



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN  
NICOLÁS DE HIDALGO**



**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIÓFAGOS QUE LISAN A  
CEPAS EPIDEMIOLÓGICAMENTE RELEVANTES DE *Staphylococcus aureus*  
CAUSANTES DE MASTITIS BOVINA**

**TESIS**

**PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**EN LA OPCIÓN DE:**

**MICROBIOLOGÍA CELULAR Y GENÉTICA MOLECULAR  
APLICADA**

**QUE PRESENTA:**

**QFB. NORMA ANAHI VALLE HURTADO**

**ASESOR:**

**DC. JUAN JOSÉ VALDEZ ALARCÓN**

**COASESOR:**

**DC. LUIS KAMEYAMA KAWABE**

**MORELIA, MICHOACÁN, MÉXICO; FEBRERO 2016**

*“Solo hay un agente infeccioso que viaje más  
rápido que un virus, el miedo.”*

**Dan Brown**

*“La soberbia no es grandeza sino hinchazón;  
y lo que está hinchado parece grande, pero no está sano”*

**Agustín de Hipona**

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de epidemiología molecular y biotecnología de las enfermedades infecciosas del Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia perteneciente a la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, bajo la dirección del Dr. Juan José Valdez Alarcón. En la realización de este trabajo se contó con el financiamiento de la coordinación de la investigación científica de la UMSNH (no. CIC-14.7), proyecto de fondos mixtos (No. MICH-2012-C05-196879) y beca de CONACYT (CONACYT no. 509360).

## AGRADECIMIENTOS

Primeramente agradezco a Dios la oportunidad de vida que me ha brindado, por dejarme recorrer este camino y guiarme a seguir su propósito.

**A mi mami**, que siempre ha sido mi motor de vida, mi ejemplo de lucha constante, de superación y valentía. A ti agradezco los valores con los que hoy me conduzco. Gracias por todo lo brindado durante este camino de preparación.

**A Papá Gil**, a ti agradezco todo ese apoyo que sin ser tu responsabilidad me has brindado. Gracias por enseñarme tantas cosas y por siempre motivarme a llegar más lejos.

### A mis hermanos:

**Bren**, por motivarme a ser mejor, por siempre tener una palabra perfecta para seguir adelante, por ser mi soporte en momentos difíciles. Gracias por ser mi gran amiga. **Frank**, por apoyarme en todas las formas posibles e incluso más allá de tu posibilidad. Mi niño, gracias por ser mi gran amigo y el soporte de la familia. **Normis**, porque pese a no llevar la misma sangre siempre estás ahí, eres sin duda una hermana de vida, gracias por todo tu apoyo, tus enseñanzas y sin duda la enorme paciencia. Gracias por el regalo más hermoso que pudieras darme (mi enano aby).

**A mi compañero de vida: Amor (Alex)**, agradezco de manera infinita todo tu apoyo, tu paciencia, tu motivación para culminar este proyecto, gracias por siempre estar ahí para mí, por jamás dejarme caer ni permitirme retroceder.

### A mis otras familias:

**Tía Gely y Tío Enry**, a ustedes agradezco el apoyo en todos los ámbitos, saben que para mí son como unos segundos padres. Agradezco a mis enanos **César, Ángel y Karito** por siempre llenar mi vida de alegría. **Tío Beto, Vianys**, de antemano no sé cómo retribuir a todo el apoyo, saben que para mí siempre serán parte esencial. Gracias por permanecer a mi lado siempre. Gracias por regalarme a esas latitas hermosas que llenan mi vida de color (**Fredy y Diego**)

**A mis niños de casa: Dianis, Cariño y Sinuhé**, gracias porque cada uno en su tiempo hizo más llevadero este proceso. Gracias por siempre tener un comentario positivo hacia mi persona.

**A mis amigos: Ely, Ale, Pita, Ady, Chio, Mary y Erick**. Gracias por todas las enseñanzas académicas y de vida. Gracias por caminar junto a mí en este proyecto, por toda su paciencia y apoyo incondicional.

**A Clau, Carito, Amigo grande (Humberto), Luis, Mina, Viry, Francisco, Aliz, Monse, Gaspar, Raúl, Dieguito, May, Jatziry, Dany, Uriel** y todos aquellos cuantos me apoyaron e hicieron más amenos los días en el laboratorio.

## AGRADECIMIENTO ACADÉMICO

Para el **Dr. Juan José Valdez Alarcón**, por darme la oportunidad de formar parte de su equipo, por compartir la idea que me dio las bases en mi investigación, y por facilitarme los medios para alcanzar los objetivos establecidos. Más allá de lo académico, agradezco los consejos y las enseñanzas, que directa o indirectamente me permiten hoy ser una mejor persona.

### A los miembros del comité sinodal.

**Dr. Luis Y. Kameyama Kawabe**, Co-asesor del proyecto de investigación, agradezco todas y cada una de sus aportaciones que sin duda enriquecieron y motivaron en gran medida el trabajo realizado.

**Dr. Marcos Cajero Juárez**, por sus aportaciones académicas y hacerme saber que todo siempre debe hacerse “perfecto”. Gracias por hacerme saber que en esta vida no hay cavidad para quien permanece en el error.

**Dr. Javier Oviedo Boyso**, por todos los aportes académicos, por la amistad y consejos durante la realización de esta tesis. Por los estímulos cuando la situación se tornaba complicada. Gracias por inyectar en mí, esa calidad humana que lo caracteriza.

**Dr. Alejandro Bravo Patiño**. Gracias por las aportaciones hacia mi trabajo y agradezco enormemente por fomentar en mí esa inquietud de siempre ir a buscar el “porque” de todo.

## **DEDICATORIA**

Dedico la presente tesis a todos aquellos que iniciaron, permanecieron y pese a las circunstancias hoy siguen conmigo, ha sido un largo camino, en el que disfrute de cada momento, pero donde sin duda hubo momentos de debilidad y no me dejaron sola. Fueron un pilar en todo momento y este logro lo obtuvimos juntos.

Con todo mi cariño, any.

## CONTENIDO

LISTA DE TABLAS.....	10
LISTA DE FIGURAS .....	11
ABREVIATURAS.....	13
RESUMEN.....	14
SUMMARY.....	15
<b>I.    INTRODUCCIÓN GENERAL .....</b>	<b>16</b>
<b>II.   MARCO TEÓRICO</b>	
<b>2.1 S. aureus como agente causal de mastitis bovina</b>	
2.1.1 Características.....	20
2.1.2 Clasificación de los factores de virulencia de <i>S. aureus</i> .....	21
2.1.3 Caracterización molecular .....	21
2.1.4 Multilocus Sequence Typing (MLST) .....	22
2.1.5 <i>spa</i> -typing.....	22
2.1.6 Patrones de resistencia a antibióticos .....	23
<b>2.2 Bacteriófagos</b>	
2.2.1 Historia.....	26
2.2.2 Características generales.....	28
2.2.3 Morfología.....	29
2.2.4 Clasificación.....	30
2.2.5 Replicación.....	33
2.2.5.1 Ciclo lítico.....	34
2.2.5.2 Ciclo lisogénico.....	36
2.2.5.2.1 Terapia lisogénica.....	36
<b>2.3 Fagoterapia lítica</b>	
2.3.1 Evolución.....	37
2.3.2 Aplicación de la fagoterapia en humanos.....	39

2.3.3	Aplicación de la fagoterapia en infecciones causadas por <i>S. aureus</i>	41
.....		
<b>III.</b>	<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	45
<b>IV.</b>	<b>HIPÓTESIS</b> .....	48
<b>V.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	48
<b>VI.</b>	<b>METODOLOGÍA</b>	
6.1	Selección y activación de cepas.....	49
6.2	Muestreo de bacteriófagos.....	49
6.3	Enriquecimiento de bacteriófagos.....	50
6.4	Aislamiento de bacteriófagos.....	50
6.5	Determinación de viabilidad de <i>S. aureus</i> a D.O. 0.5.....	51
6.6	Determinación de títulos 1.....	51
6.7	Determinación de títulos 2.....	51
6.8	Determinación del rango de hospedero (Prueba de la gota).....	52
6.9	Extracción de material genético.....	52
6.10	Identificación de material genético.....	53
6.11	Caracterización molecular de bacteriófagos.....	54
6.12	Determinación de estabilidad de los bacteriófagos a temperatura...55	
6.13	Determinación de estabilidad de los bacteriófagos a pH.....	55
<b>VII.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	
7.1	Selección y activación de cepas.....	56
7.2	Muestreo de bacteriófagos.....	58
7.3	Enriquecimiento y aislamiento de bacteriófagos.....	60
7.4	Incremento de títulos en medio sólido.....	65
7.5	Determinación de títulos 1.....	66
7.6	Determinación de viabilidad de <i>S. aureus</i> a D.O. 0.5.....	67
7.7	Rango de hospedero.....	67
7.8	Identificación de material genético.....	73

7.9	Caracterización molecular de bacteriófagos .....	74
7.10	Determinación de títulos 2 .....	81
7.11	Determinación de estabilidad de los bacteriófagos a temperatura...82	
7.12	Determinación de estabilidad de los bacteriófagos a pH .....	86
<b>VIII.</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	90
<b>IX.</b>	<b>REFERENCIAS</b> .....	91

## LISTA DE TABLAS

1. Frecuencia de patrones de resistencia de antibióticos  $\beta$ - lactámicos de especies de *Staphylococcus* asociados estadísticamente a mastitis subclínica bovina.
2. Frecuencia de Patrones de resistencia antibióticos no  $\beta$ - lactámicos para *S. aureus* asociados estadísticamente a mastitis subclínica bovina.
3. Clasificación de bacteriófagos por morfotipos.
4. Componentes de reacción para digestión con DNasa.
5. Componentes de reacción para digestión con RNasa.
6. Componentes de reacción para digestión con enzimas ®Promega.
7. Cepas de *S. aureus*. Criterios de selección para utilizarse en el desarrollo del proyecto.
8. Relación de sitios de muestreo para la obtención de fagos.
9. Origen de los fagos aislados y morfología de placas líticas.
10. Determinación de títulos 1.
11. Viabilidad de diferentes genotipos de *S. aureus* a DO de 0.5.
12. Rango de hospedero. Determinación de infección o no infección.
13. Rango de hospedero. Comparaciones genéticas entre las cepas de aislamiento e infección.
14. Características de las enzimas de restricción utilizadas.
15. Determinación de títulos 2.

## LISTA DE FIGURAS

1. Línea del tiempo de sucesos importantes en la historia de los bacteriófagos.
2. Morfología típica de fagos.
3. Ciclos de replicación de bacteriófago  $\lambda$  en *E. coli*: ciclo lítico y lisogénico.
4. Muestreo en producción lechera de traspatio, comunidad de Tejaro, Michoacán.
5. Muestreo en planta tratadora de aguas residuales "Las Garzas" Pátzcuaro, Michoacán.
6. Muestreo en planta tratadora de aguas residuales "San Pedrito" Pátzcuaro, Michoacán.
7. Esquematización de enriquecimiento para obtención de fagos.
8. Aislamiento de Placas líticas mediante agar doble capa.
9. Incremento de títulos en medio sólido.
10. Determinación de títulos en placa.
11. Digestión de material genético con DNasa y RNasa observado mediante electroforesis en gel de agarosa.
12. Patrón de corte en digestión de material genético de fagos con enzima *Xba I*, observado mediante electroforesis simple en gel de agarosa.
13. Árbol filogenético producto del análisis del patrón de corte con la enzima *Xba I*.
14. Patrón de corte en digestión de material genético de fagos con enzima *Hind III*, observado mediante electroforesis simple en gel de agarosa.
15. Árbol filogenético producto del análisis del patrón de corte con la enzima *Hind III*.
16. Patrón de corte en digestión de material genético de fagos con enzima *Eco RI*, observado mediante electroforesis simple en gel de agarosa.
17. Árbol filogenético producto del análisis del patrón de corte con la enzima *Eco RI*.
18. Patrón de corte en digestión de material genético de fagos con enzima *Pst I*, observado mediante electroforesis simple en gel de agarosa.

19. Árbol filogenético producto del análisis del patrón de corte con la enzima *Pst* I.
20. Patrón de corte en digestión de material genético de fagos con enzima *Kpn* I, observado mediante electroforesis simple en gel de agarosa.
21. Árbol filogenético producto del análisis del patrón de corte con la enzima *Kpn* I.
22. Determinación de títulos 2.
23. Estabilidad a temperatura correspondiente al bacteriófago 3.
24. Estabilidad a temperatura correspondiente al bacteriófago 8.
25. Estabilidad a temperatura correspondiente al bacteriófago 15.
26. Estabilidad a temperatura correspondiente al bacteriófago 18.
27. Estabilidad a temperatura correspondiente al bacteriófago 27.
28. Estabilidad a pH correspondiente al bacteriófago 3.
29. Estabilidad a pH correspondiente al bacteriófago 8.
30. Estabilidad a pH correspondiente al bacteriófago 15.
31. Estabilidad a pH correspondiente al bacteriófago 18.
32. Estabilidad a pH correspondiente al bacteriófago 27.

## ABREVIATURAS

°C	Grados centígrados
g	Gramos
µg	Microgramos
l	Litros
ml	Mililitros
µl	Microlitros
µm	Micrómetros
nm	Nanómetros
M	Concentración molar
CSS	Cuanto sea suficiente para
pH	Potencial de Hidrógeno
min	Minutos
s	Segundos
rpm	Revoluciones por minuto
%	Porcentaje
UV	Luz ultravioleta
UFC	Unidades formadoras de colonia
UFP	Unidades formadoras de placa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
D.O.	Densidad óptica
MG	Material genético
CI	Cepas infectadas
RH	Rango de Hospedero
CaCl <sub>2</sub>	Cloruro de Calcio
BSA	Albumina de suero de bovino
EDTA	Ácido Etilendiaminotetraacético
HCl	Ácido Clorhídrico
MgSO <sub>4</sub>	Sulfato de Magnesio
NaCl	Cloruro de Sodio
PEG	Polietilenglicol
SDS	Dodecil sulfato de sodio
RE	Solución amortiguadora de reacción E
SM	Solución amortiguadora a base de NaCl, MgSO <sub>4</sub> y Tris-HCl. pH 7.5
TE	Solución amortiguadora a base de Tris-HCl y EDTA pH 7.5
TM	Solución amortiguadora a base de Tris-HCl y MgSO <sub>4</sub> pH 7.5
2xYT	Medio de cultivo a base de triptona, extracto de levadura y NaCl.

## RESUMEN

La terapia de bacteriófagos es una alternativa re-emergente para el control de bacterias multiresistentes a antibióticos causales de enfermedades infecciosas. El éxito en el aislamiento de bacteriófagos efectivos depende de la apropiada selección de cepas. En este trabajo se presenta el aislamiento de bacteriófagos basado en una colección de cepas de *Staphylococcus aureus*, obtenidas de casos de mastitis bovina que fueron objeto de la caracterización molecular por multilocus sequence typing (MLST) y *spa*-typing. En un estudio anterior, encontramos alta prevalencia de aislados de *S. aureus* con secuencias tipo (STs) asociados al subgrupo ST97 (ST97 y ST126) y ST352 en el complejo clonal (CC) CC5, genotipos aislados de mastitis bovina o de la zona de producción lechera. Con menor prevalencia encontramos aislados relacionados con el subgrupo ST8 también perteneciente al CC5, un genotipo relacionado con las infecciones adquiridas en la comunidad e intrahospitalarias. Aislados correspondientes a estos genotipos diferentes en *spa*-tipo y en el perfil de resistencias a diversos antibióticos, fueron utilizados para la selección de los bacteriófagos a partir de muestras del tanque de llegada de una planta tratadora de aguas residuales. Se aislaron 28 bacteriófagos siguiendo el protocolo de Kwiatek *et al.*, (2011). 25 bacteriófagos fueron aislados en presencia de CaCl<sub>2</sub> 10 mM y tres con CaCl<sub>2</sub> y MgCl<sub>2</sub>, 5 mM cada uno. Se determinó la estabilidad a la temperatura y pH para cada bacteriófago. El rango de hospedero se analizó probando contra los diferentes fondos genéticos de *S. aureus*. Se identificaron al menos 10 patrones de infección o rango de hospedero (RH). La mayoría de los RH fueron infectivos contra cepas del CC5, subgrupos ST97 y ST126. El polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción del ADN genómico de bacteriófago, con las enzimas de restricción *Xba* I, *Hind* III, *Eco* RI, *Pst* I y *Kpn* I revelaron diferentes patrones de restricción, que fueron asociados en al menos 4 grupos principales usando el algoritmo UPGMA del software PyElph v4. Las asociaciones genotípicas sugieren que los bacteriófagos 5-8 pueden ser usados en terapia fágica por su amplio rango de hospedero (7 genotipos). En conclusión, el uso de cepas de *S. aureus* estrictamente tipificadas con enfoques moleculares, nos permitió aislar diversos bacteriófagos contra los principales fondos genéticos de *S. aureus* prevalentes en la región. Este enfoque de aislamiento de bacteriófagos basado en estudios de epidemiología molecular representa un ejemplo práctico de la epidemiología molecular funcional para el desarrollo biotecnológico.

**Palabras clave:** Epidemiología molecular, *Staphylococcus aureus*, mastitis bovina, bacteriófagos, RFLP.

## SUMMARY

Bacteriophage therapy is re-emerging as an alternative for the control of multidrug resistant bacteria that are causative agents of infectious diseases. Success in the isolation of useful bacteriophages depends on the proper selection of strains. In this work we present the isolation of bacteriophages based on a collection of *Staphylococcus aureus* strains obtained from subclinical bovine mastitis cases that were subject to molecular characterization by multilocus sequence typing (MLST) and *spa*-typing. In a previous study we found high prevalence of *S. aureus* isolates with sequence types (STs) associated to subgroups ST97 (ST97 and ST126) and ST352 in Clonal Complex (CC) CC5, genotypes typical for bovine or livestock isolates, respectively. With lower prevalence we found isolates related with subgroup ST8 also from CC5, a genotype related with community-acquired and hospital-acquired infections. Isolates corresponding to these genotypes and differing in *spa*-type and in the pattern of resistances to diverse antibiotics were used for the selection of bacteriophages from samples of the receiving tank of a wastewater treatment facility. 28 bacteriophages were isolated following the protocol of Kwiatek *et al* 2011. 25 bacteriophages were isolated in the presence of 10 mM CaCl<sub>2</sub> and three with CaCl<sub>2</sub> and MgCl<sub>2</sub>, 5 mM each. Stability to temperature and pH was determined for each bacteriophage. Host range was analyzed testing against the different *S. aureus* genetic backgrounds. At least 10 infection patterns or host range (RH) were identified. Most of the infection patterns were infective against strains from CC5, subgroups ST97 and ST126. Restriction fragment length polymorphism of bacteriophage genomic DNA, with the restriction enzymes *Xba* I, *Hind* III, *Eco* RI, *Pst* I and *Kpn* I revealed slightly different patterns that were grouped in at least four major clusters with each enzyme using the UPGMA algorithm of PyElph v4. Genotypic clustering suggests that bacteriophages 5-8 may be used in phage therapy because of their wider host range. In conclusion, the use of *S. aureus* strains finally typed with molecular approaches allowed us to isolate diverse bacteriophages against the major genetic backgrounds of *S. aureus* prevalent in the region. This approach of bacteriophage isolation based on molecular epidemiology studies represents a practical example of functional molecular epidemiology for biotechnological development.

## I. INTRODUCCIÓN GENERAL

La leche es definida por la Norma Oficial Mexicana NOM-243-SSA1-2010 como una secreción natural de las glándulas mamarias de las vacas sanas o de cualquier otra especie animal, excluido el calostro.

La leche vacuna es un alimento de primera necesidad y de gran demanda por su alto valor nutricional, es considerado un alimento básico en la dieta de toda la población. Los mamíferos dependen fundamentalmente de la leche de las hembras de su especie en sus primeros períodos de vida y el hombre ha aprovechado también la de algunos animales para su alimentación, empleándola directamente y transformándola para la obtención de derivados (Arrieta, 2011). La industrialización de la leche vacuna se ha desarrollado en todas las latitudes, permitiendo que cada día se obtenga una cantidad mayor de productos que son ideales para la nutrición humana.

En éste documento se maneja como leche a aquella secreción de origen bovino. En México, la leche se produce bajo tres sistemas principalmente, el especializado, semiespecializado y familiar o de traspatio (Villamar y Olivera, 2005). En el año 2012 la producción mundial de leche, registrada por la FAO, ascendió a cerca de 626 millones de toneladas. La producción de México en ese año fue de alrededor de 10.9 millones de toneladas, es decir, 1.7% del total mundial, ocupando el 16° lugar (LactoData, 2014).

Con base en datos estadísticos de SIAP/SAGARPA e INEGI, se estima que en Michoacán en el año 2014 se produjeron aproximadamente 346 427 toneladas de leche vacuna, ocupando así el 16° lugar en la producción del país (LactoData, 2016). En Michoacán el 90% de la producción lechera se lleva a cabo bajo el sistema de traspatio, el cual se caracteriza por ser extensiones territoriales en cercanía con las viviendas de los productores, poco tecnificadas que constan de 3-30 vacas, con ordeño manual que generalmente se conduce con poca higiene. El contacto durante la ordeña y las deficiencias sépticas, propician infecciones en los bovinos, tal es el caso de la mastitis (Saran y Chaffer, 2000). El sistema de

traspatio es considerado un sistema sustentable (Espinosa *et al.*, 2004), sin embargo, cuando en los hatos lecheros hay presencia de mastitis, se produce un bajo rendimiento en la producción de leche y un cambio en sus características organolépticas (Hortet y Segers, 1998; Bedolla y León, 2008). Por ende, esto se traduce en pérdidas monetarias para los productores (Wellenberg *et al.*, 2002; Bedolla y León, 2008; Hogeveen *et al.*, 2011).

La mastitis se caracteriza por una inflamación intramamaria grave en uno o más cuartos de la ubre, causada más comúnmente por la acción de uno o más patógenos, aunque también puede ser causada por una lesión y menos frecuente, por alergia y neoplasias (Menzies y Ramanoon, 2001).

Los microorganismos que provocan la mastitis bovina se clasifican en contagiosos tales como *Staphylococcus aureus*, y *Streptococcus* spp. (Zadoks *et al.*, 2011) y ambientales, los cuales son transmitidos por el contacto entre superficies contaminadas y la ubre de la vaca, entre estos se encuentran las bacterias del grupo coliforme, *Staphylococcus* coagulasa negativo (SCoN) y el grupo *Staphylococcus intermedius* (SIG) (Pyörälä S y Taponen S., 2009).

Estudios realizados en la zona de Tarímbaro Michoacán, muestran una prevalencia de mastitis del 64.57% (subclínica 60.41%, clínica 4.16%; Bautista-Trujillo *et al.*, 2013). Aislamientos obtenidos de muestras de mastitis en bovinos de esta región, muestran la participación de *S. aureus* como patógeno causal de la enfermedad.

Estos hallazgos y estudios anteriores referentes a mastitis bovina de otras regiones, muestran que si bien *S. aureus* no es el único patógeno que produce inflamación en la glándula mamaria (Zadoks *et al.*, 2011), si es el principal agente causal de la mastitis contagiosa (Hamilton *et al.*, 2006). A la fecha *S. aureus* es uno de los patógenos más estudiados en torno a esta patología, debido principalmente a su importancia en enfermedades de humanos relacionadas con procesos inflamatorios (Zadoks *et al.*, 2011).

A pesar de que existen mecanismos de control de la mastitis sugeridos por el Consejo Nacional de Mastitis de Estados Unidos de Norte América (National Mastitis Council, 1999), existe preocupación por la presencia de cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina (MRSA) y *Staphylococcus no-aureus* resistentes a meticilina (MRSCoN y MRSIG), así como *Staphylococcus spp.*, resistentes a vancomicina, los cuales son indicadores de la alarmante resistencia y multiresistencia hacia los fármacos antimicrobianos, lo que dificulta el tratamiento de la mastitis bovina. Existe evidencia de la transferencia horizontal de genes y elementos genéticos móviles entre bacterias (Brody *et al.*, 2008; Hiramatsu *et al.*, 2013) y es la principal razón de la generación de cepas más virulentas y resistentes a los antibióticos (Zaneveld *et al.*, 2008).

En la preocupación por el tratamiento de patologías asociadas a patógenos multiresistentes a antibióticos se cuestiona el uso de nuevas terapias. La terapia fágica o terapia a base de virus que infectan bacterias (bacteriófagos o fagos) comienza a principios del siglo XX, principalmente con el objetivo de tratar la disentería y algunas infecciones durante la segunda guerra mundial. Diversos ensayos clínicos acerca del uso de bacteriófagos muestran el uso de éstos en aproximadamente 2000 pacientes infectados con una variedad de patógenos (predominantemente resistentes a antibióticos) que fueron tratados y cuyos resultados, en forma global, fueron exitosos entre el 60 y 90% de los casos (Inal, 2003).

