* productoras de betalactamasas de amplio espectro recolectadas de un río en Korea del Sur; mientras, Mokracka *et al.*(2011) reportaron una resistencia de 73.4% a la TE en sus aislamientos recolectados en plantas tratadoras de agua. La resistencia a estos antibióticos se ha encontrado en gran medida en el hábitat acuático donde se tiene evidencia de actividades humanas como en plantas tratadoras de agua (Zhang *et al.*, 2009); la elevada resistencia encontrada en nuestro estudio sugiere a que son unos de los antibióticos que se desarrollan en gran escala y son usados comúnmente en la clínica humana y veterinaria para tratar infecciones de cuadros diarreicos y respiratorios.

La resistencia encontrada en el presente estudio a la ampicilina (AM) fue de 48.6% y al cloranfenicol (CL) fue de 62%; una resistencia similar al CL fue encontrada por Fuentes *et al.*(2013) en rastros tipo TIF reportando 61.1% en aislamientos de *E. coli*, mientras que Aguilar-Montes de Oca *et al.*(2015) reportaron una resistencia menor a la AM con 32% en aislamientos de *E. coli* encontrados en rastros de los estados de Jalisco y México. Esta resistencia similar encontrada en rastros es ocasionada probablemente por el abuso que se tienen en la utilización de estos antimicrobianos en el empleo como promotores de crecimiento y profilaxis.

La prevalencia encontrada del gen *bla_{TEM}* en este estudio en aislamientos de *E. coli* fue de 37.8%, mientras que prevalencias similares a este gen son reportadas a nivel

mundial, Ouedraogo *et al.*(2016), reportaron una prevalencia de 36.3% del gen *bla_{TEM}* en aislamientos de *E. coli* recolectados de un hospital en el continente Africano, mientras que Jang *et al.*(2012), encontraron 32.6% de prevalencia de este mismo gen en el continente Asiático en unos aislamientos provenientes de plantas tratadoras de agua, Aguilar-Montes de Oca *et al.*(2015) reportaron una prevalencia mayor con 48% en aislamientos de *E. coli* encontrados en rastros en el continente Americano. Esta resistencia es la más reportada mundialmente entre bacterias Gram negativas y esto se debe presumiblemente a que se ha encontrado en heces de aves acuáticas con actividad de migración. Autores recientes sugieren que la gran resistencia reportada surge a partir de la cantidad de enzimas β -lactamásas sintetizadas por bacterias, ya que hasta el momento se tiene un registro de más de 400 enzimas (Zhan *et al.*, 2009)

La prevalencia reportada del gen *qnrA* en el presente estudio fue de 8.1% y para el gen *qnrB* fue de 29.7% en aislamientos de *E. coli* provenientes de rastros en la zona norte del Estado de México, diversas prevalencias a estos genes han sido reportadas en México; Ramirez *et al.*, 2013, reportaron una prevalencia menor del gen *qnrB* con 17.6% de aislamientos de *E. coli* recolectados en un río de Aguascalientes, México, mientras en el estudio realizado por Aguilar-Montes de Oca *et al.*, 2015 no reportaron la prevalencia del gen *qnrA*. Aunque la prevalencia no es alta, actualmente la resistencia a las quinolonas ha ido en aumento, esto se debe al uso indiscriminado tanto en la clínica veterinaria como en la humana, desde el primer gen encontrado en 1998, *qnrA*, han sido descritos diversos genes con la misma actividad de conferir resistencia a las bacterias contra los antibióticos quinolonas, diversos estudios sugieren que esta resistencia se originó en ambientes acuáticos ya que es su principal reservorio (Colomer-Lluch *et al.*, 2014b).

