

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

ESCUELA DE BIOANÁLISIS

**DISERTACIÓN PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
MICROBIÓLOGO**

Caracterización fenotípica y genotípica del bacteriófago 5Q18 activo contra

***Escherichia coli* enteropatógena multirresistente.**

PABLO ROBERTO EGAS VIVERO

DIRECTORA: MSc. Rosa de los Ángeles Bayas-Rea.

CO-DIRECTOR: PhD. Esteban Fernández Moreira.

QUITO, 2016

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, PABLO ROBERTO EGAS VIVERO, C.I. 1004019095, autor del trabajo de graduación intitulado: “CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y GENOTÍPICA DEL BACTERIÓFAGO 5Q18 ACTIVO CONTRA *Escherichia coli* ENTEROPATÓGENA MULTIRRESISTENTE”, previa a la obtención del grado académico de MICROBIÓLOGO en la Escuela de Bioanálisis:

1. Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos del autor.
2. Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través del sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de la Universidad.

Quito, 12 de julio del 2016



Sr. Pablo Roberto Egas Vivero

C.I. 1004019095

CERTIFICACIÓN

Certifico que la Disertación de Microbiología del Sr. Pablo Roberto Egas Vivero sobre el tema “Caracterización fenotípica y genotípica del bacteriófago 5Q18 activo contra *Escherichia coli* enteropatógena multirresistente” ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas, por lo tanto puede ser presentada para la calificación correspondiente.



Rosa de los Ángeles Bayas-Rea, MSc.

Directora de la Disertación

Quito, 12 de julio del 2016

DEDICATORIA

A mi familia, especialmente, a mis padres, Pablo y Elisa.

A mis hermanas, Paola y Marcela.

Al amor de mi vida y a mis amigos cercanos.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia por apoyarme en todas las etapas de mi vida, principalmente, a mis padres porque ellos han sido un ejemplo de constancia y de lucha diaria, lo que ha permitido que alcance mis metas propuestas hasta el día de hoy.

A la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, con especial gratitud para la Máster Sandra Andrade Heredia, quien confió en mis capacidades y me dio la referencia para trabajar en el proyecto de investigación “Bacteriófagos como alternativa antibiótica”.

Al equipo que formó parte del mencionado proyecto de investigación; en especial, al Doctor Esteban Fernández Moreira, quien fue el director del proyecto y mentor de la presente disertación. Muchas gracias por impartir su valioso conocimiento, el cual me permitió adentrar en el mundo de la investigación microbiológica. Agradezco la vital ayuda que brindó Jordy Larco Lasso, tesista del proyecto, quien fue parte principal para la realización de los ensayos.

Al Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI), especialmente al Laboratorio de Referencia Nacional de Resistencia a los Antimicrobianos, por abrir sus puertas y brindarnos información acerca de las cepas de ECEP. Gracias al Doctor Gabriel Trueba de la Universidad San Francisco de Quito (USFQ), quién proporcionó los aislados bacterianos.

A mi directora de disertación, MSc. Rosita Bayas-Rea, quien me brindó un apoyo invaluable durante el desarrollo de la parte teórica del presente documento. Gracias también a los lectores de la disertación, Mtr. Eduardo Villacis y MSc. Pablo Palacios.

Finalmente, al Ing. Julio Sánchez por sus consejos y apoyo, en particular, con el desarrollo de los análisis estadísticos.

TABLA DE CONTENIDOS

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN.....	II
CERTIFICACIÓN.....	III
DEDICATORIA.....	IV
AGRADECIMIENTOS.....	V
TABLA DE CONTENIDOS.....	VII
LISTA DE FIGURAS.....	X
LISTA DE TABLAS.....	XI
LISTA DE ANEXOS.....	XII
RESUMEN.....	XIII
ABSTRACT.....	XV
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Justificación.....	3
1.2. Objetivos.....	5
1.2.1 Objetivo general.....	5
1.2.2 Objetivos específicos.....	5
2. MARCO TEÓRICO	6
2.1. Antecedentes.....	6
2.2. Diarrea infecciosa aguda.....	7
2.3. <i>Escherichia coli</i>	9
2.3.1. Patotipos.....	10
2.3.1.1. <i>Escherichia coli</i> Enteropatógena.....	11
2.4. Antibióticos.....	13

2.4.1. Resistencia antimicrobiana.....	14
2.4.1.1. Resistencia bacteriana natural.....	15
2.4.1.2. Resistencia bacteriana adquirida	16
2.4.2. Mecanismo de resistencia antimicrobiana.....	17
2.4.2.1. Bomba de eflujo.....	17
2.4.2.2. Cambio de permeabilidad.....	18
2.4.2.3. Modificación enzimática de los antibióticos.....	19
2.4.2.4. Mutaciones.....	20
2.4.2.5. Transferencia horizontal de genes.....	20
2.4.3. Resistencia antimicrobiana en <i>Escherichia coli</i>	21
2.4.3.1. Resistencia antimicrobiana en <i>Escherichia coli</i> enteropatógena.....	24
2.5. Bacteriófagos.....	25
2.5.1. Taxonomía de bacteriófagos.....	26
2.5.1.1. Familia <i>Myoviridae</i>	27
2.5.2. Mecanismo de acción de los bacteriófagos.....	28
2.5.3. Caracterización de los bacteriófagos.....	29
2.5.4. Fagoterapia.....	30
3. MATERIALES Y MÉTODOS	33
3.1. Tipo de estudio.....	33
3.2. Procedencia de las muestras	33
3.2.1. Muestras de aguas residuales.....	33
3.2.2. Aislados de <i>Escherichia coli</i> enteropatógena.....	34
3.3. Aislamiento y perfil de resistencia de <i>Escherichia coli</i> enteropatógena.....	34

3.4. Actividad lítica del bacteriófago.....	35
3.5. Titulación del bacteriófago.....	36
3.6. Purificación de ADN del bacteriófago.....	37
3.7. Caracterización fenotípica.....	38
3.8. Caracterización genética.....	39
3.9. Ensayo de actividad.....	39
4. RESULTADOS.....	41
4.1. Aislamiento y tipificación de <i>Escherichia coli</i> enteropatógena.....	41
4.2. Actividad lítica del bacteriófago 5Q18.....	41
4.2.1. Perfil de actividad lítica del bacteriófago 5Q18.....	42
4.3. Titulación de bacteriófagos.....	42
4.4. Purificación de bacteriófagos.....	43
4.5. Caracterización de bacteriófagos.....	44
4.6. Ensayo de actividad <i>in vitro</i> del fago frente a <i>Escherichia coli</i> enteropatógena.....	45
5. DISCUSIÓN.....	47
5.1. Aislamiento y caracterización del bacteriófago 5Q18.....	47
5.2. Protocolo de caracterización del bacteriófago.....	52
6. CONCLUSIONES.....	58
7. RECOMENDACIONES.....	59
8. REFERENCIAS.....	60
9. ANEXOS.....	84

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Cinética de lisis del bacteriófago 5Q18 aislado del río Machángara.....	42
Figura 2. Formación de placas del bacteriófago 5Q18 mediante ensayo de doble agar.....	43
Figura 3. Morfología del bacteriófago 5Q18 aislado del río Machángara.....	44
Figura 4. Resultado de la digestión enzimática del bacteriófago 5Q18 en gel de agarosa al 0,7%.....	45
Figura 5. Crecimiento de UFC/cm ² de cada tratamiento realizado en el ensayo de actividad <i>in vitro</i>	46

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Patrón de resistencia antibiótica de los aislados clínicos de <i>Escherichia coli</i> enteropatógena.....	41
Tabla 2. Análisis de varianza de un factor del ensayo de actividad lítica <i>in vitro</i>	46
Tabla 3. Prueba <i>pos hoc</i> de <i>Tukey</i> del ensayo de actividad lítica <i>in vitro</i>	47

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Protocolo de purificación del kit <i>Wizard SV and PCR-Up System</i>	84
Anexo 2. Protocolo de preparación de las muestras para su medición en el fluorómetro <i>Qubit</i>	85
Anexo 3. Datos obtenidos mediante espectrofotometría para la realización de la curva de cinética de lisis del fago 5Q18.....	87

RESUMEN

Escherichia coli enteropatógena (ECEP) es un patotipo de *E. coli* relacionado con diarreas infecciosas que afectan especialmente a niños. En el Ecuador, las diarreas de tipo infecciosa representan la sexta causa de muerte. El abuso de antibióticos para tratar diferentes tipos de infecciones ha generado multirresistencia por parte de las bacterias, lo cual se ha vuelto un serio problema de salud pública. Esta situación ha causado una escasez de antibióticos eficaces, por lo que, la fagoterapia resulta ser una alternativa para el tratamiento de bacterias multirresistentes en los países occidentales. El presente estudio tuvo como objetivo la caracterización fenotípica y genotípica del bacteriófago 5Q18 con actividad lítica contra ECEP multirresistente. Para lo cual se colectó muestras de agua del río Machángara con el fin de aislar un fago con actividad lítica. Una vez que se aisló el fago se lo tituló mediante el ensayo de doble agar con la cepa ECEP 14 multirresistente. La actividad lítica contra ECEP 14 se evaluó mediante la cinética de lisis del fago. Por otro lado, la caracterización morfológica del fago 5Q18 se realizó mediante microscopía de transmisión electrónica; mientras que, para la caracterización molecular se purificó el ADN del fago en base a dos metodologías: i) un protocolo modificado y ii) el kit *Wizard® Genomic DNA Purification kit* de Promega. Después, el ADN fue cortado con la enzima de restricción *XbaI* para determinar el tipo de material genético. Finalmente se realizó un ensayo de actividad *in vitro* con dos tratamientos y tres repeticiones para comprobar la actividad lítica del fago contra ECEP 14. Como resultados de la microscopía de transmisión electrónica se determinó que el bacteriófago 5Q18 pertenece a la familia *Myoviridae* del orden *Caudovirales* con un genoma de >20 Kb. Además se encontró que el fago tiene un amplio espectro de actividad lítica frente a miembros de la especie *E. coli* tanto comensal como a dos patotipos, ECEP y ECEH; en particular, contra la cepa ECEP

14 multirresistente. La actividad bactericida del fago 5Q18 sobre ECEP 14 fue más alta que el ácido láctico que se usa como preservante en la industria alimenticia. En conclusión, en base a los equipos y materiales disponibles en el país se pudo caracterizar al fago 5Q18. Además, debido a las características que presenta este fago se lo puede considerar como un agente biocontrolador de *E. coli* enteropatógena multirresistente, por lo que, el fago podría ser aplicado en la industria alimenticia.

Palabras clave: Bacteriófago 5Q18, biocontrol, *Caudovirales*, ECEP multirresistente, industria alimenticia, *Myoviridae*.

ABSTRACT

Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) is a pathotype of *E. coli* related to infectious diarrhea in children. In Ecuador, this kind of diarrhea represents the sixth cause of death. The antibiotic overuse to treat diverse kind of infections has developed antibiotic-multiresistant bacteria, becoming a major public health problem. This particular situation has decreased the effectiveness of antibiotics; thus, the phage therapy become an alternative to threat multiresistant bacteria, especially, in west countries. The aim of the present study was the phenotypic and genetic characterization the 5Q18 phage active against multidrug-resistant EPEC. The phage with lytic activity was isolated from Machángara river's sewage. Then, the phage was tittered by the double agar assay using multiresistant EPEC 14 strain. The lytic activity of 5Q18 phage against EPEC 14 strain was evaluated by the lytic kinetics analysis. The phage morphology was obtained using Transmission Electron Microscopy (TEM). On the other hand, the 5Q18's DNA was purified according to two methodologies: i) a modified protocol and ii) the *Wizard® Genomic DNA Purification kit* from Promega. The pattern of restriction of 5Q18's DNA was carried out with the restriction endonuclease *XbaI* in order to define the kind of genetic material. Finally, we tested 5Q18's lytic activity based on *in vitro* assay with two treatments and three repetitions. As a result, the 5Q18 phage was identified according to the morphologic characteristics as a member of *Myoviridae* family in the *Caudovirales* order with a genome of >20 Kb. Moreover, we found 5Q18 has a spectrum of activity against commensal and pathogenic *E. coli*, especially, enteropathogenic and enterohemorrhagic pathotypes. Bactericidal activity of 5Q18 phage was much efficient than lactic acid, a common preservative used in food industry. In conclusion, the characterization of 5Q18 phage was based on the equipment and materials available in the

country. According to the characteristics of the 5Q18 phage, it could be define as a potential biocontrol agent against Enteropathogenic *E. coli*, and it might be used in food industry.

Keywords: 5Q18 bacteriophage, biocontrol, *Caudovirales*, food industry, multidrug-resistant EPEC, *Myoviridae*.

1. INTRODUCCIÓN

Escherichia coli es una enterobacteria, perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*. La bacteria está presente naturalmente en el estómago de mamíferos aunque también se la ha descrito como un patógeno oportunista en humanos (Murray, Rosenthal, y Pfaller, 2014). Actualmente existen seis patotipos de *E. coli* asociados con infecciones gastrointestinales en todo el mundo (Croxen y Finlay, 2010). Entre los patotipos que afectan a humanos se encuentran *E. coli* enteropatógena (ECEP), *E. coli* enterohemorrágica (ECEH), *E. coli* enteroagregativa (ECEA), *E. coli* enterotoxigénica (ECET), *E. coli* difuso adherente (ECDA) y *E. coli* enteroinvasiva (ECEI) (Croxen y Finlay, 2010; Croxen et al., 2013). ECEP es uno de los patotipos de mayor importancia, relacionado con diarreas infecciosas que afectan principalmente a niños (Black et al., 2010; Ochoa et al., 2009). Las diarreas infecciosas representan un severo problema sanitario en países en vías de desarrollo como el Ecuador, siendo la sexta causa de muerte en el país (Organización Mundial de la Salud [OMS], 2008). En la mayoría de los casos, la transmisión de los patotipos de *E. coli* a humanos se produce a través de productos contaminados con excretas provenientes de animales (Murray et al., 2014).

El abuso de antibióticos para tratar diferentes tipos infecciones causadas por diversos patógenos ha generado una preocupación a nivel mundial (OMS, 2016). Esto se debe principalmente al incremento de la multirresistencia de los diferentes patógenos que causan infecciones comunes (Chellat, Raguž, y Riedl, 2016). En particular, aquellos responsables de la enfermedad diarreica como *Escherichia coli* diarrenogénicas (Qu et al., 2016). Esta situación ha causado una escases de antibióticos eficaces contra patógenos multirresistentes (World Health Organization [WHO], 2014), por lo que, las infecciones se vuelven más frecuentes (Tanwar, Das, Fatima, y Hameed, 2014). En la actualidad, varios

científicos han proclamado que la era post-antibiótica es una realidad visible; por lo que, el desarrollo de terapias alternativas resulta urgente. Una de las alternativas es el uso de la fagoterapia, promovida antiguamente por países de la Unión Soviética (Abedon, Kuhl, Blasdel, y Kutter, 2011). Esta terapia consiste en el uso de virus líticos para combatir infecciones causadas por bacterias patógenas de importancia clínica; en especial, aquellas que han desarrollado resistencia a varios antibióticos (Segundo, Hernández, López, y Torres, 2010). El uso de los bacteriófagos como terapia presenta varias ventajas (Chan, Abedon, y Loc-Carrillo, 2013; Gill y Hyman, 2010), entre ellas, el aislamiento que es relativamente sencillo, los mecanismos de acción que son totalmente diferentes a los antibióticos tradicionales y la alta especificidad de hospederos, entre otras (Chan et al., 2013). Sin embargo, para que exista un apropiado control de los patógenos se debe considerar factores como la selección del fago, tiempo de exposición y el método de dosificación de los mismos (Gill y Hyman, 2010).

Actualmente, la fagoterapia es impulsada principalmente en los países occidentales como Estados Unidos (Reardon, 2014). Esta terapia es ampliamente estudiada contra varios patógenos que causan infecciones de tipo entérico (Lu y Koeris, 2011). En especial, la fagoterapia ha sido probada en diversos miembros de la familia Enterobacteriaceae (Askora, Merwad, Gharieb, y Maysa, 2015; Kutter et al., 2011; Murray et al, 2014; Niu, McAllister, Nash, Kropinski, y Stanford, 2014; Tomat, Migliore, Aquili, Quiberoni, y Balagué, 2013). Una de las especies de estudio ha sido *Escherichia coli* y sus patotipos que presentan una alta resistencia antibiótica (Keary et al., 2013). Resistencia que ha sido adquirida a través de diferentes mecanismos, generando fenotipos multirresistentes (Garcia, Silva, y Diniz, 2011; Heidary, Momtaz, y Madani, 2014; Kandakai-Olukemi, Mawak, y Onojo, 2009; Ochoa et al., 2009). Entre los patotipos más estudiados se reportan

a ECEP (Askora et al., 2015; Denou et al., 2009; Tomat et al., 2013), ECEH (Askora et al., 2015; Niu et al., 2014), ECET (Denou et al., 2009) y *E. coli* shiga-toxigénica (Tomat et al., 2013). En el Ecuador, la fagoterapia es escasamente estudiada. Un estudio relacionado trata del uso de los bacteriófagos como alternativa para eliminar aislados de *Acinetobacter baumannii* resistentes (López, 2015). En un estudio más reciente aislaron fagos líticos específicos de especies patógenas y resistentes del género *Salmonella* (Quiroz et al., 2016). Hasta el momento no se ha encontrado estudios relacionados con la caracterización de bacteriófagos contra los diferentes patotipos de *E. coli* multirresistente.

Por todo lo mencionado anteriormente, el presente estudio respondió la siguiente pregunta: ¿Qué potencial bactericida posee el bacteriófago 5Q18 aislado del río Machángara para el desarrollo de fagoterapia contra *Escherichia coli* enteropatógena multirresistente?

1.1 Justificación

Escherichia coli enteropatógena (ECEP) es uno de los principales patotipos de *E. coli* causante de diarreas infecciosas responsable de una alta tasa de mortalidad en niños menores de cinco años (Black et al., 2010). Las diarreas infecciosas son una enfermedad que cada vez tiene mayor impacto en la sociedad de nuestro país tanto en el aspecto económico como sociológico. Este problema se vuelve más complicado debido a la resistencia que las bacterias adquieren principalmente por el abuso de los antibióticos, lo que ha generado una disminución de la eficacia de muchos de ellos. Aunque el problema es de importancia a nivel de salud, los estudios relacionados con fagoterapia contra bacterias multirresistentes son escasos en el país. De ahí la necesidad de llevar a cabo el presente estudio en donde se desarrolló un protocolo accesible para purificar y caracterizar

un fago, lo cual es el primer paso para llevar a cabo una terapia alternativa que permitirá el tratamiento de diarreas infecciosas causadas por *E. coli* enteropatógena con un fenotipo de multirresistencia.

Actualmente se está viviendo el inicio de la era post-antibiótica, en la cual muy pronto la farmacopea disponible no logrará satisfacer la demanda sanitaria. Esto se debe principalmente a que la mayoría de antibióticos están perdiendo su efecto para combatir infecciones bacterianas debido a la multirresistencia desarrollada por diferentes patógenos. Ante la posibilidad de una escasez de antibióticos efectivos para combatir las diarreas infecciosas es imperativo desarrollar nuevas metodologías. La fagoterapia entonces resurge de las cenizas como el “Ave Fénix” y vuelve a ser de interés por parte de la comunidad científica como terapia para combatir infecciones causadas por bacterias multirresistentes

Para el desarrollo de la fagoterapia, un paso esencial es la caracterización de los bacteriófagos tanto a nivel genotípico como fenotípico. Esto permite discernir los bacteriófagos que son aplicables como terapia contra bacterias multirresistentes de aquellos que pueden inducir solo virulencia en las bacterias (Gill y Hyman, 2010). Por lo tanto, los resultados del presente estudio darán a conocer un bacteriófago con las características recomendadas para ser usado en fagoterapia. En ese sentido, la caracterización de un fago específico para ECEP beneficiará al sistema sanitario intrahospitalario y a los pacientes. El uso del fago constituirá una nueva alternativa para el tratamiento de infecciones causadas principalmente por ECEP con el fenotipo multirresistente, evitando así tanto la compra como el uso indiscriminado de antibióticos convencionales. Finalmente, el presente estudio servirá como línea base para la elaboración de estudios relacionados con la caracterización de fagos con potenciales usos en diferentes áreas de la fagoterapia.

El presente estudio resultó viable gracias a las pautas para el aislamiento, purificación y preparación de bacteriófagos para ser usados como terapia antimicrobiana dictadas por Gill y Hyman (2010). Además, el estudio contó con cepas de ECEP multirresistentes provistas por el Instituto Nacional de Salud Pública e Investigación (INSPI); así como, el financiamiento, la disponibilidad de materiales, equipamiento y locaciones dispuesta por la Escuela de Bioanálisis de la PUCE.

1.2. OBJETIVOS

1.2.1. Objetivo general

Caracterizar fenotípica y genotípicamente a un bacteriófago que posee actividad lítica contra *Escherichia coli* enteropatógena con fenotipo de multirresistencia.

