

Caracterización fenotípica y molecular de colifagos de granjas de pollos de engorde con Colibacilosis y plantas beneficiadoras de aves en Azuay, Ecuador

Phenotypic and molecular characterization of colifages from broiler farms with Colibacilosis and poultry processing plants from Azuay, Ecuador

Fabián Astudillo-Riera^{1,3*}, Kevin Astudillo-Vallejo¹, Maria Laura Gómez-Asanza¹, Luis Armando Pacha-Aguilar¹,
Antonio Javier Vallecillo-Maza^{1,2} y Sergio Emiro Rivera-Pirela³

¹Universidad de Cuenca, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Cuenca, Ecuador.

²Universidad de Cuenca, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Laboratorio de Biología Molecular. Cuenca, Ecuador.

³Universidad de Zulia, Facultad de Ciencias Veterinarias. Maracaibo, Venezuela.

*Correo electrónico: fabian.astudillo@ucuenca.edu.ec

RESUMEN

La *Escherichia coli* patógena extraintestinal, denominada *E. coli* patógena aviar, posee atributos de virulencia específicos que causan infecciones invasivas en aves de corral, responsables de la Colibacilosis aviar. Los veterinarios tienen opciones restringidas de agentes antimicrobianos para su tratamiento, debido a problemas de resistencia bacteriana de la *E. coli*, que incide indirectamente en la salud humana. Como alternativa se plantea el uso de bacteriófagos con poder bacteriolítico específico contra bacterias enteropatógenas. El objetivo de este estudio fue el de caracterizar bacteriófagos líticos específicos para *E. coli* (colifagos) como una alternativa de biocontrol contra la colibacilosis aviar, determinando su especificidad frente a *E. coli* enteropatógenas aisladas de la zona, su capacidad lítica, fenotipo y genotipo. Para ello se recolectaron muestras ambientales de plantas beneficiadoras avícolas y de aguas residuales en granjas de producción con problemas de colibacilosis. Se procedió al aislamiento de bacteriófagos con actividad lítica aparente frente a *E. coli* TOP10F⁺ y sobre los aislados de *E. coli* patógenas previamente caracterizadas de la zona. Un total de 36 aislados de colifagos líticos fueron enfrentados a 10 cepas patógenas de *E. coli*. De éstos, 22 fagos afectaron entre el 10-50 % de las cepas evaluadas, 5 fagos infectaron entre el 60 y 70 % y solo 9 fagos no mostraron capacidad lítica frente a las cepas patógenas de *E. coli*. Los fagos con capacidad lítica más alta fueron seleccionados y caracterizados genotípicamente mediante la técnica de fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP), posterior a su tratamiento con enzimas de restricción: *Bam*HI, *Eco*RI, *Eco*RV y *Hind* III. Como resultado se obtuvieron 4 colifagos con diferentes patrones de banda. Se concluye que, en muestras ambientales de granjas avícolas diagnosticadas de colibacilosis, se pueden aislar una gran variedad de colifagos con potencial lítico para el biocontrol de *E. coli* patógena.

Palabras clave: Colifagos; biocontrol; RFLP; *E. coli*; resistencia

ABSTRACT

Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*, termed *E. coli* avian pathogenic possess specific virulence attributes causing invasive infections in poultry, namely Colibacilosis. Veterinarians have limited options of antimicrobial agents for its treatment, due to problems of bacterial resistance of *E. coli* that indirectly affects human health. As an alternative, the use of bacteriophages with specific bacteriolytic power against enteropathogenic bacteria is proposed. The objective of this study was to characterize lytic bacteriophages specific for *E. coli* (coliphages) as a biocontrol alternative against avian Colibacilosis, determining their specificity against enteropathogenic *E. coli* isolated from the area, their lytic capacity, phenotype and genotype. For this, semi-solid environmental samples were collected from poultry slaughterhouses and from wastewater in production farms. With the samples, it was proceeded to isolate the plaques formed by the bacteriophages with the best apparent lytic activity against *E. coli* TOP10F⁺ and on the previously characterized pathogenic *E. coli* isolates. A total of 36 coliphage isolates were tested against 10 pathogenic strains of *E. coli*. Of these, 22 phages affected between 10-50 % of the strains evaluated, 5 phages infected between 60 and 70 % and only 9 phages did not show lytic capacity against pathogenic *E. coli* strains. The phages with the highest lytic capacity were selected and genotypically characterized by the Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) technique, after treatment with restriction enzymes: *Bam*HI, *Eco*RI, *Eco*RV and *Hind* III. As a result, 4 coliphages with different band patterns were obtained. It is concluded that a wide variety of coliphages with lytic potential for the biocontrol of pathogenic *E. coli* can be isolated from environmental samples of poultry farms diagnosed with Colibacilosis.

Key words: Coliphages; biocontrol; RFLP; *E. coli*; resistance

INTRODUCCION

La *Escherichia coli* (*E. coli*) patógena aviar es un subgrupo de *E. coli*-extraintestinal que ingresa a través de diferentes vías, incluidas las vías genital y respiratoria, y causa varias enfermedades extraintestinales conocidas colectivamente como Colibacilosis, responsables de grandes pérdidas económicas en la industria avícola [25]. Las *E. coli* patógenas aviares pertenecen principalmente a los serotipos O1, O2 y O78, cuando son tipificables y representan un riesgo zoonótico potencial para los seres humanos [21, 28]. El tratamiento de enfermedades causadas por *E. coli* generalmente requiere terapia antimicrobiana. La decisión de utilizar terapia antimicrobiana se basa en la susceptibilidad del microorganismo y la farmacocinética del fármaco para obtener la concentración terapéutica requerida en el sitio de la infección y por lo tanto, la eficacia clínica [27]. Los veterinarios tienen un número limitado de agentes antimicrobianos para ser usados en la industria avícola, debido a problemas de resistencia a múltiples fármacos y el peligro que representan para la salud humana. El uso indiscriminado de los antimicrobianos condujo a un aumento de la tasa de resistencia a los antibióticos [41], especialmente en los países subdesarrollados y en desarrollo, donde los antibióticos se utilizan sin control para la profilaxis y el tratamiento de enfermedades humanas y animales [42]. *E. coli* presente, tanto en humanos como en animales, posee resistencia a varias clases de antibióticos, como aminoglucósidos, penicilina, estreptomina, cefalosporinas, sulfonamidas, tetraciclina y quinolonas [21, 24]. Muchas cepas y genes resistentes a los medicamentos pueden transmitirse y diseminarse entre patógenos animales y humanos [6].

Mucho antes del descubrimiento y uso de nuevos antibióticos, se había sugerido la prevención y/o tratamiento de infecciones bacterianas con la administración de bacteriófagos o llamados también fagos [39]. Felix d'Herelle, un microbiólogo franco-canadiense del Instituto Pasteur en 1917, observó la aparición de pequeñas áreas claras contra *Vibrio cholerae*, que finalmente denominó placas [7]. El nombre "bacteriófago" fue propuesto por d'Herelle en 1917. En la década de 1940, Eli Lilly Company (Indianapolis, Ind.) USA, produjo siete productos de fagos para uso humano, incluidas preparaciones dirigidas contra estafilococos, estreptococos, *Escherichia coli* y otros patógenos bacterianos [9]. La eficacia de las preparaciones de fagos fue controvertida, y con la llegada de los antibióticos, la producción comercial de fagos terapéuticos cesó en la mayor parte del mundo occidental. Sin embargo, los fagos continuaron usándose terapéuticamente, junto con o en lugar de antibióticos, en Europa del Este y en la antigua Unión Soviética [44].