La resistencia a los antibióticos ha provocado grandes pérdidas millonarias y vidas humanas, en un reporte del CDC (2013) menciona que en Europa causa 25, 000 muertes al año generando una pérdida económica de 1.5 billones de euros anuales, además en Estados Unidos de América genera 2 millones de personas infectadas causando 23 mil muertes al año; en países de continuo desarrollo como los de América Latina se estiman 35 millones de dólares adicionales a los gastos de salud. Esta resistencia además de ser un fenómeno natural, recientemente se ha reportado que los elementos genéticos móviles (MGE's por sus siglas en inglés), como los bacteriófagos atemperados, actúan como uno de los responsables de transferir genes de resistencia a los antibióticos (ARG's por sus siglas en inglés) tanto a bacterias patógenas como a

comensales. Colomer-Lluch *et al.*(2011) reportaron que aislamientos de *E. coli* adoptaron el gen *bla*_{TEM} al ser expuestos a fagos atemperados que amplificaban este mismo gen.

Estos juegan un rol muy importante en el problema de salud pública ya que por su estructura morfológica son muy difíciles de eliminar como lo demuestra Calero-Cáceres & Muniesa (2016), en su estudio realizado en Barcelona compararon diferentes tratamientos de desinfección en diversas plantas tratadoras de agua midiendo la prevalencia de ARG's en ADN fágico. Los tratamientos que ellos utilizaron fueron térmicos, el pH, la radiación por UV y la cloración en el cual comprobaron que todos los tratamientos que se utilizaron para la desinfección no dañan la cápside de los fagos atemperados, el riesgo es mayor cuando se incrementa la posibilidad de que uno de estos fagos sobrevivientes a los tratamientos encuentre un hospedero y pueda transmitir ARG's.

Hoy en día los bacteriófagos atemperados con sus altas densidades de ARG's en su ADN han adquirido una atención especial, ya que se han reportado en diversos lugares antropogénicos como los son en plantas tratadoras de agua, en ríos de ciudades de gran importancia y en rastros municipales (Colomer-Lluch *et al.*, 2001, 2014a, 2014b). A partir de los aislamientos bacterianos recolectados en este estudio, se registró la presencia de fagos atemperados en 27% (10/37), estos con al menos un gen de resistencia. De igual manera, Quirós *et al.* (2014), han detectado la presencia de fagos atemperados en un hospital de España, donde 77.5% (62/80) de sus muestras totales amplificó al menos un gen de resistencia a los antibióticos.

En este estudio se reportó una prevalencia de 13.5% del gen *bla*_{TEM} en el ADN de fagos atemperados provenientes de aislamientos de *E. coli*, mientras que en un estudio realizado en Túnez por Colomer-Lluch *et al.*(2014a) reportaron una prevalencia de 86.6% del gen *bla*_{TEM} en fagos atemperados provenientes de 15 muestras ambientales recolectadas de agua residual en granjas de producción animal, y 100% de prevalencia de este mismo gen en ADN fágico proveniente de 33 muestras recolectadas de plantas tratadoras de agua residual con destino urbano, esta misma prevalencia fue reportada por Colomer-Lluch *et al.*(2011). en plantas tratadoras de agua, esto en España. Estos resultados muestran la prevalencia del gen *bla*_{TEM} en plantas tratadoras de agua no ha disminuido; además, Quirós *et al.* (2014) recolectaron 80 muestras de heces humanas procedentes de 46 mujeres y 34 hombres de un rango de edad desde los 6 meses

hasta los 102 años del hospital Saint Pau en Barcelona, el muestreo tuvo una duración de 6 meses, la prevalencia que reportan para el gen *bla_{TEM}* fue de 63.8%. Las altas prevalencias encontradas por Colomer-Lluch *et al.* (2011, 2014a) se debe presumiblemente a que los fagos atemperados recolectados fueron provenientes de muestras ambientales, mientras que nuestro estudio, los fagos atemperados que fueron recolectados provienen a partir de aislamientos bacterianos.