Sin embargo, a pesar de los éxitos citados, la fagoterapia ha sido relegada ante la creciente comercialización de antibióticos (Sulakvelidze, *et al.*, 2001) y de la estricta regulación por las leyes nacionales e internacionales (Parracho, *et al.*, 2012). Recientemente se han incrementado las investigaciones alrededor del mundo enfocadas en el uso de bacteriófagos como agentes antibacterianos para un amplio rango de aplicaciones. El incremento en la incidencia de bacterias patógenas multiresistentes a antibióticos ha justificado la revaloración de los bacteriófagos como agentes antibacterianos (O'Flaherty *et al.*, 2009).

El grupo de trabajo del laboratorio de epidemiología molecular y biotecnología de las enfermedades infecciosas dirigido por el Dr. Juan José Valdez Alarcón, ha realizado estudios de epidemiología molecular basados en la caracterización mediante *MLST*, genes de virulencia como (*spa*, *coa* y *pvl*) y algunos otros relacionados a la resistencia a antibióticos como genes del *mec*-Staphylococcal chromosome cassette (*SCCmec*). La información recabada mediante *MLST* permite integrarla en bases de datos globales y conocer el fondo genético que comparten los aislados locales y además compararlas con el resto de las cepas reportadas. Además incluye los sitios de aislamiento permitiendo conocer la transmisión de las cepas entre hospederos, *spa*-typing permite realizar una caracterización en uno de los factores de virulencia (gen de la proteína A) de *S. aureus*, el cual permite diferenciar entre los grupos de similitud establecidos por *MLST*. La múltiple resistencia a antimicrobianos conlleva al desarrollo de terapias alternativas para el tratamiento de *S. aureus* descrito como principal agente infeccioso causal de mastitis bovina. La realización de un estudio epidemiológico molecular que identifique las cepas prevalentes en las zonas lecheras con sistemas familiares, contribuye en el diseño de estrategias de prevención y control que disminuyan el riesgo de diseminación de *S. aureus* en los animales y los humanos (Ángel-Andrés, 2010; Carmona-Gasca 2012; Bautista-Trujillo 2013; Ángel-Andrés, 2012 y Bautista-Trujillo, 2014).

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1 *S. aureus* como agente causal de mastitis bovina

#### 2.1.1 Características

*Staphylococcus aureus* es una bacteria inmóvil Gram positiva, esférica y usualmente agrupada en racimos, anaerobia facultativa, catalasa positiva. Produce generalmente la enzima coagulasa (enzima que tiene un importante papel en la patogenia de la enfermedad, debido a que causa la formación de una capa de fibrina alrededor del absceso estafilocócico, localizando la infección y protegiendo a la bacteria de la fagocitosis), fermenta el manitol y otros azúcares, formando ácido pero no gas. Su crecimiento ocurre en un amplio rango de temperatura (6.5 a 50° C), siendo su temperatura óptima 30 - 40° C. Tolera altas concentraciones (7 al 10%) de cloruro de sodio. Se destruye fácilmente por temperaturas arriba de los 60° C y por casi todos los agentes desinfectantes, por lo cual la presencia de esta bacteria en alimentos procesados o en equipos indica generalmente higiene deficiente o contaminación post-proceso por causa humana (Castro *et al.*, 2006).

*S. aureus* tiene buena capacidad para colonizar animales, incluyendo mamíferos, reptiles y aves. En humanos, este organismo reside principalmente en las fosas nasales, piel, y ocasionalmente, puede encontrarse como parte de la flora del tracto digestivo y vaginal. Sin embargo, *S. aureus* también causa enfermedades en los humanos, algunas adquiridas en la comunidad como dermatitis, infecciones respiratorias, del tracto urinario; otras son adquiridas en hospitales (nosocomiales) como endocarditis infecciosa, osteomielitis y septicemias; todas de alta morbilidad y mortalidad entre pacientes hospitalizados. *S. aureus* también provoca intoxicación alimentaria al liberar sus enterotoxinas en los alimentos y produce el síndrome de choque tóxico provocado por la liberación de superantígenos en el torrente sanguíneo (Bustos-Martínez *et al.*, 2006).

Las cepas de *S. aureus* expresan diversos factores de virulencia; algunos de estos factores son expresados por genes que se localizan en elementos genéticos móviles como las islas de patogenicidad y los bacteriófagos lisogénicos (Foster, 2004).

### **2.1.2 Clasificación de los factores de virulencia de *S. aureus***

Baizabal *et al.* (2009), hacen una nueva clasificación de los factores de virulencia, donde además incorpora los genes que dan origen a los diferentes factores de virulencia, así como su localización. Asocia a éstos en 4 grupos: 1) exoenzimas (proteasas de serina, estafilocinasa, fosfodiesterasa, estafilo-coagulasa, hialuronidasa, proteasa de zinc e hidrolasas) las cuales intervienen en la invasión de tejidos y la evasión de la respuesta inmune del hospedador; 2) toxinas (exotoxinas, leucotoxinas D y E, leucocidinas F y M, leucocidina Pantón-Valentine, toxina de síndrome de choque tóxico, enterotoxinas y hemolisinas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\delta$ ) involucradas en su mayoría en la evasión de defensa celular y la invasión tisular; 3) adhesinas (como las proteínas de unión a fibrinógeno y fibronectina) características de unión a matriz extracelular y formación de biopelículas; 4) otros, como el transportador ABC de ferricromo y el sistema de incorporación de hierro.

### **2.1.3 Caracterización molecular**

En el laboratorio de epidemiología molecular y biotecnología de enfermedades Infecciosas del CMEB se ha iniciado la caracterización molecular de los aislamientos de *S. aureus* de mastitis bovina en granjas de traspato de la localidad de Tarímbaro en el estado de Michoacán mediante técnicas como Multilocus Sequence Typing MLST, análisis de macrorrestricción en geles de campos pulsátiles y análisis de la secuencia de la región Xr del gen que codifica para la proteína A, *spa*-typing (Ángel-Andrés *et al.*, en preparación; Bautista-Trujillo *et al.*, 2013; Carmona-Gasca *et al.*, 2012; Valdez-Alarcón *et al.*, 2012)

#### **2.1.4 Multilocus Sequence Typing (MLST)**

Esta técnica permite determinar el fondo genético compartido entre los aislados de *S. aureus* y agrupar a los mismos de acuerdo al número de alelos compartidos entre siete genes que se analizan. Los alelos evaluados pertenecen a genes de metabolismo primario, los cuales codifican para las enzimas carbamato cinasa (*arcC*), shiquimato deshidrogenasa (*aroE*), glicerol cinasa (*glpF*), guanilato cinasa (*gmk*), fosfo acetil transferasa (*pta*), triosa fosfato isomerasa (*tpi*) y acetil CoA transferasa (*yqiL*). A la combinación de alelos de los siete genes se les denomina Secuencia-tipo (ST). A los grupos de similitud que comparten seis, cinco o cuatro de los siete alelos, se les denomina complejos clonales (CC) (Carmona-Gasca *et al.*, 2012; Maiden 2006; Enright *et al.*, 2000).

Mediante el análisis de secuencias multilocus (MLST) de aislamientos de *S. aureus* se identificaron 6 STs reportados, 4 alelos (Nas) y 12 STs nuevos (NSTs). El NST-4 fue el más ubicuo, ya que se identificó en aislados de *S. aureus* de origen bovino, humano y fomite. La mayoría de los aislados de bovino y un aislado de humano se agruparon en el CC97 reportado como asociado a bovinos. Se encontraron dos aislados de bovinos con ST8, la cual se ha reportado como asociada a infecciones de comunidad en humanos. Análisis de distribución de las cepas sugieren que el NST-4 se comporta como la clona fundadora de la cual se derivan varios de los NSTs encontrados en bovinos. La presencia de aislados con genotipo NST-4 en humanos y fómites y de aislados con genotipo ST8 en bovinos, sugiere que estos genotipos tienen potencial zoonótico (Ángel-Andrés *et al.*, en preparación).

#### **2.1.5 spa-typing**

Para conocer el comportamiento epidemiológico de cepas de *S. aureus* se ha abordado el análisis del polimorfismo en genes de virulencia como el gen de la proteína A (*spa*) y de la coagulasa (*coa*), los cuales según estudios anteriores,

presentan una relación con las formas de patogenia de la enfermedad causada por este microorganismo (Bustos-Martínez *et al.*, 2006).

La técnica *spa*-typing permite identificar el número, tipo y orden en el que se presentan las SSR's (secuencias cortas repetidas) que componen la porción Xr de la región variable en la proteína SpA. La región Xr promueve procesos inflamatorios de una manera dependiente de la longitud de los SSR's. Esta región es identificada gracias a la delimitación dada por secuencias denominadas "firmas" en los extremos 5' (RCA MCA AAA) y 3' (TAY ATG TCG T). La variabilidad en la longitud y en el polimorfismo de secuencias de las SSR's se ha aprovechado para utilizar a la región Xr como un marcador molecular en la caracterización de *S. aureus*. Los *spa*-tipos (combinación de SSR's en la región Xr) encontrados mediante esta técnica en los aislados de *S. aureus* del CMEB son t224, t008, t605, t693, t1965, t4570, t189, t605, t267, t267, t267, t224, t008, t1965, t1965, t8265, t1965 y t211 (Carmona-Gasca *et al.*, 2012).

### **2.1.6 Patrones de resistencia a antibióticos**

Las cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina (MRSA) y *Staphylococcus* coagulasa-negativos y del grupo de *S. intermedius* resistentes a meticilina (MRSCoN y MRSIG), así como *Staphylococcus* spp. resistentes a vancomicina, son un indicador de la alarmante multiresistencia hacia los fármacos antimicrobianos, lo que dificulta el tratamiento de infecciones bacterianas. Existe evidencia de la transferencia horizontal de genes y elementos genéticos móviles entre bacterias (Brody *et al.*, 2008; Hiramatsu *et al.*, 2013) y es la principal razón de la aparición de cepas más virulentas y resistentes a los antibióticos (Zaneveld *et al.*, 2008). Un ejemplo de movilidad genética es la presencia de islas genómicas en *S. aureus*, principalmente la "isla de resistencia móvil" *SaRI* la cual se cree que fue adquirida por transferencia horizontal y porta el gen *fusB* que confiera resistencia al ácido fusídico (O'Neill *et al.*, 2007).

La resistencia a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos ( $\beta$ -LAC) y específicamente a Oxacilina (OXA) en especies de *Staphylococcus*, se debe principalmente al gen *mecA* localizado en un elemento genético móvil conocido como mec-Staphylococcal chromosome cassette (SCC*mec*), que también puede contener otros genes de resistencia a aminoglucósidos o macrólidos, y de los que se conocen hasta ahora 11 variantes del SCC*mec* que contienen 6 complejos *mec* diferentes. Recientemente se han descrito homólogos del gen *mecA* conocidos como *mecB* y *mecC* en humanos y animales. La adquisición de estos genes de resistencia sugieren una constante evolución de las bacterias resistentes a meticilina (Garcia *et al.*, 2011; Unnerstad *et al.*, 2013).

Una de las características importantes en aislados del género *Staphylococcus* es su capacidad para resistir la acción de compuestos antimicrobianos. El grupo de trabajo antes mencionado, obtuvo los siguientes resultados al evaluar la resistencia a penicilina (P), ampicilina (AM), oxacilina (OXA), cefoxitina (FOX) (antibióticos  $\beta$ -lactámicos) de 241 cepas de especies de *Staphylococcus* asociadas estadísticamente a mastitis subclínica bovina. En la tabla 1, se observa el alto porcentaje de resistencia a P y AM en la mayoría de las especies. En el estudio se evaluó además la resistencia a otros fármacos como Vancomicina (VA) (Glicopeptidos), Gentamicina (GM) (Aminoglucosidos) y Lincomicina (L) (Lincosamidas) (Tabla 2).

**Tabla 1 Frecuencia de Patrones de resistencia de antibióticos  $\beta$ - lactámicos de especies de *Staphylococcus* asociados estadísticamente a mastitis subclínica bovina. Modificado de Bautista-Trujillo 2014**

Nombre (Número de cepas)	Prueba de difusión en disco			
	No. De cepas resistentes (%)			
	P	AM	OXA	FOX
<i>S. aureus</i> (n=72)	62 (86.11)	56 (77.78)	19 (26.39)	15 (20.83)
<i>S. haemolyticus</i> (32)	23 (75)	22 (71.88)	2 (6.25)	2 (6.25)
<i>S. saprophyticus</i> (22)	11 (54.55)	8 (36.36)	4 (18.18)	6 (22.73)
<i>S. sciuri</i> (21)	16 (76.19)	16 (76.19)	3 (14.29)	8 (42.86)
<i>S. epidermidis</i> (37)	31 (83.78)	29 (78.38)	6 (16.22)	6 (16.22)
<i>S. hominis</i> (14)	14 (100)	14 (100)	4 (28.57)	6 (35.71)
<i>S. xylosus</i> (26)	9 (34.62)	5 (19.23)	2 (7.69)	3 (11.54)
<i>S. Intermedius</i> Group (17)	14 (82.35)	14 (82.35)	5 (29.41)	4 (23.52)

**Tabla 2 Frecuencia de Patrones de resistencia de antibióticos no  $\beta$ - lactámicos para *S. aureus* asociados estadísticamente a mastitis subclínica bovina. Modificado de Bautista-Trujillo, 2014**

Nombre (Número de cepas)	Prueba de difusión en disco			
	% De cepas resistentes			
	VA5	VA30	GM	L
<i>S. aureus</i> (n=72)	71 98.28	56 77.78	2 2.78	50 69.44

## 2.2 Bacteriófagos

### 2.2.1 Historia

La historia en torno al descubrimiento de los bacteriófagos se ha envuelto en polémica, principalmente en la prioridad de los personajes implicados. Felix d'Herelle (1916) acuña el término bacteriófago o “fagos que comen bacterias” a partir del fenómeno observado con un brote de disentería hemorrágica grave entre las tropas francesas. Propone que el fenómeno se debe a un virus capaz de parasitar bacterias y no a procesos enzimáticos como lo propuesto por investigadores años atrás. Si bien d'Herelle establece que el proceso es llevado a cabo por virus, Ernest Hankin (1896) y Gamaleya (1898) observaron el mismo fenómeno con *Vibrio cholerae* y *Bacillus subtilis*, respectivamente. Frederick Twort en 1915, a la par de los estudios de d'Herelle, informa de un fenómeno similar al de Gamaleya y hace avanzar la hipótesis de que este pudo haberse debido, entre otras posibilidades, a un virus. Aquí surge la mayor polémica en cuanto a quién atribuir el descubrimiento de los bacteriófagos. d' Herelle continua con el trabajo de fagoterapia realizandola en humanos, en 1919 se administra una sola preparación del fago a un niño de 12 años con grave disentería, recuperándose en pocos días. A pesar de que d' Herelle realizara las primeras aplicaciones de los bacteriófagos en humanos, el primer reporte de su aplicación en éstos se remonta a 1921 cuando Richard Bruynoghe y Maisin Joseph redactan el primer reporte de la aplicación de fagos para tratar enfermedades infecciosas en humanos al eliminar infecciones de piel ocasionadas por estreptococos. Se siguieron diversos ensayos similares, y animados por los resultados d'Herelle y otros continuaron con estudios sobre el uso terapéutico de los fagos. d'Herelle utilizó diversas preparaciones de fagos para tratar a miles de personas que padecían cólera y/o la peste bubónica en la India. Además, varias empresas empezaron la producción activa comercial de fagos en contra de diversos patógenos bacterianos. (Fig. 1)

La comercialización de antibióticos en los años 40's condujeron al descenso en el uso de los fagos como agentes terapéuticos en occidente, sin embargo, en el este continuó la explotación de los fagos solos o en combinación con antibióticos (Sulakvelidze *et al.*, 2001)

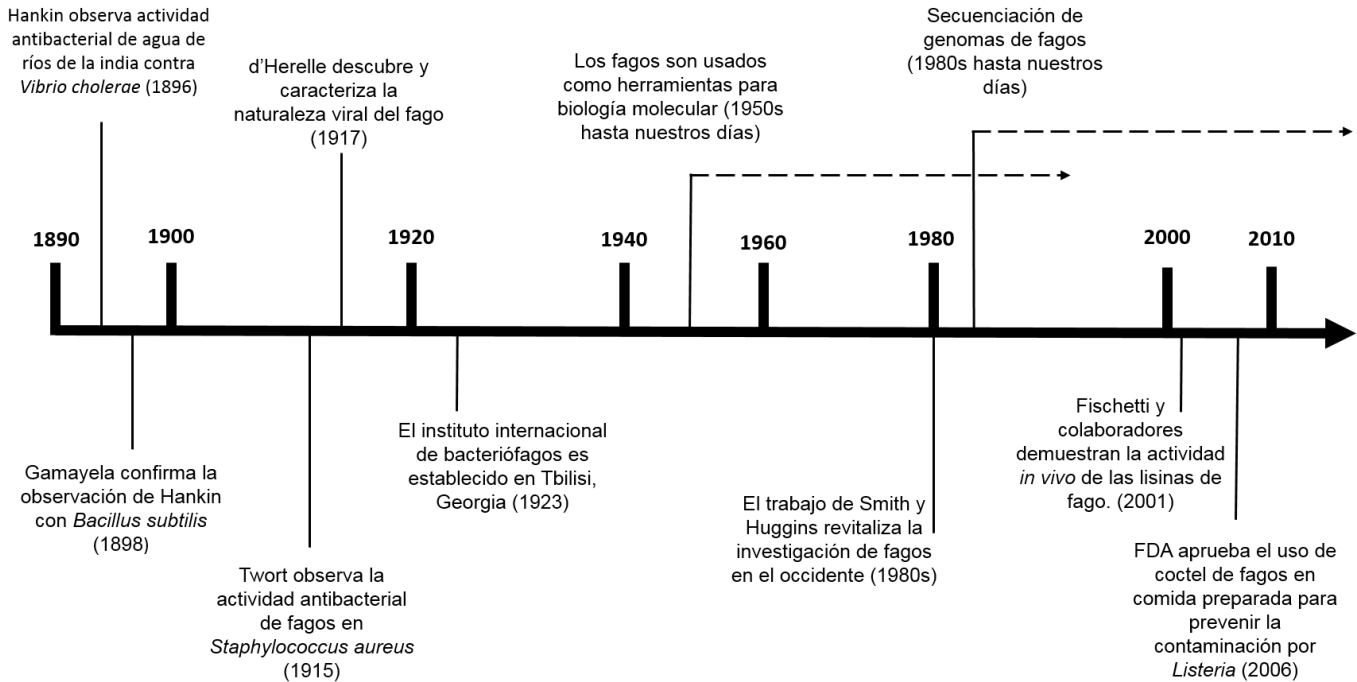


Fig. 1. Línea del tiempo de sucesos importantes en la historia de los bacteriófagos. Modificado de O'Flaherty, 2009.

En conjunto con el resurgimiento del interés en los fagos como agentes terapéuticos y la llegada de la secuenciación de alto rendimiento, el número de genomas de fagos secuenciados completos se ha incrementado drásticamente en los últimos años de 105 genomas en 2002 a un aproximado de 520 a la fecha. El análisis de estos genomas ha llevado a un mayor conocimiento de la evolución de los fagos, interacciones fago-hospedero, patogenicidad bacteriana y el origen de los propios fagos (Rohwer & Edwards, 2002).

En la década pasada se observó una considerable cantidad de investigación mundial focalizada en la explotación de los fagos como agentes antibacterianos para un amplio rango de aplicaciones. Uno de los más relevantes avances es el

uso de fagos como agentes de biocontrol ocurrido en 2006 cuando la FDA (food and drug administration) aprobó el uso de un coctel de 6 fagos llamado LMP-102 TM para el uso en carne “lista para comer” para el control de la contaminación por *Listeria monocytogenes* (O’Flaherty *et al.*, 2009).

### **2.2.2 Características generales**

Los bacteriófagos son descritos como parásitos obligados de bacterias (O’Flaherty, 2009). Se han aplicado en áreas como Biología Molecular e Investigación Clínica, principalmente en el tratamiento de infecciones bacterianas (Fagoterapia) (Segundo, 2010). Hasta el 2008 se conocían 13 familias y 30 géneros, se cree que al tratarse de virus, estos son la entidad más abundante en el planeta. Los fagos son ubicuos, por ejemplo se estima que se encuentran  $1 \times 10^6$  partículas por gota de agua de mar y un máximo de  $1 \times 10^8$  partículas por gramo de suelo. La rapacidad del fago permite destruir un estimado de la mitad de la población bacteriana en todo el mundo cada 48 horas. (Abedon, 2008; Deresinski, 2009)

Los bacteriófagos presentan varias ventajas sobre los antibióticos:

- 1) Son la entidad más abundante en la naturaleza.
- 2) Se multiplican de manera natural, no requieren procesos industriales elaborados de fabricación por lo que son “ecológicamente compatibles”
- 3) Su rango de hospedero es restringido, por lo que no afecta a la flora bacteriana normal.
- 4) Hasta la fecha no se han reportado efectos colaterales de su aplicación
- 5) Su multiplicación en el organismo depende del hospedero, por lo que al eliminar al patógeno disminuyen los títulos del bacteriófago o bien, éste desaparece del organismo. (Kutateladze, 2010).
- 6) Es posible utilizar solo la parte enzimática del bacteriófago (endolisinas) que estos producen (O’Flaherty, 2009).

Las endolisinas son enzimas de bacteriófagos que causan la muerte de bacterias por hidrólisis de peptidoglicano, las cuales pueden ser usadas como enzibióticos.

Las endolisinas han sido usadas satisfactoriamente como agentes antimicrobianos en áreas como medicina humana, medicina veterinaria, sector agrícola y la industria. Éstas han sido utilizadas para la eliminación de biopelículas, tal es el caso de la endolisina Ø11 la cual fue exitosa en el tratamiento de biopelículas de *S. aureus* NCTC8325 e incluso su campo de aplicación va más allá de la terapéutica, las endolisinas además han sido utilizadas como herramienta biotecnológica al ser usadas en la extracción de material genético y proteínas de *Listeria monocytogenes*.

Los antibióticos convencionales tienen la desventaja de no ser selectivos, las endolisinas destruyen solo la bacteria patógena blanco para la cual el bacteriófago es específico, sin afectar la flora normal del organismo, comida o medio ambiente en donde éstas fueron usadas. Generalmente la estructura de las endolisinas consiste en dos dominios funcionales que comprende el dominio catalítico en el extremo N -terminal, y el dominio de reconocimiento de la pared celular, en el extremo C -terminal. Esto permite a las endolisinas tener suficiente plasticidad para ser objeto de modificaciones de ingeniería genética para aumentar su actividad catalítica, la estabilidad y el rango de hospedero. La coevolución de los bacteriófagos con sus células hospederas bacterianas resulta en el reconocimiento de motivos de estructuras altamente conservadas en la envoltura celular. Esta interacción sugiere que, como se espera poca o ninguna variabilidad en la estructura molecular conservada de las envolturas celulares, la posibilidad para las bacterias de desarrollar resistencia a los bacteriófagos o sus lisinas es bastante baja. Todas estas características hacen de las endolisinas una opción prometedora para el control biológico de las bacterias patógenas (Barrera-Rivas *et al.*, 2015).

### **2.2.3 Morfología**

La primera aplicación del microscopio electrónico al estudio de los bacteriófagos fue realizada por Ruska en 1940, quien publicó la primera fotografía de una bacteria infectada por bacteriófagos (Adams, 1966; Wurtz, 1992) e hizo posible

determinar la morfología de los virus bacterianos y condujo también a un conocimiento más completo de las características de todos los virus (Wong *et al.*, 1994).