Los Fagos están constituidos por una cubierta proteica o cápside en cuyo interior se encuentra el material genético que puede ser ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN). Desde que se observó actividad bactericida de los fagos en 1896, el uso de bacteriófagos ha sido un foco de investigación dado que promete ser una técnica que aborda varias deficiencias a un costo muy bajo [22]. El biocontrol con el uso de fagos se acepta cada vez más como una técnica natural y ecológica, eficaz para atacar específicamente patógenos bacterianos [40]. En la década de 1930 se aislaron los primeros colifagos por Rakieten [22, 36]. En 1980, la inactivación fágica de *E. coli* en ratones (*Mus musculus*) demostró la eficacia de esta técnica comparada con el uso de antibióticos y a partir de este éxito, entre otros, la exploración del uso de fagos como agentes de biocontrol se convirtió en una modalidad atractiva para mejorar la seguridad alimentaria en sustitución de antibióticos generadores de resistencia bacteriana [18, 22, 40, 43]. Los virus bacteriófagos son microorganismos que han sido presentados como candidatos

para una aplicación terapéutica frente a bacterias enteropatógenas. Éstos pueden aislarse de muestras fecales, aguas residuales y ríos contaminados [11, 26, 39].

Igualmente, tienen la capacidad de invadir y alterar el metabolismo de dichos microorganismos, siendo específicos para un hospedador [30].

Los fagos se pueden dividir en virulentos y temperados en función de su ciclo de vida. Los virulentos producen el ciclo lítico usado preferiblemente para eliminar las bacterias patógenas. Los fagos se unen a la superficie de la célula bacteriana, inyectan su genoma, se reproducen gracias a la maquinaria molecular del hospedador y como resultado se producen nuevas partículas fágicas que rompen la pared celular liberando a los fagos de la progenie y matando al anfitrión. Aunque dentro de sus capacidades está el multiplicarse rápidamente, sin generar daño colateral sobre animales, plantas o el ambiente [17].

Smith y col. estudiaron sobre el uso de fagos en Medicina Veterinaria en 1982 y 1987 [35, 36]. En un primer trabajo informaron sobre el uso exitoso de colifagos como tratamiento de infecciones experimentales de *E. coli* en ratones; posteriormente, demostraron cómo la aplicación de una dosis única de fago específico para *E. coli*, redujo el número de bacterias en el tracto digestivo de terneros (*Bos taurus*), corderos (*Ovis orientalis aries*) y lechones (*Sus scrofa domestica*) infectados, con diarrea causada por una cepa de *E. coli*. Adicional a esto, el tratamiento disminuyó la pérdida de líquido causada por la misma patología [39, 40].

Los colifagos son virus específicos para bacterias como *E. coli*, los cuales secuestran el mecanismo metabólico de las mismas para replicarse [15]. Según su ciclo de vida o tipo de infección, los fagos pueden causar una infección lítica (fago virulento) o lisogénica (fago leve). El primero por lo general produce la inoculación de su material genético en el hospedador, en este caso en la bacteria, induciendo variaciones de la estructura proteica del hospedador lo que va a terminar con la lisis bacteriana y la liberación de fagos en una cantidad que va desde 50 a 200 [29]. El tipo de infección lisogénica resulta en la recombinación del genoma del fago con el de la bacteria, aunque también puede existir como un plásmido. Este material genético unido a la célula se heredará por varias generaciones de la bacteria sin variaciones significativas en su metabolismo. En algunos casos, los bacteriófagos pueden modificar su ciclo de vida cambiando de lisogénicos a líticos, especialmente cuando el número de hospedadores ha disminuido [32].

Recientemente, modelos animales bien controlados han demostrado que los fagos pueden librar animales; pollos (*Gallus gallus domesticus*), ratones (*Mus musculus*), terneros, cerdos, corderos, peces (*osteictios*), entre otros, de una gran variedad de infecciones dañinas causadas por *E. coli* o *Salmonella* spp. [3, 4, 5, 19, 20, 23, 34, 38, 39, 40].

Oliveira y col. [31] utilizaron exitosamente la técnica de fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP) para caracterizar molecularmente bacteriófagos. Las diferencias entre los fagos se confirmaron mediante la comparación entre los patrones RFLP individuales [8]. Igualmente, evaluaron su desempeño lítico frente a cepas de *E. coli* patógenas aviares con altos patrones de resistencia a antibióticos, con el fin de seleccionar fagos como producto terapéutico para tratar la colibacilosis en pollos (*Gallus gallus domesticus*) [2].

Esta investigación tuvo por objetivo el aislamiento, determinación de la capacidad lítica y la caracterización molecular de los colifagos obtenidos a partir de muestras de plantas beneficiadoras avícolas

y granjas de producción de pollos de engorde, con historia de colibacilosis, ubicadas en la provincia del Azuay, Ecuador.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo

Las muestras para este estudio fueron recogidas de aguas residuales de plantas beneficiadoras de aves y muestras semisólidas de zonas donde había crianza de pollos de engorde con problemas de colibacilosis. Se obtuvieron 36 muestras ambientales procedentes de aguas estancadas, acequias, cama del galpón, plumas y vísceras dentro del perímetro de la provincia del Azuay. Estas muestras tuvieron un volumen superior a 5 mililitros (mL) (muestras líquidas) y 10 gramos (g) (muestras sólidas), se colocaron en tubos estériles y se transportaron en una hielera con refrigerante para posteriormente ser procesadas todo el mismo día, en el laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca.

Aislamiento y enriquecimiento de bacteriófagos de las muestras ambientales

Para el enriquecimiento, las muestras de aguas residuales (5 mL) se centrifugaron a $14.000 \times G$ (Centrífuga Eppendorf 5430 R, Eppendorf, Alemania), durante 10 minutos (min), para separar las partículas de gran tamaño. Las muestras ambientales sólidas (10 g) se mezclaron con 10 mL de solución salina antes de la centrifugación, se tomaron 1,8 mL de la muestra recogida, previamente homogenizada en el vórtex (Agitador Vortex TP – Laboratorio, México) y se colocaron en tubos Eppendorf y se centrifugaron a $14.000 \times G$ por 10 min a temperatura ambiente. Se tomó 1 mL del sobrenadante resultante y se esterilizó por filtración utilizando filtros de membrana de baja unión a proteínas de 0,22 micrómetros (μm) (Filtros de jeringa; PVDF; 0,22 μm de diámetro; estéril; EUA).

Para tener un cultivo de *E. coli* TOP10F' (Invitrogen™ *E. coli* químicamente competente One Shot™ TOP10F') se sembró en LB agar (Medio de cultivo Luria Bertani; Triptona 1%, extracto de levadura 0,5% y cloruro de Sodio 1%) y se dejó incubar a 37°C toda la noche. Con puntas estériles de micropipetas se tomaron cada una de las placas formadas por cada muestra ambiental ensayada. A esta punta se la introdujo en 5 mL de cultivo LB y se colocaron 500 microlitros (μL) de *E. coli* TOP10F' y se sembraron en 5 mL LB líquido. Se incubó toda la noche a 37°C en estado estático.

El filtrado resultante (0,5 mL) se mezcló con 0,5 mL de cultivo de *E. coli* TOP10F' y luego se le adicionaron 5 mL de medio de cultivo LB líquido. La mezcla fue incubada con una agitación de 200 revoluciones por minutos (rpm) a 37°C toda la noche (Agitador magnético Corning, PC620D, Corning, México). De este cultivo se tomaron 1,8 mL y se colocaron en la centrifuga refrigerada a $14.000 \times G$ por 10 min a 4°C, luego se recuperaron 1,2 mL del sobrenadante, el cual almacenó en tubos Eppendorf de 1,5 mL a 4°C.