1.2.2. Objetivos específicos

- Aislar un bacteriófago con actividad lítica contra ECEP multirresistente a partir de muestras de agua del río Machángara.
- Titular el bacteriófago mediante un ensayo de doble agar usando la cepa ECEP 14.
- Identificar fenotípicamente el bacteriófago 5Q18 a través de microscopía electrónica de transmisión.
- Determinar el tipo de ADN del bacteriófago 5Q18 llevando a cabo la digestión enzimática del ADN con la endonucleasa de restricción *XbaI*.
- Comprobar la capacidad lítica del fago 5Q18 sobre ECEP 14 multirresistente gracias a la realización de un ensayo *in vitro*.
- Establecer un protocolo de caracterización de bacteriófagos del río Machángara que resulte asequible y viable con los materiales disponibles en el país.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

La terapia con bacteriófagos ha sido estudiada desde el año 1930 (Skurnik y Strauch, 2006). Con la llegada de la era antibiótica, la mayoría de los países occidentales dejaron de estudiar a estos virus especiales como terapia antimicrobiana. Sin embargo, algunos estados de la Unión Soviética y el este de Europa siguieron experimentando con bacteriófagos durante los últimos 80 años con resultados abrumadores (Gill y Hyman, 2010; Summers, 2012). Este mecanismo bactericida consiste en el uso de bacteriófagos o fagos, virus que infectan y lisan bacterias de manera específica, constituidos principalmente de material genético y proteínas para combatir la proliferación de bacterias o atenuar su infectividad (Gill y Hyman, 2010). A nivel mundial, el uso de la fagoterapia ha crecido como una alternativa al uso de antibióticos. En particular, su uso ha aumentado contra diferentes especies bacterianas patógenas que han adquirido resistencia e incluso multirresistencia (Keary et al., 2013).

En especial, la fagoterapia ha sido usada contra varias especies de la familia Enterobacteriaceae con fenotipo de multirresistencia (Askora et al., 2015; Kutter et al., 2011; Niu et al., 2014; Tomat et al., 2013), responsables de altas tasas de mortalidad (Xu et al., 2015). Una de las especies sujeto de estudio es *Escherichia coli* (Beheshti, Soleimani, y Salmanizadeh, 2015) debido a la multirresistencia que está adquiriendo (Jamal, Hussain, Rajanna, y Andleed, 2015). En particular se han caracterizado y aislado fagos contra patotipos de *E. coli* que además de tener genes de virulencia han adquirido una alta resistencia antibiótica (Keary et al., 2013). Entre los patotipos más estudiados se reportan a ECEP (Askora et al., 2015; Denou et al., 2009; Tomat et al., 2013), ECET (Denou et al.,

2009; Wilder, Lancaster, Cahill, Rasche, y Kutty, 2015), ECEH (Askora et al., 2015; Kutter et al., 2011; Niu et al., 2014) y *E. coli* shiga-toxigénica (Tomat et al., 2013). Concretamente, para ECEP se aisló bacteriófagos activos que pertenecen a la familia *Myoviridae*, los mismos que fueron eficaces al reducir las poblaciones de las bacterias con fenotipo de resistencia a tetraciclinas y ampicilina (Budiarti, Hidayati, y Rusmana, 2011). Los estudios relacionados concluyen que los bacteriófagos constituyen excelentes candidatos para ser utilizados posteriormente en fagoterapia humana (Askora et al., 2015; Capparelli et al., 2010; Chan et al., 2013; Chhibber y Kumari, 2008; Jamalludeen, Johnson, Shewen, y Gyles, 2009; Keary et al., 2013).

En el Ecuador, la información sobre el desarrollo de la fagoterapia como una alternativa antimicrobiana es escasa. Un estudio relacionado con el tema es sobre los bacteriófagos como opción para eliminar cepas de *Acinetobacter baumannii* resistentes a antibióticos aisladas de tres hospitales del Ecuador (López, 2015). En un estudio más reciente aislaron fagos líticos de las familias *Myoviridae* y *Siphoviridae* específicos para *Salmonella enterica* de los serovares Enteritidis e Infantis (Quiroz et al., 2016). Estudios relacionados con la caracterización de bacteriófagos contra los diferentes patotipos de *Escherichia coli* multirresistente no han sido desarrollados hasta el momento en el país.

2.2. Diarrea infecciosa aguda

Clínicamente, la diarrea se define como la eliminación de heces no formadas o irregularmente líquidas (Camilleri y Murray, 2012) con una mayor periodicidad de defecación (Hodges y Gill, 2010). La diarrea puede ser clasificada en varios cuadros clínicos como seudodiarrea, diarrea por rebosamiento, incontinencia fecal y diarrea infecciosa aguda (Camilleri y Murray, 2012). La diarrea infecciosa aguda, causada por microorganismos o sus toxinas, se manifiesta principalmente por la inflamación o mal

función del intestino (Montoro, 2008). La sintomatología es susceptible a cambios debido a la gran variedad de agentes causales que la provocan. Generalmente, los síntomas que se presentan son cólicos abdominales, anorexia y excreciones acuosas (LaRocque, Ryan, y Calderwood, 2012).

La diarrea infecciosa aguda puede ser causada por diversos microorganismos como bacterias, parásitos y virus (Murray et al., 2014). Las especies bacterianas responsables de diarrea infecciosa pertenecen principalmente a los géneros *Salmonella*, *Campylobacter*, *Shigella*, *Escherichia* y *Vibrio*, entre otros. Los agentes virales de mayor importancia son Rotavirus, Calicivirus y Adenovirus. Los parásitos como *Cryptosporidium parvum*, *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* y *Cyclospora cayetanensis* causan severas enfermedades diarreicas, principalmente en niños (Connor, 2013; Hodges y Gill, 2010; LaRocque et al., 2012; Murray et al., 2014).

Las diarreas infecciosas representan un severo problema sanitario en países en vías de desarrollo (Gómez-Duarte, 2014). Este tipo de infección constituye una de las principales causas de muerte en niños (Hodges y Gill, 2010). En el reporte de la OMS del 2008 se describieron 388 casos fatales de diarrea infecciosa en niños menores de cinco años, siendo la sexta causa de muerte en el Ecuador. Para el 2009, las diarreas infecciosas fueron la octava causa de mortalidad infantil de 0,3% por cada 1 000 nacidos vivos en el país. En el 2012, el número de defunciones de menores de 5 años fue de 6 000, de las cuales, el 4% fue debido a diarreas infecciosas (OMS, 2012). En el reporte más reciente de las estadísticas sanitarias del 2014 se determinó que el número de defunciones de menores de 5 años fue de 8 000, de las cuales el 4% fueron a causa de diarreas infecciosas (OMS, 2014).

2.3. *Escherichia coli*

Escherichia coli es una de las especies más importantes de la familia Enterobacteriaceae (Murray et al., 2014). La especie es una bacteria ubicua; es decir, se encuentra diseminada vastamente en el medio ambiente como el suelo, agua y vegetación (Torres, Arenas, y Martínez, 2010). Además, la bacteria está presente en grandes cantidades en el tubo digestivo de mamíferos como flora comensal (Singh y Kapoor, 2010). Sin embargo, la bacteria ha pasado de tener una relación de comensalismo a ser un patógeno oportunista (Williams, Torres, y Lloyd, 2010). Como patógeno, la especie es responsable de causar diarrea infecciosa en el ser humano debido a la presencia de diferentes factores de virulencia (Jafari, Aslani, y Bouzari, 2012; Scaletsky, Souza, Aranda, y Okeke, 2010).

Escherichia coli ha adquirido factores de virulencia mediante transferencia horizontal de genes. La presencia de estos factores pueden cambiar de un estado comensal de la bacteria o incrementar su patogenicidad (Williams et al., 2010). Generalmente, estos factores de virulencia son codificados en plásmidos, islotes de patogenicidad o en el ADN de bacteriófagos lisogénicos (Jafari et al., 2012; Scaletsky et al., 2010). En *E. coli* se ha reportado la presencia de varios factores de virulencia, como por ejemplo, la presencia de islas de patogenicidad (locus de eliminación de microvellocidades intestinales), genes de virulencia putativos, plásmidos que codifican la formación del pili y factores de adherencia, entre otros (Gomes y González-Pedrajo, 2010; Scaletsky et al., 2010).

2.3.1. Patotipos

La presencia de los diferentes factores de virulencia puede determinar un patotipo específico dentro de la especie. En *Escherichia coli* se han descrito al menos ocho patotipos clasificados dentro dos grupos, diarrenogénico (DEC) y extraintestinal (ExPEC) (Torres et al., 2010). Las DEC son las que causan principalmente infecciones gastrointestinales; mientras que, las ExPEC son responsables de infecciones urinarias (*E. coli* uropatogénica, ECUP) y de meningitis neonatal (NMEC, por sus siglas en inglés) (Williams et al., 2010). A los patotipos de *E. coli* que producen infección gastrointestinal en humanos se los ha clasificado en seis: *E. coli* enteropatógena (ECEP), *E. coli* enterohemorrágica (ECEH), *E. coli* enteroagregativa (ECEA), *E. coli* enterotoxigénica (ECET), *E. coli* difuso adherente (ECDA) y *E. coli* enteroinvasiva (ECEI) (Croxen y Finlay, 2010; Croxen et al., 2013; Williams et al., 2010).

Varios procesos evolutivos han permitido diferenciar a los diferentes patotipos (Williams et al., 2010), los cuales se caracterizan por tener factores de virulencia específicos. Por ejemplo, ECEP se describe por poseer pilis formadores de haces (Bfp, por sus siglas en inglés), ECEH se destaca por producir toxinas *Shiga* (Stx-1 y Stx-2), ECEA posee fimbrias adherentes agregantes (AAF/I, AAF/II y AAF/III), ECET produce dos tipos de enterotoxinas, termolábil (LT) y termoestable (ST), ECDA y ECEI son productoras de hemolisinas como la HlyA (Croxen y Finlay, 2010; Croxen et al., 2013; Gomes y González-Pedrajo, 2010; Hodges y Gill, 2010; Murray et al., 2014).

Cada grupo de factores de virulencia están asociados a la presencia de las características clínicas y patológicas de la infección (Gomes y González-Pedrajo, 2010). Todos los patotipos causantes de infecciones intestinales son responsables de altas tasas de

mortalidad y morbilidad (Black et al., 2010). Entre las infecciones causadas por DEC, la infección producida por ECEP es la segunda en importancia luego de la infección por ECEH (Williams et al., 2010).

2.3.1.1. *Escherichia coli* enteropatógena

ECEP fue el primer patotipo de *Escherichia coli* identificado como agente causal de la enfermedad diarreica. En las décadas de 1940 y 1950, este patotipo fue el principal responsable de brotes de diarrea en niños en países industrializados (véase en Bray, 1945). Actualmente, la infección por ECEP es una de las causas frecuentes de diarrea en lactantes tanto en países en desarrollo (Russo y Johnson, 2012) como países en vías de desarrollo (Gomes y González-Pedrajo, 2010). En Sudamérica se ha reportado su presencia en países como Brasil (Guth, Picheth, y Gomes, 2010), Colombia (Gómez-Duarte, 2014), Uruguay, Perú (Varela, Gomez-Duarte, y Ochoa, 2010) y en comunidades remotas del Ecuador (Bayas, 2011; Bhavnani et al., 2016; Schreckinger, 2008). En el país, los estudios realizados en comunidades remotas del noroeste indican que ECEP se la encuentra en bajos niveles asociada fuertemente a episodios de diarrea (Bayas, 2011; Bhavnani et al., 2016; Schreckinger, 2008), en especial, en niños menores de cinco años (Bhavnani et al., 2016). El principal reservorio de ECEP son los humanos y el ganado (Williams et al., 2010) por lo que su forma de transmisión es oral-fecal (Hodges y Gill, 2010; Torres et al., 2010).

ECEP se caracteriza por tener varios factores de virulencia responsables de infecciones gastrointestinales (Torres et al., 2010). Este patotipo es portador de la isla genómica de patogenicidad denominada locus de eliminación de microvelocidades intestinales (LEE, por sus siglas en inglés) que codifica efectores proteínicos, el sistema de

secreción tipo III, intimina y el receptor de la intimina (Tir) (Yan et al., 2013). El sistema de secreción tipo III es el responsable de transferir los factores de virulencia dentro de las células (Gomes y González-Pedrajo, 2010) como los efectores proteicos EspF y EspZ. Estos efectores son importantes en la regulación de la supervivencia celular mediante la modulación de los niveles del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, por sus siglas en inglés). Las células sobreviven en los primeros estadios intracelularmente debido a la fosforilación de EGFR, EspF activa a las caspasas con la pérdida de EGFR, EspZ inhibe la acción de EspF, como consecuencia se da la acelerada muerte celular en estadios avanzados de la infección (Roxas, Ryan, Vedantam, y Viswanathan, 2014). La intimina es codificada por el gen *eae*, marcador para la identificación de EPEC, el cual promueve la adherencia más estrecha del patotipo a las células epiteliales, su unión es mediada por la proteína receptora Tir (Williams et al., 2010) que manipula la actina del citoesqueleto. Otro factor de virulencia es el pili formador de haces (*bfp*, por sus siglas en inglés) codificado por el gen *bfp*. Este factor de virulencia permite el contacto con la superficie de la célula hospedera así como el reordenamiento del citoesqueleto. Además, el *bfp* es responsable del envío de señales que permiten a la bacteria adoptar un estilo de vida extracelular cuando sea necesario (Zahavi et al., 2011) y de esta forma generar la dispersión de la bacteria (Roxas et al., 2014). Todos estos factores en conjunto son necesarios para causar los síntomas en el hospedador (Ochoa y Contreras, 2011) y la posterior diseminación del patógeno en el ambiente (Roxas et al., 2014).

ECEP puede ser de dos tipos, típica (tECEP) y atípica (aECEP). Esta clasificación depende de la presencia o ausencia del plásmido EAF que contiene el gen *bfp* (Williams et al., 2010). Las tECEP, cuyo único reservorio natural son los humanos, son portadoras del plásmido EAF que estimula la formación del pili necesario para su adherencia a las células

epiteliales. Mientras que, aECEP carece del plásmido por lo que no codifica los genes *bfp* (Salehi, Badouei, y Gohari, 2011). La tECEP es la principal responsable de diarrea acuosa persistente en niños de países en vías de desarrollo (Williams et al., 2010). Por otro lado, aECEP está relacionada con diarrea esporádica o epidémica en países desarrollados (Gomes y González-Pedrajo, 2010).

2.4. Antibióticos

Los antibióticos, compuestos de origen natural y/o sintético, son producidos por algunos microorganismos o mediante síntesis química cuya función es inhibir el crecimiento bacteriano (Murray et al., 2014). Con el descubrimiento de los antibióticos o antimicrobianos, en especial de la penicilina, su uso para el tratamiento de enfermedades infecciosas ha ido incrementando (Murray et al., 2014; Penesyan, Gillings, y Paulsen, 2015). Gracias al advenimiento de la era antibiótica se logró combatir o mantener bajo control diferentes tipos de enfermedades infecciosas (Davies y Davies, 2010; Penesyan et al., 2015). Aunque rápidamente surgieron bacterias con fenotipos de resistencia debido al uso extenso de este tratamiento (Davies y Davies, 2010; Murray et al., 2014).

Los antibióticos ejercen su acción sobre unas pocas moléculas presentes exclusivamente en las bacterias (Debabov, 2013). Estas moléculas son afectadas principalmente a nivel de función celular, la misma que es esencial para la sobrevivencia de la bacteria (Kohanski, Dwyer, y Collins, 2010). De acuerdo al componente celular que afecten, los antibióticos pueden ser bactericidas o bacteriostáticos (Bernatová et al., 2013; Murray et al., 2014). Los antibióticos bactericidas causan rápidamente la muerte del microorganismo como por ejemplo los β -lactámicos como las penicilinas, cefalosporinas y carbapenémicos; los glicopéptidos como la vancomicina y teicoplanina; los

aminoglucósidos como la estreptomicina y gentamicina; entre otros como la rifampicina, quinolonas, sulfonamidas y trimethoprim. Mientras que, los antibióticos bacteriostáticos son aquellos que causan una interrupción del crecimiento microbiano, aunque en elevadas concentraciones pueden tener un efecto bactericida como los macrólidos, tetraciclinas, cloranfenicol, linezolid, ácido fusídico y mupirocina (Murray et al., 2014).

La actividad bactericida de los antibióticos se da a nivel de pared celular, síntesis de ácidos nucleicos y de proteínas (Kohanski et al., 2010). Los antibióticos que afectan la pared celular y la inhibición de su síntesis son la vancomicina, bacitracina y β -lactámicos (Davies y Davies, 2010); mientras que, los que atacan a nivel de la membrana celular son las polimixinas (Murray et al., 2014). Su modo de acción está destinado a dañar la permeabilidad de la membrana celular, unirse a los esteroides de la pared celular y así permitir el ingreso de moléculas bactericidas (Kong, Schneper, y Mathee, 2010). En las últimas décadas se han desarrollado agentes que actúan contra la síntesis de ácidos nucleicos (Murray et al., 2014). Por ejemplo, las quinolonas que afectan a la ADN girasa y topoisomerasa IV, la rifampicina que actúa a nivel de ARN polimerasa (Kohanski et al., 2010), las sulfonamidas y el trimethoprim que inhiben la síntesis de folato (Rezaei, Komijani, y Javadirad, 2012). A nivel de ribosomas, los antibióticos como el cloranfenicol o las tetraciclinas influyen en la función de las subunidades ribosomales 30S o 50S, inhibiendo la síntesis de las proteínas (Madigan, Martinko, Dunlap, y Clark, 2009).

2.4.1. Resistencia antimicrobiana

La resistencia antibiótica es un proceso evolutivo de las bacterias que depende de diversos factores (Debabov, 2013; Murray et al., 2014). Las bacterias han desarrollado varios mecanismos para evadir la acción de moléculas antibióticas (Davies y Davies, 2010;

Murray et al., 2014) que puede ser por mecanismos no enzimáticos o la expresión de enzimas que inactivan los antibióticos (Alekhun y Levy, 2007). La mayoría de estos mecanismos se han generado como respuesta a condiciones naturales adversas, resistencia bacteriana natural (Madigan et al., 2009) o por la adquisición de información genética, resistencia adquirida (Debabov, 2013).

1.4.1.1. Resistencia bacteriana natural

Desde la antigüedad, las bacterias han desarrollado mecanismos de resistencia a sustancias antibióticas naturales (Murray et al., 2014). Este mecanismo de resistencia es determinado genéticamente y no tiene ninguna correlación con el uso indiscriminado de antimicrobianos naturales o sintéticos (Pérez-Cano y Robles-Contreras 2013). Los genes que intervienen en este tipo de resistencia se encuentran en el cromosoma bacteriano, como los genes que codifican para las enzimas AmpC o β -lactamasas que causan inactivación enzimática (Debabov, 2013) o los genes que codifican para proteínas que participan en el sistema de eflujo (Alekhun y Levy, 2007; Debabov, 2013). Por lo que, varias especies bacterianas tienen la habilidad de resistir a ciertos antibióticos como resultado de la herencia de características funcionales y estructurales (Blair, Webber, Baylay, Ogbolu, y Piddock 2015). Por ejemplo, la composición de la pared celular es diferente en varias especies bacterianas, de ahí la susceptibilidad intrínseca a los antibióticos (Davies y Davies, 2010). La resistencia natural también depende de la hidrofobicidad del antibiótico, la cual es mediada por la formación de *biofilms* (Penesyan et al., 2015). Por lo general, la causa de este tipo de resistencia está relacionada estrechamente con la aparición de mutaciones espontáneas (Krebs et al., 2014), debido fundamentalmente a la exposición natural a sustancias antagónicas producidas por otros organismos (Madigan et al., 2009).

Varias especies Gram negativas y positivas poseen una resistencia natural a sustancias antibióticas (Boerlin y White, 2013; Kohanski et al., 2010). Un claro ejemplo de bacterias con resistencia natural es la especie *Pseudomonas aeruginosa*. Esta especie se caracteriza por tener el operón *mexAB-oprM* que regula los genes de las porinas y de la bomba de eflujo, concediendo resistencia para las quinolonas, tetraciclinas, cloranfenicol y meropenem (Debabov, 2013). Otras bacterias que poseen resistencia natural a los aminoglucósidos son los miembros del género *Enterococcus*. Esto se debe a que las especies carecen de metabolismo oxidativo que permita la captación de las moléculas (Boerlin y White, 2013; Kohanski et al., 2010). En *Escherichia coli*, la resistencia natural está dada por mutaciones puntuales presentes en algunos genes que afectan el sitio blanco de determinados antibióticos y la codificación de enzimas hidrolíticas como AmpC (Manu, Lupan, y Popescu, 2011).

1.4.1.2. Resistencia bacteriana adquirida

La resistencia adquirida se ha dado como resultado de diferentes mecanismos (Murray et al., 2014); principalmente, por mutaciones en genes regulatorios o estructurales del cromosoma bacteriano (Alekhun y Levy, 2007; Harbottle, Thakur, Zhao, y White, 2006; Blair et al., 2015) y la transferencia horizontal de genes que ha permitido el intercambio de material genético entre bacterias de diferentes especies (Blair et al., 2015; Davies y Davies, 2010; Finley et al., 2013). Este mecanismo es uno de los más importantes en la transmisión y evolución de los determinantes génicos entre especies bacterianas patógenas hacia comensales o viceversa (Finley et al., 2013). La transmisión de material genético entre especies se ha visto en la familia *Enterobacteriaceae* (Krebs et al., 2014; Lewin, 2008; Madigan et al., 2009), por lo general, la transmisión es mediada por plásmidos. Por ejemplo, los genes *blaCTX-M-15* que codifican β -lactamasas de espectro

extendido se los ha descrito en *Kluyvera ascorbata*, raramente patógeno en humanos, así como, en plásmidos y en el cromosoma de cepas patógenas de *Escherichia coli* (Iredell, Brown, y Tagg, 2015). Otro ejemplo de transferencia de genes de resistencia es el caso del plásmido de tipo InFII_K que transfiere resistencia a las cefalosporinas (Rodríguez et al., 2015) y carbapenémicos (Iredell et al., 2015) entre los géneros *Escherichia* y *Klebsiella*.

1.4.2. Mecanismos de resistencia antimicrobiana

Los mecanismos de resistencia bacteriana pueden ser intrínsecos y adquiridos. Entre los mecanismos intrínsecos se reporta a la bomba de eflujo, cambio en la permeabilidad e hidrólisis enzimática (Debabov, 2013; Lawson, 2008; Pérez-Cano y Robles-Contreras, 2013); mientras que, los mecanismos adquiridos los constituyen las mutaciones y la transferencia horizontal de genes (Sundqvist, 2014).