Los bacteriófagos típicos morfológicamente constan de una cabeza y una cauda. La cabeza presenta un denso paquete central de ácido nucleico rodeado por una cubierta de proteína o lipoproteína también denominada cápside. Ésta se encuentra formada por subunidades idénticas, agrupadas para formar una estructura geométrica, generalmente hexagonal en sección transversal. La cauda de los bacteriófagos varía grandemente en complejidad de un tipo a otro. Las caudas más complejas constan por lo menos de tres partes que son: un tallo central hueco, una vaina contráctil y una placa basal terminal, de forma hexagonal, en la cual pueden estar implantadas púas y/o fibras caudales. Los bacteriófagos también varían con respecto a la estructura terminal de la cauda; unos tienen placas basales, otros botones y algunos otros carecen de estructuras terminales específicas (Wong, 1994). (Fig. 2)

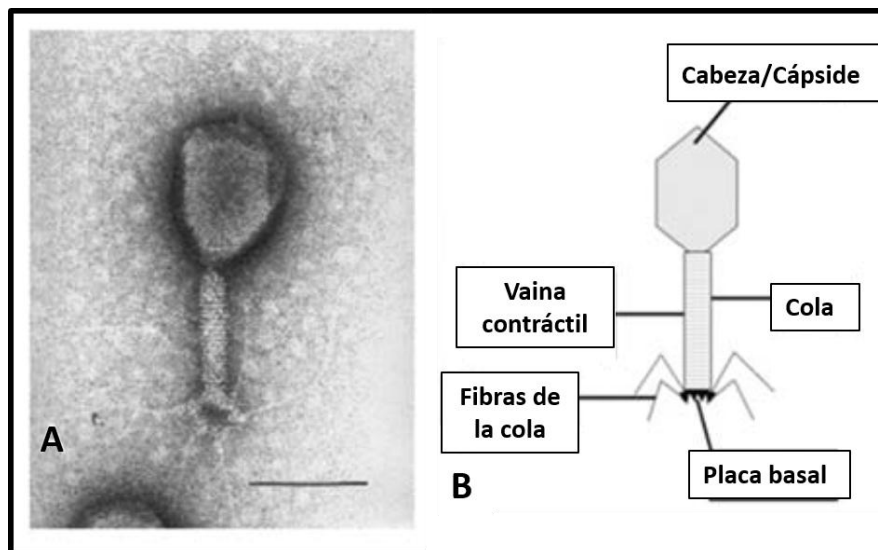


Fig. 2 Morfología típica de fagos. A) Micrografía electrónica con tinción negativa del fago *Aeromonas* tipo T4, fago con cola. B) Estructura del fago T4. Modificado de Deresinski, 2009.

#### 2.2.4 Clasificación

El primer estudio de descripción morfológica de bacteriófagos fue publicado en 1969, en donde los bacteriófagos eran enlistados por el nombre, especie hospedera, dimensiones y referencia. Este estudio incluía 111 virus, 99 de los cuales presentaban cauda y eran cúbicos o filamentosos.

Más tarde fueron clasificados en 6 grupos de acuerdo a su tipo morfológico (morfotipos) (Bradley, 1967).

- A. Los más complejos tienen una cabeza hexagonal, cola rígida con vaina contráctil y fibras caudales.
- B. Similares a los primeros, excepto que carecen de vaina contráctil; su cola es flexible y tienen o no apéndices terminales.
- C. Se caracterizan por tener cabeza hexagonal y cola más corta que la cabeza; la cola no es contráctil y puede o no tener apéndices.
- D. Hexagonales con capsómeros grandes en cada vértice del hexágono; no tienen cola.
- E. Un hexágono simple sin los grandes capsómeros que poseen los cuatro grupos anteriores.
- F. Un filamento sencillo y largo, sin cabeza u otra estructura característica de la mayor parte de los bacteriófagos.

Un estudio similar que apareció en 1968 e incluía 298 bacteriófagos. Estos listados tan detallados eran muy imprácticos debido al enorme número de referencias involucradas. Subsecuentemente, los bacteriófagos fueron enlistados por morfotipo y el género de su hospedero o simplemente de acuerdo a una morfología más general y a un grupo mayor de géneros (Ackermann, 1992).

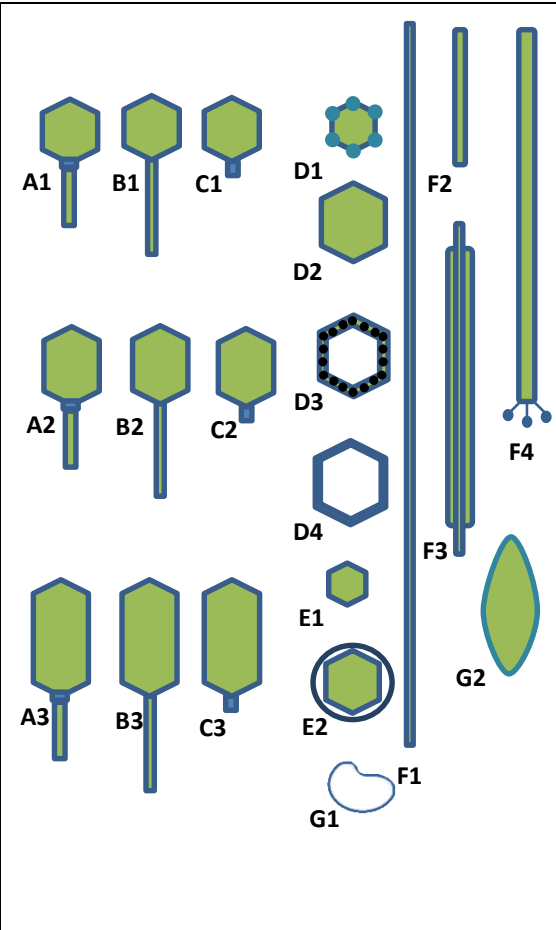
En 1992, Ackermann, enlistó a los bacteriófagos por morfotipos y géneros de las bacterias hospedadoras. Encontró que, al menos 4,007 bacteriófagos que han sido descritos pertenecen a 13 familias de virus (Tabla 3). Cerca de 3,850 bacteriófagos (96%) tienen cauda y 154 bacteriófagos (4%) son cúbicos, filamentosos ó pleomórficos. *Siphoviridae* ó bacteriófagos con grandes caudas no

contráctiles constituyen el 60% de bacteriófagos con cola. Los bacteriófagos son encontrados en más de 100 géneros bacterianos incluyendo Rickettsiae y el dominio Archaeobacteria (Ackermann, 1992; Ackermann, 2001).

Los diversos tipos morfológicos de bacteriófagos se caracterizan también por tener diferentes tipos de ácido nucleico. Los tipos A, B, y C de Bradley tienen morfología exclusiva de los bacteriófagos y presentan ADN de doble cadena (dc), los tipos morfológicos D y F presentan un tipo de ácido nucleico ADN de cadena sencilla (sc) y el grupo E un ácido nucleico ARN de cadena sencilla (Bradley, 1967; Ackermann 2001). Cabe destacar que entre estos grupos el material genético que poseen puede encontrarse en forma lineal (L), circular (C) y en algunos casos en segmentos (S).

**Tabla 3 Clasificación de bacteriófagos por morfotipos. Sc: cadena simple, dc: doble cadena, C: circular, S: superhelicoidal, L: lineal, seg.: segmentado. Modificado de Ackermann 2001**

MORFOTIPO	FORMA	ÁCIDO NUCLEICO	FAMILIA	PARTICULARIDADES
A1 a A3	Fagos con cola	ADN dc, L	<i>Myoviridae</i>	Cola contráctil
B1 a B3			<i>Siphoviridae</i>	Cola larga, no contráctil
C1 a C3			<i>Podoviridae</i>	Cola corta
D1	Fagos poliédricos	ADN sc, C	<i>Microviridae</i>	Capsómeros sobresalientes
D3		ADN dc, C, S	<i>Corticociridae</i>	Cápside compleja, lípidos
D4		ADN dc, L	<i>Tectiviridae</i>	Vesícula lipídica, pseudocola
E1		ARN sc, L	<i>Leviviridae</i>	
		ARN dc, L, S		
E2		Seg.	<i>Cystoviridae</i>	Cubierta lipídica
F1	Fagos filamentosos	ADN sc, C	<i>Inoviridae</i>	Filamentos largos
F2				Bastones cortos
F3		ADN dc, L	<i>Lipothrixviridae</i>	Cubierta lipídica
F4			<i>Rudiviridae</i>	Similar al virus del mosaico del tabaco
G1	Fagos pleomórficos	ADN dc, C, S	<i>Plasmaviridae</i>	Cubierta lipídica, sin cápside
G2		ADN dc, C, S	<i>Fuselloviridae</i>	Cubierta lipídica, sin cápside, en forma de limón



## 2.2.5 Replicación

Los fagos, como todos los virus, son parásitos obligados intracelulares, es decir necesitan estar dentro de una bacteria para poder replicarse y en este sentido, los fagos han desarrollado dos tipos de ciclo (Fig. 3).

- **Ciclo lítico:** el fago se replica en el interior de la bacteria y el proceso finaliza con la lisis del huésped inducida por el fago y la liberación de la progenie.
- **Ciclo lisogénico:** el ADN del fago se integra en el material genético de la célula hospedadora pero no hay liberación de viriones, y la bacteria se mantiene viable.

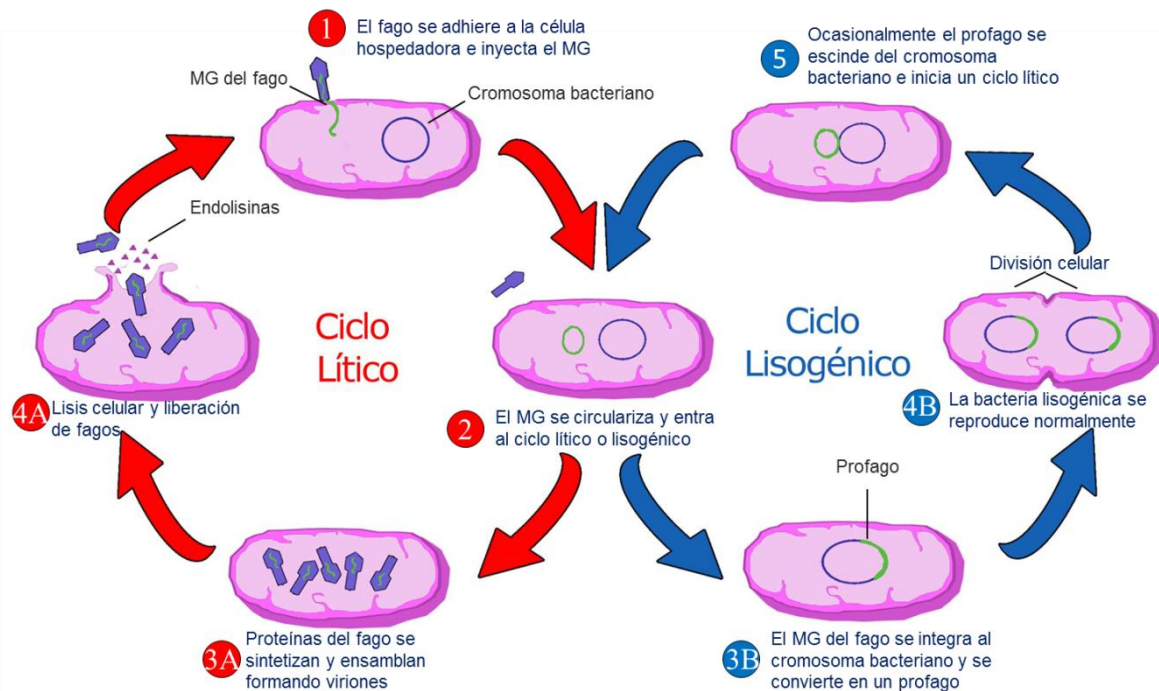


Fig. 3 Ciclos de replicación del bacteriófago  $\lambda$  en *E. coli*: Ciclo lítico y lisogénico. Modificado de Tortora, 2007

### 2.2.5.1 Ciclo lítico

El ciclo lítico lo llevan a cabo los fagos virulentos, en donde se da un reconocimiento de los receptores de la bacteria por los contra receptores del fago, una adsorción del fago a la célula huésped, seguido de la penetración del ácido nucleico fágico a la bacteria, el desarrollo intracelular de los componentes fágicos y la liberación de progenie viral (Segundo, 2010). Estas etapas se detallan a continuación.

#### *Adsorción.*

El paso que desencadena la infección es sin duda la interacción bacteriófago-bacteria. La cauda es el órgano de adsorción, éste se adhiere a los receptores de la superficie bacteriana, siendo específicos estos para cada tipo de fago. A través de la cauda, el bacteriófago inyecta el ácido nucleico al interior de la célula hospedera quedando en el exterior de la célula la cubierta proteica que forma la cápsula de la cabeza y la estructura de la cola.

La adsorción del fago a la superficie de la bacteria huésped puede producirse en uno o varios pasos, en este último caso se produce una unión *reversible* por interacción de las fibras de la cola con moléculas de la superficie de la bacteria que sirve para posicionarse correctamente y posteriormente generar una unión *irreversible* de otra proteína de la cola a una molécula receptora diferente. El tipo de receptor de superficie varía considerablemente entre bacterias gram-positivas (elementos del peptidoglicano, ácidos teicoicos y lipoteicoicos y proteínas asociadas a la pared celular) y gram-negativas (componentes de los lipopolisacáridos (LPS), y proteínas de la membrana externa como porinas y proteínas de transporte), también los componentes de cualquier matriz externa que secrete la bacteria pueden ser utilizados como receptores, tal como los antígenos k de los exopolisacáridos capsulares o las proteínas de capa S. Un mismo fago puede tener como receptores varias moléculas y poseer varias adhesinas diferentes en su estructura. Cuantas más moléculas pueda reconocer como receptores más amplio será el *rango de hospedero* del fago, es decir, mayor

será el número de cepas, especies y en algunos casos géneros bacterianos que podrá utilizar como hospederos (Kutter & Sulakvelidze, 2005).

### *Replicación.*

En el ciclo lítico, inmediatamente después de la inyección del ácido nucleico, el virus bacteriano emplea la maquinaria biosintética del hospedero para la construcción de sus macromoléculas, al inicio de la infección, se sintetizan numerosas proteínas (proteínas tempranas). Entre estas se incluyen ciertas enzimas necesarias para la síntesis del ácido nucleico del bacteriófago. Posteriormente aparecen proteínas tardías, las cuales incluyen subunidades de la cabeza y cola del bacteriófago, así como una enzima lítica (endolisina) que hidroliza la capa de peptidoglicano de la pared celular del hospedero y así poder liberar la progenie de bacteriófagos. Todas las enzimas, proteínas tempranas y tardías del bacteriófago son sintetizadas por la célula bacteriana utilizando la información genética proporcionada por el ácido nucleico del fago. Posteriormente continúa el período de maduración que consiste en la combinación irreversible del material genético del bacteriófago con una cubierta proteica. La partícula madura es, desde un punto de vista morfológico, un virus infeccioso típico.

La eficiencia en la replicación de los fagos depende tanto de la naturaleza del fago en cuestión como del tipo de huésped, ya que el proceso de replicación depende necesariamente de la maquinaria de este último. La velocidad con que se replique el ADN de un fago, se generen las proteínas de cubierta y se ensamble determinarán lo que se conoce como *período de eclipse*, que se define como el tiempo transcurrido desde la infección hasta la formación de las partículas de fago completas (infectivas) (Clokic & Kropinski, 2009). El tiempo que transcurre desde la infección del huésped hasta la liberación de las partículas de fago por la lisis del huésped inducida por el fago se denomina *período de latencia*.

### *Liberación de la progenie de fagos*

Finalmente, la célula hospedera se lisa debido a la presión osmótica sobre la pared celular y la debilidad ocasionada por una proteína tardía, la endolisina, las cuales difieren en su sitio de corte clasificándose en diversos tipos: muramidasa, endo-N-acetil glucosaminidasa, N-acetil-muramidasa, transglicosilasa y endopeptidasa, Proceso que culmina en la liberación de los viriones infecciosos. (Wong *et al.*, 1994; Segundo *et al.*, 2010; Jassim & Limoges, 2014; Barrera-Rivas *et al.*, 2015)

En éste último paso, se liberan las partículas maduras que infectarán a otros huéspedes y comenzarán un nuevo ciclo de lisis. El número de partículas que se libera por cada bacteria infectada se denomina *tamaño de explosión*. Los tamaños de explosión para diferentes fagos, o incluso para un mismo fago en diferentes hospedadores, pueden variar desde algunas unidades hasta miles.

El tiempo que tarda la replicación viral es variable, algunos de ellos pueden replicarse en cuestión de minutos (alrededor de 30) (Segundo *et al.*, 2010).

### **2.2.5.2 Ciclo lisogénico**

El ciclo lisogénico, desarrollado por los fagos temperados comprende prácticamente los mismos pasos que el lítico, pero después de la penetración, el ácido nucleico del fago se inserta en el cromosoma bacteriano y se replica como si fuera un gen más de la bacteria por una o varias generaciones sin mayores consecuencias metabólicas para las bacterias, no obstante en éste ciclo, el fago tras un proceso de daño grave al material genético de la bacteria, puede salir del cromosoma bacteriano y llevar a cabo un ciclo lítico; este es un modo de infección latente y ocurre con baja frecuencia (Segundo *et al.*, 2010).

#### **2.2.5.2.1 Terapia lisogénica**

El fenómeno de lisogenia también provee inmunidad contra futuras infecciones por fagos del mismo tipo, asegurando que solo hay una copia del fago por célula bacteriana. La única característica de los fagos lisogénicos o temperados y el

potencial para su explotación ha sido demostrado en un sistema que restaura la eficacia de los antibióticos por inversión de patógenos con resistencia a éstos. Estos fagos están genéticamente modificados para revertir la resistencia que poseen los patógenos, restaurando así su sensibilidad a los antibióticos.

A diferencia de la terapia de fagos convencional, el sistema no se basa en la capacidad del fago para matar los agentes patógenos en los hospederos infectados, en su lugar, es la capacidad para incorporar las construcciones genéticas en la bacteria y por lo tanto hacerlos sensibles a los antibióticos antes de que la infección ceda.

La transferencia del casete de sensibilización por medio del fago construido enriquecerá significativamente los patógenos tratables con antibióticos en los hospitales. Esta podría ser la clave para la reutilización de antiguas generaciones de antibióticos, conduciendo al uso de la biotecnología de fagos sinérgicamente con antibióticos (Jassim & Limoges, 2014).

## **2.3 Fagoterapia lítica**

### **2.3.1 Evolución**

Desde el descubrimiento de los bacteriófagos por el bacteriólogo Frederick Twort y el microbiólogo Félix d'Herelle, la idea de usar los fagos para combatir las infecciones bacterianas era ya evidente. d'Herelle comenzó a probar los efectos terapéuticos que los fagos podían tener utilizando primero animales tales como pollos y vacas, lo cual brindó resultados exitosos. Posteriormente, se llevaron a cabo pruebas en humanos y el desarrollo de la terapia se hizo más extenso. La fundación del Instituto Eliava en 1923 fortaleció el desarrollo de la fagoterapia. Durante la década de 1940, la compañía farmacéutica Eli Lilly comenzó la comercialización de fagos en los EE.UU. Durante la Segunda Guerra Mundial, se

utilizaron los fagos para tratar enfermedades bacterianas entre los soldados de la ex Unión Soviética, en particular la gangrena y la disentería.

El desarrollo de los antibióticos en los años 40s y 50s condujo a un retraso temporal en la investigación de la fagoterapia sobre todo en la región occidental. En la ex Unión Soviética, la investigación en torno a los fagos continuó debido a la inaccesibilidad a los antibióticos. En 1989, con el colapso de la ex Unión Soviética, la terapia de bacteriófagos vuelve a llamar la atención en occidente; sin embargo, algunas dificultades como la falta de controles en los ensayos europeos y la carencia de detalle en su documentación, se interpreta como falta de seriedad limitando su aprobación para el uso como agentes terapéuticos (Sulakvelidze *et al.*, 2001; Caplin, 2009).

En la actualidad, el incremento de bacterias multiresistentes a antibióticos, ha reavivado el interés en el desarrollo y el empleo de la terapia de fagos, no solo para el tratamiento de patologías en humanos. La fagoterapia ha dispersado su aplicación en el tratamiento y profilaxis de patologías en animales, contaminación en alimentos, aplicación en la agricultura y su aplicación en la biología molecular. Incluso existen grupos de investigación interesados en modificar fagos con métodos de ingeniería genética para ser utilizados como vacunas o en el combate del cáncer. De manera recíproca, los avances en biología molecular aunado a la investigación sobre biología y ecología de bacteriófagos ha permitido el desarrollo de métodos de purificación y caracterización, con lo cual es posible obtener bacteriófagos altamente purificados para su uso terapéutico (Deresinski, 2009; O'Flaherty, 2009; Kutateladze, 2010; Jassim & Limoges, 2014).

Hoy en día la aplicación de fagos se ha realizado por diversas vías resaltando tópica y oral. Se ha limitado el uso de fagos intravenosos debido a que éstos tienen el potencial de provocar respuestas inmunes, debido principalmente a su contenido proteico, y como consecuencia, el sistema puede eliminar los bacteriófagos del cuerpo rápidamente. La interacción entre los bacteriófagos y los

anticuerpos es preocupante porque si el bacteriófago provoca una respuesta mediada por anticuerpos, el tratamiento particular podría ser negado. Otra de las preocupaciones sobre el uso de preparaciones intravenosas de fagos es la probabilidad de que el paciente desarrolle la reacción de Jarisch–Herxheimer, shock sistémico resultante de la liberación repentina de lipopolisacárido en el torrente sanguíneo durante la lisis de las bacterias susceptibles (Caplin, 2009).

En los últimos años el mayor aporte en la terapia de fagos ha sido realizado por el Hirsfeld Institute of Immunology and Experimental Therapy en Wroclaw, Polonia. Se ha tratado alrededor de 2000 pacientes que padece una variedad de infecciones que a menudo comprometen su vida, obteniendo resultados muy positivos con una tasa global de éxito del 60-90% y no existen reportes graves de reacciones adversas (Stone, 2002).

La eficacia de la terapia combinada de fagos y antibióticos contra infecciones *in vivo* ha sido documentada por ensayos donde se ha demostrado que los fagos toman ventaja de la alteración de la pared celular bacteriana —tratada con antibióticos— para incrementar su propia producción y además acelerar la lisis de las células infestadas; permitiendo a los fagos diseminarse más rápidamente. (Comeau *et al.*, 2007; Krylov *et al.*, 2011).

Hasta hace pocos años, las terapias estaban basadas únicamente en la administración de la partícula completa del bacteriófago, desde los años 2000 se ha iniciado también el estudio de la purificación de enzimas líticas tales como lisinas y holinas con el mismo fin (Fischetti, 2005; Barrera-Rivas *et al.*, 2015).

### **2.3.2 Aplicación de la fagoterapia en humanos**

La literatura internacional contiene demasiados reportes sobre terapia de fagos en humanos, la mayoría de las recientes publicaciones provienen de investigaciones en Europa y la ex Unión Soviética y solo pocos reportes de publicaciones en otros

países (Sulakvelidze, 2001). La mayoría de los reportes detallados en Inglés sobre fagoterapia en humanos fueron realizados por Slopek y colaboradores quienes publicaron una serie de artículos sobre la efectividad de los fagos contra infecciones causadas por varios patógenos bacterianos, incluidos resistentes a antibióticos (Slopek 1983; Slopek1985).

Uno de los estudios más extensivos que evalúan la utilidad de los fagos como agentes terapéuticos para profilaxis de enfermedades infecciosas, fue conducido por el instituto Tbilisi, Georgia durante 1963-1964, involucrando fagos contra disentería bacteriana. Un total de 30,769 niños de 6 meses a 7 años de edad fueron incluidos en el estudio. A un grupo de 17044 niños se les aplicó fagos orales contra *Shigella* y a otro grupo de 13,725 no se le aplicó terapia fágica. Las muestras fecales de los dos grupos fueron evaluadas para determinar la presencia de *Shigella* spp. y otras bacterias inespecíficas causales de diarrea. La incidencia de disentería fue menor en el grupo de niños tratado con fagos respecto del grupo placebo. La efectividad de los fagos fue mayor en niños entre 6 meses y 1 año de edad y fue menor en niños entre 5 a 7 años, lo cual pudo deberse a la respuesta inmune en las diferentes edades (Babalova, 1968).

En las tres últimas décadas, las investigaciones en torno a la fagoterapia ha incluido el aislamiento de nuevos bacteriófagos contra microorganismos multiresistentes y su aplicación en pacientes inmunocomprometidos. Zhukov *et al.*, (1978) evaluaron 60 pacientes con infecciones supurativas ocasionadas por *Staphylococcus sp.*, *Streptococcus sp.*, *E. coli*, y *Proteus sp.* que fueron tratados con fagos adaptados (fagos seleccionados contra cepas bacterianas aislados de pacientes individuales) y comparados con preparaciones comerciales de fago, obteniendo eficacia mayor en los fagos adaptados (Zhukov-Verezhnikov, 1978). La fagoterapia también fue usada para tratar 223 pacientes con infecciones pleurales y de pulmón, los resultados fueron comparados con 117 casos donde se usaron antibióticos. La recuperación total fue observada en 82% de los pacientes en el grupo tratado con fagos, en los pacientes tratados con antibiótico se obtuvo una

recuperación de solo el 64% (Meladze, 1982). La fagoterapia ha sido utilizada para tratar infecciones postoperatorias. Kochetkova *et al.*, (1989) evaluaron este tipo de infecciones ocasionadas por *Staphylococcus sp.* y *Pseudomonas sp.* en 131 pacientes con cáncer, obteniendo un éxito en el 82% de los casos mientras que el tratamiento con antibióticos tuvo éxito en el 61% de ellos.