Evaluación de la actividad lítica sobre cepas de *E. coli* TOP10F' y los aislados de *E. coli* patógenas.

Se colocaron 30 mL de agar nutritivo (Peptona 0,5%, extracto de carne 0,3% y agar 0,7%) en el fondo de las cajas Petri. Se sembraron 10 cepas de *E. coli* del biobanco del laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de C.C. A.A. previamente aisladas de casos clínicos en aves cultivadas en agar nutritivo [35] y, adicionalmente *E. coli* TOP10F' en medio LB. En un tubo de ensayo se colocaron 500 μL de

cultivo de *E. coli* más 5 μL de la última solución con fagos, se dejaron reposar durante 5 min a temperatura ambiente. Se dividió en un número determinado de cuadrantes cada caja Petri, uno por cada cepa de *E. coli* (se utilizaron 36 cuadrantes), en cada uno de los cuales se colocaron 2 μL de la mezcla *E. coli* con los diferentes aislados de fagos. Se colocaron 3 mL de agar de cubierta, incubado a 45°C, para mantenerlo en estado líquido (Incubadora bacteriológica Selecta, 3000957, Selecta, España), en la superficie de la placa luego de la siembra y se dejó incubar a 37°C toda la noche en aerobiosis. El fago al corresponder a la bacteria, se replica dentro de ella, observándose un halo transparente de lisis en la caja (prueba de manchas) [1, 2, 3]. Al día siguiente se verificó, identificando las placas Petri aquellas manchas que tuvieron un color más claro, que tendieran a la transparencia, señal que indicaría si hubo o no actividad lítica por parte de los fagos contra la *E. coli*.

Una vez identificadas en el cultivo con la cepa *E. coli* TOP10F', las muestras que contenían colifagos, se procedió a verificar para el resto de las cepas de *E. coli*, las placas formadas en cada una de las muestras, seleccionando aquellas que mostraron mayor actividad lítica (bordes definidos y transparencia). Donde se mostraron muy aglomeradas se realizaron diluciones seriadas hasta lograr una concentración mínima de títulos capaz de provocar lisis de las bacterias. De esa manera se obtuvieron placas o clonas virales distinguibles con facilidad para la posterior amplificación individual de cada fago. La capacidad lítica se clasificó de acuerdo a una valoración numérica especulativa: en nula (0), baja (1), media (2), moderada (3) y alta (4) [22] (FIG. 1).

Para la nomenclatura de los virus se utilizó las siguientes denominaciones: vB (virus Bacteriano), Eco (*E. coli*), raya baja (no se ha identificado la familia viral), primer número (número de muestreo), segundo número (número de muestra) y tercer número (número de fago aislado según la actividad lítica) [1].



FIGURA 1. Placa de Colifagos líticos: 4.4.2 = nula (0); 4.10.1 = baja (1); 4.4.1 = media (2); 4.7.2 = moderada (3); 4.8.1 y 4.3.1 = alta (4)

Purificación del ADN de los colifagos aislados

Se tomaron 5 aislados, considerando aquellos fagos que presentaron mayor actividad lítica frente a las cepas de *E. coli* patógenas. Para la amplificación de cada uno de los aislados de estos colifagos se inocularon 20 μ L del fago en 200 mL de LB con *E. coli* TOP10F. Se dejó incubando durante toda la noche a 37°C en agitación a 200 rpm. Al día siguiente se centrifugaron los 200 mL a 2.500 \times G por 15 min y se recuperaron los fagos en el sobrenadante.

Un total de 250 mL de la solución con colifagos se mezclaron con 50 mL de la solución de Polietilenglicol 6000 y NaCl 20 % / 2,5 Molar (M)(PEG / NaCl). Se dejó reposar toda la noche a 4°C para favorecer la precipitación. Al siguiente día se centrifugó la suspensión de fagos en tubos Falcon (Thermo Scientific, 339652, Thermo Scientific, EUA) de 50 mL a 3.000 \times G por 10 min a 4°C. Luego el sedimento resultante, se mezcló con 8 mL de la solución buffer SM (Tris HCl 5 %, NaCl 2 % y MgSO₄ 0,8 %) por tubo. Se dejaron en refrigeración por 2 horas (h). Posteriormente se añadieron 40 μ L de la solución de ARNasa (Ribonucleasa pancreática bovina), 20 miligramos por mililitro (mg·mL⁻¹) por tubo y se dejó incubar a 37°C durante una h. Concluida la incubación, se agregaron 2 mL de PEG/NaCl y se dejó en refrigeración a 4°C de 2 a 4 h. Luego se centrifugó a 2.500 \times G por 15 min. Se recogió el sobrenadante y se colocó en tubos de 20 mL con 2 mL de buffer SM los cuales se dejaron en refrigeración una h. De cada tubo se extrajeron 3 mL y se colocaron en 2 tubos Eppendorff de 1,5 mL. Luego se centrifugaron a 4.200 \times G por 10 min. Se eliminó el sobrenadante y se agregó más solución (1,5 mL) a los tubos de 20 mL y se volvió a centrifugar igual al procedimiento anterior. Se eliminó el sobrenadante y se reservó el sedimento de cada tubo centrifugado, se colocó en tubos Falcon, se agregaron 4 mL del buffer SM y se dejó a 4°C durante toda la noche. Después se tomaron 2 muestras de cada tubo y se colocaron en tubos Eppendorf de 1,5 mL. A cada tubo se le agregaron 20 μ L de la solución de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 0,5 M, pH 8,0 más 5 μ L de la solución de proteinasa K (Serina proteasa inespecifica derivada del hongo *Engyodontium album*, Sigma), 20 mg·mL⁻¹. Se incubó en baño María (Mommert, CE, Schutzart, Alemania) a 60°C por 2 h. Después de esto se colocaron 500 μ L de la solución de Fenol:Cloroformo:Ácido isoamílico (25:24:1) y se centrifugó a 14.000 \times G por 10 min. Se tomaron 300 μ L del sobrenadante y se colocaron en otro tubo, luego se agregaron 480 μ L de Isopropanol. Se dejó a temperatura de -20°C toda la noche (Congelador Indurama, Dos P, Indurama, Ecuador).

Luego de retiradas las muestras del congelador se dejaron reposar a temperatura ambiente. A continuación, se procedió a centrifugar las muestras a 14.000 \times G por 10 min a 4°C. se retiró con una pipeta el Isopropanol de cada tubo. A estos tubos se les agregaron 500 μ L de solución de Etanol al 70 % (para lavado). Se centrifugó a 14.000 \times G por 10 min a 4°C. Se retiró la solución de Etanol al 70 % y se dejaron secar los tubos con el sedimento a temperatura ambiente por 15 min. Se agregaron 40 μ L de agua desionizada a cada tubo y se colocaron en baño María (Mommert, CE, Schutzart, Alemania) por 20 min a 61°C. A continuación, se realizó una resuspensión en 200 μ L de agua desionizada; seguido se colocaron a baño María por 20 min a 61°C. Por último, las muestras de material genético total fueron almacenadas a 4°C.

Identificación molecular de los colifagos por RFLP

Para obtener un total de 500 nanogramos (ng) de material genético extraído de los cinco colifagos seleccionados, se realizó el cálculo de la concentración de ADN con la utilización del espectrofotómetro

(Biotek, Epoch, BioTek, EUA) y su adaptador Take 3 (Biotek, Epoch, BioTek, EUA), para así obtener la concentración adecuada de material genético y resultados más homogéneos en los ensayos RFLP.