1.4.2.1. Bomba de eflujo

Uno de los principales mecanismos de resistencia antibiótica es la bomba de eflujo (Tanwar et al., 2014) que se encuentra de forma natural en casi todas las bacterias (Sun, Deng, y Yan, 2014). Este mecanismo genera una resistencia natural en donde se involucran proteínas de transporte que remueven sustancias del medio intracelular hacia el extracelular (Blanco et al., 2016), constituyendo un proceso de detoxificación (Sun et al., 2014). El mecanismo intrínseco es codificado en el cromosoma bacteriano (Alekhshun y Levy, 2007; Sun et al., 2014) que se activa por estímulos ambientales o mutaciones en los diferentes genes que constituyen el operón relacionado con la expresión de genes de la bomba de eflujo (Blanco et al., 2016; Sun et al., 2014).

Los genes de la bomba de eflujo son controlados por genes reguladores que forman parte de un operón (Webber y Piddock, 2003). La sobreexpresión de dichos genes puede deberse a cuatro mecanismos: i) mutaciones en el gen regulatorio global, ii) mutaciones en el gen represor local, iii) mutaciones en la región promotora del gen de transporte e iv) inserción de elementos *up* del gen de transporte (Sun et al., 2014). Estas mutaciones aumentan la codificación de bombas de eflujo y por ende se da un incremento en la tasa de resistencia antimicrobiana (Blanco et al., 2016).

1.4.2.2. Cambio de permeabilidad

La diferencia en la composición de la membrana externa puede generar resistencia intrínseca a los antibióticos (Aleksun y Levy, 2007). La membrana externa de las bacterias Gram negativas provee más permeabilidad, por lo tanto, más resistencia comparada con las bacterias Gram positivas (Chellat et al., 2016). El mecanismo de resistencia está mediado por la reducción de la permeabilidad de la membrana que se da por la alteración de las porinas en las Gram negativas (Harbottle et al., 2006). En particular, esta reducción está mediada por el gen *micF* (Manu et al., 2011). Estas bacterias alteran la permeabilidad de la membrana al cambiar los niveles de las porinas de membrana externa, responsables de la formación del canal para la difusión pasiva (Guan et al., 2013). Las proteínas Omps de membrana externa proveen los canales de entrada para las moléculas dependiendo de la carga, forma y tamaño. Mutaciones en los genes que codifican a las proteínas de membrana o pared pueden generar resistencia a varios antibióticos (Harbottle et al., 2006). En particular, la pérdida de la porina OmpF confiere resistencia antibiótica (Guan et al., 2013). Por ejemplo, mutaciones a nivel de los genes que codifican los lipopolisacáridos (LPS) también promueven resistencia (Harbottle et al., 2006) esto es porque puede existir una modificación en el LPS de la pared celular mediante

la adición de 4-amino-4-deoxi-l-arabinosa (LAra4N) a un grupo fosfato (Kocsis y Szabó, 2013). Como resultado se da la inactivación del antibiótico por la poca afinidad para ingresar en el medio intracelular (Davies y Davies, 2010).

1.4.2.3. Modificación enzimática de los antibióticos

La resistencia antimicrobiana puede ser mediada por la inactivación o degradación enzimática de las moléculas antibióticas (Blair et al., 2015; Debabov, 2013; Tanwar et al., 2014). Varias enzimas degradan y modifican diferentes tipos de antibióticos (Blair et al., 2015). Los antibióticos son degradados por hidrólisis de los puentes de los ésteres o amidas y por la transformación química ya sea por adenilación, acetilación, fosforilación, glicosilación o hidroxilación (Tanwar et al., 2014). Por ejemplo, las enzimas β -lactamasas destruyen por hidrólisis el anillo β -lactámico de la penicilina, carbapenems y cefalosporinas (Blair et al., 2015; Manu et al., 2011). Estas enzimas de acuerdo a la clasificación de Ambler pueden ser serin- β -lactamasas y metalo- β -lactamasas que operan por la presencia de la serina o de cationes Zn^{2+} en el sitio activo, respectivamente (Wright, 2005). Otras enzimas como las esterasas actúan sobre macrólidos y epoxidadas, confiriendo resistencia a la fosfomicina (Manu et al., 2011). Entre el grupo de enzimas que promueven transformación química se menciona a las acetiltransferasas, fosfotransferasas y nucleotiltransferasa (Blair et al., 2015). Por ejemplo, la enzima acetiltransferasa aminoglucósido añade grupos acetil causando la inactivación del antibiótico, por lo tanto, éste no puede unirse al sitio A del ribosoma (Harbottle et al., 2006). Los diferentes genes que codifican enzimas que confieren resistencia antibiótica son transmitidos entre especies, gracias a la transferencia horizontal de genes (Blair et al., 2015).

1.4.2.4. Mutaciones

Las mutaciones puntuales, por lo general, alteran los sitios de unión a los antibióticos (Harbottle et al., 2006). La resistencia que adquieren las bacterias se debe principalmente a que los antibióticos naturales o sintéticos aumentan la tasa de mutación (Rodríguez-Rojas, Rodríguez-Beltrán, Couce, y Blázquez, 2013) en diferentes niveles (Thi et al., 2011). Cualquier alteración a nivel de genoma bacteriano puede generar resistencia (Sundqvist, 2014). Por lo general, las bacterias que presentan una alta tasa de mutación pasan por un proceso de presión selectiva (Rodríguez-Rojas et al., 2013). Las mutaciones son mantenidas en las bacterias por alteraciones de los genes del sistema de reparación por error (Krebs, Goldstein, y Kilpatrick, 2014). La proporción de bacterias con mutaciones incrementan a través de las generaciones, por lo tanto, aumenta la probabilidad de resistencia a los antibióticos (Rodríguez-Rojas et al., 2013). Esto se ha visto incrementado por la presión selectiva causada por el abuso de antibióticos en hospitales, comunidades y granjas (Lawson, 2008; Laxminarayan et al., 2013). Lo cual se ha vuelto un serio problema de salud pública, el mismo que puede agravarse con la aparición de nuevos mecanismos de resistencia que alteren los sitios de acción de los antibióticos (Penesyan et al., 2015). Como resultado, se da una reducción de tratamientos eficaces, mayor costo de fabricación de antibióticos, mayor mortalidad por infecciones comunes y finalmente el advenimiento de la era post-antibiótica (Barriere, 2015).

1.4.2.5. Transferencia horizontal de genes

La resistencia antibiótica como resultado de la transferencia horizontal de genes ocurre mediante tres mecanismos: transformación, conjugación y transducción (Krebs et al., 2014). La transformación consiste en tomar ADN del medio ambiente. Este mecanismo

confiere resistencia antibiótica mediante una modificación de la proteína blanco que ocurre por la formación de un mosaico de genes (Blair et al., 2015; Boerlin y White, 2013). El segundo mecanismo, la conjugación, juega un papel fundamental en movilizar los determinantes de resistencia entre las bacterias (Finley et al., 2013) mediante la formación de un pili por donde pasarán los elementos genéticos móviles y plásmidos (Krebs et al., 2014). Los plásmidos llevan los genes de resistencia presentes en su genoma o en transposones conjugativos (Snyder, Peters, y Henkin, 2013). La transducción es un mecanismo mediado por bacteriófagos, en particular, por aquellos que se insertan dentro del genoma. Los fagos lisogénicos incorporan genes de resistencia o virulencia junto con su genoma, los mismos que son heredados a las células hijas durante cada replicación bacteriana (Krebs et al., 2014).

2.4.3. Resistencia antimicrobiana en *Escherichia coli*

Escherichia coli ha sido uno de los microorganismos que ha desarrollado resistencia antibiótica (Lawson, 2008). La especie presenta altas tasas de resistencia, principalmente, a los antibióticos de tercera generación como las fluoroquinolonas y cefalosporinas de acuerdo al último reporte de la OMS (WHO, 2014). Sin embargo, La resistencia que se encuentra en la especie a los antibióticos antes mencionados se debe a mutaciones en algunos genes (Iredell et al., 2015) o por la adquisición de elementos móviles (Flannery, 2011).

La resistencia intrínseca en *Escherichia coli* está mediada genéticamente por el locus *mar* del cromosoma bacteriano (Manu et al., 2011). Las mutaciones en el locus *marCRAB* que consiste de cuatro genes, *marC*, *marR*, *marA* y *marB* (Manu et al., 2011; Scaletsky et al., 2010) son importantes para la generar una multirresistencia a los antibióticos como las

β -lactamasas, quinolonas, cloranfenicol y tetraciclina. En particular, la mutación en el gen *marR* activa la transcripción del operón *marRAB* lo que genera resistencia antibiótica. La expresión de *marA* también promueve la resistencia antibiótica (Manu et al., 2011). La concentración de la proteína MarA está relacionada con los niveles de expresión de la proteína de membrana externa OmpF (Kim y Hooper, 2014; Manu et al., 2011) que confiere resistencia mediante la permeabilidad de la membrana.

En la especie se ha descrito mutaciones en varios genes de importancia. Las mutaciones que ocurren en los genes *gyrA* y *parC* que codifican a la ADN girasa y la topoisomerasa IV, respectivamente (Chellat et al., 2016; Kocsis y Szabó, 2013; Manu et al., 2011), confieren resistencia a las quinolonas (Manu et al., 2011). Mutaciones en el gen que codifica el dihydrofolato reductasa puede generar la sobreexpresión de una enzima que reduce la afinidad del antibiótico trimetoprim, generando la resistencia en la especie (Aleksun y Levy, 2007). Por otro lado, mutaciones en los genes *rpo* y *ampC* que codifican la proteína rpoB y enzima AmpC, respectivamente (Blair et al., 2015) pueden generar resistencia a algunos antibióticos. La proteína rpoB genera resistencia a la rifampicina al afectar a su punto blanco (Rodríguez-Verdugo, Gaut, y Tenailon, 2013); mientras que, la enzima AmpC promueve resistencia a cefalosporinas, penicilinas y los inhibidores de β -lactamasas (Kocsis y Szabó, 2013).

Las proteínas de la bomba de eflujo que genera resistencia a quinolonas es codificada por genes presentes en plásmidos. Las mutaciones en genes regulatorios genera una sobreexpresión de los genes responsables de la expresión de la bomba de eflujo (Naeem et al., 2016). En particular, la sobreexpresión de la proteína *marA* media la multiresistencia en la especie al regular la expresión de la bomba de eflujo *acrAB-TolC* (Kim y Hooper, 2014; Kocsis y Szabó, 2013) y otras proteínas que promueven la resistencia antibiótica

(Alekshun y Levy, 2007). El incremento de MarA genera la sobreexpresión del operón *acrAB* y los genes *tolC* y *micF* (Debabov, 2013; Manu et al., 2011). El operón *acrAB* se caracteriza por la presencia del gen *acrA* que codifican una proteína de fusión (AcrA) (Kocsis y Szabó, 2013), el gen *acrB*, controlado por el represor AcrR (Sun et al., 2014), codifica una proteína de bomba de membrana interna (AcrB) y el gen *TolC* que codifica una proteína de membrana externa (TolC), todos conforman la bomba de eflujo (Kocsis y Szabó, 2013).

En *Escherichia coli*, los elementos móviles como los plásmidos confieren genes de resistencia a diferentes antibióticos como a las cefalosporinas de tercera generación, penicilinas de espectro extendido (WHO, 2014) o a las quinolonas (Kocsis y Szabó, 2013). La resistencia a las cefalosporinas es mediada por la producción de β -lactamasas (Bajaj, Singh, y Viridi, 2016). En particular, las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) de tipo SHV, TEM y CTX-M (Allocati, Masulli, Alexeyev, y Di Ilio, 2013). Por otro lado, la resistencia a las quinolonas es mediada por los determinantes *qnr* que son transportados por plásmidos. La resistencia se genera al reducir la unión a la ADN girasa y topoisomerasa IV, reduciendo la unión al sitio blanco del cromosoma (Alekshun y Levy, 2007; Naeem et al., 2016). Esta resistencia se da cuando las bacterias que tienen los determinantes *qnr* sobreviven a bajas concentraciones de fluoroquinolonas (Alekshun y Levy, 2007). Otro gen asociado con la resistencia a quinolonas es el que codifica a la proteína acetiltransferasa aminoglucosido, enzima que promueve acilación (Naeem et al., 2016).

Finalmente, en la especie se ha mencionado la resistencia a la cefamicina y carbapenémicos mediada por las enzimas AmpC- β -lactamasas y carbapenemasas,

respectivamente (Bajajet al., 2016). Entre las carbapenemasas presentes en la especie se reporta a las de tipo KPC y OXA-48, principalmente (Kocsis y Szabó, 2013).

2.4.3.1. Resistencia antimicrobiana en *Escherichia coli* enteropatógena

Los diferentes patotipos de *Escherichia coli* se han vuelto multirresistentes debido al abuso de antibióticos para tratar diferentes tipos de infecciones (Garcia et al., 2011; Heidary et al., 2014; Kandakai-Olukemi et al., 2009; Ochoa et al., 2009). Este grupo de bacterias presenta una alta resistencia a diferentes antibióticos como ampicilina (Garcia et al., 2011; Heidary et al., 2014; Ochoa et al., 2009), cotrimoxazol, ácido nalidíxico (Ochoa et al., 2009), tetraciclina (Garcia et al., 2011; Heidary et al., 2014; Mosquito et al., 2012; Ochoa et al., 2009) y trimethoprim/sulfametoxazol (Garcia et al., 2011; Mosquito et al., 2012). En particular, ECEP presenta una resistencia a varios antibióticos como ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina, sulfamidas y tetraciclina (Kandakai-Olukemi et al., 2009; Mitra et al., 2011).

Los mecanismos de resistencia de ECEP han sido adquiridos por mutaciones (Scaletsky et al., 2010) y por transferencia de material genético (Sundqvist, 2014). La resistencia adquirida es mediada por plásmidos que contienen transposones que codifican genes de resistencia (Sundqvist, 2014), especialmente, en tECEP (Scaletsky et al., 2010). Algunos transposones en conjunto con los integrones pueden conferir multirresistencia (Sundqvist, 2014) o resistencia a un antibiótico en particular como el Tn3, Tn5 y Tn10 provee de resistencia a β -lactámicos, kanamicina y tetraciclinas, respectivamente (Manu et al., 2011). Entre los genes de mayor prevalencia en ECEP se encuentran *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M}, que confieren resistencia a β -lactámicos, *dfrA1* y *sul2* que median la resistencia

para sulfamidas, *tetA* otorga resistencia a tetraciclinas y el gen *cat* que concede resistencia a cloranfenicol (Mosquito et al., 2012).

2.5. Bacteriófagos

Los bacteriófagos o fagos son virus constituidos ya sea por ADN o ARN que pueden ser de doble o simple cadena (Krebs et al., 2014). Una característica particular es que poseen la capacidad de infectar exclusivamente bacterias de una forma especie-específica (Kutter, Gvasalia, Alavidze, y Brewster, 2013) debido a que reconocen receptores definidos de la membrana externa (Orlova, 2012), por lo tanto no afectan a células eucariotas (Kutter et al., 2013). Los fagos son considerados como las entidades vivas más abundantes del planeta (Orlova, 2012; Shors, 2009; Snyder et al., 2013) con una estimación de alrededor de 1×10^{31} (Shors, 2009; Snyder et al., 2013). Motivo por el cual se los encuentra en todos los ambientes y están relacionados directamente con el número de bacterias presentes (Orlova, 2012), sin embargo, su principal hábitat son los focos de contaminación (Ackermann, 2006).

Por lo general, los fagos se caracterizan por tener una cubierta de proteínas que se denomina cápside y una cola (Snyder et al., 2013). La cápside está constituida por proteínas de envoltura o estructurales, cuya función primordial es resguardar al material genético del fago (Shors, 2009). Por otro lado, la cola de los fagos puede presentar estructuras diferentes constituidas por varias proteínas estructurales, cuya función principal es mediar la unión entre el fago y la bacteria para transferir su material genético (Snyder et al., 2013).

2.5.1. Taxonomía de bacteriófagos

De acuerdo a la clasificación del Comité Internacional de Taxonomía de los Virus (ICTV), los fagos pertenecen a un orden constituido de tres familias, nueve subfamilias y 99 géneros (ICTV, 2015). Actualmente, las propiedades que poseen los bacteriófagos permiten su clasificación por el tipo de ácido nucleico, la morfología y la simetría (Ackermann, 2006), variedad de hospederos y su ciclo de vida (Orlova, 2012).

Dependiendo del tipo de material genético, los bacteriófagos pueden ser fagos de ADN de doble y simple cadena (ADNdc y ADNsc) y de ARN de doble y simple cadena (ARNdc y ARNsc). Por ejemplo, las familias *Microviridae* e *Inoviridae* se caracterizan por tener ADNsc, mientras que, las familias *Myoviridae*, *Siphoviridae*, *Podoviridae*, *Corticoviridae*, *Fuselloviridae*, *Tectiviridae*, *Plasmaviridae*, *Lipothrixviridae* y *Rudiviridae* están constituidos por ADNdc. Por otro lado, los fagos de ARNdc y ARNsc pertenecen a las familias *Leviviridae* y *Cystoviridae*, respectivamente (Ackermann, 2006; Ackermann, 2012; Orlova, 2012).

Conforme a la morfología, los fagos se clasifican como binarios o con cola, cúbicos, helicoidales y pleomórficos (Ackermann, 2006). Los fagos que contienen cola pertenecen al orden *Caudovirales*, los fagos cúbicos corresponden a las familias *Microviridae*, *Corticoviridae*, *Tectiviridae*, *Leviviridae* y *Cystoviridae*, los fagos helicoidales están agrupados en las familias *Inoviridae*, *Lipothrixviridae* y *Rudiviridae*, los fagos pleomórficos se encuentran en las familias *Plasmaviridae* y *Fuselloviridae* (Ackermann, 2012).

En cuanto al ciclo de vida los fagos se clasifican en dos grupos principales, líticos y lisogénicos (Krebs et al., 2014; Orlova, 2012; Snyder et al., 2013). Los fagos líticos o

virulentos son aquellos que causan infección lítica con posterior muerte celular; mientras que, los fagos lisogénicos o temperados producen una infección lisogénica, integración de su genoma en el cromosoma de la bacteria (Orlova, 2012; Shors, 2009).

2.5.1.1. Familia *Myoviridae*

Los fagos de la familia *Myoviridae* pertenecen al orden *Caudovirales*, los cuales representan el 25% de los bacteriófagos identificados con cola (Ackermann, 2012; Orlova, 2012; Shors, 2009; Snyder et al., 2013). Esta familia se caracteriza por tener una simetría binaria (Ackermann, 2006), poseer ADN lineal de doble cadena (Snyder et al., 2013), una cápside, una cola contráctil de tamaño medio y un cuello que une la cápside con la cola (Ackermann, 2012; Fokine y Rossmann, 2014; Orlova, 2012). La cola es ensamblada mediante el apilamiento de docenas de anillos de la proteína mayor de la cola (MTP, por sus siglas en inglés); mientras que, la cápside está formada por pocas copias de la proteína *Tape Measure Protein* (TMP) y el cuello que une la cola y la cápside está compuesto por proteínas YqbG (Fokine y Rossmann, 2014). La familia *Myoviridae* utiliza proteínas y/o polisacáridos de la pared celular bacteriana como receptores (Jamal et al., 2015). Esta familia de fagos por su naturaleza de ADNdc codifica holinas y lisinas para romper las células hospederas (Xu et al., 2015). Las holinas son proteínas de membrana que controlan la actividad de las endolisinas del fago para degradar la pared celular hospedera e iniciar la cascada de lisis (Krebs et al., 2014). Las lisinas tienen dos funciones: i) inhibir la síntesis de péptidoglicano e ii) hidrolizar el peptidoglicano con la ayuda de las holinas. Las lisinas se acumulan en el citosol durante la última etapa del ciclo lítico, hidrolizan el peptidoglicano de la pared celular para permitir la dispersión de la progenie viral (Fenton, Ross, McAuliffe, O'Mahony, y Coffey, 2010). Dentro de la familia se encuentra los fagos

$\phi 92$ y ϕKZ (Fokine y Rossmann, 2014), T4, P1, P2, Mu, SPO1 (Snyder et al., 2013), entre otros.

2.5.2. Mecanismos de acción de los bacteriófagos

Los fagos poseen dos ciclos replicativos, lítico y lisogénico (Gill y Hyman, 2010; Kutter et al., 2013). Los dos ciclos replicativos actúan mediante el reconocimiento de los receptores específicos presentes en la membrana externa de la bacteria e inyectan su material genético dentro de la célula hospedera (Lewin, 2008). En el interior de la célula, el fago puede entrar a ciclo lítico o lisogénico (Krebs et al., 2014). El ciclo lítico lo llevan a cabo los fagos virulentos que manipulan la maquinaria celular bacteriana para su replicación (Krebs et al., 2014; Segundo et al., 2010; Snyder et al., 2013). Por lo general, el resultado casi siempre es la destrucción o lisis de la bacteria, aunque todo depende de las condiciones de infección, genotipo del fago y de la bacteria (Madigan et al., 2009).