En el presente estudio se encontró una prevalencia de 2.7% del gen *qnrA* y se encontró 10.8% del gen *qnrB* en el ADN fágico, mientras que Colomer-Lluch *et al.*(2014b), en España, reportaron una prevalencia de 71.4% del gen *qnrA* en agua residual procedente de granjas en producción animal, y 100% en plantas tratadoras de agua; además Colomer-Lluch *et al.*(2014a), en Túnez, reportaron una prevalencia de 15.1% de este mismo gen en una planta tratadora de agua; Quirós *et al.*(2014) reportaron una prevalencia de 42.5% del gen *qnrA* en el hospital Saint Pau en Barcelona. Con la prevalencia reportada en este estudio y en anteriores confirman la presencia de ARG's en el genoma viral. En estudios anteriores, la presencia del gen *qnrB* no ha sido reportada en aislamientos fágicos. Los fagos atemperados son uno de los responsables de transmitir tanto ARG's como factores de virulencia, Iversen *et al.*(2015) reportaron que 39.4% de colonias de *E. coli* comensales fueron susceptibles al fago atemperado que amplificaba el factor de virulencia *sxt2*.

Aunque la resistencia a los antibióticos es un fenómeno natural, se considera que está íntimamente relacionada al uso indiscriminado e innecesario de los antibióticos utilizados en la clínica veterinaria. Debido a este uso, uno de los hábitats más propenso a adquirir una gran variedad de ARG es el acuático; plantas tratadoras de agua, agua para el uso de agricultura, rastros y otros ambientes acuáticos son donde han reportado la prevalencia de ARG's tanto en el ADN fágico como bacteriano. Los fagos, al pertenecer al grupo de MGE's, juegan un rol muy importante en la transferencia de ARG's no solo entre bacterias patógenas haciéndolas más virulentas sino de bacterias patógenas a bacterias comensales presentes en adultos y niños.

IX. Conclusiones

1. Se obtuvieron 37 aislamientos de *E. coli* procedentes de 4 rastros municipales de la zona centro-norte del Estado de México.
2. Todos los aislamientos bacterianos amplificaron el gen *uidA*; mientras que ningún aislamiento fágico lo amplificó.
3. Se encontró un mayor número de aislamientos bacterianos resistentes procedentes de agua residual (51.3%), seguido de la alcantarilla (48.6%), mientras que no se obtuvo ningún aislamiento procedente de agua potable.
4. Se obtuvo una mayor resistencia a la tetraciclina (TE) registrando 32/37 (86.4%) aislamientos.
5. 18/37 (48.6%) de los aislamientos fueron resistentes a la ampicilina (AM) y este mismo número de aislamientos resistentes fueron resistentes al ácido nalidíxico (NA).
6. No se obtuvo ningún aislamiento resistente a la cefotaxima (CFX).
7. 14/37 (37.8%) de los aislamientos bacterianos amplificaron el gen *bla_{TEM}*, donde 10 fueron resistentes a la ampicilina (AM), 1 tuvo resistencia intermedia y 3 fueron sensibles, esto indica que no fue necesario presentar una resistencia a la ampicilina para que amplifique el gen *bla_{TEM}*.
8. Se obtuvo 5/14 (35.7%) aislamientos fágicos que amplificaron el gen *bla_{TEM}* procedentes de los aislamientos bacterianos resistentes a la ampicilina (AM).
9. 3/37 (8.1%) de los aislamientos bacterianos amplificaron el gen *qnrA*, de los cuales 2 presentaron resistencia al ácido nalidíxico (NA) y 1 presentó resistencia intermedia, esto indica que fue necesario que presentara al menos resistencia intermedia para que se amplifique el gen.
10. 1/3 (33.3%) de aislamiento fágico amplificó el gen *qnrA* procedente del aislamiento bacteriano resistente al ácido nalidíxico (NA).
11. Se obtuvieron 11/37 (29.7%) aislamientos bacterianos que amplificaron en gen *qnrB*, donde 5 fueron resistentes, 4 presentaron resistencia intermedia y 2 fueron sensibles al ácido nalidíxico, esto indica que no fue necesario presentar una resistencia al antibiótico para que se amplificara el gen.
12. 4/11 (36.3%) aislamientos fágicos amplificaron en gen *qnrB*, todos procedentes de aislamientos bacterianos resistentes al ácido nalidíxico.