Los ADN extraídos de los colifagos fueron sometidos a las enzimas de restricción: *Bam*HI (Thermo Scientific, #ER0051, EUA), *Eco*RI (Thermo Scientific, #ER0271, EUA), *Eco*RV (Thermo Scientific, #ER0301, EUA), y *Hind* III (Thermo Scientific, #ER0501, EUA). Se utilizaron entre 3 a 4 μ L de ADN de fagos, a los cuales se les añadieron aproximadamente entre 8–9 μ L de agua desionizada (de acuerdo a las cantidades de material genético presente en cada muestra) y 1,5 μ L de la enzima correspondiente. Se incubaron toda la noche a 37°C en estático. Las reacciones de digestión con cada una de las enzimas de restricción se retiraron de la incubadora y se les añadieron 1,5 μ L de solución tamponada de carga para ADN 6X [Bromofenol azul 0,03 %, xileno cianol FF 0,03 %, 60 milimolar (mM) de EDTA, pH 7.6 y glicerol 60 %], más 5 μ L de Colorante SYBR Green 10.000X (Invitrogen, Ref. S7567); esta mezcla se homogenizó en el Vortex (IKA, Lab dancer, IKA, EUA). Luego se incubó a 37°C por 10 min. Se realizó la preparación del gel al 1,2 %, utilizando agarosa (Invitrogen, Cat. No. 16500-500) y Buffer TAE 1X (Tris-acetato de 0,04 M, EDTA 1 mM y pH 8,0). Las muestras fueron retiradas de la incubadora y se cargaron 20 μ L de cada de ellas en cada pozo del gel de agarosa, y adicionalmente se colocaron en otro pozo, 5 μ L del marcador de peso molecular [Thermo Scientific Gene Ruler 1 kilobase (kb) Plus DNA Ladder, #SM1331, EUA]. Se corrió la cámara electroforesis horizontal (Biometra, Compactt XS/S, Biometra, Alemania) por una h y media, con 90 de Voltios. Una vez concluidas las corridas de cada una de las reacciones de digestión, se realizó la documentación de la imagen con el fotodocumentador ultravioleta (UV) (Bio Rad, Gel Doc XR+, Bio Rad, EUA) [12].

Análisis de información

Se estimaron frecuencias relativas, absolutas, se construyeron histogramas y tablas de contingencia con el programa estadístico Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versión 27.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento de fagos en granjas avícolas y plantas beneficiadoras de aves

En la TABLA I se muestra los resultados de los aislamientos de fagos obtenidos de las diferentes muestras sólidas y líquidas. Todas las muestras resultaron indistintamente positivas en su aislamiento, tanto muestras sólidas como líquidas. Las muestras líquidas (70 %) y sólidas (30 %) obtenidas de granjas de aves con colibacilosis y plantas beneficiadoras de aves respectivamente, resultaron positivas en el aislamiento de fagos colifagos. Se reporta que las fuentes más comunes de colifagos son aguas residuales de desechos de animales domésticos y plantas de tratamientos de aguas residuales, y posteriormente las heces [33]. La mayor presencia de bacteriófagos en las aguas residuales puede explicarse por el hecho de que la abundancia de fagos en el agua dulce, su habitat principal, es 10 a 20 veces mayor que la abundancia de las células hospedadoras o bacterias [13].

Las diluciones finales de las mezclas de fagos mostraron títulos individuales máximos de actividad bacteriolítica que van desde 1/100 hasta 1/100.000 (TABLA I). Este resultado es relevante para determinar el efecto de las condiciones de almacenamiento en la estabilidad de los fagos a largo plazo. Algunos autores, analizando la pérdida de título de

bacteriófagos, mantenidos a temperatura ambiente durante 1 y 2 años, observaron que en los fagos almacenado durante 1 año se produjo una pérdida de 6 logaritmos (log) en el título en tanto que, no se detectaron placas de lisis después de 2 años de almacenamiento [2, 10].

Capacidad lítica de bacteriófagos frente a cepas *E. coli*

Para evaluar la capacidad lítica, se desafiaron los 36 aislados de bacteriófagos contra 10 cepas de *E. coli* provenientes de casos clínicos (FIG. 2), obtenidos del biobanco del laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca, Ecuador [35].

TABLA I
Colifagos provenientes de muestras líquidas y sólidas de granjas avícolas y plantas beneficiadoras de aves con actividad lítica y diluciones óptimas de su actividad bacteriolítica frente a la cepa *E. Coli* Top10F^r

No.	Bacteriófago	Estado de la muestra	Dilución	Positivo / Negativo
1	vB-Eco_121	Líquido	1:100.000	Positivo
2	vB-Eco_122	Líquido	1:100.000	Positivo
3	vB-Eco_131	Líquido	1:100.000	Positivo
4	vB-Eco_132	Líquido	1:100.000	Positivo
5	vB-Eco_133	Líquido	1:100.000	Positivo
6	vB-Eco_141	Sólido	1:100.000	Positivo
7	vB-Eco_142	Sólido	1:100.000	Positivo
8	vB-Eco_161	Líquido	1:100.000	Positivo
9	vB-Eco_171	Líquido	1:10.000	Positivo
10	vB-Eco_181	Sólido	1:10.000	Positivo
11	vB-Eco_211	Líquido	1:10.000	Positivo
12	vB-Eco_241	Sólido	1:10.000	Positivo
13	vB-Eco_242	Sólido	1:10.000	Positivo
14	vB-Eco_251	Líquido	1:10.000	Positivo
15	vB-Eco_252	Líquido	1:10.000	Positivo
16	vB-Eco_261	Líquido	1:10.000	Positivo
17	vB-Eco_321	Líquido	1:10.000	Positivo
18	vB-Eco_322	Líquido	1:10.000	Positivo
19	vB-Eco_323	Líquido	1:10.000	Positivo
20	vB-Eco_324	Líquido	1:10.000	Positivo
21	vB-Eco_331	Sólido	1:10.000	Positivo
22	vB-Eco_322	Sólido	1:10.000	Positivo
23	vB-Eco_341	Sólido	1:1.000	Positivo
24	vB-Eco_411	Líquido	1:1.000	Positivo
25	vB-Eco_431	Sólido	1:1.000	Positivo
26	vB-Eco_441	Líquido	1:1.000	Positivo
27	vB-Eco_442	Líquido	1:1.000	Positivo
28	vB-Eco_451	Líquido	1:1.000	Positivo
29	vB-Eco_461	Líquido	1:1.000	Positivo
30	vB-Eco_462	Líquido	1:1.000	Positivo
31	vB-Eco_471	Líquido	1:1.000	Positivo
32	vB-Eco_472	Líquido	1:1.000	Positivo
33	vB-Eco_481	Líquido	1:1.000	Positivo
34	vB-Eco_491	Sólido	1:1.000	Positivo
35	vB-Eco_492	Sólido	1:1.000	Positivo
36	vB-Eco_410	Líquido	1:1.000	Positivo