El primer ciclo replicativo es el de importancia en fagoterapia (Gill y Hyman, 2010). Esto es porque la resistencia antibiótica que tenga la bacteria no influye en la actividad lítica del fago (Orlova, 2012). El proceso para que un fago realice lisis bacteriana está sujeto a una cascada de reacciones (Krebs et al., 2014; Lewin, 2008). El ciclo lítico ocurre en tres fases: i) la transcripción de los genes tempranos, ii) transcripción de los genes que codifican para las enzimas necesarias para la replicación y iii) transcripción de genes estructurales y de lisis (Krebs et al., 2014). En la primera etapa se da la transcripción de los genes inmediatamente tempranos, *N* y *cro*, mediada por la ARN polimerasa del hospedador. El gen *N* codifica un factor antiterminador y actúa en los sitios *nut* para que la transcripción prosiga hacia los genes tempranos retrasados. Por otro lado, el gen *cro* tiene una doble función: i) codifica un represor que impide la expresión del gen *cl* necesaria para

que el fago entre en fase lisogénica e ii) inactiva la expresión de los genes tempranos inmediatos. La proteína cro es fundamental en el ciclo lítico en conjunto con la proteína reguladora pN. Esta proteína permite que la transcripción continúe hacia los genes retrasados, involucrados en la replicación. Finalmente, el gen regulador Q codifica el factor antiterminador que permite a la ARN polimerasa continúe transcribiendo los genes tardíos, S y R, mediada por el factor pQ (Krebs et al., 2014; Lewin, 2008; Shors, 2009; Snyder et al., 2013). La proteína S realiza el poro de la membrana celular; mientras que, la proteína R es una endolisina que destruye el peptidoglicano de la pared celular (Snyder et al., 2013).

El segundo ciclo, el lisogénico, no es de utilidad en fagoterapia (Kutter et al., 2013; Gill y Hyman, 2010). Esto es porque los fagos lisogénicos integran su genoma dentro de una región específica en el cromosoma del hospedero, el cual se replicará junto al genoma bacteriano, transmitiéndose a la progenie (Orlova, 2012). Por otro lado, el fago lisogénico puede conferir características de virulencia (Orlova, 2012; Shors, 2009) o de resistencia (Shors, 2009), los mismos que se transmitirán a las nuevas generaciones.

2.5.3. Caracterización de los bacteriófagos

La infección del fago es evaluada usando una capa de agar y un cultivo bacteriano que permita la difusión de la progenie viral (Gill y Hyman, 2010), como consecuencia se forma la placa. La placa es la parte circular que se da como resultado de la lisis celular y la liberación de partículas virales (Shors, 2009). Por otro lado, la microscopía de transmisión electrónica es hoy en día una de las técnicas más empleadas para la identificación morfológica de bacteriófagos (Ackermann, 2012). En conjunto, la caracterización de los fagos se completa con análisis moleculares como la digestión enzimática y la

secuenciación para conocer la naturaleza genómica del fago (Gill y Hyman, 2010, Kutter et al., 2013). Además, varios ensayos como la electroforesis en gel de poliacrilamida con sodio dodecil sulfato (SDS-PAGE por sus siglas en inglés) permiten conocer más a fondo la estructura proteica del fago (Boulanger, 2009). Una vez que se caracteriza al fago, existen diferentes técnicas para determinar la estabilidad de los fagos en distintas condiciones de pH, temperatura (Gutiérrez, Martínez, Rodríguez, y García, 2010; Jamal et al., 2015) y oxígeno (Kutter et al., 2011). Cuando se ha determinado la estabilidad del fago, el siguiente paso es establecer ensayos *in vitro* e *in vivo* para determinar su posible uso en fagoterapia (Gill y Hyman, 2010; Kutter et al., 2013) por la capacidad que tenga el fago de reducir poblaciones bacterianas (Bardina, Spricigo, Cortés, y Llagostera, 2012; Budiarti et al., 2011; Gutiérrez et al., 2010).

2.5.4. Fagoterapia

La fagoterapia es la aplicación de bacteriófagos para el tratamiento de infecciones (Gill y Hyman, 2010). Esta terapia alternativa ha sido estudiada desde los años 30 en países de la Unión Soviética, en particular, el Instituto Eliava ha llevado a cabo varios estudios en Georgia (Kutter et al., 2013). Actualmente, la fagoterapia es uno de los principales métodos que se están analizando por las farmacéuticas como principales armas de combate contra bacterias multirresistentes (Reardon, 2014). La fagoterapia es uno de los mecanismos bactericidas que consiste en el uso de bacteriófagos o fagos para combatir la proliferación de bacterias o atenuar su infectividad (Gill y Hyman, 2010; Kutter et al., 2013).

Para la selección de los bacteriófagos como una terapia antimicrobiana, en particular, se necesita considerar varios aspectos. Entre los aspectos que se toma en consideración

están la naturaleza del bacteriófago, el rango de hospederos y la producción de toxinas, entre otros (Gill y Hyman, 2010). Otros factores de consideración para la fagoterapia son las interacciones farmacocinéticas y farmacodinámicas del fago en el organismo receptor, así como, la toxicología y posología (Lu y Koeris, 2011). Todos estos factores deberán ser evaluados mediante ensayos clínicos que se rigen a normas internacionales estandarizadas para la aprobación de medicamentos (Chan et al., 2013).

En general se han desarrollado experimentos relacionados con el uso de la fagoterapia contra patógenos gastrointestinales tanto de animales como de humanos. En animales, esta terapia ha sido probada en aves de corral contra *Campylobacter jejuni*, responsable de infecciones gastrointestinales; como resultado, a determinadas dosis de bacteriófagos, se redujo la población bacteriana (Kittler, Fischer, Abdulmawjood, Glünder, y Klein, 2014). Otros estudios indican el uso de bacteriófagos en diferentes especies del género *Salmonella*, como *Salmonella* spp., *S. enterica*, *S. typhimurium*, responsables de graves infecciones gastrointestinales (Atterbury et al., 2007; Bardina et al., 2012; Capparelli et al., 2010; Hooton, Atterbury, y Conneton, 2011; Moreira, Santos, Meireles, Dantas, y de Oliveira, 2013). En *Salmonella* spp., se usó la terapia para eliminar o mantener sus niveles inocuos en aves de corral. De acuerdo al estudio, la selección del fago, tiempo de exposición y el método de dosificación de los mismos son los principales factores para que exista un apropiado control de los patógenos (Moreira et al., 2013).

Hoy en día existen en el mercado preparaciones de bacteriófagos para tratar diferentes tipos de infecciones como las purulentas, respiratorias, auditivas, urinarias y gastrointestinales, entre otras (Abedon et al., 2011). Las preparaciones están compuestas por fagos que infectan a bacterias multirresistentes, principalmente, de los géneros *Streptococcus*, *Proteus*, *Pseudomonas* o *Escherichia* (Kutter et al., 2013). Además del

potencial biomédico de los bacteriófagos, también existen diversos estudios que mencionan a los fagos como un mecanismo para evitar el abuso de antibióticos. Varios estudios sugieren el biocontrol de bacterias mediante el uso de la fagoterapia (Atterbury et al., 2007; Goodridge y Bisha, 2011; Janež y Loc-Carrillo, 2013; Lomelí-Ortega y Martínez-Díaz, 2014). Los fagos han sido usados contra varias bacterias como *Listeria monocytogenes* y ECEH, bacterias patógenas de importancia para la industria ganadera y de alimentos procesados (Goodridge y Bisha, 2011) y *Vibrio parahaemolyticus* en la industria camaronera (Lomelí-Ortega y Martínez-Díaz, 2014). Por otro lado, los fagos también han sido usados para el biocontrol de bacterias zoonóticas como *Campylobacter* spp. (Janež y Loc-Carrillo, 2013) y *Salmonella* spp. (Atterbury et al., 2007). Organismos de certificación de medicamentos como la *Food and Drug Administration* (FDA) ya han aprobado una solución de bacteriófagos que se usa para el biocontrol de *Listeria monocytogenes* en productos cárnicos listos para el consumo y producción de aves de corral (Goodridge y Bisha, 2011).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio formó parte del proyecto “Bacteriófagos como alternativa antibiótica”, código L13298. El proyecto fue financiado por la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (PUCE).

3.1. Tipo de estudio

El estudio fue de tipo exploratorio, descriptivo y experimental. La investigación fue exploratoria debido a que se buscó y se obtuvo un bacteriófago candidato para la fagoterapia a partir de una matriz en donde no se ha reportado su presencia. Después, el estudio pasó a ser descriptivo porque se caracterizó tanto fenotípica como genotípicamente al bacteriófago 5Q18. Una vez que se encontró al fago con las características para ser usado en fagoterapia, el estudio pasó a ser experimental porque se evaluó la capacidad lítica del bacteriófago 5Q18 contra la cepa ECEP 14 para lo cual se realizó un ensayo *in vitro* con dos tratamientos.

3.2. Procedencia de las muestras

3.2.1. Muestras de aguas residuales

Las muestras utilizadas en el presente estudio fueron proporcionadas por Esteban Fernández. Para lo cual, los fagos fueron colectados de acuerdo a las especificaciones de Gill y Hyman (2010) que recomienda que sean aislados de muestras en donde se presume se encuentra el hospedero a estudiar. Partiendo de esta premisa, las muestras fueron recolectadas del río Machángara en el sur de Quito. Este río se caracteriza por tener altos niveles de contaminación, valores altos de pH y bajo potencial de óxido reducción. Además, el río presenta una subsecuente acumulación de materia orgánica, llegando a

niveles semi eutróficos (Reinoso, 2015). Por todas estas características, el río constituye un ambiente ideal para la proliferación de fagos, por tal motivo se colectó las muestras en el mencionado río. Las muestras de agua fueron procesadas en el Laboratorio de Diagnóstico Molecular y Citogenética (Lab 011) de la Escuela de Bioanálisis de la PUCE.

3.2.2. Aislados de *Escherichia coli* enteropatógena

Para el estudio se trabajó con nueve aislados de *Escherichia coli* procedentes de brotes epidémicos en el Ecuador. Los aislados fueron proporcionados por Gabriel Trueba de la Universidad San Francisco de Quito (USFQ). Para la identificación de los patotipos de *E. coli* se amplificaron ocho genes de virulencia, *Stx*, *Etc*, *Eae*, *DaaC*, *Vt1*, *Vt2*, *Agg e* *Ipa-H* mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) de tipo múltiple. La amplificación fue realizada por Fernando Villavicencio en el INSPI.

3.3. Aislamiento y perfil de resistencia de *Escherichia coli* enteropatógena

Los aislados de ECEP fueron reactivados en medio líquido de enriquecimiento (LEM, por sus siglas en inglés) al 1,5%. Una vez que se tuvo un crecimiento en medio líquido se sembró en agar MacConkey, medio selectivo y diferencial, con el fin de obtener por un lado colonias puras para realizar el perfil de resistencia y por otro conseguir un cultivo puro en fase exponencial.

En el Laboratorio de Resistencia a Antimicrobianos se realizó el perfil de resistencia antibiótica de la bacteria mediante el ensayo de difusión en disco de acuerdo a los lineamientos dictados por Kirby-Bauer y el manual de *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2015). Para la prueba de sensibilidad se usaron los parámetros de calidad establecidos por el CLSI. Finalmente, para la prueba de sensibilidad se incluyó cinco

discos de antibióticos, ampicilina, nitrofurantoína, trimethoprim/sulfametoxazol, ciprofloxacina y levofloxacina.

Para la obtención del cultivo de ECEP en fase exponencial se realizaron inoculaciones de colonias puras de la bacteria en medio LEM y se incubó a 37°C por 90 minutos o hasta obtener una absorbancia o densidad óptica (DO) igual a 0,6 a 600 nm. El cultivo fue utilizado inmediatamente para el aislamiento y titulación del bacteriófago.

3.4. Actividad lítica del bacteriófago

El aislamiento del fago se efectuó siguiendo el protocolo y los parámetros dispuestos por Gill y Hyman (2010). Primero se preparó el medio *Deca-Strength-Phage Broth* (DSPB) que contenía 100 g de peptona, 50 g de extracto de levadura y 80 g de fosfato de potasio aforado a 1 000 ml con agua destilada, el mismo que fue autoclavado. Por otro lado, para el aislamiento del fago se filtró 100 ml de las muestras de agua para lo cual se utilizó un filtro con poro de 0,2 µm de diámetro.

Para el enriquecimiento del fago se colocó 18 ml de agua residual filtrada y 2 ml de cultivo de ECEP en fase exponencial en 2 ml de medio DSPB. La mezcla fue incubada a 37°C por 30 minutos. Para el ensayo se incluyeron controles positivos y negativos. Como control positivo se usó una solución de medio DSPB con un bacteriófago conocido (5Q5) en una concentración estimada de 10⁹ Unidades Formadoras de Placa (UFP)/ml y 2 ml de cultivo de ECEP en fase exponencial. Como control negativo se usó agua destilada con medio DSPB y 2 ml de cultivo de ECEP en fase exponencial. Posteriormente se midió la absorbancia o DO a 600 nm de cada muestras y de los controles para lo cual se usó el espectrofotómetro *SmartSpec Plus Spectrophotometer*TM de Bio-Rad©. Una vez medida la primera absorbancia, las muestras fueron incubadas para medir sus absorbancias en

intervalos de 60 minutos las cinco primeras mediciones y después cada 30 minutos hasta llegar a los 300 minutos. Las mediciones tomadas de cada absorbancia en cada intervalo fueron usadas para la realización de curva de crecimiento microbiano.

El fago lítico fue escogido por la capacidad que presentó para infectar a ECEP con fenotipo de multirresistencia. El potencial de infectividad fue evaluado mediante la comparación de las curvas de crecimiento microbiano de las muestras con los controles. Las muestras que resultaron positivas para la presencia de bacteriófagos se centrifugaron a 3 500 rpm por 10 min, se separó el sobrenadante y se conservó en refrigeración a -4°C para su posterior uso en la titulación.

3.5. Titulación del bacteriófago

La titulación del bacteriófago se basó en el protocolo descrito por Moreira et al. (2013) que se detalla a continuación. Como primer paso se realizó diluciones seriadas hasta la dilución 10^{-9} de los bacteriófagos en medio líquido LEM. Del sobrenadante de la muestra positiva para bacteriófagos del paso 3.4 se tomó 1 ml y se mezcló con 9 ml de medio LEM para realizar la primera dilución (10^{-1}). De la dilución 10^{-1} se tomó 1 ml y se colocó 9 ml de medio LEM para realizar la segunda dilución (10^{-2}) y así sucesivamente hasta llegar a la dilución 10^{-9} . A cada dilución se colocó 300 μ l de un cultivo de ECEP en fase exponencial del paso 3.3 para realizar la confrontación. Cada mezcla se la incubó por 30 minutos a una temperatura de 37°C. Finalmente se realizó el ensayo de doble agar para la obtención de UFP de los bacteriófagos, para lo cual se sembró la mezcla en medio LEM 0,7% a 45°C con la posterior siembra sobre el medio sólido LEM 1,5 % y se lo dejó solidificar para incubarlo a 37°C por 6 horas.

3.6. Purificación de ADN del bacteriófago

La purificación del ADN de los bacteriófagos es un paso de vital importancia debido a que permitió eliminar principales contaminantes como los polianiones (ácidos nucleicos bacterianos, exonucleasas y endonucleasas). En el presente estudio se realizó una purificación de ADN que consistió de dos fases.

En la primera fase de purificación se basó en los estudios desarrollados por Atterbury et al. (2007), Bardina et al. (2012) y Moreira et al. (2013) con ligeras modificaciones que se detalla a continuación. En la primera fase se obtuvo el bacteriófago directamente de una placa de lisis. Para lo cual se tomó una porción del agar con la ayuda de puntas estériles, el mismo que fue resuspendido en 1 ml de *buffer* SM en un tubo Axygen® de 10 ml y se dejó en refrigeración a 4°C durante toda la noche. Posteriormente se mezcló 100 µl de la resuspensión que contenía el bacteriófago de interés con 300 µl de un cultivo de ECEP 14 en fase exponencial en un tubo Axygen® de 50 ml y se incubó por 30 minutos a 37°C para que los bacteriófagos se propaguen en la bacteria. Después de la primera incubación se agregó 10 ml de *top* agarosa al 0,7% y se incubó nuevamente por 6 horas a 37°C. A continuación se añadió 10 ml de *buffer* SM con gelatina al 0,01% y se refrigeró a 4°C toda la noche para precipitar al bacteriófago. Una vez precipitado el bacteriófago se tomó aproximadamente 5 ml del sobrenadante y se aforó hasta 10 ml con *buffer* SM. Para inhibir la actividad bacteriana se añadió 100 µl de cloroformo a la mezcla y se centrifugó a 3 500 rpm por 30 minutos a una temperatura de 4°C. El sobrenadante fue transferido a un tubo Axygen® de 15 ml al mismo que se añadió 50 µl de azul de bromofenol al 0,1% y 5 ml de Di-etil-amino-etil (DEAE) Sepharosa al 50% en *buffer* SM. La sepharosa es una matriz que retiene impurezas de la lisis bacteriana. El contenido se mezcló por inversión durante 10 minutos y se prosiguió con una centrifugación de 3 500 rpm por 5 minutos a

temperatura ambiente. Para desestabilizar la cubierta proteica de los fagos se añadió 10 g de tiocianato de guanidina en el caso de obtener 12,5 ml de sobrenadante.

En la segunda fase se usó el sistema de purificación de ADN *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* de ©Promega. El *kit* permite la eliminación de contaminantes como fosfatasas, quinasas, exonucleasas, endonucleasas, sales y mononucleótidos mediante el uso de una resina que liga 20 µg de ADN por cada mililitro y filtros que funcionan con un sistema al vacío o con émbolos para retener los contaminantes. En un microtubo de 1,5 ml se colocó el sobrenadante obtenido previamente y se siguió con el protocolo determinado para la purificación de acuerdo a las especificaciones del fabricante (Promega, 2010; ver anexo 1).

Una vez que se obtuvo el ADN purificado de los bacteriófagos se estimó la concentración y calidad del ADN mediante espectrofotometría utilizando el *Nanodrop®* 2000 y fluorometría con el *Qubit dsDNA HS®*. El *Nanodrop®* fue usado para evaluar la cantidad de contaminantes en el ADN; mientras que, el *Qubit®* se usó para calcular la concentración del ADN de los bacteriófagos debido a su mayor especificidad. Las muestras para la medición en el fluorómetro se prepararon de acuerdo a las especificaciones del fabricante (ThermoFisher Scientifics, 2015; ver anexo 2).

3.7. Caracterización fenotípica

La caracterización fenotípica de los bacteriófagos fue realizada por microscopía de transmisión electrónica (TEM, por sus siglas en inglés). El procedimiento fue efectuado por el Centro de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ingeniería en Biotecnología de la Escuela Politécnica Superior del Ejército (ESPE). Para lo cual, la muestra fue teñida de forma negativa con uranil acetato al 2% (Bardina et al., 2012). La identificación a nivel de

familia de los bacteriófagos fue realizada en base a la morfología tomando en consideración la forma de la cápside y, en particular, la forma y tamaño de la cola. Para determinar la familia del fago, las fotografías enviadas por la ESPE fueron comparadas con imágenes disponibles en el libro *Advances in virus research* (Ackermann, 2012).

3.8. Caracterización genética

Para la caracterización genética del fago lítico se realizó una digestión enzimática utilizando la enzima de restricción *Xba*I. El patrón de bandeo determina la naturaleza del fago, ADN de doble o simple cadena. Las condiciones de reacción dependieron de las especificaciones del fabricante (Promega, 2011). El volumen final de reacción fue igual a 30 μ l en la que se colocó 12 μ l del ADN del bacteriófago purificado a una concentración de 30 μ g/ml, 1 μ l de enzima (10 U/ μ l), 2 μ l de *Buffer* (10X) y 0,2 μ l de *Bovine Serum Antigen* (BSA, 10 μ g/ μ l) y 14,8 μ l de agua grado molecular. La reacción de digestión fue incubada por 3 horas a 37°C. Los fragmentos de restricción generados migraron en gel de agarosa al 0,7% que fue teñido con *GelStarTM Nucleic Acid Gel Stain 10 000X-Lonza* y visualizado mediante UV en el equipo *ChemiDoc MP®* de *Bio-Rad®*. Como control se usó el plásmido *pBluescriptR*.

3.9. Ensayo de actividad

Para el ensayo de actividad lítica del bacteriófago se realizó dos tratamientos con tres repeticiones, para lo cual se usó trozos de salchicha de 1 cm² de superficie. Los tratamientos consistieron en: i) salchicha fresca contaminada con 300 μ l de un cultivo ECEP 14 (DO=0,6) y ii) salchicha contaminada con 300 μ l de un cultivo de ECEP 14 (DO=0,6) y 100 μ l de una solución del bacteriófago 5Q18 (10⁹ UFP/ml). Para los tratamientos se usaron dos controles, positivo y negativo. El control positivo consistió en el

tratamiento del trozo de salchicha con 300 μ l de un cultivo de ECEP 14 (DO=0,6) y 100 μ l de ácido láctico al 2%, preservante de la industria alimenticia, y el control negativo fue un trozo de salchicha inoculado con 400 μ l de agua residual del río Machángara. Los tratamientos fueron incubados por 90 minutos a 37°C. Posteriormente se realizó un enjuague de todos los tratamientos y se les añadió medio líquido LEM para realizar diluciones desde 10^{-1} hasta 10^{-6} . Finalmente se efectuó una siembra en agar MacConkey para determinar el crecimiento de la cepa ECEP 14 a la mayor dilución y se incubó a 35°C por 90 minutos (Bielke et al., 2007).

Las diferencias estadísticas entre los tratamientos fueron analizadas con el Análisis de Variancia (ANOVA) de un factor y la desviación estándar. Para la comparación de las medias de los diferentes grupos se realizó la prueba de *pos hoc* de Tukey. La significancia estadística fue evaluada con el valor de $p < 0,05$. Todos los análisis estadísticos fueron realizados en el programa *IBM SPSS Statistics v23* (IBM Corp., 2015).