Los fagos han sido utilizados tanto en lesiones internas como externas. En 1992, diversos fagos fueron reportados por ser efectivos en un tratamiento de 109 pacientes con infecciones de piel y mucosa nasal ocasionadas por *Klebsiella ozaenae*, *K. rhinoscleromatis*, y *K. pneumoniae* (Bogovazova, 1992). Frecuentes abscesos subrenales ocasionados por cepas de *E. coli* resistentes a antibióticos fueron tratados exitosamente con terapia de fagos (Kwarcinski, 1994). En 1999, una terapia oral de fagos administrada a pacientes recién nacidos con meningitis cerebro espinal ocasionada por *K. pneumoniae*, fue exitosa después de una terapia fallida con antibióticos (Stroj, 1999). En 2005, se probó la seguridad del uso del bacteriófago T4 contra *E. coli* en casos de disentería en humanos voluntarios, resultando exitoso en la mayoría de los casos (Bruttin y Brüssow, 2005). En 2008, se aplicó un coctel de 6 fagos contra *Pseudomonas aeruginosa* para tratar infecciones crónicas de oído interno, obteniendo resultados positivos en cuanto a su eficacia y seguridad. Un concepto similar involucro la nebulización de bacteriófagos contra *Burkholderia cepacia* para tratar la fibrosis quística (Golshahi *et al.*, 2008).

### **2.3.3 Aplicación de la fagoterapia en infecciones causadas por *S. aureus***

De acuerdo con informes recientes de la Organización Mundial de la Salud, en Estados Unidos de América, mueren anualmente aproximadamente 14 000 personas por infecciones resistentes a los medicamentos. Internacionalmente el 60 % de las infecciones reportadas son resistentes a los agentes antimicrobianos. En América Latina, las cepas bacterianas más peligrosas han sido denominadas ESKAPE: *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella sp.*,

*Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*. (Boucher, 2009; Kutateladze, 2010)

Una de las medidas para el control de infecciones causadas por *S. aureus* es el control biológico mediado por bacteriófagos. Desde los inicios de la terapia, Twort (1915) observó su actividad sobre *S. aureus* (O'Flaherty, 2009). La importancia de éste patógeno en patologías tanto de animales como de humanos ha impulsado la continua búsqueda de avances en la fagoterapia.

Weber-Dabrowska, trató infecciones supurativas ocasionadas por *Staphylococcus* y varias bacterias gram negativas administrando fagos, los cuales fueron exitosos en el tratamiento de 56 pacientes (Weber-Dabrowska, 1987). En el 2006, Marza *et al.* aplicaron en Texas, Estados Unidos de América, un coctel de 8 fagos dentro de los cuales dos eran destinados al tratamiento de *S. aureus* en úlceras infectadas en pierna (Marza *et al.*, 2006).

Con el surgimiento de cepas de *S. aureus* resistente a antibióticos, se potencializa el estudio de tratamientos alternativos. En el 2006, el bacteriófago Msa fue probado contra cepas de *S. aureus* meticilina resistentes (MRSA) inoculadas en ratón, obteniendo la muerte de la bacteria intracelular tanto *in vivo* como *in vitro*, en el mismo estudio se observó que dicho fago previene la formación de abscesos, con lo cual se sugiere su uso para control tanto local como sistémico (Capparelli *et al.*, 2006).

En el 2009, García *et al.*, aislaron una colección de fagos representativos contra *S. aureus* de muestras de leche infectadas como un avance para el desarrollo de estrategias antimicrobianas con aplicación en la preservación de alimentos. Los hallazgos sugieren la efectividad de los fagos en algunos tipos de leche para inhibir el patógeno blanco que es causa frecuente de mastitis y contaminación de la leche (García, 2009).

El *L. Hirschfeld Institute* posee 11 bacteriófagos polivalentes con amplio espectro de actividad. Los fagos fueron examinados por su actividad lítica contra cepas MRSA aislados de pacientes humanos. De aquí surge una preparación que contiene tres fagos que causan la lisis total de cepas MRSA (Kutter, 2010).

En los últimos años, Intralytix como parte de sus investigaciones estudia el desarrollo de un producto como el generado por el Instituto Tbilisi denominado PhagoBioDerm™, el cual es un polímero de matriz biodegradable a base de poliéster amida, impregnado con bacteriófagos para ser usado vía tópica en pacientes con infecciones dérmicas contra cinco microorganismos, entre los cuales el género *Staphylococcus* forma parte (Segundo *et al.*, 2010).

En el tratamiento de patologías en animales causadas por *S. aureus* tales como la mastitis, Kwiatek *et al.*, caracterizaron un fago lítico aislado de mastitis bovina, concluyendo que es un fago similar a los ubicados en la familia *Myoviridae* (Twort, K, G1, 812) que han sido utilizados de forma exitosa en la fagoterapia (Kwiatek, 2011).

En 2014, se administró un cóctel de fagos a diversas dosis, los cuales fueron efectivos para prevenir y controlar infecciones localizadas ocasionados por MRSA, su actividad fue similar a la de vancomicina y clindamicina. La dosis única del cóctel de fagos no logró controlar la infección localizada; asimismo, la fagoterapia no resultó efectiva en infecciones sistémicas. La explicación la podemos encontrar en la depuración de fagos por el sistema inmune del hospedero, principalmente el sistema fagocítico mononuclear y los anticuerpos, que reducen su concentración a niveles que impiden controlar la infección bacteriana (Tamariz *et al.*, 2014).

En 2015, Pincus *et al* evaluaron la eficacia, seguridad y viabilidad comercial de fagos para el tratamiento de infecciones por *S. aureus* utilizando el fago comercial SATA-8505. Se encontró que dicho fago controla efectivamente el crecimiento y

reduce la viabilidad de *S. aureus* tanto *in vitro* como en infecciones de piel en ratón (Pincus, 2015).

En los últimos 5 años se han utilizado las lisinas provenientes de fagos en animales de experimentación con el objetivo de eliminar *S. aureus* de las fosas nasales (Fenton *et al.*, 2010), el tratamiento de infecciones sistémicas y la eliminación de la bacteria en piel (Gu *et al.*, 2011; Pasiaga *et al.*, 2011).

### III. JUSTIFICACIÓN

En Michoacán, la ganadería como actividad productiva es un sistema de economía familiar y base sociocultural de una amplia población campesina. Tarímbaro es uno de los municipios cercanos a la ciudad de Morelia, que produce 12,163, 000 litros de leche (346 427 toneladas) al año convirtiéndose en el municipio número uno de producción lechera en la zona (SIAP, 2014). Los sistemas de producción se caracterizan por unidades pequeñas consideradas como granjas familiares o de traspatio. SE ubican en los corrales o traspatios de las viviendas, con ordeño manual y venta de leche bronca sin ningún control sanitario (Magaña y Montañez, 2005).

La mastitis bovina, es la infección que mayores pérdidas económicas causa a la industria lechera. En México las pérdidas económicas por mastitis bovina han sido cuantificadas hasta por un monto de \$1,700.00 a \$2,000.00 pesos anuales por vaca (Wolter *et al.*, 2004). *Staphylococcus aureus* es el principal agente causal de mastitis bovina. Su diseminación causa un grave problema de salud pública ya que este microorganismo también coloniza en humanos. Su control y tratamiento han fracasado, debido a la diversidad de cepas existentes y a la ubicuidad del microorganismo y a los altos niveles de resistencia a antimicrobianos (Amorim *et al.*, 2007; Dixon, 1995; Enright *et al.*, 2000; Feil *et al.*, 2003; Horan *et al.*, 1992; Zadoks *et al.*, 2000).

En el laboratorio de epidemiología molecular y biotecnología de las enfermedades infecciosas, se ha aplica la epidemiología molecular para identificar y caracterizar de forma puntual a los microorganismos responsables de las enfermedades infecciosas y asociar con variables de riesgo potenciales como sus fuentes físicas de aislamiento, sus características biológicas, y la ruta de transmisión. Además, de caracterizar los genes responsables de la virulencia y los determinantes que confieren resistencia a antibióticos.

La mayor prevalencia corresponde a la mastitis subclínica (60.41%), donde *Staphylococcus aureus* se presentó con una prevalencia de 16.36 % en el sistema

de producción de granjas familiares (Bautista *et al.*, 2013). La caracterización molecular de los aislados basados en la comparación de alelos de genes de metabolismo primario mediante la técnica de *MLST* ha permitido la asociación de éstos de acuerdo al denominado ST. El análisis de los STs de aislados locales en la base de datos global ha permitido obtener que algunos de estos genotipos (ST-8) han sido reportado solo a infecciones de comunidad en humanos, lo cual sugiere una transmisión entre hospederos, representando un riesgo para la salud pública. Permitió ubicar STs locales previamente reportados en animales de granja (ST-97 y ST-352) y leche de bovino (ST-126). La caracterización de genes de virulencia como el gen que codifica para la proteína A ha permitido encontrar diferencias genotípicas en aislados, incluso en aquellos ubicados en el mismo complejo clonal mediante la caracterización con *MLST*.

La resistencia a antibióticos, principalmente  $\beta$ -lactámicos, en cepas de *S. aureus* asociadas significativamente a la mastitis subclínica bovina, dificulta su tratamiento. Además, es importante considerar que en los sistemas de producción lechera de traspatio, las condiciones higiénicas son mínimas y el contacto por el ordeño manual, pueden incrementar el riesgo de transmisión de nuevas cepas (Bautista *et al.*, 2014).

La realización de un estudio epidemiológico molecular que identifique las cepas prevalentes en las zonas lecheras con sistemas familiares, contribuye en el diseño de estrategias de prevención y control que disminuyan el riesgo de diseminación de *S. aureus* en los animales y los humanos dentro del ecosistema productivo.

La fagoterapia o terapia con bacteriófagos es una opción para el control de este patógeno, utilizada desde principios de 1900 y relegada ante la creciente comercialización de antibióticos (Sulakvelidze, *et al.*, 2001) y de la estricta regulación por las leyes nacionales e internacionales (Parracho, *et al.*, 2012). Recientemente se han incrementado las investigaciones alrededor del mundo enfocadas en el uso de bacteriófagos como agentes antibacterianos para un amplio rango de aplicaciones. El incremento en la incidencia de bacterias

patógenas multiresistentes a antibióticos ha justificado la revaloración de los bacteriófagos como agentes antibacterianos (O'Flaherty *et al.*, 2009).

En este trabajo, se presenta una estrategia integral que conjunta el análisis epidemiológico molecular como una herramienta para la selección de cepas con características epidemiológicas importantes, y la selección de bacteriófagos líticos utilizando estas cepas.

#### **IV. HIPÓTESIS**

En muestras ambientales existen bacteriófagos específicos que lisan a cepas epidemiológicamente relevantes de *Staphylococcus aureus* causantes de mastitis bovina.

#### **V. OBJETIVOS**

##### General

- Aislar y caracterizar bacteriófagos que lisen a cepas epidemiológicamente relevantes de *Staphylococcus aureus* asociadas a mastitis bovina.

##### Específicos

- Establecer las condiciones para el aislamiento y reproducción de los bacteriófagos líticos contra cepas de relevancia epidemiológica de *Staphylococcus aureus*.
- Caracterizar por rango de hospedero los bacteriófagos aislados.
- Caracterizar mediante RFLP los genomas de los bacteriófagos aislados.
- Evaluar de la estabilidad de los bacteriófagos aislados a pH y temperatura.

## VI. METODOLOGÍA

### 6.1 Selección y activación de cepas

Las cepas de *S. aureus* con las que se trabajó pertenecen a la colección del laboratorio de epidemiología molecular y biotecnología de las enfermedades infecciosas del centro multidisciplinario de estudios en biotecnología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Las cepas epidemiológicamente relevantes se seleccionaron tomando en consideración la previa caracterización por *MLST*, *Spa-typing* y el perfil de resistencia a antibióticos. La activación de las cepas se realizó en agar sal y manitol, ya que estudios recientes reportan este medio de cultivo óptimo para el aislamiento y caracterización morfológica de *S. aureus* (Bautista-Trujillo, 2013).

### 6.2 Muestreo de bacteriófagos

Un tubo Falcón estéril de 50 ml se sumergió por debajo del nivel de la superficie del líquido (tanques de almacenamiento de aguas residuales, leche del tanque, aguas residuales de granja de traspatio, etc.) y se transportó en hielo al laboratorio. El volumen se dividió en dos tubos Falcón de 50 ml, los cuales se equilibraron en la campana de flujo laminar. Se centrifugaron a 4000 rpm por 15 minutos o 10 000 rpm por 5 minutos, de preferencia en refrigeración. El sobrenadante se recuperó y se adicionaron 100 µl de cloroformo por cada 10 ml de sobrenadante. Se incubó en agitación por 20 minutos a 120 rpm y se centrifugó nuevamente en las condiciones antes mencionadas. El sobrenadante se filtró a través de una membrana Millipore de 0.22 µm y se almacenó a 4°C. Para preservación a largo plazo, se agregó un volumen de glicerol estéril (concentración final, 50%), se homogeniza perfectamente, se congela en nitrógeno líquido y se almacenó a -80°C.

### 6.3 Enriquecimiento de bacteriófagos

Cepas de *S. aureus* perfectamente caracterizadas se crecieron durante toda la noche a 37°C en agitación a 200 rpm en tubos de cultivo con 3 ml de medio de cultivo 2xYT\* (triptona, 16g/L; extracto de levadura, 10g/L; NaCl, 5g/L). \*[El medio 2xYT se preparó aparte y al momento de usar se adicionó el CaCl<sub>2</sub> y el MgSO<sub>4</sub> a partir de soluciones madre estériles de 100 mg/ml]. Del cultivo de toda la noche se tomaron 150 µl y se inocularon en 3 ml del medio 2xYT adicionado con CaCl<sub>2</sub> 10 mM y MgSO<sub>4</sub> 10 mM (2xYTϕ). Se adicionaron 150 µl del filtrado de bacteriófagos y se incubaron por toda la noche a 37°C en agitación a 200 rpm. El cultivo clarificado por la lisis de las bacterias se centrifugó a 4000 rpm por 15 minutos o a 12 000 rpm por 5 minutos. Al sobrenadante se adicionó 100 µl de cloroformo por cada 10 ml de sobrenadante, se incubó en agitación por 20 minutos a 120 rpm y se centrifugó nuevamente en las condiciones anteriormente mencionadas. El sobrenadante se filtró a través de una membrana Millipore de 0.22 µm (GSWP 02500). Al filtrado se adicionó 100 µl de cloroformo por cada 10 ml de sobrenadante y se almacenó a 4°C. Para preservación a largo plazo, se agregó un volumen de glicerol estéril (concentración final, 50%), se homogenizó perfectamente, se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -80°C.

### 6.4 Aislamiento de bacteriófagos

De cultivos de *S. aureus* de toda la noche en 3 ml de medio 2xYTϕ, se agregaron 100 µl a 3 ml de 2xYTϕ-top agar (2xYTϕ con 7g/l de agar) fundido y atemperado a 45°C. La mezcla se vertió en placas de agar 2xYTϕ (2xYTϕ con 15 g/l de agar) cuidando la orientación de la placa en la campana. Lo anterior para garantizar que el agar base y el de cobertura tenga la misma inclinación y por lo tanto sean de grosor homogéneo. Una vez gelificados ambos medios, se adicionaron alícuotas de 15 µl a partir de diluciones seriadas de los fagos. Se incubó por toda la noche a 37°C. Las placas líticas obtenidas se aislaron utilizando como sacabocado una puntilla de 1000 µl (azul) con la punta recortada. El trozo de agar se suspendió en amortiguador SM (Tris-HCl 20 mg/l, MgSO<sub>4</sub> 10 mg/l, CaCl<sub>2</sub> 10 mg/l, NaCl 100 mg/l;

pH 7.5). Se añadieron 100 µl de cloroformo por cada 10 ml de sobrenadante para preservación a 4°C o un volumen de glicerol para preservación a -80°C.

### **6.5 Determinación de viabilidad de *S. aureus* a D.O. 0.5**

Se creció la bacteria a 37°C en agitación constante por toda la noche en medio 2xYTØ. Se Tomó una alícuota de 100µl del cultivo de toda la noche e inoculó en 3ml de medio fresco. Se incubó a 37°C en agitación constante por 2-3 horas hasta alcanzar una D.O. de 0.5 a una longitud de onda de 595nm. Se realizaron diluciones seriadas base 10. De las diluciones anteriores se inocularon 15 µl por alícuota sobre agar 2xYTØ. Las placas de agar se Incubaron toda la noche a 37°C. La cuantificación de UFC se realizó considerando la dilución que permita contar entre 30-50 UFC) y se ajustó a UFC/ml mediante el programa Excel 2007®.

### **6.6 Determinación de títulos 1**

Para obtener el título de los bacteriófagos, de cultivos de *S. aureus* de toda la noche en 3 ml de medio 2xYTϕ, se agregaron 100 µl a 3ml de 2xYTϕ-top agar (2xYTϕ con 7g/l de agar) fundido y atemperado a 45°C, el cual se vertió en placas de agar 2xYTϕ (2xYTϕ con 15 g/l de agar) cuidando la orientación. Sobre la superficie del 2xYTϕ-top agar, se aplicaron alícuotas de 15 µl de diluciones de cada uno de los bacteriófagos aislados. Se incubaron por toda la noche a 37°C y se cuantifican la UFP/ml.

### **6.7 Determinación de títulos 2**

Para obtener el título de los bacteriófagos, de cultivos de *S. aureus* de toda la noche en 3 ml de medio 2xYTϕ, se agregaron 100 µl a 3ml de 2xYTϕ-top agar (2xYTϕ con 7g/l de agar) fundido y atemperado a 45°C, a lo anterior se añadieron 100 µl de las diluciones seriadas del bacteriófago. La mezcla anterior se vertió en placas de agar 2xYTϕ (2xYTϕ con 15 g/l de agar) cuidando la orientación para homogenización en el grosor del agar.

## 6.8 Determinación del rango de hospedero (Prueba de la gota)

El rango de hospedero se determinó inoculando 10  $\mu$ l de una suspensión de bacteriófagos ajustada a  $1 \times 10^8$  UFP/ml sobre  $1 \times 10^8$  UFC (Aproximadamente DO 0.5) de *S. aureus* en 2xYT $\phi$ -top agar. Las cepas de *S. aureus* correspondieron con los genotipos prevalentes.

## 6.9 Extracción de material genético

La extracción del material genético se llevó a cabo con algunas adecuaciones al protocolo descrito por Sambrook. Se incrementó el título de fagos en medio líquido adicionando 200  $\mu$ l de fagos en un título de  $10^5$ - $10^8$  UFP/ml a 4ml de medio 2xYt enriquecido con 10mM de CaCl<sub>2</sub> previamente inoculado e incubado hasta alcanzar una D.O. (595nm) de 0.5. Se Incubó a 37 °C durante 5 horas para obtener un medio clarificado característico de lisis bacteriana total.

El cultivo clarificado se adicionó a 50 ml de medio 2xYt enriquecido con 10mM de CaCl<sub>2</sub> previamente inoculado e incubado hasta alcanzar una D.O. (595nm) de 0.5. Nuevamente se incubó a 37 °C de 5 horas a toda la noche para lisis total. El cultivo clarificado se centrifugó a 4000 rpm/10 min. Al sobrenadante se adicionó 1ml de cloroformo y se agitó por 10 min. Se adicionaron los gramos necesarios de NaCl para alcanzar una concentración 1M y se dejó a 4°C durante 1 hora. Se Centrifugó a 4000 rpm/10 min y al sobrenadante colectado se adicionó PEG 8000 a razón de 0.1g/ml. Se Agitó durante 30 min a temperatura ambiente (2' en agitador a 37°C y el resto manualmente a intervalos de 5 min). Se Incubó a 4°C durante 2 horas y posteriormente se centrifugó a 10 000 rpm/20 min. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 8 ml de buffer SM. Se adicionó DNAsa (1 $\mu$ g/ml ó 1U/8ml) y RNAsa (1 $\mu$ g/ml) y se incubó a 37 °C durante 1 hora (revisar características propias de cada enzima). Se agregaron 15  $\mu$ l de EDTA 0.5M para una posterior centrifugación a 25 000 rpm/ 2 horas a 4°C. Se resuspendió la pastilla en 1 ml de buffer SM. Se dividió en 2 alícuotas de 0.5 ml y se extrajo una vez con 100  $\mu$ l de cloroformo.

Se adicionaron al sobrenadante 3.5 µl de SDS 20% y 15 µl de EDTA 0.5 M e inmediatamente incubar a 68°C durante 30'. Se extrajo dos veces la fase acuosa con solución de fenol-cloroformo-álcohol isoamílico (24:25:1). Entre cada extracción y/o lavado se centrifugó 15 000 rpm durante 15 min. Se extrajo nuevamente la fase acuosa con cloroformo-álcohol isoamílico (24:1). Se repitieron los dos pasos anteriores hasta obtener sobrenadante transparente. Se adicionaron 0.2 volúmenes de acetato de amonio 10 M y 2 volúmenes de etanol absoluto para una posterior incubación a -20°C durante 1 hora. Se lavó la pastilla 2 veces con etanol 70% y se dejó secar al aire. Se adicionaron 100 µl de buffer TE<sub>10/1</sub> justo antes de que el tubo se seicara completamente. Los tubos con el material genético se almacenaron a 4°C para su conservación.

### 6.10 Identificación de material genético

Para conocer el tipo de material genético se realizaron digestiones con las enzimas DNasa y RNasa (Promega®). Se prepararon las reacciones utilizando 1 µg del material genético y se complementaron como se indica en las hojas técnicas de las enzimas (Tabla 4; Tabla 5). Las reacciones se homogenizaron por pipeteo, se concentraron con un pulso en la centrifuga y se incubaron a 37°C durante una hora. Para observar la digestión se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% seguido de una tinción con bromuro de etidio para la observación mediante luz UV. Se realizó una edición de la imagen obtenida utilizando azul sobre negro para una mejor nitidez de bandas.

**Tabla 4 Componentes de reacción para digestión con DNasa® Promega**

Componente	Cantidad
Material genético en agua o buffer TE <sub>10/1</sub>	1-8 µl
Buffer de Rx 10x	1 µl
DNasa libre de RNasa	1U/µg de material genético
Agua libre de nucleasas	CSS 10µl

**Tabla 5 Componentes de reacción para digestión con RNasa® Promega**

<b>Componente</b>	<b>Cantidad</b>
Material genético en agua o buffer TE <sub>10/1</sub>	1-8 µl
Buffer de Rx 10x	1 µl
RNasa A	1 µl /µg de material genético
Agua libre de nucleasas	CSS 10µl

### 6.11 Caracterización molecular de bacteriófagos

La caracterización molecular se llevó a cabo mediante la técnica de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) utilizando las enzimas de digestión *Xba* I, *Hind* III, *Eco* RI, *Pst* I y *Kpn* I. Las reacciones se prepararon con base en lo establecido en la hoja técnica de cada enzima (Tabla 6). Las reacciones se homogenizaron por pipeteo, se concentraron con un pulso en la centrifuga para posterior incubación a 37°C durante una hora. Para obtener el patrón de corte se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% seguido de una tinción con bromuro de etidio para la observación mediante luz UV. Se realizó una edición de la imagen obtenida utilizando azul sobre negro para una mejor nitidez de bandas.

**Tabla 6. Componentes de reacción para digestión con enzimas ®Promega**

<b>Componente</b>	<b>Cantidad</b>
Agua desionizada estéril	CSS 20 µl
Buffer RE 10X	2 µl
BSA acetilado 10µg/µl	0.2 µl
DNA 1 µg/µl	1-8 µl
Enzima de restricción 10U/ µl	0.5 µl

### **6.12 Determinación de estabilidad de los bacteriófagos a temperatura**

Para determinar la estabilidad de los bacteriófagos a la temperatura, los bacteriófagos aislados se suspendieron en agar SM, se realizaron diluciones para determinar aquella que proporcione UFP susceptibles de cuantificar. Las diluciones de los fagos se incubaron a 4°C, 37°C, 50°C, 60°C y 70°C. Se tomaron alícuotas después de los 5, 15, 40 y 60 minutos para ser titulados por el método de agar doble capa.

### **6.13 Determinación de estabilidad de los bacteriófagos a pH**

Para evaluar la estabilidad de los bacteriófagos al pH, las diluciones de los bacteriófagos aislados que proporcionara UFP susceptibles de cuantificar se adicionaron a tubos que previamente contenían TM (50 mM Tris, 10 mM MgSO<sub>4</sub>) de diferentes valores de pH (2-11 que se ajustó usando NaOH o HCl). Se tituló el tiempo cero, posteriormente se incubaron por 1 hr a 37°C y se tituló nuevamente por el método de agar doble capa (Kwiatek, 2011; Ma, 2008).

## VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Selección y activación de cepas

*Staphylococcus aureus*, microorganismo que es un constituyente de la flora normal de animales y humanos, causal de problemas de salud en los mismos. Patógeno presente en alimentos y razón de enfermedades severas en pacientes hospitalarios. En América Latina, *S. aureus* es una de las cepas bacterianas más peligrosas (Boucher, 2009; Kutateladze, 2010). En la actualidad es foco rojo de investigación debido a la aparición de cepas con un incremento en la resistencia a antibióticos (Bautista-Trujillo 2014).

De la colección de aislados de *S. aureus* que se tiene en el laboratorio de epidemiología molecular y biotecnología de enfermedades infecciosas, se seleccionaron 12 que en su mayoría corresponden a la región de Tarímbaro. Para la elección de los 12 aislados se tomaron como criterios de elección: 1) Origen del aislado, 2) Caracterización por *MLST*, 3) Caracterización por *spa*-typing y 4) patrón de resistencia a antibióticos. Éstos aislados fueron obtenidos de bovinos con mastitis clínica y subclínica; además se incorporó una referencia de infecciones en humanos. Considerando la caracterización por *MLST*, los 12 aislados elegidos se asocian en 6 genotipos diferentes. La cepa MRI-14 aislada de mastitis bovina subclínica, NCTC 8325 la cual es cepa de referencia en humanos y ATCC27543 de referencia aislada de mastitis bovina clínica poseen ST-8 el cual se ha reportado solo a infecciones de comunidad en humanos lo cual sugiere una transmisión entre hospederos representando un riesgo para la salud pública.

Las cepas MRI-150 y MRI-149 aisladas de mastitis bovina subclínica y leche respectivamente poseen ST-97 el cual se consideró un ST local y reportados en la base de datos global <http://www.saureus.mlst.net> previamente en animales de granja, sin embargo, la leche proveniente de animales contaminados podría actuar como vehículo de transmisión de estos genotipos ocasionando patologías de comunidad en humanos, fenómeno similar al observado con el ST8. Las cepas

MRI-166 y MRI-171 aisladas de mastitis bovina poseen un ST-352 que al igual que el ST-97 son asociados globalmente como un ST local asociado a animales de granja. Las cepas MRI-147 y MRI-157 aisladas de muestras de leche poseen un ST-126, el cual ha sido reportado previamente en aislamientos de leche de bovino y que además se comporta como fundador del CC126. LA cepa MRI-148 posee una NST-1 la cual no ha sido reportada en bases de datos globales y por tanto sugiere un nuevo genotipo al igual que la cepa MRI-156 la cual posee una NST-2 además de ser el único aislado de mastitis clínica.

Considerando la caracterización por *spa*-typing las cepas se asocian en 7 genotipos, lo que marca diferencias puntuales en algunos genes tales como el que codifica para un factor de virulencia como lo es la proteína A y permite diferenciar cepas que pertenecen al mismo complejo clonal. La cepa MRI-151 ha sido ubicada como *Staphylococcus sp* ya que cumple los parámetros bioquímicos para ser clasificada como *S. aureus*, sin embargo, no ha sido caracterizada molecularmente como tal; en la base de datos de secuencias de ARNr 16S del género *Staphylococcus* no presenta homología suficiente con especies conocidas, por lo que se cree pueda ser una nueva especie. El criterio de elección para incorporarla dentro de las cepas utilizadas en este trabajo es debido a su multiresistencia a antibióticos (8). El perfil de resistencia es variable y abarca de 1 a 8 antibióticos dentro de los que destacan Aminocumarinas [Novobiocina (NB)], Aminoglicosidos [Gentamicina (GM)],  $\beta$ -lactámicos [Oxacilina (OXA) y Cefoxitina (FOX)], Cloranfenicol (C), Glicopeptidos [Vancomicina (VA)], Lincosamidas [Lincomicina (L) y Clindamicina (CC)], Macrolidos [Eritromicina (E)] y Oxazolidinonas [Linezolid (LZD)] (Tabla 7).

**Tabla 7 Cepas de *S. aureus*. Criterios de selección para utilizarse en el desarrollo del proyecto. MSC: Mastitis subclínica, MC: Mastitis clínica, ST: Secuencia tipo, NST: Nueva secuencia tipo**

Aislados	Origen	Región	Secuencia Tipo (ST)	<i>spa</i> - tipo	Resistencia a antibióticos
MRI-14	Leche/MSC	Tarímbaro	ST-8	-	3 (NB, OXA, L)
MRI-150	Leche/MSC	Tarímbaro	ST-97	t4570	3 (NB, GM, FOX)
MRI-156	Leche/MC	Tarímbaro	NST-2	t605	4 (NB, GM, FOX, E)
MRI-166	Leche/Mastitis	Tarímbaro	ST-352	t267	1 (GM)
MRI-171	Leche/Mastitis	Yuriria Gto.	ST-352	t267	2(GM, FOX)
NCTC 8325	Referencia Humanos		ST-8	t211	-
ATCC 27543	Leche/MC		ST-8	t008	2 (NB, GM)
MRI-157	Leche	Tarímbaro	ST-126	-	-
MRI-147	Leche	Tarímbaro	ST-126	t605	4 (NB, GM, FOX, VA)
MRI-148	Leche	Tarímbaro	NST-1	t693	4 (NB, FOX, VA, CC)
MRI-149	Leche	Tarímbaro	ST-97	t1965	5 (NB, FOX, VA, CC, E)
MRI-151			-	-	8 (NB, GM, FOX, C, CC, L, E, LZD )

## 7.2 Muestreo de bacteriófagos

Para aislar los bacteriófagos el muestreo se realizó en repetidas ocasiones, sumergiendo los tubos falcón estériles como lo descrito en el protocolo en tanques de leche recién ordeñada, leche almacenada, estiércol seco, estiércol fresco, aguas residuales de establo y granja, bebederos temporales y fijos, todo lo anterior de producciones lecheras de traspatio (Fig. 4). Debido a que no se lograban aislamientos de bacteriófagos en muestras de producciones de traspatio en cercanía con el origen de los aislados, también se muestrearon las plantas tratadoras de aguas residuales (PTAR) “Las Garzas” (PLG) y “San Pedrito” (PSP) ubicadas en la periferia del lago de Pátzcuaro. No se muestrearon las plantas tratadoras de Morelia, debido a que no se nos proporcionó acceso. El muestreo de las PTAR se llevó a cabo en los tanques de llegada como de los reactores biológicos, en los meses de julio y diciembre (Fig.5 y 6). Las muestras fueron procesadas mediante el protocolo antes mencionado, que incluye cloroformo para

la eliminación de material liposoluble tales como bacterias y bacteriófagos con membrana. Este reactivo se añadió también para su almacenamiento a 4°C.

Los bacteriófagos fueron obtenidos en el muestreo de la PTAR “San Pedrito” (tanque de llegada) en el mes de diciembre (Tabla 8).

Se solicitaron muestras de la PTAR de hospital, sin embargo estas no cumplían con la normatividad ante COFEPRIS (Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios) y nos fueron rechazadas.



**Fig. 4 Muestreo en producción lechera de traspatio, comunidad de Téjaro, Michoacán.**



Fig. 5 Muestreo en planta tratadora de aguas residuales "Las Garzas" Pátzcuaro, Michoacán.



Fig. 6 Muestreo en planta tratadora de aguas residuales "San Pedrito" Pátzcuaro, Michoacán.

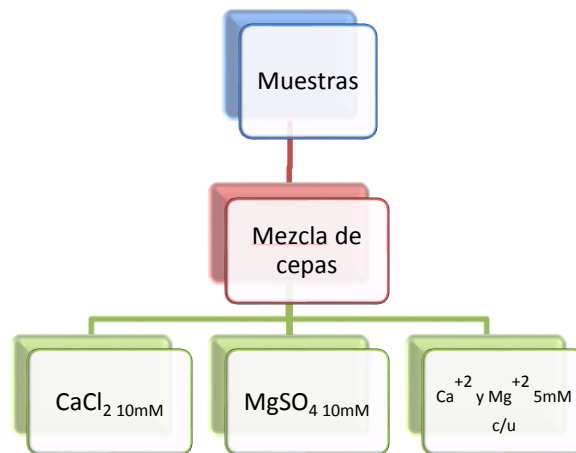
Tabla 8 Relación de sitios de muestreo para la obtención de fagos. PSP: Planta "San Pedrito"; PLG: Planta "Las Garzas".

Muestra	No. Fagos aislados	Muestra	No. Fagos aislados
Leche recién ordeñada-Téjaro	0	Agua residual de llegada PSP (03/14)	0
Leche almacenada Téjaro	0	Agua residual de llegada PLG (03/14)	0
Agua residual de granja-Téjaro	0	Agua residual de llegada PSP 07/14)	0
Estiércol fresco- Téjaro	0	Agua residual de llegada PLG (07/14)	0
Estiércol semi-humedo-Téjaro	0	Agua residual de llegada PSP (12/14)	28
Bebedores temporales-Téjaro	0	Agua residual de RB02 PSP (12/14)	0
Bebedores fijos- Téjaro	0	Leche recién ordeñada-Pátzcuaro (12/14)	0
Agua residual de establo-Téjaro	0		

### 7.3 Enriquecimiento y Aislamiento de bacteriófagos

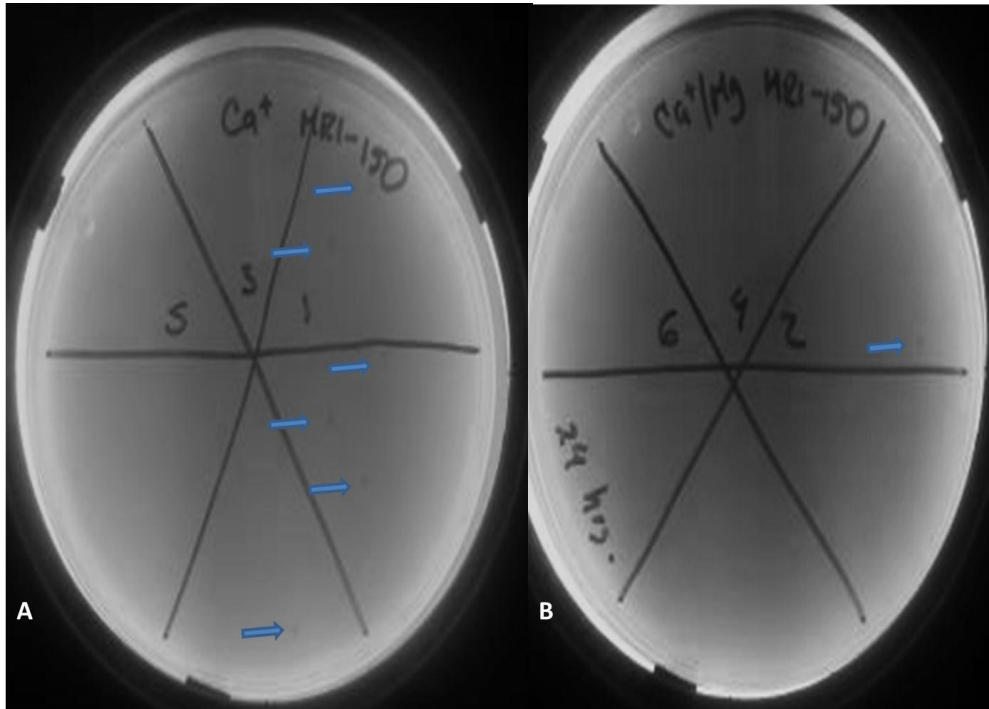
Para enriquecer o incrementar los títulos de los bacteriófagos presentes en la muestra con las cepas de *S. aureus* previamente seleccionadas. Se realizó una mezcla de todas las cepas (Tabla 12) con la finalidad de incrementar la posibilidad

de aislamiento de bacteriófagos. Las muestras de agua de llegada y del RB-02 de la PTAR “San Pedrito” así como una muestra de leche de una producción de traspatio fueron incorporadas por separado a la mezcla de cepas bajo los tratamientos con cationes divalentes ( $\text{Ca}^{+2}$  10mM,  $\text{Mg}^{+2}$  10 mM y la combinación de estos a una concentración de 5mM cada uno). De estos enriquecimientos se tomaron alícuotas a los 1, 3 y 8 días de incubación a 37°C. Se extendió a 3 y 8 días con la finalidad de forzar a la bacteria a expresar profagos, sí éstos se encontraban presentes (Fig. 7).



**Fig. 7** Esquematización de enriquecimiento para obtención de fagos. Muestras: leche, agua de llegada, agua de RB-02. Mezcla de cepas: MRI-14, MRI-147, MRI-148, MRI-149, MRI-150, MRI-151, MRI-156, MRI-157, MRI-166, NCTC 8325 y ATCC 27543

Se obtuvieron placas líticas o calvas de 0.1 mm, circulares, de bordes definidos y totalmente clarificadas en los enriquecimientos del agua de llegada de la PTAR con  $\text{Ca}^{+2}$  10mM y una disminución muy visible de ésta muestra con cationes combinados, cabe destacar que con el  $\text{Mg}^{+2}$  10mM no se obtuvo ninguna placa lítica.



**Fig. 8** Aislamiento de Placas líticas mediante agar doble capa. a) Aislamiento utilizando  $\text{CaCl}_2$  10mM b) Aislamiento utilizando  $\text{CaCl}_2$  5mM/  $\text{MgSO}_4$  5mM

Se aislaron un total de 28 placas líticas, 25 de ellas con la concentración de  $\text{Ca}^{+2}$  10mM y solo 3 con 5mM de la combinación de cationes. La cepa de origen de cada una de las placas se muestra en la Tabla 9. Las cepas de *S. aureus* pese a poseer ST diferentes, 3 de ellas pertenecen al mismo complejo clonal (CC5, subtipos 97 y 126).

**Tabla 9. Origen de los fagos aislados y morfología de placas líticas**

Cepa de aislamiento	Muestra de aislamiento	Tratamiento	No. De fago	Total de Placas líticas	Morfología de placas líticas
MRI-166	Agua de llegada PSP	Ca <sup>+2</sup> 10mM	1-4	4	
MRI-150	Agua de llegada PSP	Ca <sup>+2</sup> 10mM	5-11	8	
MRI-150	Agua de llegada PSP	Ca <sup>+2</sup> /Mg <sup>+2</sup> 5mM	12	1	Calvas circulares totalmente clarificadas de o.1mm de diámetro y bordes definidos
MRI-151	Agua de llegada PSP	Ca <sup>+2</sup> 10mM	13-20	9	
MRI-151	Agua de llegada PSP	Ca <sup>+2</sup> /Mg <sup>+2</sup> 5mM	21	1	
MRI-171	Agua de llegada PSP	Ca <sup>+2</sup> 10mM	22-27	7	
MRI-171	Agua de llegada PSP	Ca <sup>+2</sup> /Mg <sup>+2</sup> 5mM	28	1	

Se aislaron 28 bacteriófagos líticos contra las cepas de relevancia epidemiológica, utilizando muestras de aguas residuales. Synnott *et al.* en el 2009, reportaron el aislamiento de 52 fagos a partir de este tipo de muestras, los cuales probaron con aislados de *S. aureus*. El aislamiento de bacteriófagos líticos para este patógeno ha sido reportado por diversos investigadores iniciando con los aportes de Twort en 1915. En las últimas décadas las bases para la elección de las cepas blanco ha sido en su mayoría por brotes epidemiológicos y el perfil de resistencia a antibióticos. En el 2011, Kwiatek utiliza cepas de *S. aureus* aisladas de bovino, de humano y de alimentos, clasificadas por la resistencia a metilicina y vancomicina (Kwiatek, 2011). Algunos investigadores han realizado un escrutinio molecular de las cepas blanco. En trabajos anteriores acerca del aislamiento de bacteriófagos para el control de *S. aureus* causante de mastitis bovina se ha realizado una diferenciación genotípica mediante caracterización por RAPD (amplificación aleatoria de ADN polimórfico) la cual permite realizar un análisis de diversidad genética (García, 2009). Otras investigaciones acerca del aislamiento de bacteriófagos líticos para *S. aureus* ha iniciado solo con la caracterización bioquímica para confirmar la naturaleza del mismo (Kwiatek, 2011). El grupo de trabajo del laboratorio de epidemiología molecular y biotecnología de las enfermedades infecciosas ha implementado en trabajos anteriores la epidemiología molecular con el objetivo de identificar y caracterizar de manera fina

a *S. aureus* como responsable de la mastitis contagiosa y determinar sus fuentes físicas, relaciones biológicas, y la ruta de transmisión. El presente trabajo utiliza el conocimiento obtenido mediante la epidemiología molecular como bases para el desarrollo de herramientas biotecnológicas en el tratamiento puntual de la mastitis bovina.

Las cepas que permitieron el aislamiento de bacteriófagos fueron MRI-166, MRI-150, MRI-171 y MRI-151 con STs 352, 97 y 352, respectivamente. Las cepas de aislamiento, si bien pertenecen al mismo complejo clonal, se ubican dentro de subgrupos diversos, es decir; comparten por lo menos 4 de los 7 alelos analizados.

Los cationes divalentes  $\text{Ca}^{+2}$  y  $\text{Mg}^{+2}$  juegan un papel importante en la obtención de bacteriófagos líticos, ya que permiten la interacción entre las fibras de la cola de los fagos y los receptores de la célula hospedadora. La adsorción del bacteriófago a la bacteria se lleva a cabo mediante atracción electrostática, la célula bacteriana posee una ligera carga negativa por lo cual los cationes divalentes  $\text{Ca}^{+2}$  y  $\text{Mg}^{+2}$  permiten que estas se neutralicen colaborando así al proceso de adsorción del bacteriófago. Wong *et al.*, en 1994 probaron el requerimiento de estos cationes, corroborando la importancia en la interacción fago-bacteria. Wong propone una concentración mínima de 1mM para una buena adsorción (Wong *et al.*, 1994). Sin embargo, García en el 2009 utiliza de manera conjunta  $\text{CaCl}_2$  y  $\text{MgSO}_4$  a una concentración de 10mg/L (0.9M y 0.82M, respectivamente) para enriquecer el medio de cultivo durante el aislamiento de bacteriófagos líticos para *S. aureus*. En el 2011, Kwiatek utiliza una concentración de 5mM únicamente de  $\text{MgSO}_4$  obteniendo de igual manera bacteriófagos líticos para *S. aureus*. En el presente trabajo los enriquecimientos donde se utilizó  $\text{CaCl}_2$  mostraron una mayor cantidad de placas líticas en comparación con los enriquecimientos de  $\text{CaCl}_2$  y  $\text{MgSO}_4$  combinados e incluso en donde solo se añadió  $\text{MgSO}_4$ , en los cuales no se logró obtener ninguna placa lítica.

Una de las formas más usadas para la conservación de los fagos es en presencia de cloroformo, ya que este impide la contaminación microbiana, se sabe que los

bacteriófagos envueltos son sensibles a este reactivo ya que disgrega la membrana. Los ensayos realizados tanto para el aislamiento como para la conservación, revelaron que los bacteriófagos son resistentes al cloroformo, ya que se mantuvieron viables en presencia de este.

#### 7.4 Incremento de títulos en medio sólido

Para confirmar la identidad de las placas líticas aisladas, cada una de estas fue retirada con un sacabocados y suspendida en buffer SM. La placa lítica se mantuvo en el buffer SM por espacio mínimo de 3 horas para permitir la diseminación de los bacteriófagos. Alícuotas de 20  $\mu$ l fueron adicionadas sobre agar doble capa tal como se describe en la metodología de determinación de títulos. Tras la incubación de los medios gelificados a 37°C durante toda la noche, observamos la presencia de las 28 placas incrementadas a 1 cm de diámetro, con lo que se confirmó el incremento de título en medio sólido. Las placas líticas se observaron totalmente clarificadas signo de actividad lítica y con bordes definidos (Fig. 9).

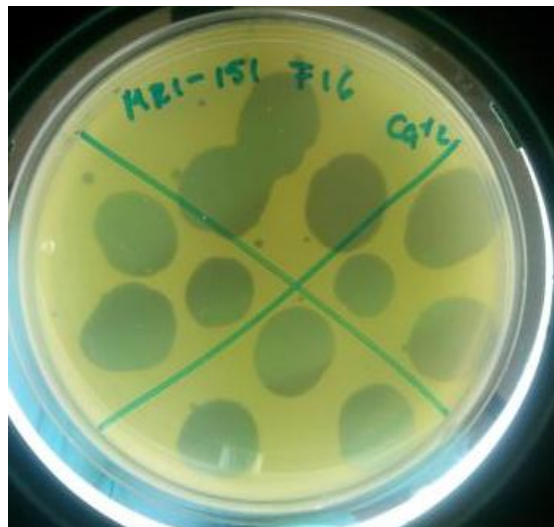


Fig. 9 Incremento de títulos en medio sólido

## 7.5 Determinación de títulos 1

Para determinar la cantidad de UFP/ml se realizaron diluciones seriadas base 10 a partir de la solución madre que contenía 3 placas líticas de 1 cm de diámetro suspendidas en 1 ml de buffer SM. Las diluciones de bacteriófagos fueron inoculadas en alícuotas de 15 µl sobre agar doble capa, tal y como se detalla en la metodología. Las diluciones susceptibles de cuantificar UFP (30-50 UFP) oscilaron entre  $10^{-7}$  y  $10^{-10}$ . Realizando las operaciones mediante el programa Excel® para obtener UFP/ml obtuvimos títulos de fagos que oscilan en un rango de  $10^9$  y  $10^{13}$  UFP/ml (Tabla 10). La determinación de títulos es indispensable para determinar el rango de hospedero.

Tabla 10 Determinación de títulos 1

Fago	UFP/ml	Fago	UFP/ml
F1	$3.1 \times 10^{11}$	F15	$3.6 \times 10^{11}$
F2	$4.3 \times 10^{11}$	F16	$2 \times 10^{11}$
F3	$5 \times 10^{11}$	F17	$5 \times 10^{11}$
F4	$4 \times 10^{11}$	F18	$5 \times 10^{11}$
F5	$3.8 \times 10^{12}$	F19	$2 \times 10^9$
F6	$5.4 \times 10^{11}$	F20	$1.4 \times 10^{10}$
F7	$3.6 \times 10^{13}$	F21	$7.5 \times 10^{11}$
F8	$4.1 \times 10^{12}$	F22	$2.6 \times 10^{10}$
F9	$3.6 \times 10^{11}$	F23	$1.2 \times 10^{12}$
F10	$3.7 \times 10^{11}$	F24	$3.7 \times 10^{12}$
F11	$1.2 \times 10^{11}$	F25	$3.2 \times 10^{12}$
F12	$3.3 \times 10^{10}$	F26	$5.1 \times 10^{12}$
F13	$2 \times 10^{10}$	F27	$6.3 \times 10^{12}$
F14	$1 \times 10^9$	F28	$5.8 \times 10^{12}$

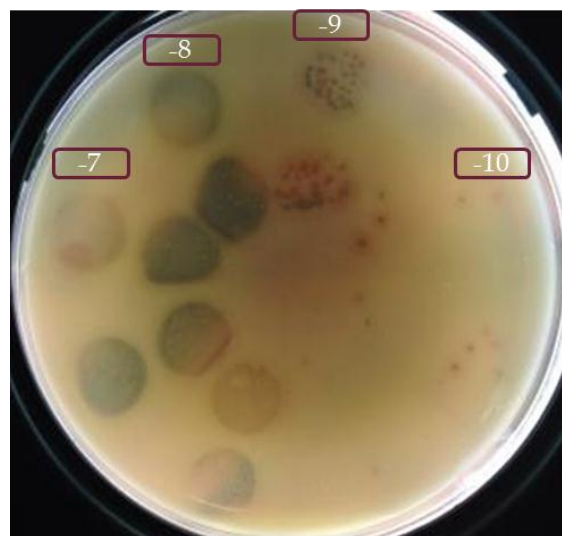


Fig. 10 Determinación de títulos en placa. Cuantificación de Unidades Formadoras de Placa (UFP) para determinación de títulos. Inoculación gota de diluciones de fago entre -7 y -10

## 7.6 Determinación de viabilidad de *S. aureus* a D.O. 0.5

Para determinar el rango de hospedero es necesario conocer la cantidad de células bacterianas a adicionar, para ello se determinó la viabilidad de los genotipos de *S. aureus* que se utilizan a una DO de 0.5 la cual es sugerida por García, 2009 y Kwiatek, 2011. Se siguió el protocolo para el crecimiento de la bacteria hasta alcanzar una DO de 0.5 en medio. Se realizaron diluciones seriadas base 10 aplicadas para reducir la carga bacteriana y con ello poder tener UFC susceptibles de cuantificar. Las diluciones seriadas se inocularon en alícuotas de 15  $\mu$ l. Se consideró aquella dilución que proporcionara entre 30 y 50 UFC por alícuota. Se realizaron ensayos por triplicado obteniendo la media de estos y su desviación estándar mediante el programa Excel® (Tabla 11).