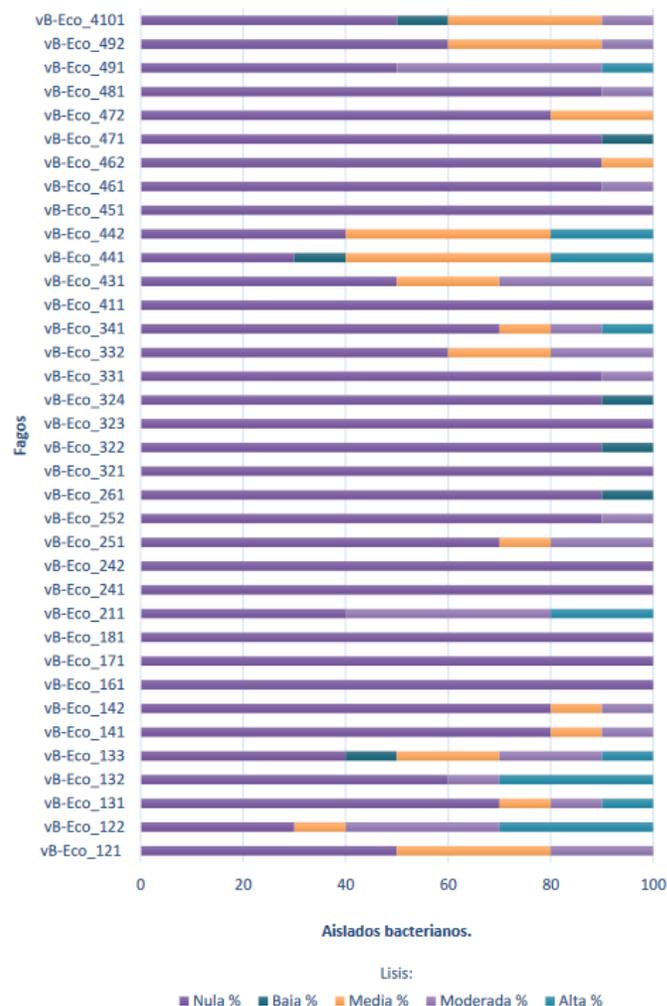


FIGURA 2. Capacidad lítica individual (%) por bacteriófago frente a 10 aislados de *E. coli* patógenas caracterizadas molecularmente

Los fagos tuvieron diferente comportamiento; los niveles de lisis se explican como el porcentaje de cepas que fueron afectadas por los fagos. Se observó que el 25 % de los fagos no mostraron capacidad lítica contra ninguna cepa de *E. coli*. El 75 % restante mostró distintos niveles de lisis bajas, medias y alta. Por otra parte, los fagos que sí presentaron capacidad lítica, mostraron diferentes niveles de acuerdo a la observación del halo (FIG. 3). Del total de 36 aislados de colifagos evaluados frente a 10 cepas patógenas de *E. coli*, 22 afectaron entre el 10 - 50 % de las cepas bacterianas evaluadas, 5 fagos infectaron entre el 60 y 70 % de bacterias y solo 9 fagos (25 %) no mostraron capacidad lítica frente a las cepas patógenas de *E. coli* (FIG.3).

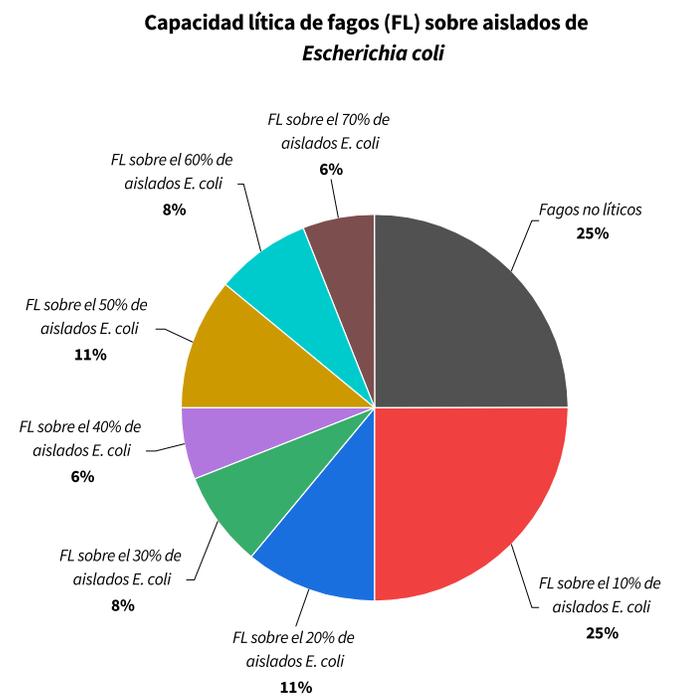


FIGURA 3. Capacidad lítica de los fagos a 10 aislados de *E. coli* patógenas caracterizadas molecularmente. El nivel de lisis se explica como el porcentaje de cepas que fueron afectadas

Egas en 2016 reportó el aislamiento de un fago de aguas residuales capaz de lisar una cepa de *E. coli* enteropatógena multiresistente, aislada de casos de diarrea en niños del Ecuador; el fago tuvo un amplio espectro de actividad lítica frente a miembros de la especie *E. coli* tanto comensal como a dos patotipos diferentes, mostrando actividad lítica alta y media sobre tres cepas diferentes [10]. Herrera y Trujillo en 2016, obtuvieron tres fagos líticos contra cepas de *E. coli* y *Salmonella choleraesuis*, sin embargo, no pudieron encontrar un fago que pudiera lisar la *E. coli* O157:h7 [16].

En este estudio se observó que un 25 % de los bacteriófagos no pudieron lisar a ninguna cepa de *E. coli*. Varios son los factores que pudieran afectar la capacidad lítica de los fagos. Se reportan diferencias en cuanto a la sensibilidad de los fagos al cloroformo usado como conservador, tiempo de exposición a la UV mayores de 40 segundos (s), tiempos de adsorción inferiores a 15 min de la mezcla fago-bacteria. El bacteriófago es sensible a temperaturas altas ya que a 55; 60 y 70 °C, en tan solo 5 min de exposición pueden ser inactivados [44].

Caracterización molecular (Ensayos RFLP)

Para la caracterización molecular de los fagos se seleccionaron los cinco con mayor capacidad lítica o sea aquellos que demostraron una actividad bactericida entre el 60 y el 70 % frente a los aislados de *E. coli* (FIG. 4). Fue posible diferenciar varios patrones de bandas del ADN de fagos, mediante ensayos RFLP, digeridos con las cuatro enzimas de restricción *BamHI*, *EcoRI*, *EcoRV* y *Hind III* (FIG.5).

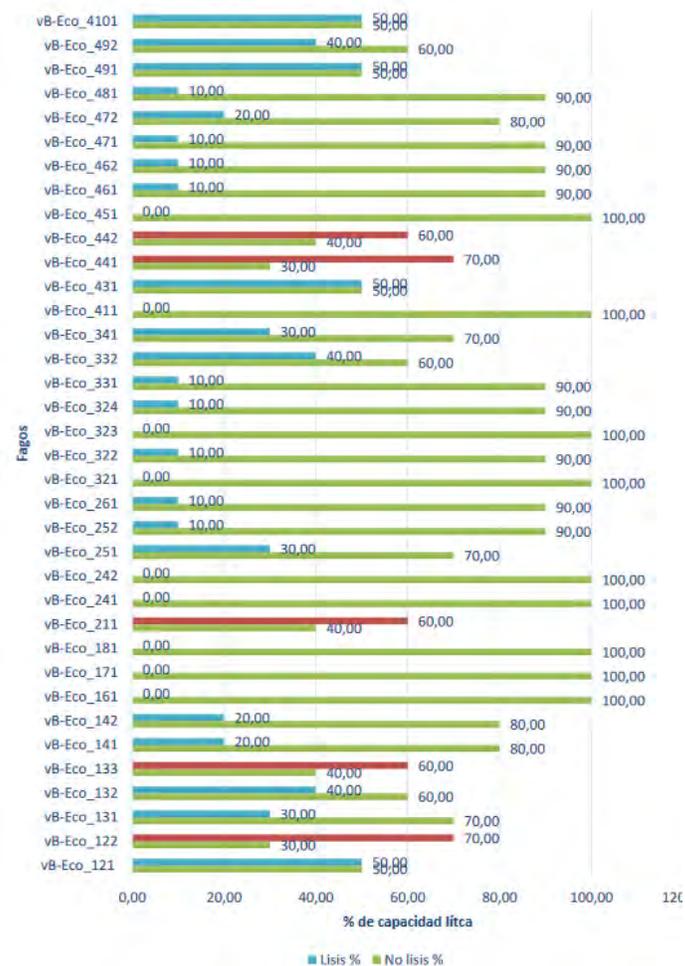


FIGURA 4. Porcentajes de cepas patógenas de *E. coli* que fueron o no afectadas por cada fago. Las barras color rojo muestran los 5 fagos seleccionados con capacidad lítica entre 60 y 70 % frente a las 10 cepas bacterianas molecularmente identificadas