4. RESULTADOS

4.1. Aislamiento y tipificación de *Escherichia coli* enteropatógena

De los nueve aislados, tres resultaron ser positivos para el gen *eae*. Las tres cepas de ECEP presentaron algún tipo de resistencia antibiótica, de las cuales la cepa 14 fue resistente para todos los antibióticos utilizados (Tabla 1).

Tabla 1. Patrón de resistencia antibiótica de los aislados clínicos de *Escherichia coli* enteropatógena. En la tabla se muestra los antibióticos utilizados y las cepas enteropatógenas. Acrónimos: ECEP = *Escherichia coli* enteropatógena, R = resistente, I = intermedio, S = sensible. Fuente: Instituto Nacional de Salud Pública e Investigación (INSPI, 2015).

Disco de antibiótico	ECEP 14	ECEP 15	ECEP 21
Ampicilina	R	S	S
Ciprofloxacina	R	S	S
Levofloxacina	R	S	S
Nitrofurantóina	R	S	S
Trimethoprim/sulfametoxazol	R	R	R

4.2. Actividad lítica del bacteriófago 5Q18

El nombre del fago se debe a que fue aislado previamente en el cuadrante 18 cuando mostró una gran actividad lítica en el ensayo *spot test* contra la cepa ECEH 5 así como con una cepa comensal. El fago fue identificado y aislado por Esteban Fernández. El fago 5Q18 mostró una actividad lítica contra tres cepas de ECEP. En particular, una gran actividad lítica del fago se observó en las cepas ECEP 15 y 21 (+++); mientras que, una actividad lítica media se evidenció en la cepa ECEP 14 (++) . Por lo que estos resultados demuestran la capacidad del fago de infectar diferentes cepas de ECEP.

4.2.1. Perfil de actividad lítica del bacteriófago 5Q18

La cepa ECEP14 fue escogida para el análisis de la cinética lítica debido a su perfil de multirresistencia aunque el fago 5Q18 presentó una actividad lítica media contra la mencionada cepa. Como resultado, el bacteriófago 5Q18 interrumpió la fase exponencial de crecimiento de la cepa ECEP14 alrededor de los 240 minutos (4 horas) con una absorbancia de 0,98 DO (Ver Anexo 3 y Figura 1). La curva de crecimiento de esta cepa comparada con el control negativo fue menor y similar a la del control positivo (Figura 1), lo que indicó una lisis de la bacteria por presencia del bacteriófago.

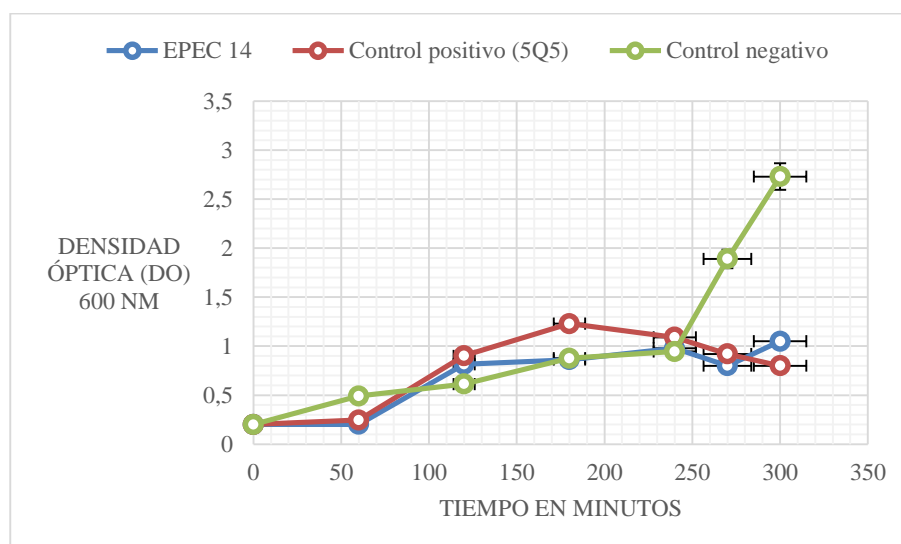


Figura 1. Cinética de lisis del bacteriófago 5Q18 aislado del río Machángara. En la figura se muestra la cepa ECEP 14 con el bacteriófago 5Q18 en línea azul, el control positivo que fue un bacteriófago conocido (5Q5) con la cepa ECEP 14 en línea roja y el control negativo que constituyó la cepa ECEP 14 sin fagos en línea verde.

4.3. Titulación de bacteriófagos

El ensayo de doble agar permitió estimar una concentración aproximada del bacteriófago. Como resultado, en las diluciones 10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-5} y 10^{-7} no se observó

UFP/ml; mientras que, en la dilución 10^{-9} se reveló un crecimiento positivo del fago con la formación de 17 UFP/ml (Figura 2), lo que indica que el fago se encontró a una concentración de 17×10^9 UFP/ml.

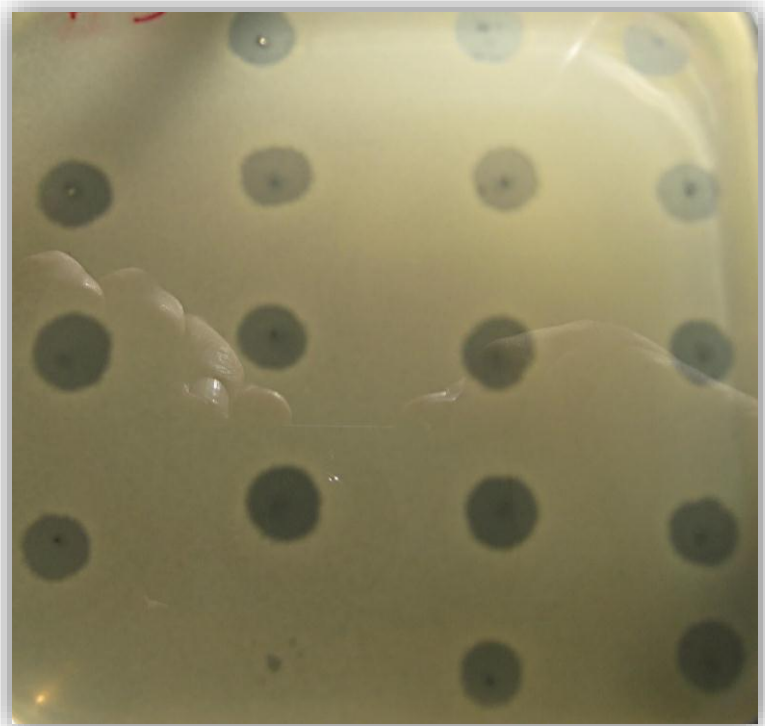


Figura 2. Formación de placas del bacteriófago 5Q18 mediante ensayo de doble agar. En la figura se observa las regiones de lisis causadas por el bacteriófago 5Q18 a la dilución 10^{-9} sobre un cultivo de la cepa ECEP 14.

4.4. Purificación de bacteriófagos

Luego de la eliminación de los polianiones y otros contaminantes que interfieren en el análisis molecular se obtuvo una concentración de ADN del bacteriófago de 535,4 ng/ μ l y 9 740 ng/ μ l mediante espectrofotometría y fluorometría, respectivamente. Además se registró a través de espectrofotometría valores de contaminación tanto por ARN (A260/280 de 2,06) así como de compuestos propios de la purificación (A260/230 0,45).

4.5. Caracterización del bacteriófago

En base a las características morfológicas del bacteriófago 5Q18 se lo clasificó dentro de la familia *Myoviridae*, orden *Caudovirales*. El bacteriófago presentó una simetría binaria, una cápside icosaédrica, una cola mediana contráctil y un cuello que une la cola y la cápside (Figura 3). A nivel de morfología, al presentar una cola de tamaño medio se puede inferir que el ADN del bacteriófago es de doble cadena. En base a las características morfológicas de la familia a la que pertenece el fago se estimó un tamaño aproximado del genoma del fago 5Q18 mayor a 20 Kb. Por otro lado, no fue posible caracterizarlo a nivel genético porque no se obtuvo un patrón de restricción (Figura 4).

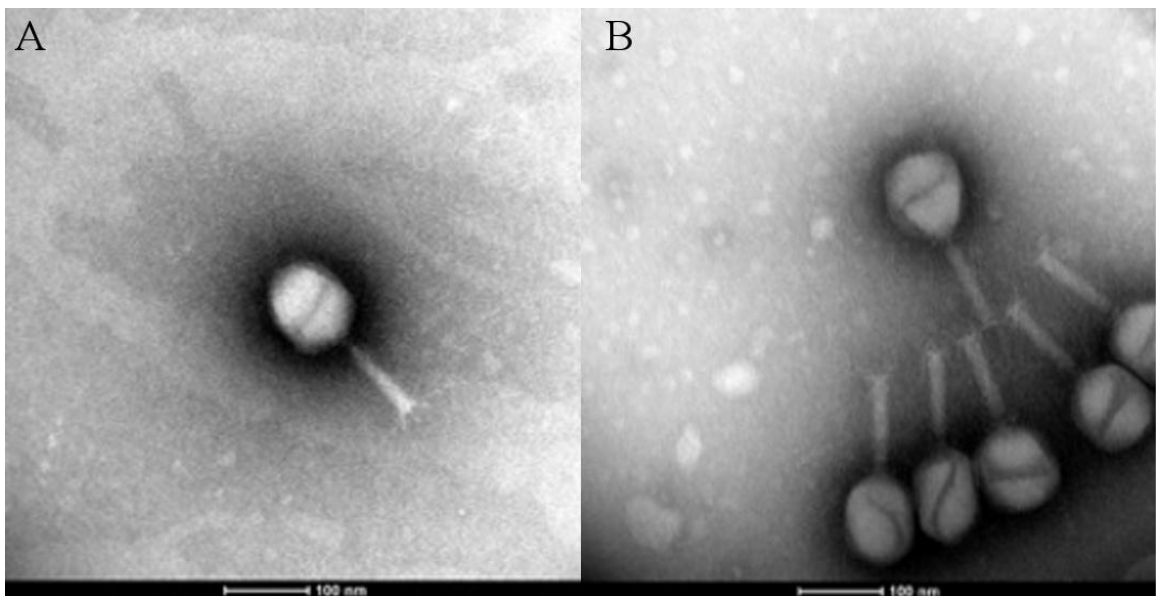


Figura 3. Morfología del bacteriófago 5Q18 aislado del río Machángara. Micrografía del fago 5Q18 después de la tinción negativa y la microscopía de transmisión electrónica. Las figuras A y B indican el bacteriófago representativo de la familia *Myoviridae*. Escala de barra de 100 nm.

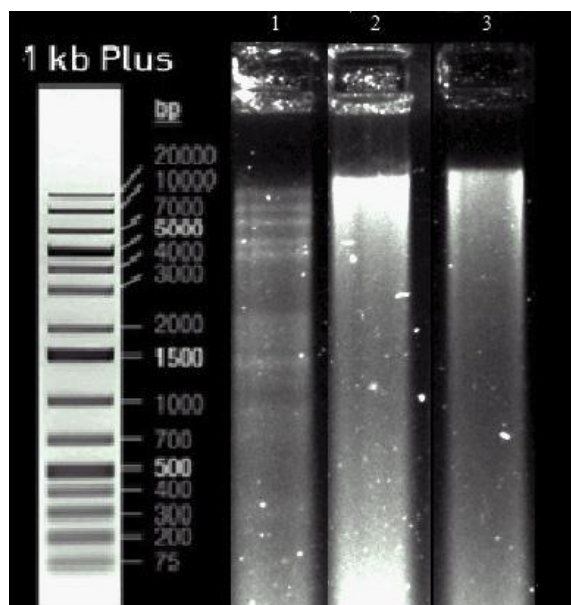


Figura 4. Resultado de la digestión enzimática del bacteriófago 5Q18 en gel de agarosa al 0,7%. La figura indica que no hubo digestión enzimática. En el pocillo 1 se encuentra el marcador de peso molecular de 1Kb plus de Invitrogen, en el pocillo 2 y 3 se colocó el bacteriófago 5Q18 y el plásmido *pBluescriptR* digeridos con la enzima *XbaI*, respectivamente.

4.6. Ensayo de actividad *in vitro* del fago frente a *Escherichia coli* enteropatógena

Como resultado de la actividad lítica *in vitro*, la cepa ECEP 14 mostró una disminución en el crecimiento debido a la presencia del bacteriófago 5Q18, tratamiento 1. De acuerdo a los análisis estadísticos, los tratamientos mostraron diferencias altamente significativas ($p < 0,05$) (Tabla 2). De acuerdo a la prueba de *pos hoc* de *Tukey*, los grupos fueron agrupados en tres subcategorías, i) una conformada por el tratamiento 1 y control positivo, ii) constituida solo por el control negativo y iii) en donde se encuentra solo el tratamiento 2 (Tabla 3). En la figura 5 se observa que no hay diferencias en el patrón de crecimiento entre el tratamiento 1 y el control positivo, lo cual es soportado con el análisis de la prueba de *Tukey* (Tabla 3). El tratamiento 1 en conjunto con el control positivo muestra diferencias tanto con el control negativo y el tratamiento 2, lo cual indica una

reducción del crecimiento bacteriano. Esto muestra que el tratamiento 2 no fue efectivo en la reducción de bacterias (Figura 5 y Tabla 3).

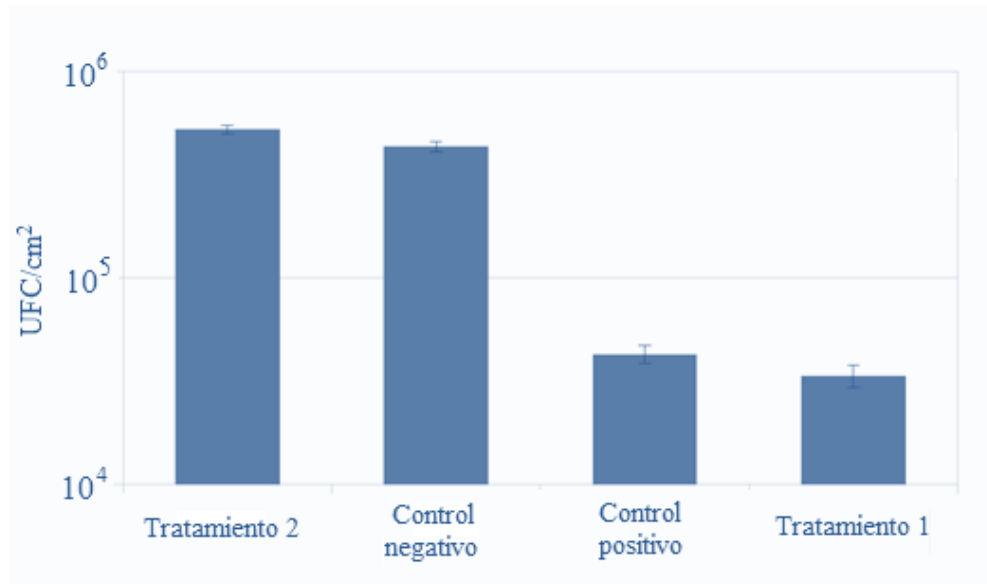


Figura 5. Crecimiento de UFC/cm² de cada tratamiento realizado en el ensayo de actividad *in vitro*. En la figura se muestra el tratamiento 1, trozos de salchicha con la cepa ECEP 14 y el bacteriófago 5Q18, el tratamiento 2 que consistió en trozos de salchicha con ECEP sin bacteriófagos, el control positivo que fue trozos de salchicha tratadas con ácido láctico 2% y el control negativo, trozos de salchicha en agua contaminada. Las barras de errores indican la desviación estándar.

Tabla 2. Análisis de varianza de un factor del ensayo de actividad lítica *in vitro*. En donde *gl* corresponde a los grados de libertad. Sig.: significancia estadística. *F*: estadístico *F*.

ANOVA de un factor					
	Suma de cuadrados	<i>gl</i>	Media cuadrática	<i>F</i>	Sig.
Entre grupos	5 934 813 891 66,667	3	197 827 129 722,222	612,643	<i>p</i> < 0,05
Dentro de grupos	2 583 260 000	8	322 907 500		
Total	596 064 649 166,667	11			

Tabla 3. Prueba *pos hoc* de Tukey del ensayo de actividad lítica *in vitro*. En donde N: número de tratamientos. Sig.: significancia estadística $p < 0,05$

Tratamientos	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
Tratamiento 1	3	33 500		
Control positivo	3	42 733,33		
Control negativo	3	432 666,67		
Tratamiento 2	3	523 666,67		
Significancia		,920	1,0	1,0

5. DISCUSIÓN

5.1. Aislamiento y caracterización del bacteriófago 5Q18

En el presente estudio se caracterizó el bacteriófago 5Q18 aislado del río Machángara que presentó una actividad lítica contra la cepa ECEP14. El bacteriófago fue aislado de focos de contaminación en donde se depositan aguas servidas provenientes de las casas cercanas al mencionado río. En particular, este río se caracteriza por una alta contaminación (Reinoso, 2015) que es la fuente más probable para encontrar bacteriófagos (Gill y Hyman, 2010). Las aguas servidas se caracterizan por la presencia de una alta cantidad de microorganismos, principalmente, por la presencia de desechos domésticos (Lamprecht et al., 2014). La existencia de bacteriófagos está relacionada estrechamente con la cantidad y presencia de sus bacterias hospederas (Orlova, 2012). En este caso, *Escherichia coli* es una de las principales bacterias presente en los focos de contaminación del río debido a que se la encuentra como habitante habitual del intestino de los animales (Murray et al., 2014). De ahí que el fago tenga la capacidad de infectar a diferentes cepas de la mencionada especie; en particular, a ECEP 14, entre otros patotipos. Estudios similares mencionan que los fagos aislados, especialmente, de aguas contaminadas son específicos para varias cepas de *E. coli* (Askora et al., 2015; Beheshti et al., 2015; Bibi, Abbas, y Rehman, 2016; Jamal et al., 2015), aunque también algunos estudios reportan el aislamiento de fagos de muestras de animales (Chibani-Chennoufi et al., 2004; Niu et al., 2014; Kulikov et al., 2014), de aguas residuales provenientes de industrias (Quiroz et al., 2016) así como de agua salada (Ferguson, Roberts, Handy, y Sharma, 20132013). Por lo que, los fagos presentan una vasta distribución en la naturaleza, principalmente asociados a focos de contaminación microbiana como son las aguas servidas, en las cuales, uno de los

principales microorganismos que puede estar presente es *E. coli*, una de las especies hospederas del fago 5Q18.

El fago 5Q18 por sus características morfológicas pertenece a la familia *Myoviridae*. Esta familia se identifica por su simetría binaria, una cápside grande icosaédrica, una cola mediana contráctil y un cuello que une la cola y la cápside (Fokine y Rossman, 2014). Varios estudios han reportado que miembros de la familia *Myoviridae* infectan a la especie *Escherichia coli* (Beheshti et al., 2015; Denou et al., 2009; Ferguson et al., 2013; Jamal et al., 2015; Kropinski et al., 2013). En el presente estudio, el fago 5Q18 presentó un amplio espectro de actividad lítica para diferentes patotipos de *E. coli* como ECEP y ECEH (datos no mostrados). Resultados similares fueron revelados por Jamal et al. (2015) y Ferguson et al. (2013), en donde aislaron bacteriófagos de la misma familia que atacan a ECEP y ECEH, respectivamente. Uno de los fagos más reportados es el fago T4 de la familia *Myoviridae*, este fago se caracteriza por tener una alta actividad lítica contra diferentes patotipos de *E. coli*; en particular, su actividad ha sido probada *in vitro* contra aislados de ECEP provenientes de pacientes con diarrea (Denou et al., 2009). Sin embargo, Quiroz et al. (2016) mencionan que algunos fagos de la familia *Myoviridae* aislados a partir de aguas residuales provenientes de una industria de procesamiento de aves también pueden infectar otras especies como *Salmonella*. Lo más característico es que los fagos de la familia fueron aislados de aguas servidas, similar al fago 5Q18; sin embargo, lo más importante es que los fagos son especie-específica. Por lo que, los fagos de la familia *Myoviridae* son específicos y capaces de infectar varias especies bacterianas dependiendo de la fuente de contaminación. En este caso el fago 5Q18 fue capaz de infectar a *E. coli*, en particular, a algunos de sus patotipos multirresistentes que al parecer constituyen uno de los patógenos más frecuentes en aguas servidas del río Machángara.

Los fagos se caracterizan por infectar de forma especie-específica (Kutter et al., 2013); esto es porque, los fagos pueden reconocer receptores específicos presentes en la membrana celular o los flagelos bacterianos (Fokine y Rosman, 2014). La familia *Myoviridae* posee seis fibras en su cola, las cuales interactúan irreversiblemente con los lipopolisacáridos (LPS) o porinas (Mahony y van Sinderen, 2012). En particular, el fago T4 reconoce a los receptores presentes es el LPS o a la porina OmpC en bacterias Gram negativas (Rakuba, Kolomiets, Szwajcer y Novik, 2010). Otro ejemplo es el fago AR1 que reconoce los receptores R1, R3 y R4 del lipopolisacárido bacteriano (Liao et al., 2011). Sin embargo, miembros de la familia *Myoviridae* no son los únicos que pueden causar lisis a *E. coli*, varias investigaciones han detectado a miembros de la familia *Siphoviridae* que infectan a diferentes patotipos como ECEH ECET, ECEI, ECEA (Bourdin et al., 2014), ECEP (Bourdin et al., 2014; Tomat et al., 2013) y STEC (Tomat et al., 2013). Por ejemplo, el fago SPP1 interactúa irreversiblemente con el receptor proteico YueB mediante los Rbp's de la punta de su cola (Mahony y van Sinderen, 2012). Bacteriófagos de otras familias interactúan de forma diferente con la especie, por ejemplo, el fago N4 de la familia *Podoviridae* reconoce el receptor NfrA de la membrana externa de *E. coli* mediante la proteína de su cola, gp65 (McPartland y Rothman-Denes, 2009). Por todo lo mencionado, la familia *Myoviridae* así como otras familias del orden *Caudovirales* se caracterizan por su especificidad en el reconocimiento de receptores celulares de la especie *E. coli*. Por lo que, los receptores que pueda reconocer el fago 5Q18 pueden ser específicos, los mismos que se encuentran a nivel de LPS o de las porinas de *E. coli*, afectando a cepas bacterianas que presentan resistencia antibiótica o no y sin importar su patrón de virulencia.