Tabla 11 Viabilidad de diferentes genotipos de *S. aureus* a DO de 0.5

Cepa <i>S. aureus</i>	UFC/ml ( $\bar{x} \pm DE$ )
MRI-150	$(3.6 \pm 1.2) \times 10^7$
MRI-151	$3.4 \times 10^9 \pm 4.1 \times 10^8$
MRI-166	$4.3 \times 10^8 \pm 2.4 \times 10^7$
MRI-171	$3.6 \times 10^8 \pm 5.2 \times 10^7$

## 7.7 Rango de hospedero

Para determinar las cepas susceptibles de infección se realizó el rango de hospedero, la técnica se llevó a cabo con base en lo descrito en la metodología (Kwiatek, 2011). Los bacteriófagos se agregaron en una relación 1:1 con las células bacterianas que formaron el tapete en medio sólido (agar doble capa) con la finalidad de incrementar la capacidad de adsorción. La susceptibilidad de infección o no infección que presentan las 12 cepas frente a la inoculación de los 28 fagos se muestra en la Tabla 12. Se obtuvo una susceptibilidad de infección en el 60% de las cepas probadas. Las cepas MRI-151 y MRI-171 poseen una sensibilidad al

total de fagos aislados mientras que las cepas MRI-14, MRI-149, MRI-156, NCTC8325 y ATCC27543 poseen una sensibilidad nula a dichos fagos.

En la Tabla 12, se agrupan los fagos con base en su cepa de origen y la similitud del rango de hospedero. Con base en su cepa de origen se lograron obtener 4 diferentes grupos y éstos se agruparon en 10 diferentes patrones de infección, considerando las combinaciones de número y tipo de cepas que infectan.

Cepa	MRI-14	MRI-147	MRI-148	MRI-149	MRI-150	MRI-151	MRI-156	MRI-157	MRI-166	MRI-171	NCTC8325	ATCC27543	CI	RH
Fago F1	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	4	1
F2	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	4	1
F3	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	4	1
F4	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	4	1
F5	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	7	2
F6	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	7	2
F7	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	7	2
F8	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	7	2
F9	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	6	3
F10	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	6	3
F11	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	6	3
F12	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	6	3
F13	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	6	3
F14	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	6	3
F15	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	4	1
F16	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	5	4
F17	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	4	1
F18	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	3	5
F19	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	4	6
F20	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	4	7
F21	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	3	8
F22	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	6	3
F23	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	7	2
F24	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	6	9
F25	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	6	3
F26	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	5	10
F27	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	5	10
F28	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	4	1

Tabla 12 Rango de hospedero. Determinación de infección (+) o no infección (-) ante las diferentes cepas de *S. aureus*. CI: número de cepas infectadas

Fago	Cepa de origen	ST	Cepas susceptibles	ST	CC
F1	MRI-166	352	150, 151, 166, 171	97,-,352,352	5 subtipo 97
F2	MRI-166	352	150, 151, 166, 171	97,-,352,352	5 subtipo 97
F3	MRI-166	352	150, 151, 166, 171	97,-,352,352	5 subtipo 97
F4	MRI-166	352	150, 151, 166, 171	97,-,352,352	5 subtipo 97
F5	MRI-150	97	147, 148, 150, 151, 157, 166, 171	126, NST-1,97,-,126,352,352	5 subtipo 97 y 126
F6	MRI-150	97	147, 148, 150, 151, 157, 166, 171	126, NST-1,97,-,126,352,352	5 subtipo 97 y 126
F7	MRI-150	97	147, 148, 150, 151, 157, 166, 171	126, NST-1,97,-,126,352,352	5 subtipo 97 y 126
F8	MRI-150	97	147, 148, 150, 151, 157, 166, 171	126, NST-1,97,-,126,352,352	5 subtipo 97 y 126
F9	MRI-150	97	147, 148, 150, 151, 166, 171	126,NST-1,97,-,352,352	5 subtipo 97 y 126
F10	MRI-150	97	147, 148, 150, 151, 166, 171	126,NST-1,97,-,352,352	5 subtipo 97 y 126
F11	MRI-150	97	147, 148, 150, 151,, 166, 171	126,NST-1,97,-,352,352	5 subtipo 97 y 126
F12	MRI-150	97	147, 148, 150, 151,, 166, 171	126,NST-1,97,-,352,352	5 subtipo 97 y 126
F13	MRI-151	-	147, 148, 150, 151,, 166, 171	126,NST-1,97,-,352,352	5 subtipo 97 y 126
F14	MRI-151	-	147, 148, 150, 151,, 166, 171	126,NST-1,97,-,352,352	5 subtipo 97 y 126
F15	MRI-151	-	150, 151, 166, 171	97,-,352,352	5 subtipo 97
F16	MRI-151	-	148, 150, 151, 166, 171	NST-1,97,-,352,352	5 subtipo 97
F17	MRI-151	-	150, 151, 166, 171	97,-,352,352	5 subtipo 97
F18	MRI-151	-	147,150,151	126,97,-	5 subtipo 97 y 126
F19	MRI-151	-	147,150,151,166	126,97,-,352	5 subtipo 97 y 126
F20	MRI-151	-	148,150,151,166	NST-1,97,-,352	5 subtipo 97
F21	MRI-151	-	148,151,166	NST-1,-,352	5 subtipo 97
F22	MRI-171	352	147,148,150,151,166, 171	126,NST-1,97,-,352	5 subtipo 97 y 126
F23	MRI-171	352	147,148,150,151,157,166,171	126,NST-1,97,-,126,352	5 subtipo 97 y 126
F24	MRI-171	352	147,148,150,151,157,171	126,NST-1,97,-,126,352	5 subtipo 97 y 126
F25	MRI-171	352	147,148,150,151,166,171	126,NST-1,97,-,352,352	5 subtipo 97 y 126
F26	MRI-171	352	147,150,151,166,171	126,97,-,352,352	5 subtipo 97 y 126
F27	MRI-171	352	147,150,151,166,171	126,97,-,352,352	5 subtipo 97 y 126
F28	MRI-171	352	150,151,166,171	97,-,352,352	5 subtipo 97

Tabla 13 Rango de hospedero. Comparaciones genéticas entre las cepas de aislamiento y de infección. RH 1: fagos 1-4, 15, 17 y 28; RH 2: fagos 5-8; RH 3: fagos 9-14 y 25; RH 4: Fago 16; RH 5: Fago 18; RH 6: Fago 19; RH 7: Fago 20; RH 8: Fago 21; RH 9: Fago 22; RH 10: Fago 23; RH 11: Fago 24; RH 12: Fagos 26 y 27.

En la Tabla 13 se engloba la caracterización molecular de la cepa de origen de los fagos con la caracterización de las cepas infectadas por ellos. En general los fagos tienen rango de hospedero restringido; sin embargo, algunos de los éstos fueron aislados de una cepa con un ST diferente al de las cepas que infectan, esto es posible debido a que dichas cepas pertenecen al mismo complejo clonal, es decir comparten cierto fondo genético. El rango de hospedero 1 (RH1) lo componen fagos del 1 al 4, 15, 17 y 28, éstos se aislaron de la cepa MRI-166, MRI-171 y MRI-151 las dos primeras pertenecen al ST-352 e infectan 5 cepas (150, 151, 166, 171) pertenecientes al ST-97 y 352, las cuales se ubican en el mismo complejo clonal (CC97). Del fago 5 al fago 8 y 23 constituyen el RH2 que fueron aislados de la cepas MRI-150 y MRI-171 con ST-97 y 352 respectivamente, éstos infectan a diferencia de los RH1 también cepas de *S. aureus* con ST locales como la NST-1. Estos fagos constituyen el grupo con un rango de hospedero mayor, ya que lisan a 7 de las 12 cepas utilizadas. El RH3 es constituido por los fagos del 9 al 14, 22 y 25, aislados de las cepas MRI-150 y 171 como los agrupados en el RH2 y que difieren únicamente en la infección de la cepa MRI-157 catalogada con ST-126 al igual que la MRI-147. Estos datos sugieren que la especificidad de los fagos pudiera deberse a diferencias más puntuales en la pared celular donde se ubican los receptores y que se ligan estrictamente al fondo genético de la especie bacteriana. EL RH 4 está constituido solo por el fago 16 que difiere de los fagos ubicados en el RH1 en la infección sobre la cepa MRI-148 reportada en la base de datos como un nuevo ST asociado a infecciones locales. El RH5 lo constituye el fago 18 el cual infecta solo 3 de las 12 cepas probadas, este se aisló de la cepa MRI-151 catalogada en la base de datos global para MLST como *Staphylococcus* sp; este fago infecta cepas con ST 97 y 352. EL RH 6 y RH7 constituidos por los fagos 19 y 20, respectivamente y aislados de la cepa MRI-151 difieren únicamente en la infección de una cepa; el 19 infecta la cepa MRI-147 mientras que el fago 20 infecta MRI-148 las cuales poseen ST diferentes asociados a animales de granja. EL RH8 conformado por el fago 21 difiere con el anterior, ya que éste no infecta la cepa MRI-150. El fago 24 aislado de la cepa MRI-171, constituye el RH9 el cual difiere

con el RH2 ya que este último grupo infecta la cepa MRI-166 y el fago 24 no, aun cuando la cepa de aislamiento de este fago posee el mismo ST de la MRI-166, lo cual se podría suponer existen receptores específicos que diferencian aun dentro de la misma especie con la misma caracterización de metabolismo primario. El RH10 constituido por los fagos 26 y 27 aislados ambos de la cepa MRI-171; éste RH difiere del RH3 ya que el RH10 no infecta la cepa MRI-148 considerada de importancia local en patologías animales.

En el rango de hospedero de los 28 fagos aislados se tuvo sensibilidad en el 60% de las cepas produciendo en todas ellas placas claras sin presencia de turbidez. Las cepas sensibles a todos los fagos fueron MRI-151 y MRI-171, esta última con un ST 352 relacionada a cepas aisladas de bovino. Las cepas divergen en gran manera en su perfil de resistencia a antibióticos ya que son resistentes a 8 y 2 respectivamente. Las cepas MRI-14, MRI-149, MRI-156, NCTC8325 y ATCC27543 de resistencia total a los fagos en su mayoría poseen un ST8 relacionado con cepas aisladas de comunidad e intrahospitalarias. El rango de hospedero es específico de genotipos dentro de la misma especie. Las cepas que fueron lisadas poseen STs ubicados dentro del CC5 mientras que aquellas no infectadas son ubicadas en un CC diferente. Se especula además que las cepas podrían contener profagos de la misma naturaleza lo cual limita una reinfección. Sin embargo, nuevos muestreos podrían permitir el aislamiento de bacteriófagos líticos para estos genotipos.

Los patrones de infección fueron establecidos por la similitud entre el número y tipo de cepa que infecta cada fago. La mayoría de estos grupos fueron infectivos contra cepas del CC5, subgrupos ST97 y ST126. Las cepas MRI-150 y MRI-149 aisladas de mastitis bovina subclínica y leche respectivamente poseen ST-97 el cual se consideró un ST local y reportados en la base de datos global <http://www.saureus.mlst.net> previamente en animales de granja, sin embargo, la leche podría actuar como vehículo de transmisión ocasionando patologías en comunidad. Las cepas MRI-166 y MRI-171 aisladas de mastitis bovina poseen un ST-352 que al igual que el ST-97 son asociados globalmente como un ST local

asociado a animales de granja. Las cepas MRI-147 y MRI-157 aisladas de muestras de leche poseen un ST-126 el cual ha sido reportado previamente en aislamientos de leche de bovino y que además se comporta como fundador del CC126. La cepa MRI-148 posee una NST-1 la cual no ha sido reportada en bases de datos globales y por tanto sugiere un nuevo genotipo. La cepa MRI-151 es la cepa con mayor multiresistencia a antibióticos (8).

Los fagos que infectan mayor número de cepas (7) 5 -8 y 23, son ubicados en el denominado RH 2. El amplio espectro de éstos denotan la naturaleza polivalente y la posibilidad de utilizarse como agentes anti estafilocócicos. Synnott *et al.*, (2009) selecciona como posibles fagos terapéuticos solo dos de un aislamiento de 202 fagos basándose de manera primordial en su rango de hospedero. Con el criterio de genotipificación de las cepas blanco se ha logrado obtener 28 bacteriófagos con rangos de hospedero asociados en 10 grupos tomando como criterio de clasificación el genotipo de las cepas infectadas, mismos que están relacionados con mastitis bovina en animales de la localidad y los cuales pudieran diseminarse a comunidad por las prácticas de ordeño en la producción de traspatio. Considerando el RH se tiene la ventaja de poder seleccionar bacteriófagos para la elaboración de un coctel de fagos susceptible de utilizar en el tratamiento de la mastitis en la región, siendo estos específicos para los genotipos prevalentes.

## **7.8 Identificación de material genético**

Para determinar la naturaleza del material genético que poseen los fagos aislados, éstos se trataron con enzimas que degradan tanto DNA (cadena sencilla y doble) como RNA. En la Fig. 11, los carriles de la digestión con DNasa no se observa ninguna banda producto de material genético, por lo que se infiere que éste es DNA. Para corroborar lo antes mencionado se realizó una digestión con RNasa A, en la cual se obtiene el material genético integro. Se utilizó como control ADN bacteriano para confirmar la efectividad de las enzimas y el patrón de corte en

este tipo de genomas. El marcador que se utilizó fue GeneCraft® de 1 Kb el cual revela tamaños de banda que van de 300-10 000 pb.

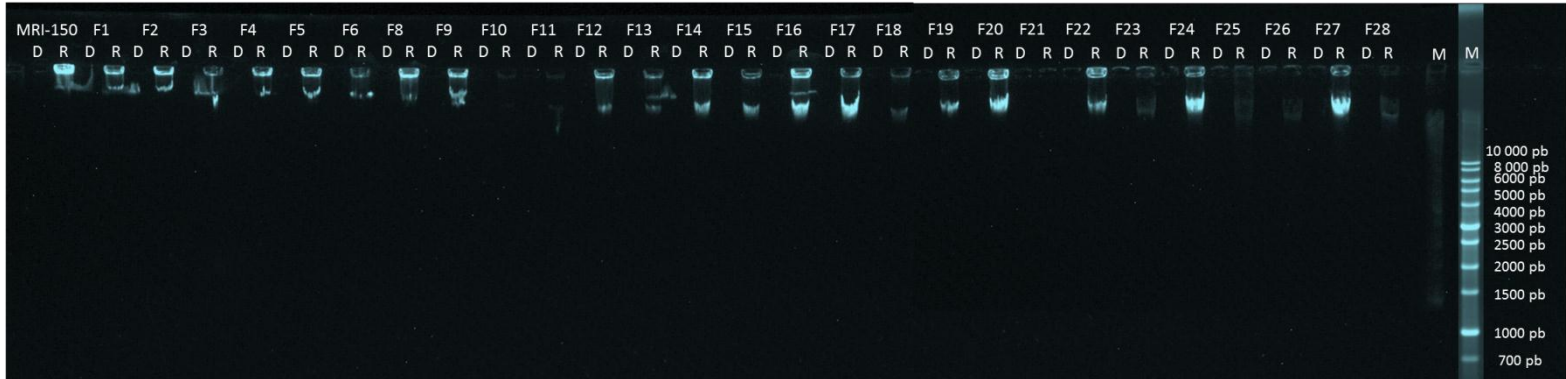


Fig. 11 Digestión de material genético con DNasa y RNasa observado mediante Electroforesis en gel de agarosa. D: DNasa R: RNasa F: Fago M: Marcador

Los fagos aislados poseen DNA de cadena doble como material genético. El principal antecedente de que los fagos infectivos poseen DNA de cadena doble radica en que las endolisinas son codificadas por este tipo de material genético (Fischetti, 2010). La mayoría de los fagos líticos se ubican dentro de las familias *Myoviridae*, *Siphoviridae* y *Podoviridae*. Fagos líticos para *S. aureus* tales como Twort, K y MSA6 se ubican dentro de la familia *Myoviridae* (O'Flaherty, 2005; Son, 2010; Kwiatek, 2011). Según la clasificación de Ackermann 2001, estas familias poseen DNA de cadena doble, por lo que los fagos aislados podrían ubicarse dentro de los fagos con cola.

### 7.9 Caracterización molecular de bacteriófagos

Para determinar diferencias genotípicas en los bacteriófagos aislados se realizó la técnica de macro caracterización mediante RFLP sobre el genoma completo. Para la digestión fueron elegidas 5 enzimas con diferente porcentaje de bases, debido a que se desconoce la composición del genoma de los bacteriófagos (Tabla 14). En la digestión con la enzima *Xba I* se obtuvieron patrones de corte diferentes en algunos de los fagos (Fig. 12). El análisis filogenético se realizó utilizando el

algoritmo UPGMA del programa PyElph 1.4. El análisis del árbol filogenético para esta digestión muestra la agrupación de los 26 fagos (en el bacteriófago 7 no fue posible el aislamiento del material genético debido a contaminación en el vial primario y en bacteriófago 21 se obtuvo una concentración muy baja en las diversas repeticiones de material genético, factor que impidió llevar a cabo las reacciones de digestión) en al menos 4 grupos, mismos que coinciden en su mayoría con la diversidad de la cepa de aislamiento. Con base en el RH éstos son agrupados en 10 (Fig 13). Los bacteriófagos agrupados en el RH1 son divididos en dos genotipos con base en su patrón de corte con *Xba* I, sin embargo, estos dos genotipos poseen ST idénticos agrupadas en el CC5 subtipo 97. La digestión con la enzima *Hind* III (Fig 14 y 15) permite la asociación en 3 grupos; éste patrón de corte incorpora a los fagos 15 y 27 en similitud con los fagos 1-4 y de los cuales solo el 27 no se asocia en el mismo RH. Sin embargo; abre un nuevo grupo donde son observadas diferencias en el fago 12. El patrón de corte con *Eco*RI (Fig 16 y 17) asocia los 26 fagos en 2 grandes grupos donde no coinciden los RH1 y RH10, ya que ambos poseen fagos de los dos grupos. La digestión con *Pst* I (Fig 18 y 19) incrementa la capacidad de escrutinio, asocia los fagos en 3 grupos separando nuevamente al fago 12 en similitud con el fago 28. Los cuales poseen RH que difieren en la capacidad de infección a dos genotipos de *S. aureus* (MRI-147 y MRI-148). *Kpn* I muestra una disminución en la frecuencia de corte por lo que se puede inferir una mayor concentración de A-T en el genoma de los bacteriófagos. El patrón de corte de esta enzima brinda una asociación igual a la recabada con *Pst* I (Fig 20 y 21).

**Tabla 14 Características de las enzimas de restricción utilizadas**

<b>Enzima</b>	<b>Sitio de reconocimiento</b>	<b>Contenido de A-T en la secuencia palíndrome (%)</b>
<i>Xba</i> I	5' T/CTAG A 3'	66.66
<i>Hind</i> III	5' A /AGCTT 3'	66.66
<i>Eco</i> RI	5' G /AATTC 3'	66.66
<i>Pst</i> I	5' CTGCA/ G 3'	33.33
<i>Kpn</i> I	5' GGTAC/ C3'	33.33

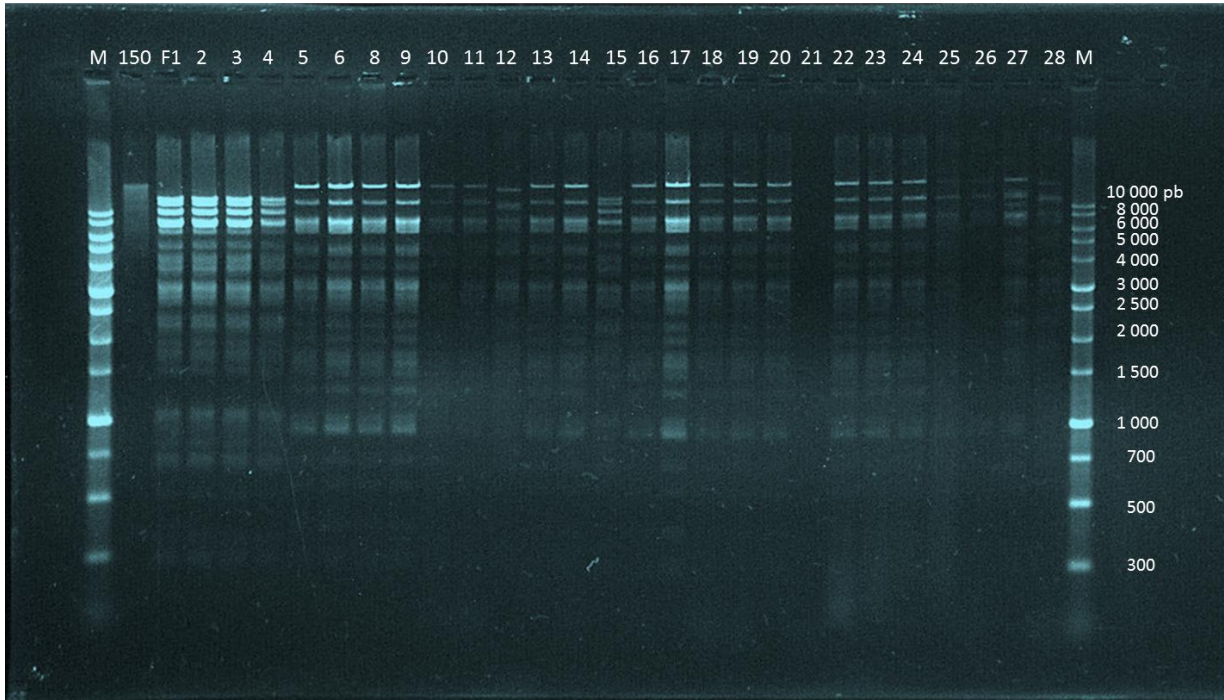


Fig. 12 Patrón de corte en digestión de material genético de fagos con enzima *Xba* I, observado mediante electroforesis simple en gel de agarosa.

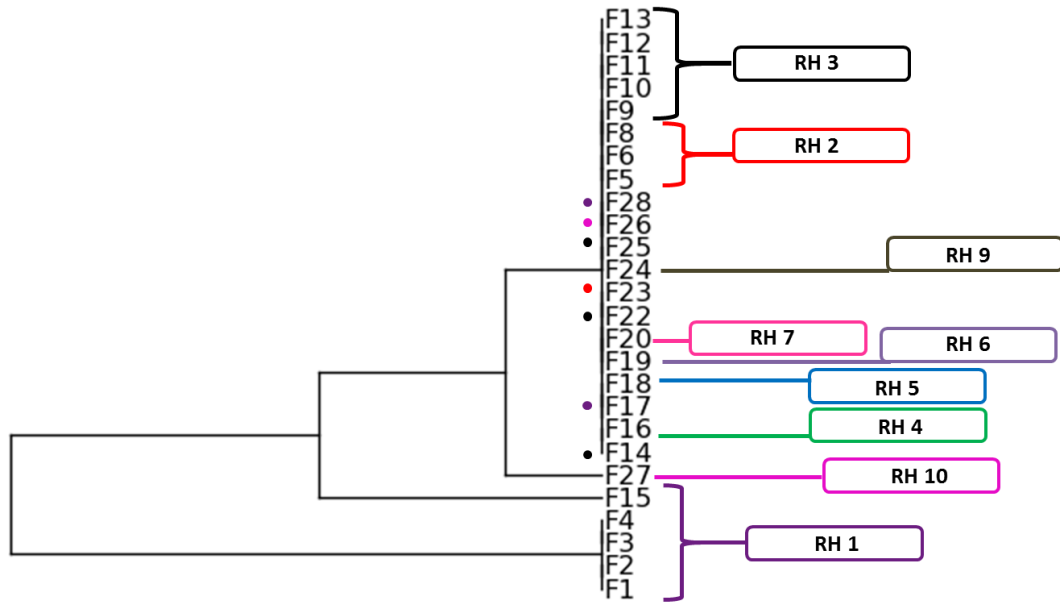


Fig. 13 Árbol filogenético producto del análisis del patrón de corte con la enzima *Xba* I.