X. Sugerencias

1. Utilizar los fagos atemperados que se lograron aislar en este trabajo y por medio de ensayos experimentales demostrar su capacidad de transmitir los ARG`s a bacterias patógenas aumentando su virulencia o a bacterias comensales.
2. Realizar mas estudios epidemiológicos moleculares en fagos atemperados provenientes de bacterias que contengan *stx1* y *stx2* ya que estudios recientes han demostrado que los fagos son los responsables de transmitir estos factores de virulencia encontrandolos en muestras de heces humanas.
3. Aislar fagos atemperados provenientes de muestras ambientales para la identificación de ARG`s y comparar los resultados con los obtenidos en este trabajo.
4. Realizar estudios en instalaciones en donde se mantenga agua almacenada para algun tipo de uso, ya sea agrícola o antropogénica, en dos tiempos; uno antes de someterla a un tipo de tratamiento de desinfeccion y el otro despues de dicho tratamiento, esto para saber la variacion que se tiene en prevalencia de ARG`s en los fagos

XI. Literatura citada

1. Abedon TS, Kuht SJ, Blasdel BG, Kutter EM. (2011). Phage treatment of humans infections. *Bacteriophage*, 1(2), 66-85.
2. Ackermann HW. (2001). Frequency of morphological phage descriptions in the year 2000. *Arch Virol*, 146(5), 843-857.
3. Ackermann HW. (2005). Bacteriophage Classification. En K. E. A, *Bacteriophages: Biology and Applications*. Florida, EE.UU: CRC Press.
4. Ackermann HW. (2007). 5500 phages examined in the electron microscope. *Arch Virol*, 152(2), 227-243.
5. Ackerman HW, Martin M, Vieu IF, Nicolle P. (1982). Félix d'Herelle: His Life and Work and the Foundation of a Bacteriophage Reference Center . *ASM News*, 44(8), 346-348.
6. 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.
7. Ahmed AM, Ishida Y, Shimamoto T. (2009). Molecular Characterization of antimicrobial resistance in Salmonella isolated from animals in Japan. *J Appl Microbiol*, 106(2), 402-409.
8. Angeles RG. (2002). Principales Características y Diagnóstico de los Grupos Patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Pública Mex*, 44(5), 464-475.
9. Atterbury RJ. (2009). Bacteriophage biocontrol in animals and meat products. *Microb Biotechnol*, 2(6), 601-612.
10. Balcazar JL. (2014). Bacteriophages as Vehicles for Antibiotic Resistance Genes in the Environment. *PLoS Pathog*, 10(7), 1-4.
11. Bertin A, De Frutos M, Letellier L. (2011). Bacteriophages-host interactions leading to genome internalization. *Curr Opin Microbiol*, 14(4), 492-496.
12. Blahová J, Hupková M, Babálová M, Krcmery V, Schäfer V. (1993). Transduction of resistance to imipenem, aztreonam and ceftazidime in nosocomial strain of *Pseudomonas aeruginosa* by wild-type phage. *Acta Virol*, 37(6), 429-436.
13. Brabban AD, Hite E, Callaway TR. (2005). Evolution of foodborne pathogens via temperate bacteriophage-mediated gene transfer. *Foodborne Pathog Dis*, 2(4), 287-303.