La mayoría de los miembros de familia a la cual pertenece el fago 5Q18 se caracterizan por ser líticos (Fokine y Rossmann, 2014), aspecto de vital importancia para la fagoterapia (Gill y Hyman, 2010). Sin embargo, hay que considerar la posibilidad de que el fago presente resistencia. De acuerdo a la cinética de lisis, el bacteriófago 5Q18 afectó el crecimiento de la cepa ECEP 14, aunque el patrón de lisis varió en los últimos 30 minutos en donde se notó un ligero incremento de la población bacteriana. Una posible resistencia de *Escherichia coli* ha sido evidenciada en varios estudios. La reducción del crecimiento bacteriano fue reportado a las diez, doce y dieciséis primeras horas en presencia de fagos de la familia *Myoviridae* como MJ1, ST79 y P.E₁, respectivamente; después, se dio un incremento gradual en la población bacteriana (Jamal et al., 2015, Kulsuwan, Wongratanacheewin, Wongratanacheewin, Yordpratum, y Ttawasart, 2014 y Bibi et al., 2016). Esta fase de declive puede deberse a diferentes factores como el desarrollo de resistencia al fago o la naturaleza lisogénica del mismo (Gutiérrez et al., 2010).

La resistencia bacteriana hacia los fagos puede ser debido a varios factores como la variación de los receptores, infección abortiva (Labrie et al., 2010) o la modificación del sistema de restricción intracelular (Kulsuwan et al., 2014; Labrie et al., 2010). Algunas bacterias pueden modificar o perder los receptores necesarios para la adsorción de los fagos, como las proteínas de membrana Omps (Hyman y Abedon, 2010). Por ejemplo, si la bacteria pierde la porina OmpC, el fago T4 no puede continuar con la infección lítica (Rakuba et al., 2010). En la infección abortiva en cambio, existe una exclusión del bacteriófago antes de la maduración del mismo, generándose una muerte tanto en el hospedero como en el fago (Hyman y Abedon, 2010; Labrie et al., 2010) pero las bacterias que quedan generan resistencia a infecciones futuras, eso explicaría el incremento de la población bacteriana. Por otro lado, la resistencia encontrada puede deberse al sistema de

repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas (CRISPR, por sus siglas en inglés) presente en *E. coli* (Horvath y Barrangou, 2010; Labrie et al., 2010). Autores como Yang, Chen, Huang, Huang, y Tseng (2014) mostraron que un incremento en la expresión del ARNm de los genes *cas* pueden ser los responsables de que la bacteria genere una resistencia a la infección del fago. Los genes *cas* codifican proteínas requeridas para la formación del complejo CRISPR en presencia de glucosa. El sistema CRISPR se caracteriza por reconocer sitios específicos en donde las nucleasas actúan para degradar virus extraños (Horvath y Barrangou, 2010).

Por otro lado, la naturaleza lisogénica del fago puede interferir en la cinética de lisis como lo reporta Gutiérrez et al. (2010), en donde la aplicación de dos fagos temperados no condujo a la lisis total de la bacteria, mientras que, un solo fago lítico causó la reducción total de microorganismos viables. A diferencia del fago 5Q18, el control positivo exhibe un declive total de crecimiento luego de la fase exponencial. Resultados similares fueron encontrados por los estudios de Jamal et al., (2015) y Kutter et al. (2011), en donde bacteriófagos de la familia *Myoviridae* interrumpieron el crecimiento bacteriano desde principios de la fase exponencial hasta la caída total de crecimiento. Askora et al. (2015) y Budiarti et al. (2011), reportaron a los fagos ϕ ZE1 y FB4, pertenecientes a la familia *Siphoviridae* con una cinética de lisis similar. Esto indica que el fago 5Q5 muestra un patrón de actividad lítica eficiente a diferencia del 5Q18 en donde puede estar actuando el sistema inmune (sistema CRISPR) de la bacteria o su posible naturaleza lisogénica. Por todo esto, el estudio de la cinética de lisis permite tener indicios importantes acerca del comportamiento de los bacteriófagos, información que es relevante para su uso en fagoterapia.

El bacteriófago 5Q18 posee un rango de lisis que puede afectar a la flora comensal, en particular, *Escherichia coli*. Esta característica del fago puede dar resultados adversos en fagoterapia, ya que como sugiere Gill y Hyman (2010), el rango de hospederos del fago debe ser limitado. Un ejemplo es el fago P.E₁, el cual puede infectar aislados clínicos de *E. coli* pero no es capaz de infectar otros géneros, por lo que es un candidato predilecto para ser usado en fagoterapia (Bibi et al., 2016). Sin embargo, este hallazgo puede resultar de vital importancia en el campo de la investigación y la biotecnología, ya que permite la replicación de bacteriófagos en cepas comensales. Al replicar al bacteriófago en células comensales se evitará los riesgos que implica trabajar con bacterias patógenas a gran escala. Sin embargo, Bourdin et al. (2014) hacen hincapié en la necesidad de reevaluar la actividad lítica luego de la replicación de progenies virales en huéspedes no patógenos. Esto sugiere que el fago 5Q18 puede involucrarse en el biocontrol de patógenos, especialmente, en la industria debido a que posee un amplio rango de lisis en diferentes cepas de *E. coli* y puede ser replicado masivamente en cepas comensales.

5.2. Protocolo de caracterización del bacteriófago

La microscopía de transmisión electrónica es una de las herramientas más usadas para la caracterización morfológica de bacteriófagos (Ackermann, 2012). Esta técnica constituye uno de los primeros pasos para la clasificación de los bacteriófagos, la misma que permite inferir sobre la naturaleza del material genético viral (Ackermann, 2012; Aprea, D'Angelo, Annunziata, y Migliorati, 2015). Por ejemplo, la morfología de la cola da información sobre si el material genético es de ADN o ARN. Los fagos con cola se caracterizan por tener ADN de doble cadena; mientras que, los que carecen de cola poseen un material genético de ARN o ADN de simple cadena (Aprea et al., 2015). En varios estudios, la técnica ha sido usada mediante la tinción negativa con uranil acetato 2%,

tinción que se caracteriza por su simpleza y rápida preparación de la muestra (Ackermann, 2012). Todos esos estudios utilizaron la técnica para inferir la familia del fago debido a las características morfológicas (Bardina et al., 2012; Budiarti et al., 2011; Gutiérrez et al., 2010; Jamal et al., 2015; Kutter et al., 2011). Por tanto, esta técnica es una herramienta muy importante en la caracterización de los fagos y lo más importante, está disponible en el país. Gracias a esta técnica se pudo determinar que el fago pertenece a la familia *Myoviridae* y que su ADN es de doble cadena por la presencia de una cápside icosaédrica, cola mediana contráctil y un cuello que une la cápside con la cola.

La pureza de los bacteriófagos recae sobre la aplicación futura que se pretende dar al fago (Kutter et al., 2013). En el caso de la fagoterapia, Gill y Hyman (2010) explican que necesariamente el fago debe ser purificado ya que será usado posteriormente en parches intradérmicos, soluciones orales o inyectables. En el presente estudio, el protocolo utilizado para la purificación del fago permitió obtener ADN del bacteriófago, aunque se detectó contaminación proteica y de compuestos propios de la purificación. Esto puede ser resultado de la presencia de residuos que no fueron eliminados en el proceso, como cloroformo, tiocianato de guanidina, DEAE-Sepharose y otros compuestos utilizados en la purificación del ADN del fago (Oslizlo et al., 2011). A diferencia de otros estudios en los que se han empleado protocolos de purificación con técnicas físico-químicas más avanzadas para obtener ADN de bacteriófagos; por ejemplo, la cromatografía por afinidad (Oslizlo et al., 2011) y la ultracentrifugación en Cloruro de cesio (CsCl) (Boulanger, 2009) con previa precipitación en Polietilenglicol (PEG) (Gutiérrez et al., 2011). Lo cual demuestra la importancia de equipos de última tecnología para la obtención de resultados consistentes y de mayor rendimiento. Sin embargo, con la metodología utilizada se puede

llegar a definir el fago por su morfología, lo cual permite que la investigación en el campo de los bacteriófagos continúe con mayor firmeza.

La caracterización genética es un pilar de vital importancia para determinar si un bacteriófago puede involucrarse en fagoterapia (Gill y Hymann, 2010). La caracterización a nivel molecular permite discernir fagos líticos de aquellos lisogénicos y de otros portadores de genes de resistencia y virulencia (Liao et al., 2011). En el presente estudio se realizó una digestión enzimática con la enzima de restricción *XbaI* que reconoce la secuencias 5' T↓CTAGA 3' (Promega, 2011). De acuerdo a los resultados no se aprecia un patrón de restricción en el fago 5Q18 ni en el plásmido pBluescriptR que se usó como un modelo de corte enzimático, esto puede deberse a varias razones. Este fenómeno puede corresponder a la resistencia a la restricción por parte del fago debido a la presencia de bases hipermodificadas, como la hidroximetilcitosina (hmC) o la hmC glicosilada, en el ADN viral (Kulikov et al., 2014) o por la adquisición de genes que codifican enzimas que alteran el ADN, como los genes *Dam* y *Dcm* que codifican metiltransferasas (Kęsik-Szeloch et al., 2013). Por ejemplo, el fago T4 se caracteriza por tener las bases modificadas lo que le permite proteger su ADN de la degradación cuando infecta a *Escherichia coli* (Snyder et al., 2013). Otro factor que puede estar involucrado es la variación o inexistencia de la secuencia de reconocimiento de la enzima tanto en el fago como en plásmido pBluescriptR (Piekarowicz et al., 2014). Por último, la presencia de compuestos contaminantes que no se eliminaron en la purificación de ADN pudo haber interferido con la actividad enzimática, muchos de los compuestos contaminantes pueden haber generado la inactivación de la enzima de restricción (Shikara, 2010). Por ejemplo, se ha reportado que la enzima *SacCI* disminuye su actividad bajo la presencia de compuestos como sodio dodecil sulfato, urea, H₂O₂, entre otros (Shikara, 2010); sin embargo, no se han encontrado

reportes en cuanto a la enzima *Xba*I. No obstante, la restricción enzimática es sólo uno de los pasos para la caracterización genética.

El análisis del genoma completo de algunos bacteriófagos mediante secuenciación da información sobre la naturaleza genómica. La secuenciación es importante para determinar sus marcos abiertos de lectura (ORF's, por sus siglas en inglés) (Kulikov et al., 2014); en particular, la presencia de genes que participan en la lisogenia, virulencia y resistencia antibiótica (Gill y Hyman, 2010). Varios estudios han secuenciado el genoma de diferentes fagos para conocer su naturaleza (Kulikov et al., 2014; Denou et al., 2009; Liao et al., 2011). Por ejemplo, fagos de la familia *Myoviridae* como el T4 que infecta un amplio rango de patotipos de *E. coli* y AR1 que infecta a *E. coli* O157:H7 (Liao et al., 2011) así también como el fago 9g de la familia *Siphoviridae* (Kulikov et al., 2014). En el presente estudio no se realizó una caracterización genética completa, por lo que se desconoce si el fago es totalmente lítico o puede entrar en lisogenia, para lo cual es necesaria la secuenciación total del genoma del fago 5Q18. No obstante, pocos estudios han reportado que miembros de la familia *Myoviridae* tienen una fase lisogénica, como el fago LBR48 (Jang, Yoon, y Chang, 2011). En fagoterapia, la posibilidad de que el fago se integre en el cromosoma bacteriano es una preocupación, principalmente, por la potencial transferencia de factores de virulencia o resistencia hacia la bacteria, causando infecciones de mayor complejidad (Kutter et al., 2013).

Los fagos una vez que son aislados son probados para ver su efectividad tanto *in vitro* como *in vivo*. En el presente estudio, el ensayo *in vitro* demuestra la capacidad del fago 5Q18 para reducir el crecimiento de ECEP sobre una superficie alimenticia a diferencia del tratamiento dos en donde el crecimiento bacteriano fue mayor. La lisis causada por el fago 5Q18 resultó ser mayor que la causada por el ácido láctico, el cual es

utilizado en la industria alimenticia para reducir el crecimiento bacteriano. Diferentes estudios han evaluado y confirmado la actividad lítica de bacteriófagos contra varias especies patógenas como *Escherichia coli* (Anany, Chen, Pelton, y Griffiths, 2011; Denou et al., 2009), *Listeria monocytogenes* (Guenther, Huwyler, Richard, y Loessner, 2009) y *Salmonella* Enteritidis (Bao et al., 2015) tanto en productos listos para consumo (Guenther et al., 2009) como productos sin procesar (Bao et al., 2015). En contraste, también estudios *in vivo* en gallinas se han realizado con éxito (Bielke et al., 2007), probando la efectividad de *cocktails* de fagos contra *Salmonella* spp. y *Campylobacter*, spp. (Kitler et al., 2013). Esto revela la posibilidad de utilizar los fagos en el biocontrol de patógenos en comidas preparadas y animales de consumo y próximamente en la fagoterapia para combatir infecciones multirresistentes en humanos. Esto manifiesta que, aunque no se tenga una caracterización completa del fago 5Q18 se puede inferir por sus características bactericidas que puede ser útil a nivel de biocontrol. En particular, el fago puede ser un sustituto del ácido láctico en la industria alimenticia.

6. CONCLUSIONES

- La caracterización del bacteriófago 5Q18 permitió clasificarlo como miembro de la familia *Myoviridae* perteneciente al orden *Caudovirales*. Además, el fago 5Q18, presente en aguas servidas del río Machángara, se caracterizó por ser especie-específica con un amplio rango para infectar diferentes cepas de *Escherichia coli*.
- La microscopía de transmisión electrónica fue de vital importancia para la caracterización morfológica del fago 5Q18. Además, esta metodología permitió inferir sobre el tipo de ADN del fago así como de su tamaño. Esta es una metodología que está disponible en el país, por lo que permite realizar estudios en el campo de la virología, en particular, para la caracterización de bacteriófagos.
- A nivel genotípico no fue posible obtener una caracterización. Por lo que, el protocolo para la caracterización genotípica de bacteriófagos aún necesita de una constante evaluación, sin embargo, los resultados obtenidos en el presente estudio representan un primer avance para futuros estudios relacionados.
- Por las características que presenta el fago se lo puede considerar como un agente biocontrolador de *E. coli* enteropatógena multirresistente. En particular, el fago 5Q18 podría ser tomado en consideración para el biocontrol en la industria alimenticia, mas no para fagoterapia aún. Esto se debe principalmente porque no se realizó la secuenciación de su genoma y porque el fago también afectó a cepas comensales.
- El uso de bacteriófagos como una alternativa a los antibióticos convencionales resulta primordial en los inicios de la era post-antibiótica. Especialmente, en el ámbito del biocontrol de patógenos en la industria alimenticia y ganadera en donde se usa indiscriminadamente los antibióticos, promoviendo la aparición de patógenos multirresistentes.

7. RECOMENDACIONES

- Se recomienda ampliar la investigación en cuanto a la purificación de ADN de bacteriófagos mediante la aplicación de nuevos protocolos y la adquisición de nuevas tecnologías que permitan la obtención de una mejor calidad de ADN. Esto es porque el protocolo realizado en el presente estudio se obtuvo una calidad de ADN que no permite el posterior desarrollo de la secuenciación total del genoma del bacteriófago.
- Además se recomienda el uso de diferentes enzimas de restricción para evaluar el patrón de restricción que pueda generar el fago.
- Para el desarrollo de biocontrol con el fago 5Q18 se recomienda realizar ensayos de la estabilidad del fago a diferentes condiciones de temperatura y pH; además, de realizar pruebas *in vivo* con un número elevado de bacteriófagos o combinar varios fagos en los denominados “*cocktails*” en animales infectados con bacterias patógenas.
- Para conocer si el fago es apto para la fagoterapia es importante secuenciar el genoma total del fago. De esta forma se podrá conocer si el fago 5Q18 es portador de genes relacionados con la lisogenia, genes de virulencia o de resistencia a los antibióticos.
- En base al presente estudio se recomienda buscar bacteriófagos de diferentes fuentes con el fin de usarlos en diferentes campos de la fagoterapia como una alternativa al uso de antibióticos.
- Finalmente, se recomienda probar la actividad lítica del fago con otras bacterias patógenas multirresistentes de importancia.

8. REFERENCIAS

- Abedon, S., Kuhl, S., Blasdel, B., y Kutter, E. (2011). Phage treatment of human infections. *Bacteriophage*, 1(2), 66-85. doi: 10.4161/bact.1.2.15845
- Ackermann, H. (2006). Classification of bacteriophages. En R. Calendar (Ed.), *The Bacteriophages* (2nd Ed., pp. 8-16). ISBN: 9780195148503
- Ackermann, H. (2012). Bacteriophage electron microscopy. En M. Lobočka y W. Szybalski (Eds.), *Advances in Virus Research, Vol. 82: Bacteriophages, Part B*. (pp.1-32). Reino Unido: London Academic Press.
- Alekshun, M., y Levy, S. (2007). Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance, *Cell*, 128(6), 1037-1050. doi: 10.1016/j.cell.2007.03.004
- Allocati, N., Masulli, M., Alexeyev, M., y Di Ilio, C. (2013). *Escherichia coli* in Europe: An Overview. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10(12), 6235-6254. doi: 10.3390/ijerph10126235
- Anany, H., Chen, W., Pelton, R., y Griffiths, M. (2011). Biocontrol of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in Meat by Using Phages Immobilized on Modified Cellulose Membranes. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(18), 6379–6387. doi: 10.1128/AEM.05493-11
- Apra, G., D'Angelo, A., Annunziata, V., y Migliorati, G. (2015). Bacteriophage Morphological Characterization by Using Transmission Electron Microscopy. *Journal of Life Sciences*, 9, 214-220. doi: 10.17265/1934-7391/2015.05.004

- Askora, A., Merwad, A., Gharieb, R. M., y Maysa, A. I. A. (2015). A lytic bacteriophage as a biocontrol for some enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains of zoonotic risk in Egypt. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 166(3-4), 76-83. Recuperado de http://www.revmedvet.com/2015/RMV166_76_83.pdf
- Atterbury, R. J., Van Bergen, M. A. P., Ortiz, F., Lovell, M. A., Harris, J. A., De Boer, A., ... Barrow, P. (2007). Bacteriophage Therapy to Reduce *Salmonella* Colonization of Broiler Chickens. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(14), 4543–4549. doi:10.1128/AEM.00049-07
- Bajaj, P., Singh, N., y Viridi, J. (2016). *Escherichia coli* Lactamases: What Really Matters. *Frontiers in Microbiology*, 7. 1-14. doi: 10.3389/fmicb.2016.00417
- Bao, H., Zhang, P., Zhang, H., Zhou, Y., Zhang, L., y Wang, R. (2015). Bio-Control of *Salmonella* Enteritidis in Foods Using Bacteriophages. *Viruses*, 7(8), 4836-4853. doi: 10.3390/v7082847
- Bardina, C., Spricigo, D., Cortés, P., y Llagostera, M. (2012). Significance of the Bacteriophage Treatment Schedule in Reducing *Salmonella* Colonization of Poultry. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(18), 6600–6607. doi: 10.1128/AEM.01257-12
- Barriere, S. (2015). Clinical, economic and societal impact of antibiotic resistance. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 16(2), 151-153. doi: 10.1517/14656566.2015.983077
- Bayas, R. (2011). *Temporal Changes in Prevalence of Escherichia coli Pathotypes in Remote Communities of Ecuador* (Tesis de maestría, Universidad San Francisco de Quito). Recuperado de

<http://repositorio.usfq.edu.ec/browse?type=author&value=Bayas+Rea%2C+Rosa+de+los+Angeles>

Beheshti, K., Soleimani, D., y Salmanizadeh, S. (2015). Isolation and Identification of two Novel *Escherichia coli* Bacteriophages and their Application in Wastewater Treatment and Coliform's phage Therapy. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 8(3), 1-6. doi: 10.5812/jjm.14945

Bernatová, S., Samek, O., Pilát, Z., Šerý, M., Ježek, J., Jákl, P., ... y Růžička, F. (2013). Following the Mechanisms of Bacteriostatic versus Bactericidal Action Using Raman Spectroscopy. *Molecules*, 18(11), 13188-13199. doi: 10.3390/molecules181113188

Bhavnani, D., Bayas, R., Lopez, V., Zhang, L., Trueba, G., Foxman, B., ... Eisenberg, J. (2016). Distribution of Enteroinvasive and Enterotoxigenic *Escherichia coli* Across Space and Time in Northwestern Ecuador. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 94(2), 276-84. doi: 10.4269/ajtmh.14-0337

Bibi, Z., Abbas, Z., y Rehman, S. (2016). The phage P.E₁ isolated from hospital sewage reduces the growth of *Escherichia coli*. *Biocontrol Science and Technology*, 26(2), 181–188. doi: 10.1080/09583157.2015.1086311

Bielke, L., Higgins, S., Donoghue, A., Donoghue, D., Hargis, M., y Tellez, G. (2007). Use of Wide-Host-Range Bacteriophages to Reduce *Salmonella* on Poultry Products. *International Journal of Poultry Science*, 6(10), 754-757. Recuperado de <http://free-journal.umm.ac.id/files/file/Use%20of%20Wide-Host-Range%20Bacteriophages.pdf>