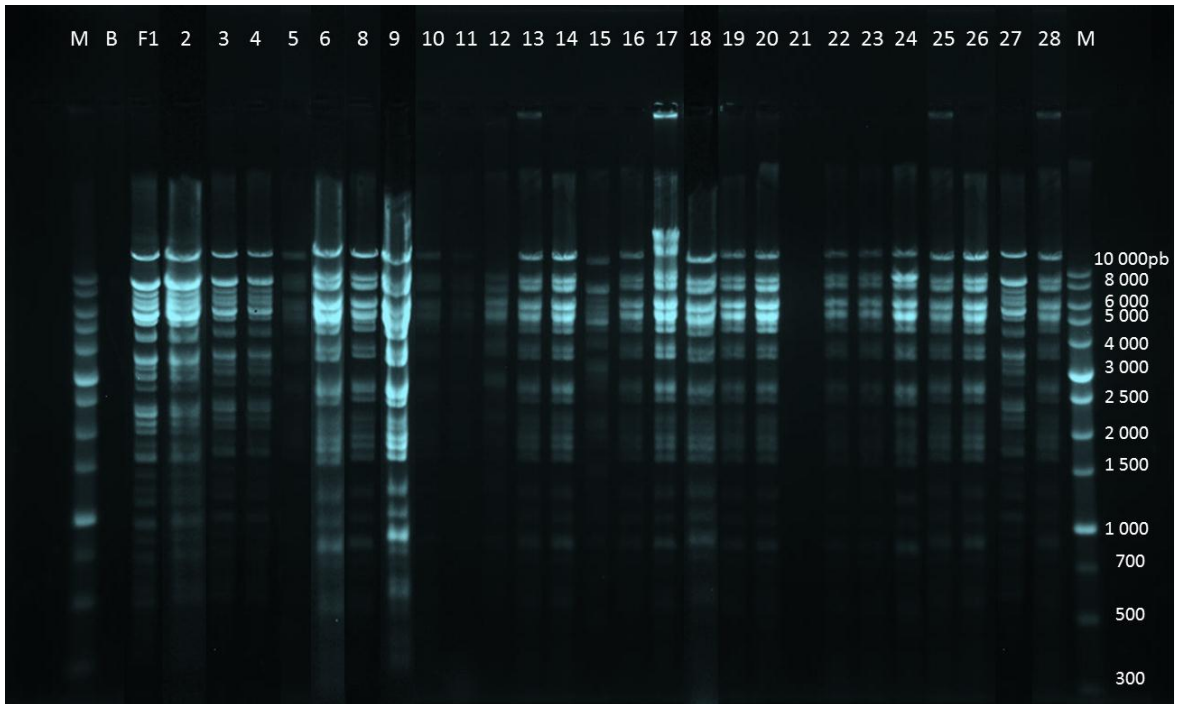


Fig. 14 Patrón de corte en digestión de material genético de fagos con enzima *Hind* III, observado mediante electroforesis simple en gel de agarosa.

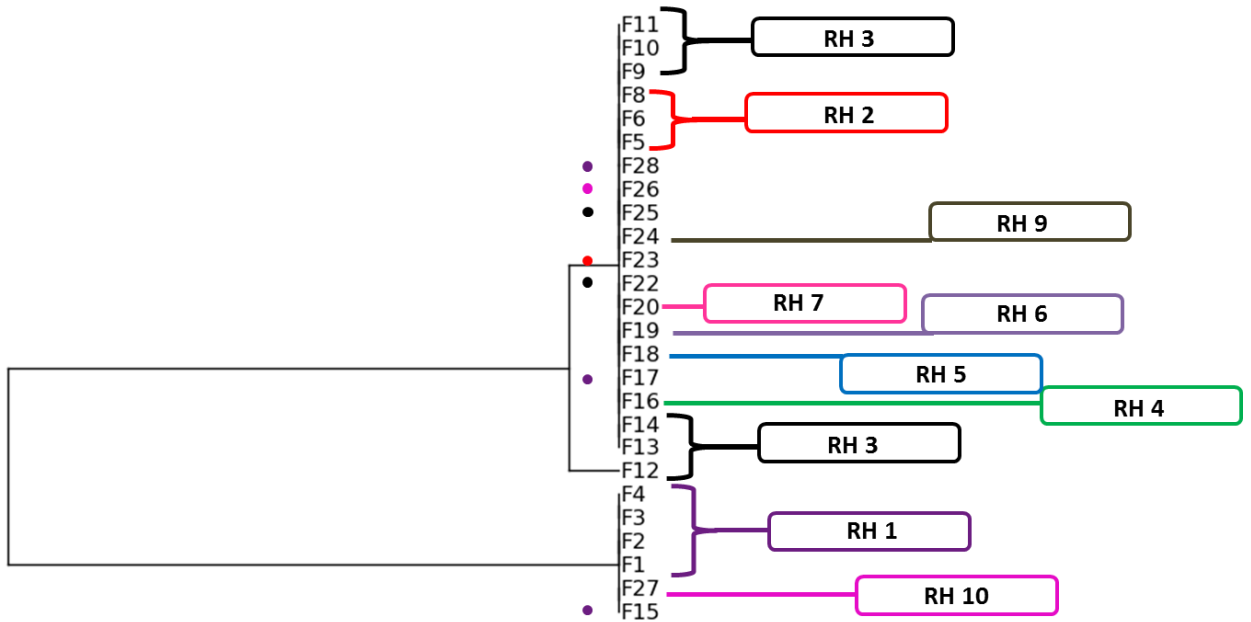


Fig. 15 Árbol filogenético producto del análisis del patrón de corte con la enzima *Hind* III

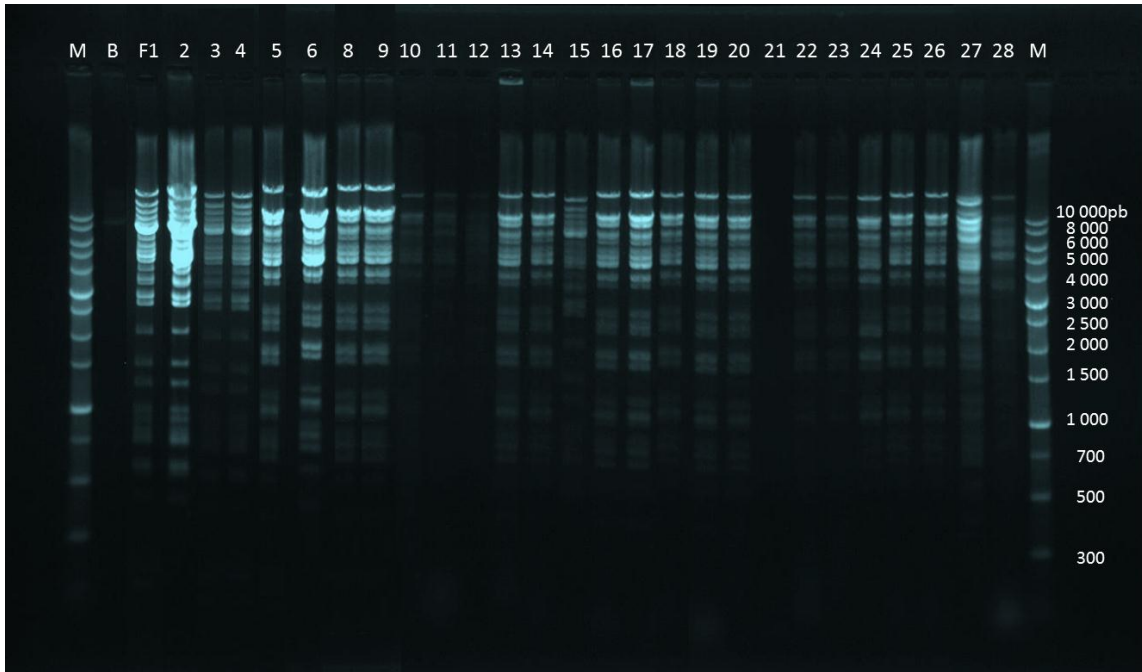


Fig. 16 Patrón de corte en digestión de material genético de fagos con enzima *Eco* RI, observado mediante electroforesis simple en gel de agarosa.

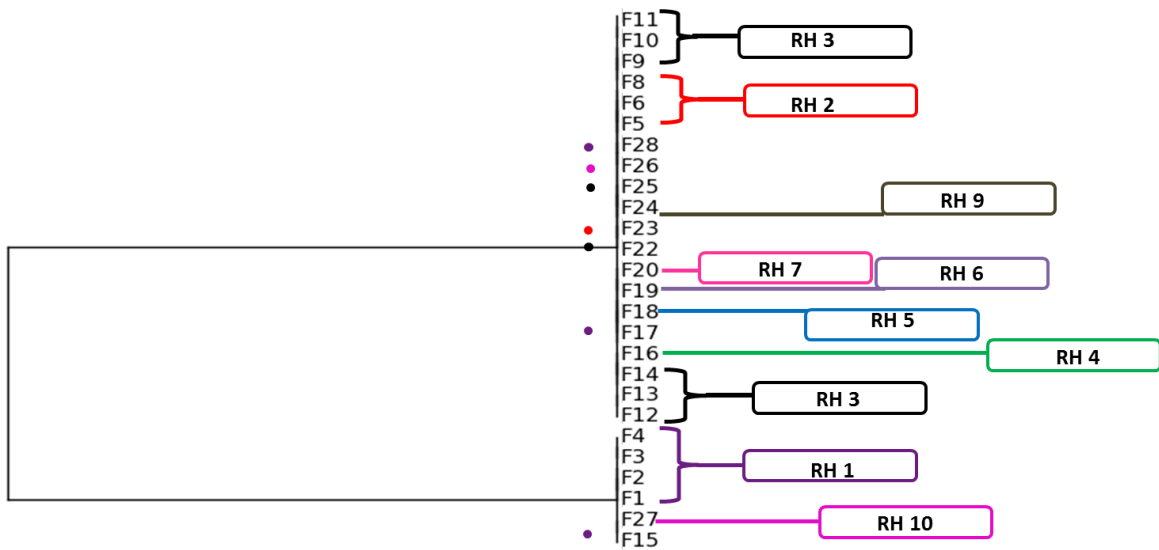


Fig. 17 Árbol filogenético producto del análisis del patrón de corte con la enzima *Eco* RI

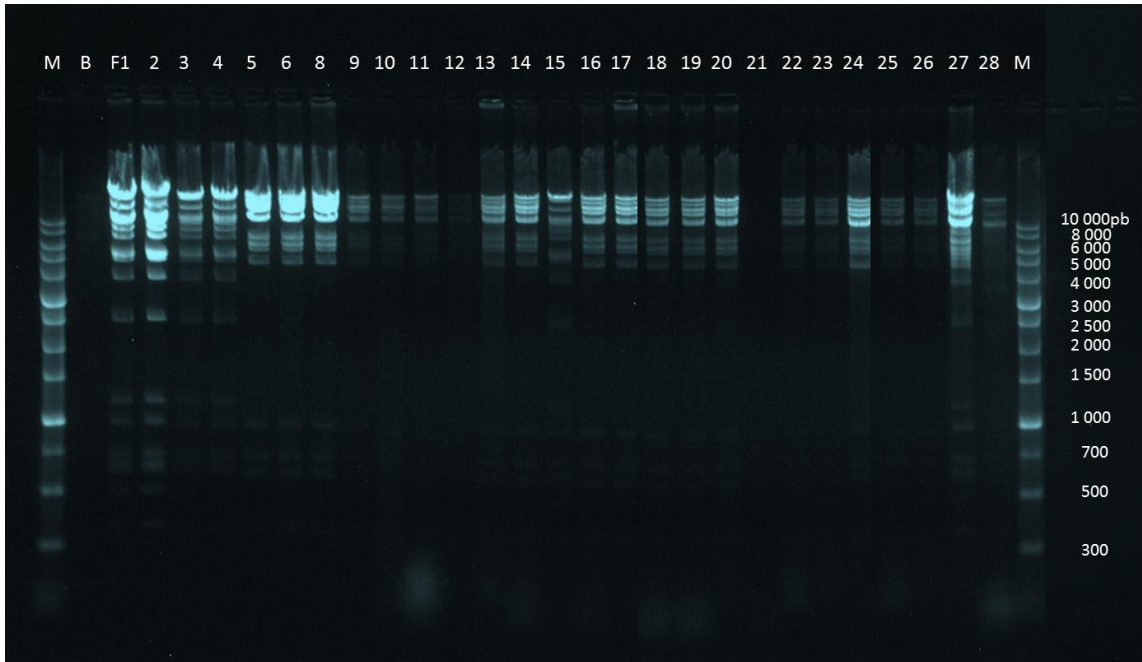


Fig. 18 Patrón de corte en digestión de material genético de fagos con enzima *Pst* I, observado mediante electroforesis simple en gel de agarosa.

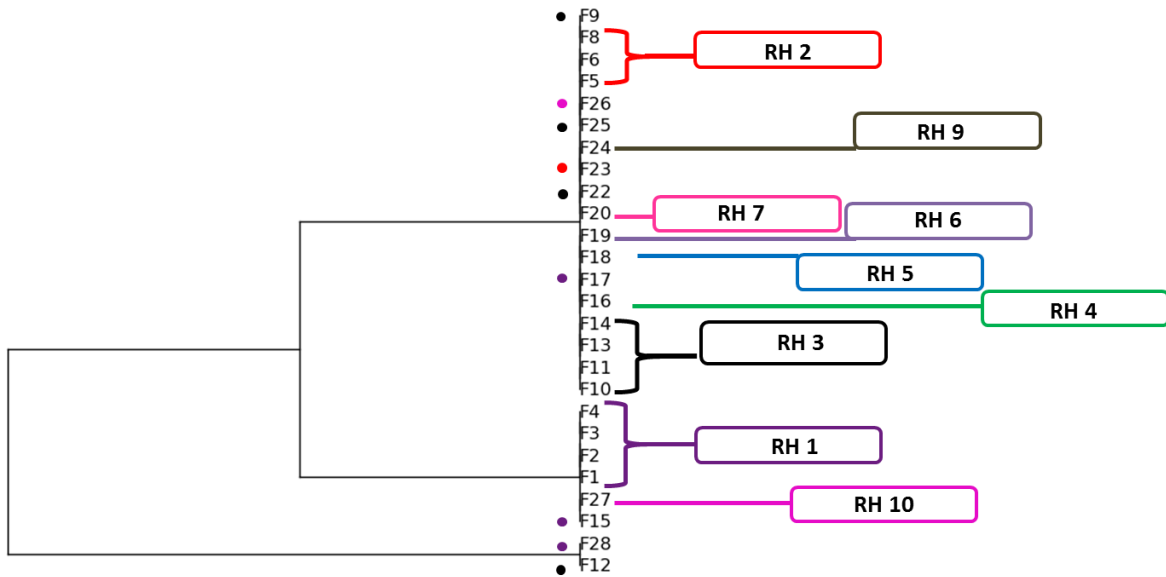


Fig. 19 Árbol filogenético producto del análisis del patrón de corte con la enzima *Pst* I

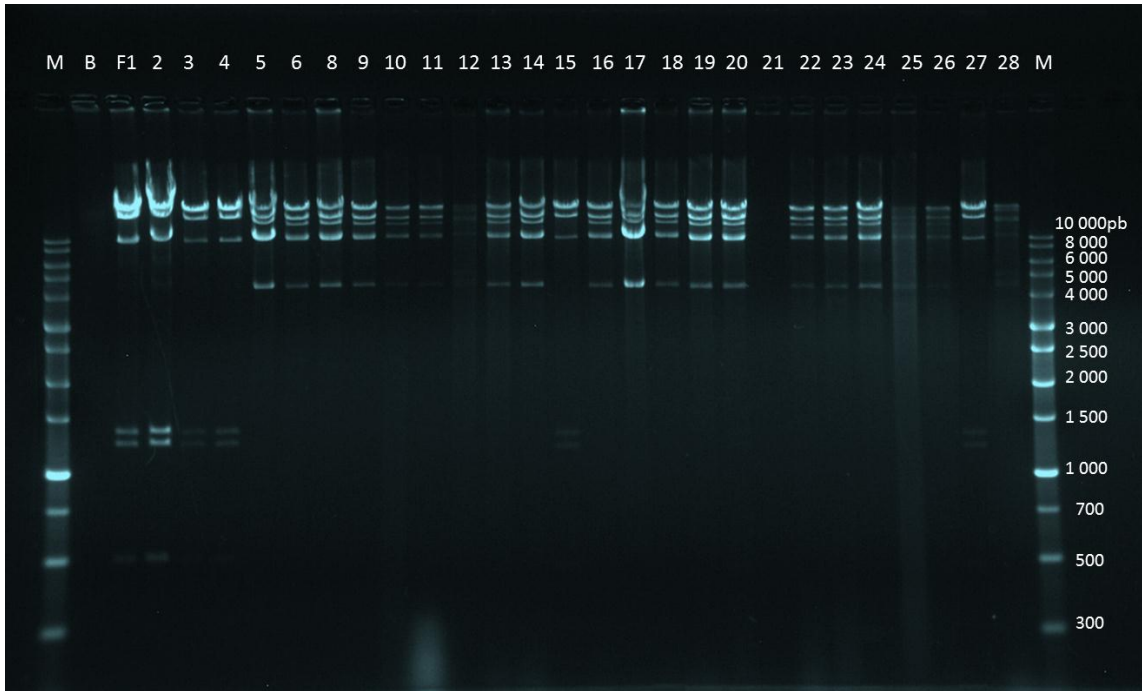


Fig. 20 Patrón de corte en digestión de material genético de fagos con enzima *Kpn I*, observado mediante electroforesis simple en gel de agarosa.

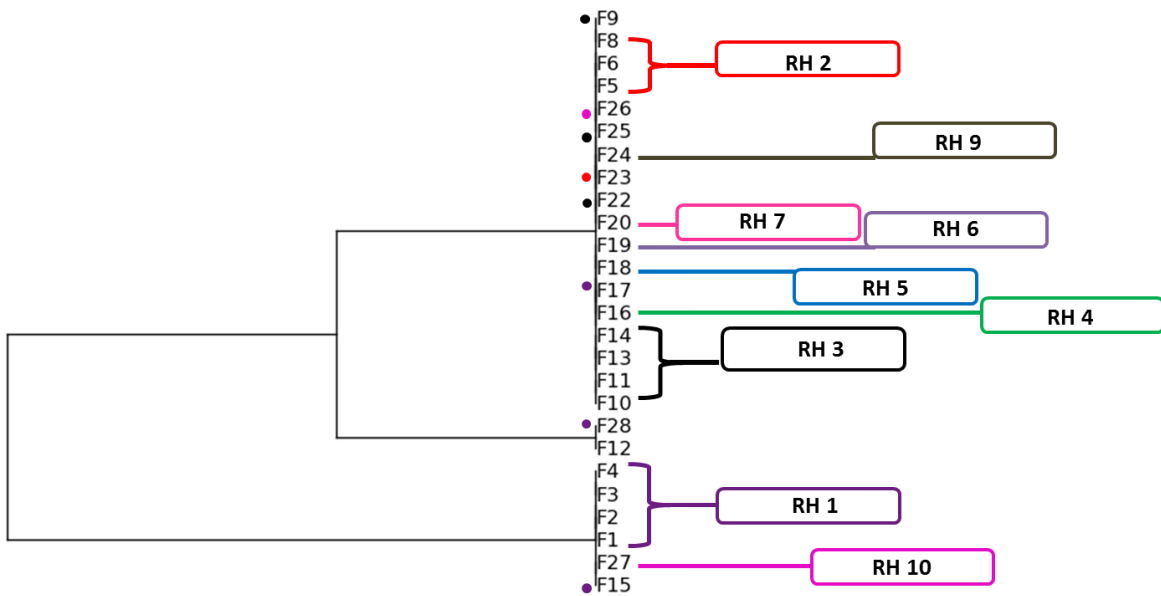


Fig. 21 Árbol filogenético producto del análisis del patrón de corte con la enzima *Kpn I*

Los patrones de corte obtenidos mediante la digestión con enzimas de restricción permitieron asociar a los fagos en un máximo de cuatro grupos, esto fue posible

con la enzima *Xba* I, sin embargo, las enzimas *Pst* I y *Kpn* I permitieron apreciar diferencias en los fagos 12 y 28 asociados en un mismo grupo con la digestión enzimática de *Hind* III y *Eco* RI. La diferencia en la concentración de bases que reconoce cada enzima, permite además hacer inferencia en cuanto al porcentaje mayoritario de bases que posee el genoma de los fagos. Los patrones de infección permitieron obtener que los fagos (5-8) con el RH más amplio son genéticamente diferentes a los demás, por lo cual pudieran ser por si solo objeto de estudio en terapia fágica. Sin embargo la elaboración de un coctel de fagos genéticamente diferentes que cubran el mayor rango de hospedero contribuiría de manera potencial al tratamiento de la mastitis en la región.

### **7.10 Determinación de títulos 2**

Para realizar las cinéticas de temperatura y pH, se determinaron los títulos siguiendo el protocolo detallado en metodología. Se incrementó el título en medio líquido de los fagos genotípicamente diferentes. Para determinar UFP/ml se realizaron diluciones seriadas base 10 a partir de la solución madre que contenía el medio clarificado por la lisis y filtrado mediante membranas millipore 0.22  $\mu\text{m}$ . Las diluciones de bacteriófagos fueron incorporadas junto con un volumen equivalente del crecimiento de la cepa de aislamiento de éste en medio 2xYTØ7 para formar un tapete bacteriano en el que se encontraran los fagos dispersos en toda la caja de Petri. Las diluciones que brindaron UFP (30-50 UFP) susceptibles de cuantificar oscilaron entre  $10^{-7}$  y  $10^{-9}$  (Fig. 22). Realizando las operaciones mediante el programa Excel® para obtener UFP/ml obtuvimos títulos de fagos que oscilan en un rango de  $10^9$  y  $10^{11}$  UFP/ml (Tabla 15). La media y desviación estándar corresponden a tres repeticiones.

Tabla 15 Determinación de títulos 2

No. Fago	UFP/ml	DE
F3	3.07E+10	± 1.5E+09
F8	8.37E+10	± 2.5E+09
F15	3.97E+11	± 1.5E+10
F18	5.13E+11	± 4.2E+10
F27	3.63E+10	± 4.7E+09



Fig. 22 Determinación de títulos 2. Se muestra cada una de las diluciones inoculadas en toda la caja de Petri bajo la técnica de agar doble capa.

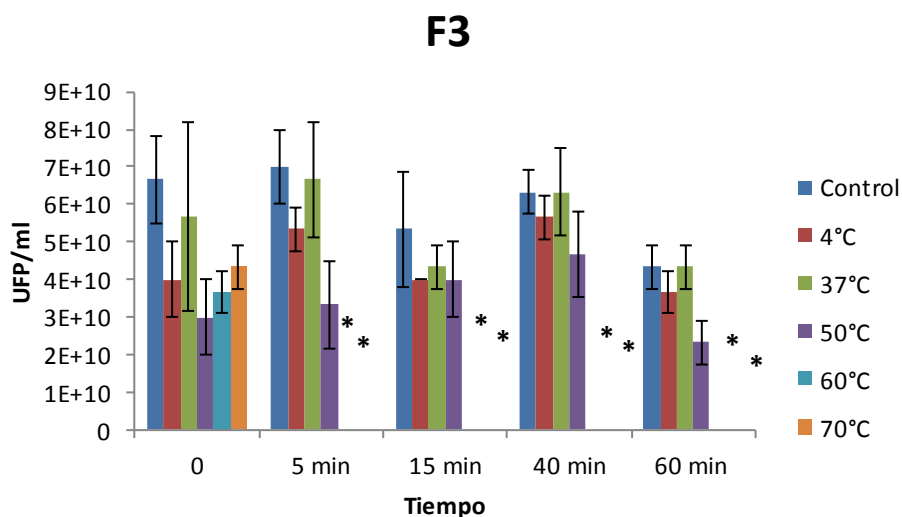
### 7.11 Determinación de estabilidad de los bacteriófagos a temperatura

La determinación preliminar de temperatura se realizó a los genotipos de fagos diferentes. Se realizó una determinación de títulos para seleccionar la dilución que proporcionara UFP susceptibles de cuantificar (-8 y -9). Las diluciones fueron sometidas a incubación a las temperaturas descritas en metodología. Se consideró como control aquella dilución mantenida a temperatura ambiente. Se tomaron alícuotas de 10 µl en los tiempos 0, 5, 15, 40 y 60 min. Éstas fueron inoculadas sobre un tapete bacteriano (*S. aureus* D0 igual a 0.5 en 3ml de medio 2xYTØ7) de agar doble capa.

Las UFP fueron cuantificadas y ajustadas a UFP/ml mediante el programa Excel®. Se realizó un comparativo estadístico entre el control y el tratamiento en cada

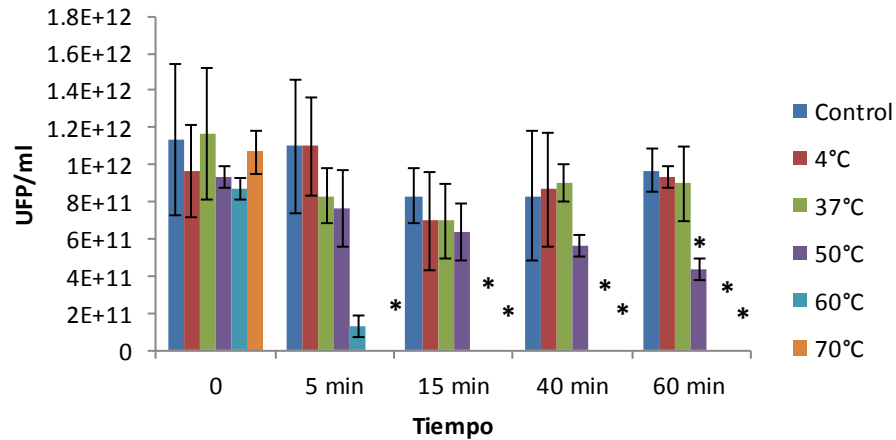
tiempo mediante una *prueba t* para muestras pareadas utilizando un nivel de significancia de 0.05 (Fig. 23-27).