14. Bravo TA. (2006). Manual de Procedimientos para el muestreo microbiológico oficial en carnes faenadas en mataderos de exportación. Programa de Reducción de Patógenos PRP/MP2. Gobierno de Chile
15. Calero-Cáceres W y Muniesa M. (2016). Persistence of naturally occurring antibiotic resistance genes in the bacteria and bacteriophage fractions of wastewater. *Water Res*, 15;95, 11-18
16. CDC (Center for Disease Control and Prevention) (2013). Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2013.
17. Chaturongakul S, Ounjai P. (2014). Phage-host interplay: examples from tailed phages and Gram-negative bacterial pathogens. *Front Microbiol*, 5:442, 1-8.
18. CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute) (2012). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, 19th edition, Approved Standard M02-A11. Wayne, PA: CLSI.
19. CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute) (2015). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*, 25th informational supplement. M100-S25. Wayne, PA: CLSI.
20. Colomer-Lluch M, Calero-Cáceres W, Jebri S, Hmaied F, Muniesa M, Jofre J. (2014 a). Antibiotic resistance genes in bacterial and bacteriophage fractions of Tunisian and Spanish wastewater as markers to compare the antibiotic resistance patterns in each population. *Environ Int*, 73: 167-175.
21. Colomer-Lluch M, Jofre J, Muniesa M. (2011). Antibiotic Resistance Genes in the Bacteriophage DNA Fraction of Environmental Samples. *PLoS One*, 6(3), 1-11.
22. 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. *J Antimicrob Chemother*, 69(5), 1265-1274.
23. 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 β -lactamases in *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother*, 65 (3), 490-495
24. 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.
25. Elbreki H, Ross PR, Hill C, O'Mahony J, McAuliffe O, Coffey A (2014). Bacteriophages and Their Derivates as Biotherapeutic Agents in Disease Prevention and Treatment. *Journal of Viruses*, 1-20

26. Fernández JR, Puchades Y, Vispo NS. (2004). Los bacteriófagos en la biología molecular pasada y actual. En S. VN, *Combinatoria Molecular* (ELFOS SCINTIAE ed., págs. 41-52). La Habana, Cuba.
27. Fuentes AR, Talavera RM, Vázquez NJ, Soriano VE, Gutierrez CA. (2013). Presence of class I integrons in *Escherichia coli* isolated from meat products in Federal Inspection Type (TIF) plants in the Estado de Mexico. *Veterinaria México*, 44(1), 23-30.
28. Gaviria AG, González SM, Castaño OJ. (2012). Técnica para aislamiento de bacteriófagos específicos para E.coli DH5a a partir de aguas residuales. *Rev. MVZ Córdoba*, 17(1), 2852-2860.
29. Gil F, Catalão MS, Moniz-Pereira J, Leandro P, McNeil M, Pimentel M,. (2008). The lytic cassette of mycobacteriophage Ms6 encodes an enzyme with lipolytic activity. *Microbiology*, 154, 1364-1371.
30. Guttman B, Raya R, Kutter E. (2005). Basic Phage Biology. En S. A. Kutter E, *Bacteriophages: Biology and Applications*. Florida, EE. UU.: CRC Press.
31. Hamelin K, Bruant G, El-Shaarawi A, Hill S, Edge TA, Fairbrother J, Harel J, Maynard C, Masson L, Brosseau R. (2007). Occurrence of Virulence and Antimicrobial Resistance Genes in *Escherichia coli* Isolates from Different Aquatic Ecosystems and Detroit River Areas within the St. Clair River. *Appl Environ Microbiol*, 73(2), 477-484.
32. 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. *J Water Health*, 4(4), 487-498.
33. Hernandez MA (2007). *Aislamiento, caracterización y detección precoz de bacteriófagos de Streptococcus thermophilus en la industria láctea* (Tesis Doctoral). Universidad de Oviedo.
34. Hooton SP, Atterbury RJ, Connerton IF. (2011). Application of bacteriophage cocktail to reduce *Salmonella Typhimurium* U288 contamination on pig skin. *Int J Food Microbiol*, 151(2), 157-163.
35. Huff WE, Huff GR, Rath NC, Balog JM, Donoghue AM. (2005). Alternatives to antibiotics: utilization of bacteriophage to treat colibacillosis and prevent food born pathogens. *Poult Sci*, 84(4), 655-659.
36. Ibrahim AJI, Al-Shwaikh MR, Ismaeil IM. (2014). Virulence and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolated from Tigris River and children diarrhea. *Infect Drug Resist*, (7), 317-322.
37. ICTV (2014). Virus Taxonomy. Tomado de ictvonline.org