De acuerdo a los perfiles observados, el fago vB-Eco_122 fue digerido por las cuatro enzimas, el fago vB-Eco_133 solo se observa digestión con la enzima *EcoRV*. Los fagos vB-Eco_211, vB-Eco_441 y vB-Eco_442 no fueron digeridos por la enzima *EcoRI* pero sí por las tres restantes. Los fagos vB-Eco_122, vB-Eco_133 y vB - Eco_211 muestran una clara diferencia entre sí, de acuerdo a la posición de sus bandas de restricción. Sin embargo, los fagos vB - Eco_441 y vB - Eco_442 muestran similitudes en la distribución y ubicación de las bandas de restricción, resultado posiblemente de sus genomas homólogos (FIG. 5).

En la TABLA II se resumen los patrones de restricción enzimática obtenidos mediante la técnica RFLP para cada uno de los fagos evaluados indicando patrones iguales y diferente de acuerdo a la distribución de sus bandas.

En cuanto a la capacidad lítica de los fagos vB-Eco_441 y vB-Eco_442, los cuales presentan patrones similares de bandas en los ensayos RFLP, presentaron algunas diferencias. En ambos el nivel de lisis fue el mismo sobre las mismas cepas, a excepción de la cepa 6, sobre

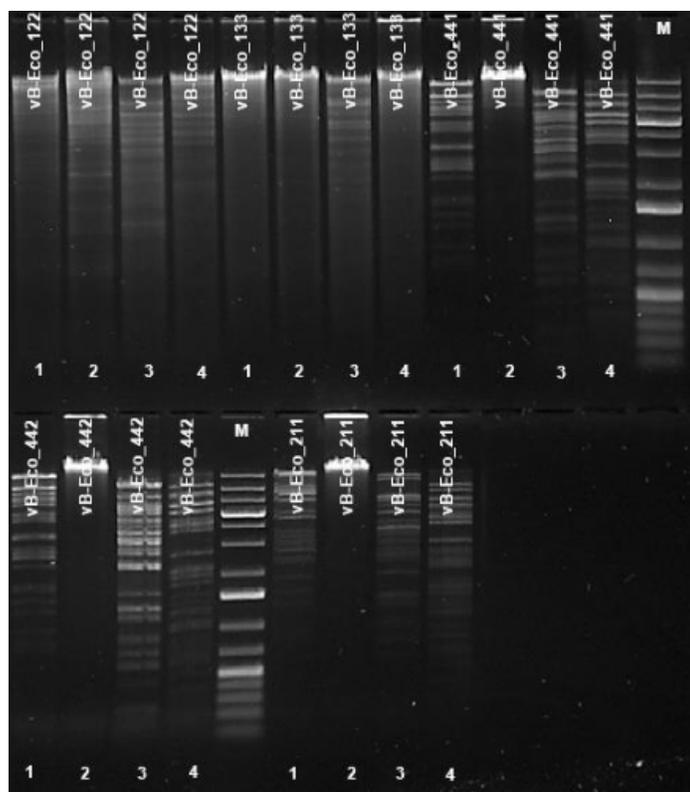


FIGURA 5. Gel de Electroforesis en Agarosa del Ensayo RFLP de los fagos seleccionados. Fagos: vB-Eco_122, vB-Eco_133, vB-Eco_211, vB-Eco_441 y vB-Eco_442. Enzimas: *BamHI* (1), *EcoRI* (2), *EcoRV* (3) y *Hind III* (4). Marcador de peso molecular (M)

TABLA II
RESULTADOS DE ENSAYOS RFLP: COMPARACIÓN DE PATRONES DE RESTRICCIÓN ENZIMÁTICA

N°	Bacteriófago	Enzima	Resultado	
			Igual	Diferente
1	vB-Eco_122	<i>BamHI</i>	-	2,3,4,5
2	vB-Eco_133		-	1,3,4,5
3	vB-Eco_211		-	1,2,4,5
4	vB-Eco_441		5	1,2,3
5	vB-Eco_442		4	1,2,3
1	vB-Eco_122	<i>EcoRI</i>	-	2,3,4,5
2	vB-Eco_133		-	1,3,4,5
3	vB-Eco_211		-	1,2,4,5
4	vB-Eco_441		5	1,2,3
5	vB-Eco_442		4	1,2,3
1	vB-Eco_122	<i>EcoRV</i>	-	2,3,4,5
2	vB-Eco_133		-	1,3,4,5
3	vB-Eco_211		-	1,2,4,5
4	vB-Eco_441		5	1,2,3
5	vB-Eco_442		4	1,2,3
1	vB-Eco_122	<i>Hind III</i>	-	2,3,4,5
2	vB-Eco_133		-	1,3,4,5
3	vB-Eco_211		-	1,2,4,5
4	vB-Eco_441		5	1,2,3
5	vB-Eco_442		4	1,2,3

la cual el fago vB-Eco_441 tuvo una lisis baja, a diferencia del fago vB-Eco_442, el cual mostro una lisis nula (FIG. 6).

En un estudio realizado por Oliveira y col. aislaron fagos de aguas residuales, logrando diferenciar genéticamente tres bacteriófagos líticos mediante la observación de bandas discriminatorias en cada patrón de restricción de ADN de fago según la enzima utilizada [31]. Estos autores muestran, por el contrario, que en su estudio hubo colifagos diferentes en su estructura molecular con diferentes actividades fagolíticas sobre las cepas de *E. coli* a las cuales afectaron [31]. López y col., tras someter el ADN de fagos a ensayos de restricción con seis enzimas, observaron que cuatro de ellas no pudieron digerir ninguno de los ADN, únicamente dos de ellas lo hicieron. Con esto obtuvieron cuatro fagos aislados y caracterizados genéticamente [23].

Para la caracterización de bacteriófagos específicos de biopelículas por *Bacillus cereus* en superficies de acero inoxidable, en instalaciones de procesamiento de alimentos, se utilizó con éxito la técnica RFLP; los ADN de bacteriófagos aislados extraídos se digirieron con cinco endonucleasas de restricción (*BamHI*, *EcoRI*, *Hind III*, *Hin6I* y *TaqI*); ninguno de los ADN de fagos extraídos fue susceptible a *BamHI* y *Hind III*, mientras que las enzimas *EcoRI*, *Hin6I* y *TaqI* dieron como resultado perfiles de restricción muy similares para los fagos seleccionados; indicando que los fagos seleccionados tenían tamaños de genoma similares y posiblemente estaban muy relacionados [14].