- Black, R., Cousens, S., Johnson, H., Lawn, J., Rudan, I., Bassani, D., ... y Mathers, C. (2010). Global, regional, and national causes of child mortality in 2008: a systematic analysis. *The Lancet*, 375(9730), 1969-1987. doi: 10.1016/S0140-6736(10)60549-1
- Blair, J., Webber, M., Baylay, A., Ogbolu, D., y Piddock, L. (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 13(1), 42–51. doi: 10.1038/nrmicro3380
- Blanco, P., Hernando-Amado, S., Reales-Calderon, J., Corona, F., Lira, F., Alcalde-Rico, M., ... y Martinez, J. (2016). Bacterial Multidrug Efflux Pumps: Much More Than Antibiotic Resistance Determinants. *Microorganisms*, 4(14), 2-19. doi: 10.3390/microorganisms4010014
- Boerlin, P., y White, D. (2013). Antimicrobial Resistance and Its Epidemiology. En S. Giguère, J. Prescott, y P. Dowling. (Eds.), *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine* (5th Ed., pp. 21-40). Recuperado de http://samples.sainsburysebooks.co.uk/9781118675106_sample_414478.pdf
- Boulangier, P. (2009). Purification of Bacteriophages and SDS-PAGE Analysis of Phage Structural Proteins from Ghost Particles. *Methods in Molecular Biology*, 502(1), 227-238. doi: 10.1007/978-1-60327-565-1_13
- Bourdin, G., Navarro, A., Sarker, S., Pittet, A., Qadri, F., Sultana, S., ... Brüssow, H. (2014). Coverage of diarrhoea-associated *Escherichia coli* isolates from different origins with two types of phage cocktails. *Microbial Biotechnology*, 7(2), 165–176. doi: 10.1111/1751-7915.12113

- Bray, J. (1945). Isolation of antigenically homogeneous strains of *Bact. coli neapolitanum* from summer diarrhoea of infants. *The Journal of Pathology and Bacteriology*, 57(2), 239–247. doi: 10.1002/path.1700570210
- Budiarti, S., Hidayati, R., y Rusmana, I. (2011). Infectivity of lytic Phage to Enteropathogenic *Escherichia coli* from Diarrheal Patients in Indonesia. *Journal of US-China Medical Science*, 8(5), 273-282. Recuperado de <http://www.davidpublishing.com/davidpublishing/Upfile/3/31/2012/2012033105936342.pdf>
- Camilleri, M., y Murray, J. (2012). Diarrea y estreñimiento. En D. Longo, A. Fauci, D. Kasper, S. Hauser, L. Jameson, y J. Loscalzo (Eds.), *Harrison. Principios de Medicina Interna* (18^{va} Ed., pp. 308-319). ISBN 978-607-15-0727-3
- Capparelli, R., Nocerino, N., Iannaccone, M., Ercolini, D., Parlato, M., Chiara, M., y Iannelli, D. (2010). Bacteriophage Therapy of *Salmonella enterica*: A Fresh Appraisal of Bacteriophage Therapy. *The Journal of Infectious Diseases*, 201(1), 52–61. doi: 10.1086/648478
- Connor, B. (2013). Chronic Diarrhea in Travelers. *Current Infectious Disease Reports*, 15(3), 203-210. doi: 10.1007/s11908-013-0328-2
- Chan, B., Abedon, S., y Loc-Carrillo, C. (2013). Phage cocktails and the future of phage therapy. *Future Microbiology*, 8(6), 769–783. doi:10.2217/fmb.13.47
- Chellat, M., Raguž, L., y Riedl, R. (2016). Targeting Antibiotic Resistance. *Angewandte Chemie International Edition*, 55, 6600-6626. doi: 10.1002/anie.201506818

- Chibani-Chennoufi, S., Sidoti, J., Bruttin, A., Dillmann, M., Kutter, E., Qadri, F., ...
Brüssow, H. (2004). Isolation of *Escherichia coli* Bacteriophages from the Stool of
Pediatric Diarrhea Patients in Bangladesh. *Journal of Bacteriology*, 186(24), 8287–
8294. doi: 10.1128/JB.186.24.8287-8294.2004
- Chhibber, S., y Kumari, S. (2008). Application of Therapeutic Phages in Medicine. En I.
Kurboke (Ed.), *Bacteriophages* (pp. 953-978). doi: 10.5772/34296
- Clinical and Laboratory Standards Institute [CLSI]. (2015). *Performance Standards for
Antimicrobial Susceptibility Testing. Twenty-Fifth Informational Supplement*.
Pennsylvania: CLSI.
- Croxen, M., y Finlay, B. (2010). Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity.
Nature Reviews Microbiology, 8(1), 26-38. doi: 10.1038/nrmicro2265
- Croxen, M., Law, R., Scholz, R., Keeney, K., Wlodarska, M., y Finlay, B. (2013). Recent
advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical
Microbiology Reviews*, 26(4), 822-830. doi: 10.1128/CMR.00022-13
- Davies, J., y Davies, D. (2010). Origins and Evolution of Antibiotic Resistance.
Microbiology and Molecular Biology Reviews, 74(3), 417–433.
doi:10.1128/MMBR.00016-10
- Debabov, D. (2013). Antibiotic Resistance: Origins, Mechanisms, Approaches to Counter.
Applied Biochemistry and Microbiology, 49(8), 665–671. doi:
10.1134/S0003683813080024

- Denou, E., Bruttin, A., Barretto, C., Ngom-Bru, C., Brüssow, H., y Zuber, S. (2009). T4 phages against *Escherichia coli* diarrhea: Potential and problems. *Virology*, 388(1), 21–30. doi: 10.1016/j.virol.2009.03.009
- Fenton, M., Ross, P., McAuliffe, O., O'Mahony, J., y Coffey, A. (2010). Recombinant bacteriophage lysins as antibacterials. *Bioengineered Bugs*, 1(1), 9-16. doi: 10.4161/bbug.1.1.9818
- Ferguson, S., Roberts, C., Handy, E., y Sharma, M. (2013) Lytic bacteriophages reduce *Escherichia coli* O157. *Bacteriophage*, 3(1), e24323. doi: 10.4161/ bact.24323
- Finley, R., Collignon, P., Larsson, D., McEwen, S., Li, Z., Gaze, W., ... Topp, E. (2013). The scourge of antibiotic resistance: the important role of the environment. *Clinical Infectious Diseases*, 57(5), 704-710. doi: 10.1093/cid/cit355
- Flannery, E. (2011). *Contribution of Horizontal Gene Transfer to Virulence and Antibiotic Resistance in Pathogens Transmitted in Healthcare Facilities* (Tesis de doctorado, Universidad de Michigan). Recuperado de https://deepblue.lib.umich.edu/bitstream/handle/2027.42/86421/eflanner_1.pdf?sequence=1
- Fokine, A., y Rossmann, M. (2014). Molecular architecture of tailed double-stranded DNA phages. *Bacteriophage*, 4(2), 1-22. doi: 10.4161/bact.28281
- Garcia, P., Silva, V., y Diniz, C. (2011). Occurrence and Antimicrobial Drug Susceptibility Patterns of Commensal and Diarrheagenic *Escherichia coli* in Fecal Microbiota from Children with and without Acute Diarrhea. *The Journal of Microbiology*, 49(1), 46–52. doi: 10.1007/s12275-011-0172-8

- Gill, J., y Hyman, P. (2010). Phage Choice, Isolation, and Preparation for Phage Therapy. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 11(1), 2-14. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20214604>
- Gómez-Duarte, O. (2014). Enfermedad diarreica aguda por *Escherichia coli* Enteropatógena en Colombia. *Revista chilena de infectología*, 31(5), 577-586. doi: 10.4067/S0716-10182014000500010
- Gomes, T., y González-Pedrajo, B. (2010). Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC). En A. Torres (Ed.), *Pathogenic Escherichia coli in Latin America* (pp. 25-47). doi: 10.2174/97816080519221100101
- Goodridge, L., y Bisha, B. (2011). Phage-based biocontrol strategies to reduce foodborne pathogens in foods. *Bacteriophage*, 1(3), 130-137. doi: 10.4161/bact.1.3.17629
- Guan, X., Xue, X., Liu, Y., Wang, J., Wang, Y., Wang, J., ... Pan, L. (2013). Plasmid-mediated quinolone resistance-current knowledge and future perspectives. *Journal of International Medical Research*, 0, 1-12. doi: 10.1177/0300060513475965
- Guenther, S., Huwyler, D., Richard, S., y Loessner, M. (2009). Virulent Bacteriophage for Efficient Biocontrol of *Listeria monocytogenes* in Ready-To-Eat Foods. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(1), 93–100. doi: 10.1128/AEM.01711-08
- Guth, B., Picheth, C., y Gomes, T. (2010). *Escherichia coli* Situation in Brazil. En A. Torres (Ed.), *Pathogenic Escherichia coli in Latin America* (pp. 162-178). doi: 10.2174/97816080519221100101

- Gutiérrez, D., Martínez, B., Rodríguez, A., y García, P. (2010). Isolation and Characterization of Bacteriophages Infecting *Staphylococcus epidermidis*. *Current Microbiology*, 61(6), 601–608. doi: 10.1007/s00284-010-9659-5
- Gutiérrez, D., Martín-Platero, A., Rodríguez, A., Martínez-Bueno, M., García P., y Martínez, B. (2011). Typing of bacteriophages by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD)-PCR to assess genetic diversity. *FEMS Microbiology Letters*, 322(1), 90-97. doi: 10.1111/j.1574-6968.2011.02342.x
- Harbottle, H., Thakur, S., Zhao, S., y White, D. (2006). Genetics of Antimicrobial Resistance. *Animal Biotechnology*, 12(2), 111-124. doi: 10.1080/10495390600957092
- Heidary, M., Momtaz, H., y Madani, M. (2014). Characterization of Diarrheagenic Antimicrobial Resistant *Escherichia coli* Isolated From Pediatric Patients in Tehran, Iran. *Iranian Red Crescent Medical Journal*, 16(4), e12329. doi: 10.5812/ircmj.12329
- Hodges, K., y Gill, R. (2010). Infectious diarrhea: Cellular and molecular mechanisms. *Gut Microbes*, 1(1), 4–21. doi: 10.4161/gmic.1.1.11036
- Hooton, S., Atterbury, R., y Connerton, I. (2011). Application of a bacteriophage cocktail to reduce *Salmonella Typhimurium* U288 contamination on pig skin. *International Journal of Food Microbiology*, 151(2), 157–163. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2013.05.009
- Horvath, P., y Barrangou, R. (2010). CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science*, 327(5962), 167-170. doi: 10.1126/science.1179555. Hyman, P., y

- Abedon, S. (2010). Bacteriophage Host Range and Bacterial Resistance. *Advances in Applied Microbiology*, 70(1), 217-248. doi: 10.1016/S0065-2164(10)70007-1
- IBM Corp. (2015). *IBM SPSS Statistics for Windows, Version 23.0*. Estados Unidos: IBM Corp.
- International Committee on Taxonomy of Virus [ICTV]. (2015). *Virus Taxonomy: 2015 Release*. Recuperado de <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>
- Iredell, J., Brown, J., y Tagg, K. (2015). Antibiotic resistance in *Enterobacteriaceae*: mechanisms and clinical implications. *BMJ*, 351(h:6420), 1-19. doi: 10.1136/bmj.h6420
- Jafari, A., Aslani, M., y Bouzari, S. (2012). *Escherichia coli*: a brief review of diarrheagenic pathotypes and their role in diarrheal diseases in Iran. *Iranian Journal of Microbiology*, 4(3), 102–117. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3465535/pdf/IJM-4-102.pdf>
- Jamal, M., Hussain, T., Rajanna, C., y Andleed, S. (2015). Isolation and Characterization of a *Myoviridae* Mj1 bacteriophage against multi-drug resistant *Escherichia coli* 3. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 8(11), e25917. doi: 10.5812/jjm.25917
- Jamalludeen, N., Johnson, R., Shewen, P., y Gyles, C. (2009). Evaluation of bacteriophages for prevention and treatment of diarrhea due to experimental enterotoxigenic *Escherichia coli* 0149 infection of pigs. *Veterinary Microbiology*, 136(1-2), 135-141. doi: 10.1016/j.vetmic.2008.10.021

- Janež, N., y Loc-Carrillo, C. (2013). Use of phages to control *Campylobacter* spp. *Journal of Microbiological Methods*, 95(1), 68–75. doi: 10.1016/j.mimet.2013.06.024
- Jang, H., Yoon, B., y Chang, H. (2011). Complete nucleotide sequence of the temperate bacteriophage LBR48, a new member of the family *Myoviridae*. *Virology*, 156(2), 319-322. doi: 10.1007/s00705-010-0841-7
- Kandakai-Olukemi, Y., Mawak, J., y Onojo, M. (2009). Isolation of Enteropathogenic *Escherichia coli* from Children with Diarrhoea Attending the National Hospital in Abuja, Nigeria. *Shiraz E-Medical Journal*, 10(3), 99-106. Recuperado de <http://hdl.handle.net/123456789/451>
- Keary, R., McAuliffe, O., Ross, P., Hill, C., O'Mahony, J., y Coffey, A. (2013). Bacteriophages and their endolysins for control of pathogenic bacteria. En A. Méndez-Vilas. (Ed.), *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education* (pp. 1028-1040). Recuperado de <http://www.formatex.info/microbiology4/vol2/1028-1040.pdf>
- Kęsik-Szeloch, A., Drulis-Kawa, Z., Weber-Dąbrowska, B., Kassner, J., Majkowska-Skrobek, G., ... Kropinski, D. (2013). Characterising the biology of novel lytic bacteriophages infecting multidrug resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Virology Journal*, 10(100), 1-12. doi: 10.1186/1743-422X-10-100
- Kim, E., y Hooper, D. (2014). Clinical Importance and Epidemiology of Quinolone Resistance. *Infection and Chemotherapy*, 46(4), 226-238. doi: 10.3947/ic.2014.46.4.226

- Kittler, S., Fischer, S., Abdulmawjood, A., Glünder, G., y Klein, G. (2014). Colonisation of a Phage Susceptible *Campylobacter jejuni* Population in Two Phage Positive Broiler Flocks. *PLoS One*, 9(4), e94782. doi: 10.1371/journal.pone.0094782
- Kocsis, B., y Szabó, D. (2013). Antibiotic resistance mechanisms in *Enterobacteriaceae*. En A. Méndez-Vilas (Ed.), *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education* (pp. 251-257). ISBN: 978-84-939843-9-7
- Kohanski, M., Dwyer, D., y Collins, J. (2010). How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nature Reviews Microbiology*, 8(6), 423-35. doi: 10.1038/nrmicro2333
- Kong, F., Schneper, L., y Mathee, K. (2010). Beta-lactam antibiotics: from antibiosis to resistance and bacteriology. *APMIS*, 118(1), 1-36. doi: 10.1111/j.1600-0463.2009.02563.x
- Krebs, J., Goldstein, E., y Kilpatrick, S. (2014). *Lewin's genes XI* (11^{va} Ed.). Estados Unidos: Jones and Barlett.
- Kropinski, A., Waddell, T., Meng, J., Franklin, K., Ackermann, H., Ahmed, R., ... Johnson, R. (2013). The host-range, genomics and proteomics of *Escherichia coli* O157:H7 bacteriophage rV5. *Virology Journal* 2013, 10(76), 1-12. doi: 10.1186/1743-422X-10-76
- Kulikov, E., Golomidova, A., Letarova, M., Kostryukova, E., Zelenin, A., Prokhorov, N., y Letarov, A. (2014). Genomic Sequencing and Biological Characteristics of a Novel *Escherichia coli* Bacteriophage 9g, a Putative Representative of a New *Siphoviridae* Genus. *Viruses*, 6(12), 5077-5092. doi: 10.3390/v6125077

- Kulsuwan, R., Wongratanacheewin, S., Wongratanacheewin, R., Yordpratum, U., y Tattawasart, U. (2014). Lytic capability of Bacteriophages (Family Myoviridae) on *Burkholderia pseudomallei*. *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health* 45(6), 1344-1353. Recuperado de <http://www.tm.mahidol.ac.th/seameo/2014-45-6/11-ms29-201422.pdf>
- Kutter, E., Skutt-Kakaria, K., Blasdel, B., El-Shibiny, A., Castano, A., Bryan, D., ... Brabban, A. (2011). Characterization of a ViI-like Phage Specific to *Escherichia coli* O157:H7. *Virology Journal*, 8(430), 2-14. Recuperado de <http://www.virologyj.com/content/8/1/430>
- Kutter, E., Gvasalia, G., Alavidze, Z., y Brewster, E. (2013). Phage Therapy. En M. Grassberger, R. Sherman, O. Glieva, C. Kim, y K. Mumcuoglu (Eds.), *Biotherapy - History, Principles and Practice: A Practical Guide to the Diagnosis and Treatment of Disease using Living Organisms* (pp. 191-231). doi: 10.1007/978-94-007-6585-6_8
- Labrie, S., Samson, J., y Moineau, S. (2010). Bacteriophage resistance mechanisms. *Nature Review Microbiology*, 8(5), 317-327. doi: 10.1038/nrmicro2315
- Lamprecht, C., Romanis, M., Huisamen, N., Carinus, A., Schoeman, N., Sigge, G., y Britz, T. (2014). *Escherichia coli* with virulence factors and multidrug resistance in the Plankenburg River. *South African Journal of Science*, 110(9/10), 1-6. doi: 0.1590/sajs.2014/20130347
- LaRocque, R., Ryan, E., y Calderwood, S. (2012). Diarreas infecciosas agudas e intoxicación alimentaria por bacterias. D. Longo, A. Fauci, D. Kasper, S. Hauser, L.

Jameson, y J. Loscalzo (Eds.), *Harrison. Principios de Medicina Interna* (18^{va} Ed., pp. 1084-1090). ISBN 978-607-15-0727-3

Lawson, M. (2008). The Antibiotic Resistance Problem Revisited. *The American Biology Teacher*, 70(7), 405-410. Recuperado de <http://puceftp.puce.edu.ec:2053/stable/pdf/30163312.pdf>

Laxminarayan, R., Duse, A., Wattal, C., Zaidi, A., Wertheim, L., Sumpradit, N., ... Cars, O. (2013). Antibiotic resistance - the need for global solutions. *The Lancet Infectious Diseases*, 13(12), 1057–1098. doi: 10.1016/S1473-3099(13)70318-9

Lewin, B. (2008). *Genes IX* (9^{na} Ed.). Estados Unidos: Jones & Barlett.

Liao, W., Ng, W., Lin, I. H., Syu, W., Liu, T., y Chang, C. (2011). T4-Like Genome Organization of the *Escherichia coli* O157:H7 Lytic Phage AR1. *Journal of Virology*, 85(13), 6567–6578. doi: 10.1128/JVI.02378-10

Lomelí-Ortega, C., y Martínez-Díaz, S. (2014). Phage therapy against *Vibrio parahaemolyticus* infection in the whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) larvae. *Aquaculture*, 434(1), 208–211. doi:10.1016/j.aquaculture.2014.08.018

López, D. (2015). *Bacteriófagos como alternativa para eliminar cepas de Acinetobacter baumannii resistente a antibióticos presentes en tres hospitales del Ecuador* (Tesis de pregrado, Universidad Internacional SEK). Recuperado de <http://repositorio.uisek.edu.ec/jspui/handle/123456789/1402>

Lu, T., y Koeris, M. (2011). The next generation of bacteriophage therapy. *Current Opinion in Microbiology*, 14(5), 524–531. doi: 10.1016/j.mib.2011.07.028

- Madigan, M., Martinko, J., Dunlap, P., y Clark, D. (2009). *Brock. Biología de los Microorganismos* (12^{va} edición). España: Pearson.
- Mahony, J., y van Sinderen, D. (2012). Structural Aspects of the Interaction of Dairy Phages with Their Host Bacteria. *Viruses*, 4(9), 1410-1424. doi: 10.3390/v4091410
- Manu, D., Lupan, I., y Popescu, O. (2011). Mechanisms of pathogenesis and antibiotics resistance in *Escherichia coli*. *Annals of the Romanian Society for Cell Biology*, 16(2), 7-19. Recuperado de <https://www.researchgate.net/publication/244442989>
- McPartland, J., y Rothman-Denes, L. (2009). The Tail Sheath of Bacteriophage N4 Interacts with the *Escherichia coli* Receptor. *Journal of Bacteriology*, 191(2), 525–532. doi: 10.1128/JB.01423-08
- Mitra, M., Ahmad, P., Mehdi, R., Hosein, A., y Ahmad, K. (2011). Multiple drug resistance of enteropathogenic *Escherichia coli* isolated from children with diarrhea in Kashan, Iran. *African Journal of Microbiology Research*, 5(20), 3305-3309. doi: 10.5897/AJMR11.483
- Montoro, M. (2008). *Gastroenteritis infecciosas, Medicina interna* (16^a Ed.). España: Elsevier.
- Moreira, H., Santos, R., Meireles, D., Dantas, M., y de Oliveira, C. (2013). Use of bacteriophages to reduce *Salmonella* in chicken skin in comparison with chemical agents. *Food Research International*, 52(1), 75–81. doi: 10.1016/j.foodres.2013.02.032