38. Iversen H, L'Abée-Lund TM, Aspholm M, Arnesen LPS, Lindback T. (2015). Commensal *E. coli* Stx2 lysogens produce high levels of phages after spontaneous prophage induction. *Front Cell Infect Microbiol*, (5), 1-8.
39. Jang J, Suh YS, Di DY, Unno T, Sadowsky MJ, Hur HG (2013). Pathogenic *Escherichia coli* Strains Producing Extended-Spectrum β -Lactamases in the Yeongsan River Basin of South Korea. *Environ Sci Technol*, 47(2), 1128-1136
40. Jaramillo ACJ, Martínez MJJ. (2010). *Epidemiología Veterinaria*. México: El Manual Moderno.
41. Jassim SA, Limoges RG. (2014). Natural solution to antibiotic resistance: bacteriophages "The Living Drugs". *World J Microbiol Biotechnol*, 30(8), 2153-2170.
42. Juan P. D. J. (2009). Preparation of Bacteriophage Lysate and Pure DNA. En *Bacteriophages: Methods and Protocols*. Reino Unido: Humana Press.
43. Keen EC. (2015). A century of phage research: Bacteriophages and the shaping of modern biology. *Bioessays*, 37(1), 6-9.
44. Kilani H, Salah AM, Ferjani S, Mansouri R, Sghaier S, Ben SR, Jaouani J, Douja G, Brahim S, Hammami S, Ben CN, Boutiba-Ben Bl. (2015). Occurrence of blaCTX-M-1, qnrB1 and virulence genes in avian ESBL-producing *Escherichia coli* isolates from Tunisia. *Front Cell Infect Microbiol*, 5(38), 1-8.
45. Kraychete, G.B. Botelho, L.A., Campana, E.H., Picão, R.C. & Bonelli R.R. 2016 Updated multiplex PCR for detection of all six plasmid-mediated *qnr* gene families. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **60** (12), 7524-7526.
46. Kropinski AM, Sulakvelidze A, Konczyk, 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.
47. Kutatelidze M, Adamia R. (2010). Bacteriophages as potential new therapeutics to replace or supplement antibiotics. *Trends Biotechnol*, 28(12), 591-595.
48. Hede K (2014). An Infectious Arms Race. *Nature*, 1;509.
49. Madigan TM, Martinko MJ, Parker J. (2004). *Brock. Biología de los microorganismos* (10ª edición ed.). Madrid, España: Pearson Educación.
50. Marti E, Variatza E, Balcazar JL. (2014). The role of aquatic ecosystems as reservoirs of antibiotic resistance. *Trends Microbiol*, 22(1), 36-41.
51. Merrill CR, Scholl D, Adhya SL. (2003). The prospect for bacteriophage therapy in Western medicine . *Nat Rev Drug Discov*, 2(6), 489-497.
52. Mokracka J, Koczura R, Jabłońska L, Kaznowski A. (2011). Phylogenetic groups, virulence genes and quinolone resistance of integron-bearing *Escherichia coli* strains isolated from a wastewater treatment plant. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 99(4), 817-824

53. Morse SA y 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.

54. Norma Oficial Mexicana NOM-230-SSA1-2002. Salud Ambiental. Agua para uso y consumo humano, requisitos sanitarios que se deben cumplir en los sistemas de abastecimiento públicos y privados durante el manejo del agua. Procedimientos sanitarios para el muestreo.