En este estudio se obtuvieron cuatro aislados de fagos diferentes molecularmente, de los cinco analizados mediante RFLP. Los

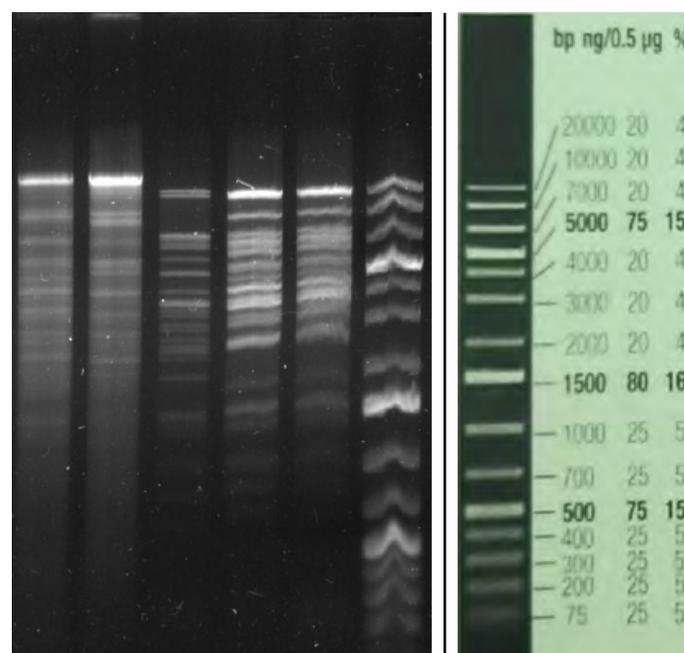


FIGURA 6. Gel de Electroforesis en Agarosa del Ensayo RFLP de los fagos seleccionados con la enzima *EcoRV* como una repetición del ensayo. Carril 1: vB-Eco_122. Carril 2: vB-Eco_133. Carril 3: vB-Eco_211. Carril 4: vB-Eco_441. Carril 5: vB-Eco_442. Carril 6: Marcador de peso molecular

resultados fluctuaron debido a que algunas enzimas no fueron capaces de digerir a un fago, pero sí a otro, propiedad individual factible de ser utilizada para la identificación del colifago. La resistencia específica a la digestión enzimática podría deberse a factores tales como la resistencia a la restricción por parte del fago debido a la presencia de bases hipermodificadas, como la hidroximetilcitosina (hmC) o la hmC glicosada en el ADN viral [21]. Otros factores que podrían estar implicados son la variación o inexistencia de la secuencia que reconoce a la enzima. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de la presencia de compuestos contaminantes que no fueron desechados en la purificación de ADN, pudiendo haber interferido inactivando determinada enzima de restricción [37].

CONCLUSIONES

- Se confirmó la presencia de colifagos en aguas residuales de plantas beneficiadoras de aves y muestras sólidas provenientes de galpones avícolas de granjas de pollos de engorde con diagnóstico de Colibacilosis, en la provincia de Azuay, Ecuador.
- Se obtuvieron cuatro aislados de bacteriófagos con diferente capacidad lítica sobre un alto porcentaje de cepas patógenas de *E. coli*, previamente identificadas molecularmente, obtenidas de granjas de la zona con casuística de colibacilosis aviar.
- La caracterización molecular por RFLP de los ADN de colifagos seleccionados, mostró diferencias en el material genético de forma eficaz y sencilla, mediante patrones de bandas exclusivas para cada fago y con diferentes susceptibilidades frente a las enzimas de restricción
- La capacidad lítica de los fagos pudiera ser independiente de su estructura molecular.
- Estos colifagos pudieran ser utilizados para enfrentar la colibacilosis aviar en sustitución de la terapia habitual de antibióticos, reduciendo así el riesgo del desarrollo de la resistencia bacteriana de las *E. coli* patógenas.

AGRADECIMIENTOS

La identificación molecular de *E. coli* patógenas y colifagos se realizó gracias al apoyo del laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca, Ecuador.

Conflictos de interés

No existen conflictos de interés.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ADRIAENSSENS, E.M.; BRISTER, J. Rodney. How to name and classify your phage: an informal guide. **Viruses**. 9(4): 70. 2017.
- [2] BAO, H.; ZHANG, H.; WANG, R. Isolation and characterization of bacteriophages of *Salmonella enterica* serovar Pullorum. **Poult. Sci.** 90(10): 2370-2377. 2011.
- [3] BARROW, P.; LOVELL, M.; BERCHIERI, A. J.R. Use of lytic bacteriophages for the control of experimental *Escherichia coli* septicemia and meningitis in chickens and calves. **Clin. Vaccine Immunol.** 5: 294-298. 1998.
- [4] BERCHIERI, A.; LOVELL, M.A.; BARROW, P.A. The activity in the chicken alimentary tract of lytic bacteriophage for *Salmonella typhimurium*. **Res. Microbiol.** 142: 541-549. 1991.
- [5] BRU-RONDA, C.; VAZQUEZ, M.; LOPEZ, R. Bacteriophages as a tool to combat infections in Aquaculture. **Aqua TIC.** 18: 3-10. 2003.
- [6] COLLIGNON, P.; WEGENER, H.C.; BRAAM, P.; BUTLER, C.D. The routine use of antibiotics to promote animal growth does little to benefit protein undernutrition in the developing world. **Clin. Infect. Dis.** 41: 1007-1013. 2005.
- [7] D'HERELLE F. Sur un microbe invisible antagonista des Bacilles dysentériques. **CR. Acad. Sci.** 165: 373-375. 1917.
- [8] DIZ, O. Técnicas de biología molecular en el diagnóstico de enfermedades infecciosas. **NPunto.** III (30): 88-111. 2020.
- [9] EATON, M.D.; BAYNE-JONES, S. Bacteriophage therapy. Review of the principles and results of the use of bacteriophages in the treatment of infections. **J.A.M.A.** 23: 1769-1939. 1934.
- [10] EGAS-VIVERO, P.R. Caracterización fenotípica y genotípica del bacteriófago 5Q18 activo contra *Escherichia coli* enteropatógena multiresistente. Ecuador. Red de Repositorios Latinoamericanos. 2006-2018. Tesis de Grado. Pp. 62. 2016
- [11] ESMAT, M. M.; ABDELHAMID, A. G.; ABO-ELMAATY, S. A.; NASR-ELDIN, M. A.; HASSAN, M. G.; KHATTAB, A. A.; ESMAEL, A. Antibiotics and phage sensitivity as interventions for controlling *Escherichia coli* isolated from clinical specimens. **J. Pure Appl. Microbiol.** 11(4): 1749-1755. 2017.
- [12] FAIZA, A.F.; HESHAM M. S.; SAHAR, M.W. PCR-based DNA Fingerprinting Analysis of Coliphages Isolated from Sewage Polluted Seawater in Alexandria. **Pakistan J. Biolog. Sci.** 5(9): 938-42. 2002.
- [13] FUHRMAN, J.A.; SCHWALBACH, M. Viral influence on aquatic bacterial communities. **Biol. Bull.** 204(2): 192-195. 2017.
- [14] GDOURA-BEN AMOR, M.; CULOT, A.; TECHER, C.; ALRESHIDI, M.; ADNAN, M.; JAN, S.; GAUTIER, M. Isolation, Partial characterization and application of bacteriophages in eradicating biofilm formation by *Bacillus cereus* on stainless steel surfaces in food processing facilities. **Pathog.** 11(8): 872. 2022.
- [15] HATFULL, G.F.; HENDRIX, R.W. Bacteriophages and their genomes. **Curr. Opin. Virol.** 1(4): 298-303. 2022.
- [16] HERRERA-ESCOBEDO, M.D.; TRUJILLO-CASTRO, M.A. Aislamiento y caracterización biológica de bacteriófagos con actividad lítica sobre las bacterias *Escherichia coli* y *Salmonella* spp. Red de Repositorios Latinoamericanos. Universidad de Sonora. Tesis de Grado. Pp 89. 2016.
- [17] HUDSON, J. A.; BILLINGTON, C.; CAREY-SMITH, G.; GREENING, G. Bacteriophages as Biocontrol Agents in Food. **J. Food Protect.** 68(2): 426-437. 2005.
- [18] HUFF, W. E.; HUFF, G. R.; RATH, N. C.; BALOG, J. M.; DONOGHUE, A. M. Bacteriophage treatment of a severe *Escherichia coli* respiratory infection in broiler chickens. **Avian Dis.** 47(4): 1399-1405. 2003.
- [19] HUFF, W.E.; HUFF, G.R.; RATH, N.C.; BALOG, J.M.; DONOGHUE, A.M. Prevention of *Escherichia coli* infection in broilers with an aerosol of bacteriophage. **Poult. Sci.** 81: 1486-1491. 2002.