- Murray, P., Rosenthal, K., y Pfaller, M. (2014). *Microbiología médica* (7^{ma} Ed.). España: Elsevier.
- Naeem, A., Badshah, S., Muska, M., Ahmad, N., y Khan, K. (2016). The current case of quinolones: synthetic approaches and antibacterial activity. *Molecules*, 21(4), 268-285 doi: 10.3390/molecules21040268
- Niu, Y. D., McAllister, T. A., Nash, J. H. E., Kropinski, A. M., y Stanford, K. (2014). Four *Escherichia coli* O157:H7 phages: A new bacteriophage genus and taxonomic classification of T1-like phages. *PLoS One*, 9(6), e100426. doi: 10.1371/journal.pone.0100426
- Ochoa, T., Ruiz, J., Molina, M., Del Valle, J., Vargas, M., Gil, A., ... Lanata, F. (2009). High Frequency of Antimicrobial Drug Resistance of Diarrheogenic *Escherichia coli* in Infants in Peru. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 81(2), 296-301. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19635887>
- Ochoa, T., y Contreras, C. (2011). Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) infection in children. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 24(5), 478–483. doi:10.1097/QCO.0b013e32834a8b8b
- Organización Mundial de la Salud [OMS]. (2008). *Estadísticas Sanitarias Mundiales 2008*. Recuperado de http://www.who.int/whosis/whostat/PDF_ES_WHS08_Full.pdf
- Organización Mundial de la Salud [OMS]. (2012). *Estadísticas Sanitarias Mundiales 2012*. Recuperado de http://www.who.int/iris/bitstream/10665/44858/1/9789243564449_spa.pdf

Organización Mundial de la Salud [OMS]. (2014). *Estadísticas Sanitarias Mundiales 2014: Una mina de información sobre salud pública mundial*. Recuperado de http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112817/1/WHO_HIS_HSI_14.1_spa.pdf

Organización Mundial de la salud [OMS]. (2016). *Importancia de la resistencia a los antimicrobianos para la salud pública*. Recuperado de http://www.who.int/drugresistance/AMR_Importance/es/

Orlova, E. (2012). Bacteriophages and Their Structural Organisation. En I. Kurtboke (Ed.), *Bacteriophages* (pp. 3-30). doi: 10.5772/34642

Oślizło, A., Miernikiewicz, P., Piotrowicz, A., Owczarek, B., Kopciuch, A., Figura, G., y Dąbrowska, K. (2011). Purification of phage display-modified bacteriophage T4 by affinity chromatography. *BMC Biotechnology*, 11(59), 1-9. doi: 10.1186/1472-6750-11-59

Penesyan, A., Gillings, M., y Paulsen, I. (2015). Antibiotic Discovery: Combatting Bacterial Resistance in Cells and in Biofilm Communities. *Molecules*, 20(4), 5286-5298. doi: 10.3390/molecules20045286

Pérez-Cano, H.J., y Robles-Contreras, A. (2013). Aspectos básicos de los mecanismos de resistencia bacteriana. *Revista Médica MD*, 4(3), 186-191. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/242406321_Aspectos_basicos_de_los_mecanismos_de_resistencia_bacteriana

Piekarowicz, A., Kłyż, A., Majchrzak, M., Szczêsna, E., Piechucki, M., Kwiatek, A., ... Steinb, D. (2014). *Neisseria gonorrhoeae* Filamentous Phage Ngo6 Is Capable of

Infecting a Variety of Gram-Negative Bacteria. *Journal of Virology*, 88(2), 1002–1010. doi: 10.1128/JVI.02707-13

Promega. (2010). *Wizard® Genomic DNA Purification kit*. Recuperado de <https://worldwide.promega.com/~media/files/resources/protcards/wizard%20genomic%20dna%20purification%20kit%20quick%20protocol.pdf>

Promega. (2011). *Assembly of Restriction Enzyme Digestions*. Recuperado de <https://worldwide.promega.com/~media/files/resources/protocols/technical%20manuals/101/restriction%20enzymes%20protocol.pdf>

Quiroz, E., Recalde, J., Torres, M., Seqqat, R., Vinueza, c., y Ayala, L. (2016). Isolation of Lytic Bacteriophages for Nanobiocontrol of Pathogenic and Antibiotic Resistant *Salmonella* Present in Poultry in Ecuador. *Biology and Medicine*, 8(3), 1-6. doi: 10.4172/0974-8369.1000287

Qu, M., Bing, L., Zhang, X., Yan, H., Huang, Y., Qian, K., ... Wang, Q. (2016). Prevalence and antibiotic resistance of bacterial pathogens isolated from childhood diarrhea in Beijing, China (2010–2014). *Gut Pathogens*, 8(31), 1-9. doi: 10.1186/s13099-016-0116-2

Rabsch, W., Ma, L., Wiley, G., Najar, F., Kaserer, W., Schuerch, D., ... Klebba, P. (2007). FepA- and TonB-dependent Bacteriophage H8: Receptor Binding and Genomic Sequence. *Journal of Bacteriology*, 189(15), 5658–5674. doi: 10.1128/JB.00437-07

Rakhuba, D., Kolomiets, E., Szwajcer, E., y Novik, G. (2010). Bacteriophage Receptors, Mechanisms of Phage Adsorption and Penetration into Host Cell. *Polish Journal of*

Microbiology, 59(3), 145-155. Recuperado de
<http://www.pjm.microbiology.pl/archive/vol5932010145.pdf>

Reardon, S. (4 de junio 2014). Phage therapy gets revitalized. *Nature*, 510, 15–16. doi:
10.1038/510015a

Reinoso, C. (2015). *Evaluación ambiental del río Machángara* (Tesis de pregrado, Escuela
Politécnica Nacional). Recuperado de
<http://bibdigital.epn.edu.ec/handle/15000/10479>

Rezaei, M., Komijani, M., y Javadirad, S. (2012). Bacteriostatic agents. En V. Bobbarala
(Ed.), *A Search for Antibacterial Agents* (pp. 219-234). doi: 10.5772/1085

Rodríguez, I., Novais, A., Lira, F., Valverde, A., Curião, T., Martínez, J., ... Coque, T.
(2015). Antibiotic-resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* 2 high-risk
clones and an IncFIIk mosaic plasmid hosting Tn1 3 (*bla_{TEM-4}*) in the past decades.
Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 59(5), 2904-2908. doi:
10.1128/AAC.00296-15

Rodríguez-Rojas, A., Rodríguez-Beltrán, J., Couce, A., y Blázquez, J. (2013). Antibiotics
and antibiotic resistance: A bitter fight against evolution. *International Journal of
Medical Microbiology*, 303(6-7), 293-297. doi: 10.1016/j.ijmm.2013.02.004

Rodríguez-Verdugo, A., Gaut, B., y Tenaillon, O. (2013). Evolution of *Escherichia coli*
rifampicin resistance in an antibiotic-free environment during thermal stress. *BMC
Evolutionary Biology*, 13(50), 1-11. doi: 10.1186/1471-2148-13-50

Roxas, J., Ryan, K., Vedantam, G., y Viswanathan, V. (2014). Enteropathogenic

Escherichia coli dynamically regulates EGFR signaling in intestinal epithelial cells. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology*, 307(3), 374-380. doi: 10.1152/ajpgi.00312.2013

Russo, T., y Johnson, J. (2012). Enfermedades causadas por bacilos entéricos gramnegativos. En D. Longo, A. Fauci, D. Kasper, S. Hauser, L. Jameson, y J. Loscalzo (Eds.), *Harrison. Principios de Medicina Interna* (18^{va} Ed., pp. 1246 - 1257). ISBN 978-607-15-0727-3

Salehi, T., Badouei, M. A., y Gohari, I. M. (2011). Molecular detection and antibacterial susceptibility of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and shigatoxigenic *Escherichia coli* (STEC) strains isolated from healthy and diarrhoeic dogs. *Comparative Clinical Pathology*, 20(6), 585–589. doi: 10.1007/s00580-010-1037-y

Scaletsky, I., Souza, T., Aranda, K., y Okeke, I. (2010). Genetic elements associated with antimicrobial resistance in enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) from Brazil. *BMC Microbiology*, 10 (25), 1-5. doi: 10.1186/1471-2180-10-25

Schreckinger, M. (2008). *Genotipificación de cepas de Escherichia coli enteropatogénica aisladas en una región rural de la costa ecuatoriana mediante el uso de la electroforesis de campo pulsado* (Tesis de pregrado, Universidad San Francisco de Quito). Recuperado de <http://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/564/1/87977.pdf>

Segundo, N., Hernández, E., López, O., y Torres, O. (2010). Los bacteriófagos como una alternativa en el tratamiento de enfermedades infecciosas bacterianas (Fagoterapia).

Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas, 41(3), 17-26. Recuperado de <http://www.redalyc.org/pdf/579/57916078003.pdf>

Shikara, M. (2010). Identification of a restriction endonuclease (*SacCI*) from *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Yeast and Fungal Research*, 1(7), 127–135. Recuperado de <http://www.academicjournals.org/journal/JYFR/article-full-text-pdf/BA0A1153040>

Shors, T. (2009). *Virus: estudio molecular con orientación clínica* (1ª Ed). Argentina: Médica Panamericana.

Singh, U., y Kapoor, K. (2010). *Introductory Microbiology*. Recuperado de <http://chem-biology.com/free-introductory-microbiology/>

Skurnik, M., y Strauch E. (2006). Phage therapy: Facts and fiction. *International Journal of Medical Microbiology*, 296(1), 5–14. doi: 10.1016/j.ijmm.2005.09.002

Snyder, L., Peters, J., y Henken, T. (2013). *Molecular Genetics of Bacteria*. doi: 10.1128/9781555817169

Summers, W. (2012). The strange history of phage therapy. *Bacteriophage*, 2(2), 130-133. doi: 10.4161/bact.20757

Sun, J., Deng, S., y Yan, A. (2014). Bacterial multidrug efflux pumps: Mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. *Biochemical and Biophysical Research communications*, 453, 254-267. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.05.090

Sundqvist, M. (2014). Reversibility of antibiotic resistance. *Upsala Journal of Medical Sciences*, 119(2), 142-148. doi: 10.3109/03009734.2014.903323

- Tanwar, J., Das, S., Fatima, Z., y Hameed, S. (2014). Multidrug resistance: an emerging crisis. *Interdisciplinary perspectives on infectious diseases*, 1-7. doi: 10.1155/2014/541340
- ThermoFisher Scientifics. (2015). *Qubit® dsDNA HS Assay Kits*. Recuperado de http://www.ieg.uu.se/digitalAssets/176/176882_3qubitquickrefcard.pdf
- Thi, T., López, E., Rodríguez-Rojas, A., Rodríguez-Beltrán, J., Couce, A., Guelfo, J., ... Blázquez, J. (2011). Effect of recA inactivation on mutagenesis of *Escherichia coli* exposed to sublethal concentrations of antimicrobials. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(3), 531-538. doi: 10.1093/jac/dkq496
- Tomat, D., Migliore, L., Aquili, V., Quiberoni, A., y Balagué, C. (2013). Phage biocontrol of enteropathogenic and shiga toxin-producing *Escherichia coli* in meat products. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 3(20), 1-10. doi: 10.3389/fcimb.2013.00020
- Torres, A., Arenas, M., y Martínez, Y. (2010). Overview of *Escherichia coli*. En A. Torres (Ed.), *Pathogenic Escherichia coli in Latin America* (pp. 1-7). doi: 10.2174/97816080519221100101Pp
- Varela, G., Gómez-Duarte, O., y Ochoa, T. (2010). Diarrheagenic *Escherichia coli* in Children from Uruguay, Colombia and Peru. En A. Torres (Ed.), *Pathogenic Escherichia coli in Latin America* (pp. 209-222). doi: 10.2174/97816080519221100101

- Webber, A., y Piddock, L. (2003). The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51(1), 9-11. doi: 10.1093/jac/dkg050
- Wilder, J., Lancaster, J., Cahill, J., Rasche, E., y Kutty, G. (2015). Complete Genome Sequence of Enterotoxigenic *Escherichia coli* Myophage Murica. *Genome Announcements*, 3(5), e01135-15. doi:10.1128/genomeA.01135-15
- Williams, N., Torres, A., y Lloyd, S. (2010). Evolution and Epidemiology of Diarrheagenic *Escherichia coli*. En A. Torres (Ed.), *Pathogenic Escherichia coli in Latin America* (pp. 8-24). doi: 10.2174/97816080519221100101
- World Health Organization [WHO]. (2014). *Antimicrobial resistance: global report on surveillance*. Recuperado de http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748_eng.pdf?ua=1
- Wright, G. (2005). Bacterial resistance to antibiotics: Enzymatic degradation and modification. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57(10), 1451-1470. doi: 10.1016/j.addr.2005.04.002
- Xu, Y., Liu, Y., Liu, Y., Pei, J., Yao, S., y Cheng, C. (2015). Bacteriophage therapy against *Enterobacteriaceae*. *Virologica Sinica*, 30(1), 11-18. doi: 10.1007/s12250-014-3543-6
- Yan, D., Quan, H., Wang, L., Liu, F., Chen, J., Cao, X., y Ge, B. (2013). Enteropathogenic *Escherichia coli* Tir recruits cellular SHP-2 through ITIM motifs to suppress host immune response. *Cellular Signalling*, 25(9), 1887-1894. doi: 10.1016/j.cellsig.2013.05.020

Yang, C., Chen, Y., Huang, Y., Huang, H., y Tseng, C. (2014). CRP represses the CRISPR/Cas system in *Escherichia coli*: evidence that endogenous CRISPR spacers impede phage P1 replication. *Molecular Microbiology*, 92(5), 1072–1091. doi: 10.1111/mmi.12614

Zahavi, E., Lieberman, J., Donnenberg, M., Nitzan, M., Baruch, K., Rosenshine, I., ... Aroeti, B. (2011). Bundle-forming pilus retraction enhances enteropathogenic *Escherichia coli* infectivity. *Molecular Biology of the Cell*, 22, 2346-2445. doi: 10.1091/mbc.E11-01-0001

9. ANEXOS

Anexo 1. Protocolo de purificación del kit Wizard SV and PCR-Up System.

Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System

INSTRUCTIONS FOR USE OF PRODUCTS A9280, A9281, A9282, AND A9285.

Quick
PROTOCOL

DNA Purification by Centrifugation

Gel Slice and PCR Product Preparation

A. Dissolving the Gel Slice

1. Following electrophoresis, excise DNA band from gel and place gel slice in a 1.5ml microcentrifuge tube.
2. Add 10 μ l Membrane Binding Solution per 10mg of gel slice. Vortex and incubate at 50–65°C until gel slice is completely dissolved.

B. Processing PCR Amplifications

1. Add an equal volume of Membrane Binding Solution to the PCR amplification.

Binding of DNA

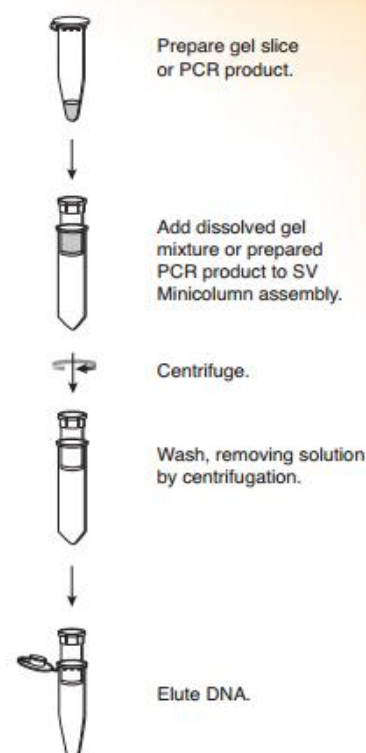
1. Insert SV Minicolumn into Collection Tube.
2. Transfer dissolved gel mixture or prepared PCR product to the Minicolumn assembly. Incubate at room temperature for 1 minute.
3. Centrifuge at 16,000 $\times g$ for 1 minute. Discard flowthrough and reinsert Minicolumn into Collection Tube.

Washing

4. Add 700 μ l Membrane Wash Solution (ethanol added). Centrifuge at 16,000 $\times g$ for 1 minute. Discard flowthrough and reinsert Minicolumn into Collection Tube.
5. Repeat Step 4 with 500 μ l Membrane Wash Solution. Centrifuge at 16,000 $\times g$ for 5 minutes.
6. Empty the Collection Tube and recentrifuge the column assembly for 1 minute with the microcentrifuge lid open (or off) to allow evaporation of any residual ethanol.

Elution

7. Carefully transfer Minicolumn to a clean 1.5ml microcentrifuge tube.
8. Add 50 μ l of Nuclease-Free Water to the Minicolumn. Incubate at room temperature for 1 minute. Centrifuge at 16,000 $\times g$ for 1 minute.
9. Discard Minicolumn and store DNA at 4°C or –20°C.



Additional protocol information is available in Technical Bulletin #TB308, available online at: www.promega.com

3760MA07_2A

Anexo 2. Protocolo de preparación de las muestras para su medición en el fluorómetro Qubit.

Qubit™ Assays

www.invitrogen.com/qubit

QUICK
REFERENCE
CARD

NOTE: For best results, store the dye and the buffer at room temperature. Store the DNA, RNA, and protein standards at 4°C. Ensure that all assay reagents are at **room temperature** before you begin.

1. Set up two Assay Tubes for the standards (three for the protein assay) and one tube for each user sample.
2. Prepare the Qubit™ **Working Solution** by diluting the Qubit™ reagent 1:200 in Qubit™ buffer. Prepare 200 µL of **Working Solution** for each standard and sample.
3. Prepare the Assay Tubes* according to the table below.

	Standard Assay Tubes	User Sample Assay Tubes
Volume of Working Solution (from step 2) to add	190 µL	180–199 µL
Volume of Standard (from kit) to add	10 µL	—
Volume of User Sample to add	—	1–20 µL
Total Volume in each Assay Tube	200 µL	200 µL

* Use only thin-wall, clear 0.5 mL PCR tubes. Acceptable tubes include Qubit® assay tubes (set of 500, Cat. no. Q32856) or Axygen PCR-05-C tubes (VWR, part no. 10011-830).

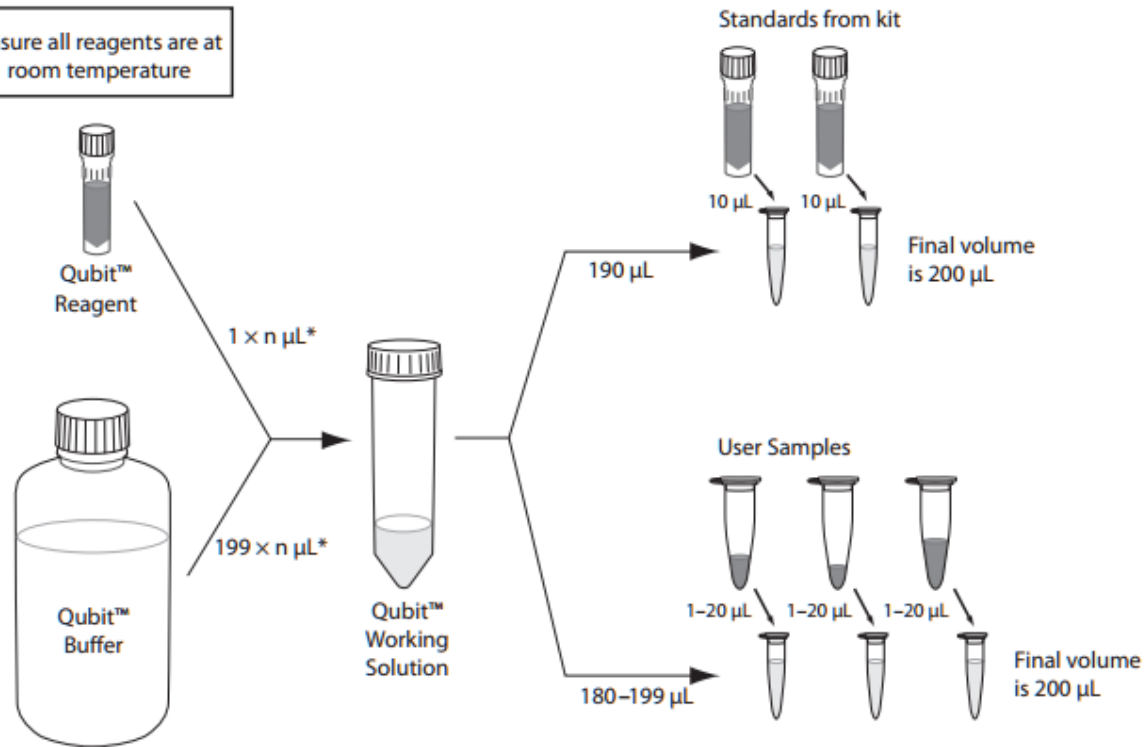
4. Vortex all tubes for 2–3 seconds.
5. Incubate the tubes for 2 minutes at room temperature (15 minutes for the Qubit™ protein assay).
6. Insert the tubes in the Qubit® 2.0 Fluorometer and take readings. For detailed instructions, refer to the Qubit® 2.0 Fluorometer manual.
7. *Optional:* Using the Dilution Calculator feature of the Qubit® 2.0 Fluorometer, determine the stock concentration of your original sample.

MP39808 | MAN0002474
Rev. date: 28 Sept 2010

molecular
probes® | invitrogen™
by life technologies™

For technical support, email tech_support@invitrogen.com.
For country-specific contact information, visit www.invitrogen.com.

Ensure all reagents are at room temperature



* where n = number of Standards plus number of Samples

molecular probes | invitrogen
by life technologies™

Vortex all assay tubes for 2-3 seconds

Incubate at room temperature for 2 minutes (15 minutes for Qubit™ protein assay)

Read tubes in Qubit® 2.0 Fluorometer



For research use only. Not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use.

©2010 Life Technologies Corporation. All rights reserved. The trademarks mentioned herein are the property of Life Technologies Corporation or their respective owners.

Anexo 3. Datos obtenidos mediante espectrofotometría para la realización de la curva de cinética de lisis del fago 5Q18.

ECEP 14	Control positivo (5Q5)	Control negativo	Tiempo (min)
0,2	0,2	0,2	0
0,203	0,246	0,491	60
0,815	0,902	0,613	120
0,862	1,23	0,877	180
0,978	1,09	0,945	240
0,8	0,92	1,89	270
1,05	0,8	2,73	300