55. Ouedraogo SA, Sanou M, Kissou A, Sanou S, Solaré H, Kaboré F, Poda A, Aberkane S, Bouzinbi N, Sano I, Nacro B, Sangaré L, Carrière C, Decré D, Ouégraogo R, Jean-Pierre H, Godreuil S. (2016). High prevalence of extended-spectrum β -lactamase producing *enterobacteriaceae* among clinical isolates in Burkina Faso. *BMC Infect Dis*, 16:326, 1-9

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

57. Qadir MI. (2015). Review: phage therapy: a modern tool to control bacterial infections. *Pak J Pharm Sci*, 28(1), 265-270.

58. 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. *Antimicrob Agents Chemother*, 58(1), 606-609

59. Ramirez CFY, Avelar GFJ, Garneau P, Márquez DF, Guerrero BAL, Harel J. (2013). Presence of multi-drug resistant pathogenic *Escherichia coli* in the San Pedro River located in the State of Aguascalientes, Mexico. *Front Microbiol*, 4:147, 1-16.

60. Raya, R.R., Hébert, EM. 2009 Isolation of Phage via Induction of Lysogens. En: *Bacteriophages. Methods and Protocols, Volume 1: Isolation, Characterization, and Interactions*, Humana Press, Volume 501 of the series Methods in Molecular Biology, Reino Unido, pp 23-32.

61. Refardt D. (2011). Within-host competition determines reproductive success of temperate bacteriophages. *ISME J*, 5(9), 1451-1460.

62. Reyes-Rodríguez NE, Talavera-Rojas M, Varela-Guerrero JA, Gutiérrez-Castillo AC, Alonso-Fresán U. (2013). Prevalencia y resistencia a antibióticos de *Escherichia coli* O157:H7 aisladas de canales de bovinos sacrificados en rastros del altiplano central Mexicano. *Rev Mex Cienc Pecu*, 4(2), 235-242.

63. 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), 1-11.

64. Skurnik M, Strauch E. (2006). Phage therapy: Facts and fiction. *International Journal of Medical Microbiology*(296), 5-14.
65. 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.
66. Spricigo DA, Bardina C, Cortés P, Llagostera M. (2013). Use of a bacteriophage cocktail to control Salmonella in food and the food industry. *Int J Food Microbiol*, 165(2), 169-174.
67. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 21^a Ed. 2005. 9222B Standard Total Coliform Membrane Filter Procedure
68. Sulakuelidze A. (2011). The challenge of Bacteriophage Therapy. *europaean INDUSTRIAL PHARMACY* (10), 14-18.
69. Van TR y Kropinski AM. (2009). Bacteriophage Enrichment from Water and Soil. En A. M. Martha R.J. Clokie, *Bacteriophages Methods and Protocols* (Vol. 1, pág. 307). Reino Unido: Humana Press.
70. Varela GJA, Talavera RM, Gutierrez CAC, Reyes RN, Vázquez GJ. (2013). Phenotypic-genotypic resistance in Salmonella spp. isolated from cattle carcasses from the north central zone of the State of Mexico. *Trop Anim Health Prod*, 45(4), 995-100.
71. Vidal JE, Canizález-Roman A, Gutiérrez-Jiménez J, Navarro-García F. (2007). Patogénesis molecular, epidemiología y diagnóstico de Escherichia coli enteropatógena. *Salúd Pública Mex*, 49(5), 376-386.
72. Weinbauer MG. (2004). Ecology of prokariotic viruses. *FEMS Microbiol Rev*, 28(2), 127-181.
73. Wittebole X, De Roock S, Mopal S. (2014). A historical overview of bacteriophage therapy as an alternative to antibiotics for the treatment of bacterial pathogens. *Virulence*, 5(1), 226-235.
74. WHO. (1996). *The world health report*. Geneva, Switzerland. Recuperado de who.int
75. Zhang XX, Zhang T, Fang HH. (2009). Antibiotic resistance genes in water environment. *Appl Microbiol Biotechnol*, 82(3), 397-414
76. Zinno P, Devirgiliis C, Ercolini D, Ongeng D, Mauriello G. (2014). Bacteriophage P22 to challenge Salmonella in foods. *Int J Food Microbiol*, 17;191, 69-74.