- [20] HUFF, W.E.; HUFF, G.R.; RATH, N.C.; BALOG, J.M.; DONOGHUE, A.M. Evaluation of aerosol and intramuscular injection of bacteriophages to treat respiratory *Escherichia coli* infection. **Poult. Sci.** 82: 1108-1112. 2003.
- [21] KULIKOV, E. E.; GOLOMIDOVA, A. K.; LETAROVA, M. A.; KOSTRYUKOVA, E. S.; ZELININ, A. S.; PROKHOROV, N. S.; LETAROV, A. V. 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. 2014.
- [22] KUTTER, E.; SULAKVELIDZE, A. Phage for the Detection of Pathogenic Bacteria. *Bacteriophages: Biology and applications.* 1st. Ed. Crc Press, Boca de Raton. Pp 1-4. 2004.
- [23] LÓPEZ-CUEVAS, O.; CASTRO-DEL CAMPO, N.; LEÓN-FÉLIX, J.; GONZÁLEZ-ROBLES, A.; CHAIDEZ, C. Characterization of bacteriophages with a lytic effect on various *Salmonella* serotypes and *Escherichia coli* O157:H7. **Can. J. Microbiol.** 57(12): 1042-1051. 2011.
- [24] MA, J.; LIU, J.H.; LUCHAO, L.; ZONG, Z.; SUN, Y.; ZHENG, H.; CHEN, Z.; ZENG, Z.L. Characterization of extended-spectrum β -lactamase genes found among *Escherichia coli* isolates from duck and environmental samples obtained on a duck farm. **Appl. Environ. Microbiol.** 76(10): 3668-3673. 2012.
- [25] MATTHIJS, M.G.; ARIAANS, M.P.; DWARS, R.M.; VAN ECK, J.H.; BOUMA, A.; STEGEMAN, A.; VERVELDE, L. Course of infection and immune responses in the respiratory tract of IBV infected broilers after superinfection with *E. coli*. **Vet. Immunol. Immunopathol.** 127(1): 77-84. 2019.
- [26] MCGRATH, S.; SINDEREN, D.V. Bacteriophage as a Model Genetic System. *Bacteriophage: Genetics and Molecular Biology.* 3rd. Ed. Caister Academic Press. New York. Pp 137-172. 2007.
- [27] MCKELLAR, Q.A.; SANCHEZ-BRUNI, S.F.; JONES, D.G. Pharmacokinetic / pharmacodynamic relationships of antimicrobial drugs used in Veterinary Medicine. **J. Vet. Pharmacol. Ther.** 27(6): 503-514. 2004.
- [28] MELLATA, M. Human and avian extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: Infections, zoonotic risks, and antibiotic resistance trends. **Foodborne Pathog. Dis.** 10: 916-932. 2013.
- [29] MIRSKI, T.; MIZAK, L.; NAKONIECZNA, A.; GRYKO, R. Bacteriophages, phage endolysins and antimicrobial peptides – the possibilities for their common use to combat infections and in the design of new drugs. **Ann. Agric. Environ. Med.** 26(2): 203-209. 2019.
- [30] MOYE, Z.D.; WOOLSTON, J.; SULAKVELIDZE, A. Bacteriophage Applications for Food Production and Processing. **Viruses.** 10(4): 205. 2018.
- [31] OLIVEIRA, A.; SILLANKORVA, S.; QUINTA, R.; HENRIQUES, A.; SERENO, R.; AZEREDO, J. Isolation and characterization of bacteriophages for avian pathogenic *E. coli* strains. **J. Appl. Microbiol.** 106(6): 1919-1927. 2009.
- [32] ORLOVA, E.V. Bacteriophages and Their Structural Organisation. **Bacteriophages Perspective and Future.** Sava, R. (Ed.). United Kingdom. Pp 5-30. 2012.
- [33] OSAWA, S.; FURUSE, K.; WATANABE, I. Distribution of ribonucleic acid coliphages in animals. **Appl. Environ. Microbiol.** 41(1): 164-168. 1981.
- [34] PARK, S.C.; SHIMAMURA, I.; FUKUNAGA, M.; MORI, K.I.; NAKAI, T. Isolation of bacteriophages specific to a fish pathogen, *Pseudomonas plecoglossicida*, as a candidate for disease control. **Appl. Environ. Microbiol.** 66: 1416-1422. 2000.
- [35] RAKIETEN, T.L.; RAKIETEN, M.L. Bacteriology in the developing chick embryo. **J. Bact.** 45: 477-484. 1943.
- [36] SHIKARA, M. Identification of a restriction endonuclease (SacC1) from *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Yeast Fungal Res.** 1(7): 127-135. 2010.
- [37] SKLAR, I.B.; JOERGER, R.D. Attempts to use bacteriophages to combat *Salmonella enterica* serovar Enteritidis infection in chickens. **J. Food Safety.** 21: 15-29. 2001.
- [38] SMITH, H.W.; HUGGINS, M.B. Successful treatment of experimental *Escherichia coli* infections in mice using phages: their general superiority over antibiotics. **J. Genet. Microbiol.** 128: 307-318. 1982.
- [39] SMITH, H.W.; HUGGINS, M.B.; SHAW, K.M. Control of experimental *Escherichia coli* diarrhea in calves by means of bacteriophages. **J. Gen. Microbiol.** 133: 1111-1126. 1987.
- [40] SPELLBERG, B. The future of antibiotics. **Crit. Care.** 18(3): 228. 2014.
- [41] SPELLBERG, B.; GILBERT, D.N. The future of antibiotics and resistance: A tribute to a career of leadership by John Bartlett. **Clin. Infect. Dis.** 59(Suppl 2): S71-S75. 2014.
- [42] SULAKVELIDZE, A.; ALAVIDZE, Z.; MORRIS, J.G. **Bacteriophage Therapy Antimicrob. Agents. Chemother.** 45(3): 649-659. 2001.
- [43] SULAKVELIDZE, A. Using lytic bacteriophages to eliminate or significantly reduce contamination of food by foodborne bacterial pathogens **J. Sci. Food. Agric.** 93: 3137-3146. 2013.
- [44] WONG-GONZÁLEZ, A. Purificación y caracterización biológica del bacteriófago uB-19 específico de *Bacillus thuringiensis*. Universidad Autónoma de Nuevo León. Tesis Doctoral. Pp 25-47.1994.