Las pruebas de hipótesis realizadas expresan que la mayoría de los fagos son estables en un rango de temperatura de 4°C y 37°C por rango de una hora. La exposición de los fagos a 50°C por tiempos mayores a 40 min produce cambios significativos en la viabilidad de estos. Los fagos a 60°C y 70°C se mantienen viables por un tiempo máximo de 5 min.



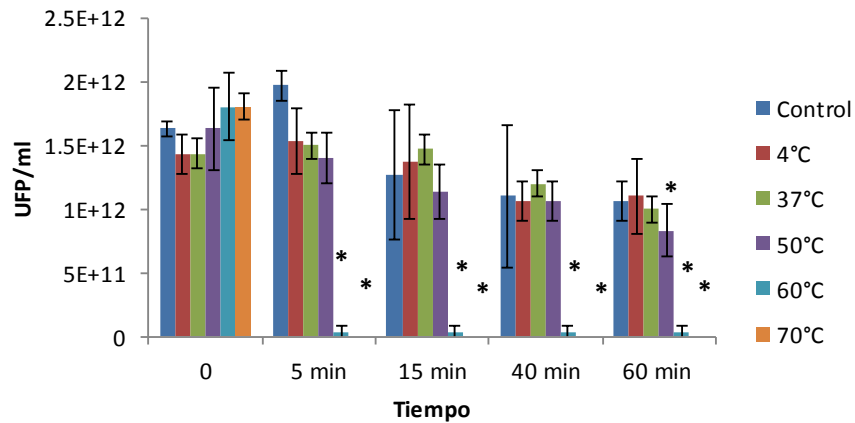
**Fig. 23** Estabilidad preliminar a temperatura correspondiente al bacteriófago 3. Las barras azules representan los títulos de fagos obtenidos con el control en cada tiempo, las barras siguientes muestran la viabilidad de los fagos ante los diversos tratamientos de temperatura. El asterisco indica variabilidad estadística con un valor de  $p < 0.05$ . Las líneas negras muestran la desviación estándar de ensayos por triplicado.

## F8



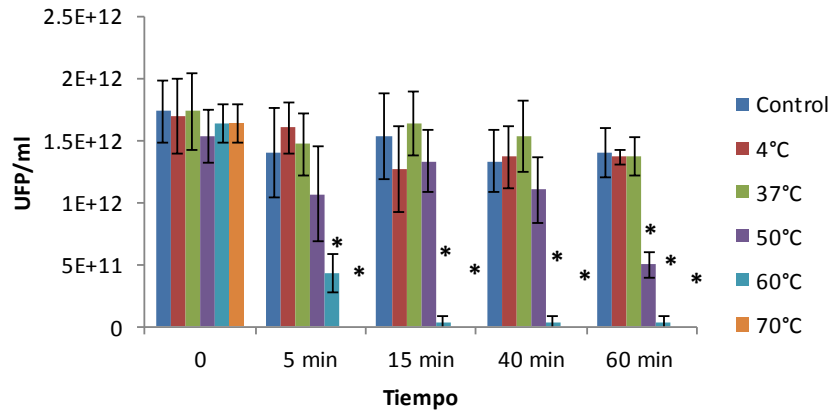
**Fig. 24** Estabilidad preliminar a temperatura correspondiente al bacteriófago 8. Las barras azules representan los títulos de fagos obtenidos con el control en cada tiempo, las barras siguientes muestran la viabilidad de los fagos ante los diversos tratamientos de temperatura. El asterisco indica variabilidad estadística con un valor de  $p < 0.05$ . Las líneas negras muestran la desviación estándar de ensayos por triplicado.

## F15



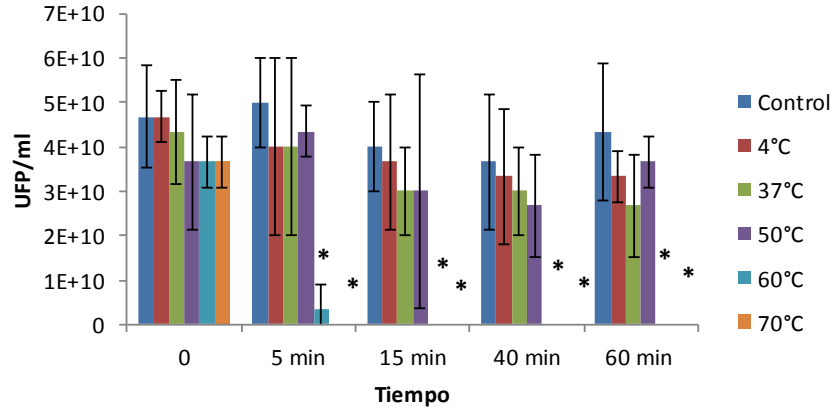
**Fig. 25** Estabilidad preliminar a temperatura correspondiente al bacteriófago 15. Las barras azules representan los títulos de fagos obtenidos con el control en cada tiempo, las barras siguientes muestran la viabilidad de los fagos ante los diversos tratamientos de temperatura. El asterisco indica variabilidad estadística con un valor de  $p < 0.05$ . Las líneas negras muestran la desviación estándar de ensayos por triplicado.

## F18



**Fig. 26** Estabilidad preliminar a temperatura correspondiente al bacteriófago 18. Las barras azules representan los títulos de fagos obtenidos con el control en cada tiempo, las barras siguientes muestran la viabilidad de los fagos ante los diversos tratamientos de temperatura. El asterisco indica variabilidad estadística con un valor de  $p < 0.05$ . Las líneas negras muestran la desviación estándar de ensayos por triplicado.

## F27

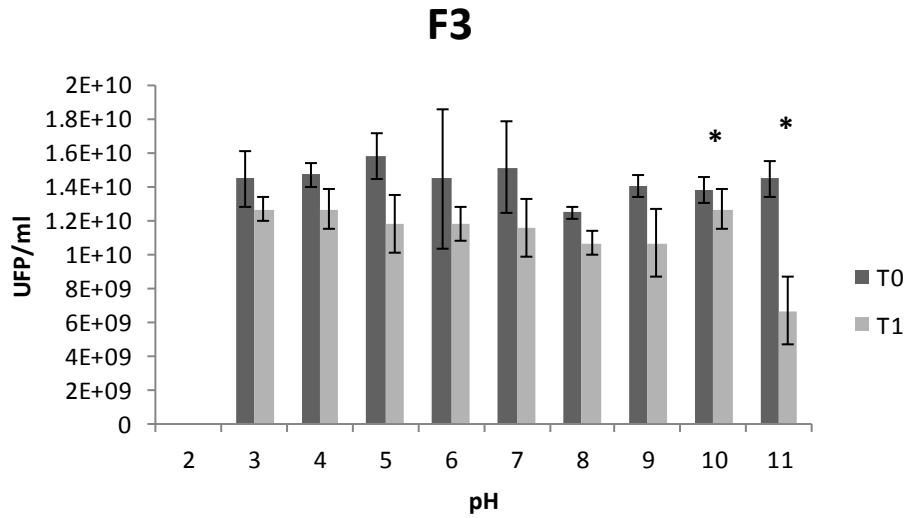


**Fig. 27** Estabilidad preliminar a temperatura correspondiente al bacteriófago 27. Las barras azules representan los títulos de fagos obtenidos con el control en cada tiempo, las barras siguientes muestran la viabilidad de los fagos ante los diversos tratamientos de temperatura. El asterisco indica variabilidad estadística con un valor de  $p < 0.05$ . Las líneas negras muestran la desviación estándar de ensayos por triplicado.

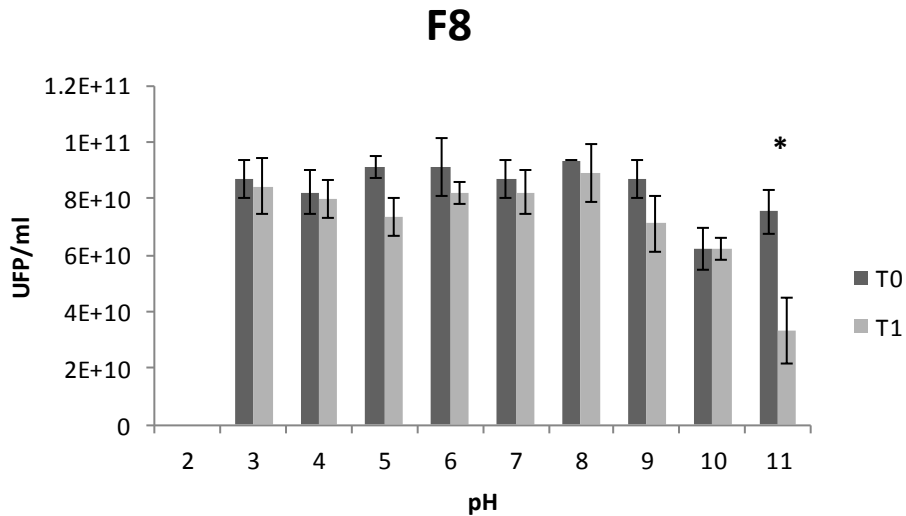
## 7.12 Determinación de estabilidad de los bacteriófagos a pH

La estabilidad preliminar a pH al igual que temperatura se realizó a los genotipos de fagos diferentes. Para ésta, se realizó la determinación de títulos para seleccionar la dilución que proporcionara UFP susceptibles de cuantificar (-7 y -8). La última dilución fue realizada en buffer TM en un rango de pH de 2-11, de manera inmediata tras la realización de la dilución, se tomaron alícuotas de 15 µl las cuales fueron inoculadas sobre un tapete bacteriano (*S. aureus* D0 o.5 en 3ml de medio 2xYTØ7) de agar doble capa. Tras la incubación de las diluciones con diferente pH durante 1 hora, éstas se volvieron a inocular en las mismas condiciones. Las UFP fueron cuantificadas y ajustadas a UFP/ml mediante el programa Excel®. Se realizó un comparativo estadístico entre el tiempo previo y posterior a la incubación mediante una *prueba t* para muestras pareadas utilizando un nivel de significancia de 0.05 (Fig. 28-32).

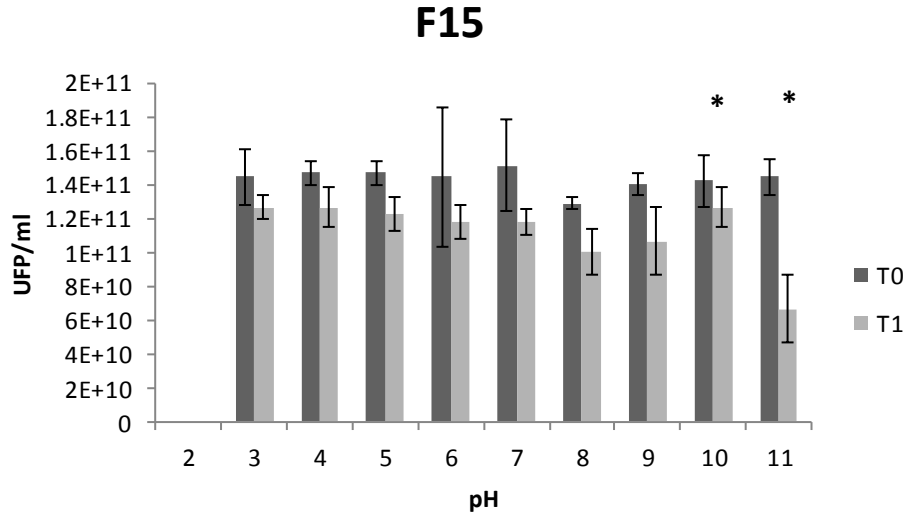
Los resultados muestran una estabilidad de los fagos en un rango de pH de 3 a 10, salvo en el fago 18, el cual se mantiene viable únicamente en un pH de 7-8. Cabe destacar que a pH 2, los fagos no fueron viables en ninguno de los tiempos. Los fagos 8 y 27 poseen el rango de pH más amplio (3-11), por lo cual pudieran ser objeto de estudio de viabilidad *in vivo*, administrando los bacteriófagos por una vía que obligue el paso por pH ácido como lo es la vía oral, el conocer el rango de estabilidad de los bacteriófagos a pH permite además el desarrollo de diversas formas farmacéuticas donde estos puedan incorporarse.



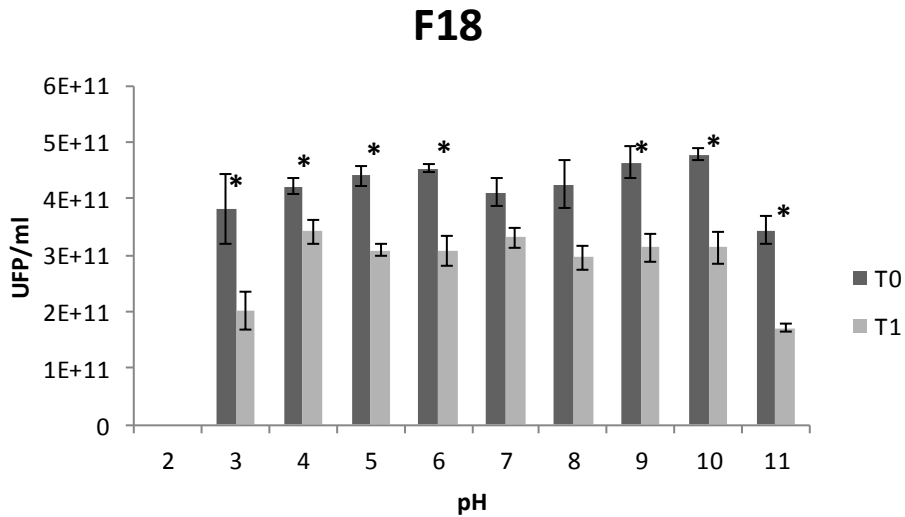
**Fig. 28** Estabilidad preliminar a pH correspondiente al bacteriófago 3. Las barras oscuras representan los títulos de fagos obtenidos antes de la incubación, las claras muestran la viabilidad de estos posteriormente. El asterisco indica variabilidad estadística con un valor  $p < 0.05$ . Las líneas negras muestran la desviación estándar de ensayos por triplicado.



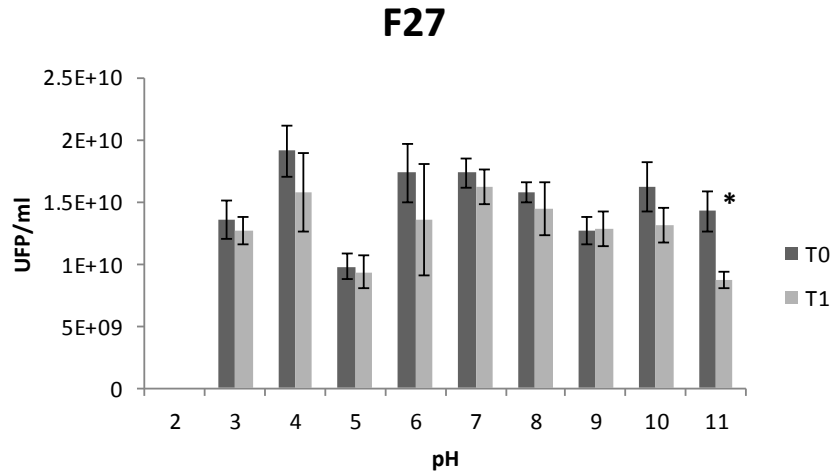
**Fig. 29** Estabilidad preliminar a pH correspondiente al bacteriófago 8. Las barras oscuras representan los títulos de fagos obtenidos antes de la incubación, las claras muestran la viabilidad de estos posteriormente. El asterisco indica variabilidad estadística con un valor de  $p < 0.05$ . Las líneas negras muestran la desviación estándar de ensayos por triplicado.



**Fig. 30** Estabilidad preliminar a pH correspondiente al bacteriófago 15. Las barras oscuras representan los títulos de fagos obtenidos antes de la incubación, las claras muestran la viabilidad de estos posteriormente. El asterisco indica variabilidad estadística con un valor de  $p < 0.05$ . Las líneas negras muestran la desviación estándar de ensayos por triplicado.



**Fig. 31** Estabilidad preliminar a pH correspondiente al bacteriófago 18. Las barras oscuras representan los títulos de fagos obtenidos antes de la incubación, las claras muestran la viabilidad de estos posteriormente. El asterisco indica variabilidad estadística con un valor de  $p < 0.05$ . Las líneas negras muestran la desviación estándar de ensayos por triplicado.



**Fig. 32 Estabilidad preliminar a pH correspondiente al bacteriófago 27. Las barras oscuras representan los títulos de fagos obtenidos antes de la incubación, las claras muestran la viabilidad de estos posteriormente. El asterisco indica variabilidad estadística con un valor de  $p < 0.05$ . Las líneas negras muestran la desviación estándar de ensayos por triplicado.**

Los resultados obtenidos en estabilidad a pH concuerdan con lo observado por Kwiatek et al. (2011), una estabilidad de los fagos hasta pH 4, y diferentes sensibilidades de cada aislado tras una hora de incubación. Ningún aislado resistió valores de pH menores a 3, sin embargo los fagos 8 y 27 resistieron este valor, por lo cual pudieran ser considerados para el desarrollo de formas farmacéuticas de administración oral. Sin otra opción para la aplicación de fagos poco viables en medios ácidos es incluirse en una matriz resistente al ácido que funcione como vehículo, o disminuir de alguna manera las condiciones extremas de acidez del estómago. En este sentido se ha propuesto la administración conjunta de los fagos con bicarbonato como otra estrategia para la administración oral (Chibani-Chennoufi *et al.*, 2004, Tanji *et al.*, 2005). Aunque los fagos no resisten valores de pH por debajo de 3, los aislados más resistentes a la acidez podrían aplicarse a otro tipo de tratamientos, como la biopreservación de alimentos ácidos o su uso conjunto con ácidos en tratamientos de descontaminación (Choi *et al.*, 2009).

## VIII. CONCLUSIONES

- ❖ En los tanques de llegada de las plantas tratadoras de aguas residuales es posible aislar bacteriófagos líticos contra genotipos epidemiológicamente relevantes de *S. aureus*.
- ❖ La adsorción de los bacteriófagos requiere cationes divalentes  $\text{Ca}^{+2}$  a una concentración de 10mM y No  $\text{Mg}^{+2}$  a la misma concentración.
- ❖ Los bacteriófagos aislados no poseen cubierta lipídica
- ❖ Tienen diversos rangos de hospedero, lisan del 25 al 60% del total de los genotipos probados.
- ❖ Los genotipos susceptibles de infección son agrupados en el complejo clonal 5 subtipos 97 y 126. Que incluyen los ST 126, 97, 352 y NST-1 no reportada anteriormente.
- ❖ Todos los bacteriófagos lisan el genotipo MRI-151 aislado de mastitis bovina, caracterizado como *Staphylococcus sp.* con resistencia a novobiocina, gentamicina, cefoxitina, lincomicina, cloranfenicol, clindamicina, eritromicina y linezolida
- ❖ Los patrones de digestión enzimática permiten agrupar a los fagos en al menos 2 grandes grupos, de los cuales contienen divisiones en cuanto a su asociación por rango de hospedero.
- ❖ Los genomas de los fagos poseen mayor concentración de A-T
- ❖ El fago 8 es el fago de elección para incluir en un coctel para el tratamiento de la mastitis, ya que es genótipicamente diferente, lisa genotipos de *S. aureus* asociados a animales de granja (ST-97 y 352), a contaminación en leche (ST-126) y genotipos locales nuevos asociados a mastitis (NST-1), además posee una estabilidad en un rango de pH de 3 a 11 y una estabilidad a temperaturas corporales manifestadas durante procesos de infección (38°C-40°C). Lo que lo hace susceptible de considerarse para tratamientos *in vivo* por administración oral y/o incorporarse en el mantenimiento de inocuidad de la leche y sus derivados.

## IX. REFERENCIAS

- Abedon, S. T. 2008. *Bacteriophage ecology : population growth, evolution, and impact of bacterial viruses*, p. 508, Cambridge University Press, Cambridge ; New York.
- Adams, M.H. 1966. Bacteriophages. Second printing. Interscience Publishers New York. N.Y. U.S.A. pp 1, 2, 6, 122, 444.
- Ángel, A.D., Solorio, J.L., Navarrete, J.D., Bautista, G.U., García, F.R., Rentería, I., Carranza, S.I., Baizabal, V.M., Bravo, P.A., Cajero, J.M., Valdez, J.J. Caracterización molecular de aislamientos de *Staphylococcus aureus* del Municipio de Tarímbaro, Michoacán. En preparación.
- Ackermann, H. W. 1992. Frequency of morphological phage descriptions. *Arch. Virol.* 124:201-209
- Ackermann, H. W. 2001. Frequency of morphological phage descriptions in the year 2000. Brief review. *Arch Virol.* 146: 843-857.
- Arrieta, M. L. E. 2011. Evaluación microbiológica de la leche y los productos lácteos producidos en cuatro expendios de la zona metropolitana de Morelia. Tesis de licenciatura. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- Babalova, E. G., K. T. Katsitadze, L. A. Sakvarelidze, N. S. Imnaishvili, T. G. Sharashidze, V. A. Badashvili, G. P. Kiknadze, A. N. Meipariani, N. D. Gendzekhadze, E. V. Machavariani, K. L. Gogoberidze, E. I. Gozalov, and N. G. Dekanosidze. 1968. Preventive value of dried dysentery bacteriophage. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 2:143–145.
- Barrera-Rivas, C., Cajero-Juarez, M., Oviedo-Boyso, J., Nuñez-Anita, R., Kameyama-Kawabe, L. & Valdéz-Alarcón, J. 2015. Advances in the use of endolysins: general remarks, structure, applications, genetic modifications and perspectives. En *The Battle Against Microbial Pathogens: Basic Science, Technological Advances and Educational Programs* (259-268). Spain: A. Méndez-Vilas.

- Bautista-Trujillo, G., Cajero-Juarez, M., Oviedo-Boyso, J., , L. & Valdéz-Alarcón, J. 2013. Performance of culture media for the isolation and identification of *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis. *Journal of medical microbiology*. 62 :369–76.
- Bogovazova, G. G., N. N. Voroshilova, V. M. Bondarenko, G. A. Gorbatkova, E. V. Afanas'eva, T. B. Kazakova, V. D. Smirnov, A. G. Mamleeva, I. A. Glukharev, E. I. Erastova, I. A. Krylov, T. M. Ovcherenko, A. P. Batur, G. V. Yalsyk, and N. A. Arefyeva. 1992. Immunobiological properties and therapeutic effectiveness of preparations from *Klebsiella* bacteriophages. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 3:30–33.
- Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS, Edwards JE, Gilbert D, Rice LB, *et al.* 2009. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 48:1-12.
- Bradley, D.E. 1967. Ultrastructures of bacteriophages and bacteriocins. *Bacteriol. Rev.* 31:230-314.
- Brody, T., Yavatkar, A.S., Lin, Y., Ross, J., Kuzin, A., *et al.* 2008. Horizontal gene transfers link a human MRSA pathogen to contagious bovine mastitis bacteria. *PLoS ONE.* 3(8):e3074
- Bustos-Martínez J.A., Hamdan-Partida A., Gutiérrez-Cadenas M. 2006. *Staphylococcus aureus*: la reemergencia de un patógeno en la comunidad. *Rev. Biomed.* 17: 287 -305.
- Capparelli, R., Parlato, M., Borriello, G., Salvatore, P., Iannelli, D. 2007. Experimental phage therapy against *Staphylococcus aureus* in mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51: 2765-2773.
- Caplin J. 2009. Bacteriophage: old treatment, new focus? *Microbiologist.* 10:20-23
- Carmona-Gasca, C.A., Talavera-Morales, L. E., García-Rodríguez, F. R., Orozco-Ortiz, A. P., Valdez-Alarcón, J. J. 2012. NiSspa: software de código abierto para la caracterización de aislados de *Staphylococcus aureus* por spa-typing para epidemiología molecular. *Biológicas.* 14(2): 30 – 36.

- Castro, O.F., Rojas, P.P., Rodríguez, Ll. 2006. Nuevas aproximaciones biotecnológicas para combatir la mastitis. *Agrociencia*. 22: 49 -58.
- Chibani-Chennoufi, S., J. Sidoti, A. Bruttin, E. Kutter, S. Sarker & H. Brussow. 2004. In vitro and in vivo bacteriolytic activities of Escherichia coli phages: implications for phage therapy. *Antimicrob Agents Chemother* .48: 2558-2569
- Choi, Y. M., O. Y. Kim, K. H. Kim, B. C. Kim & M. S. Rhee. 2009. Combined effect of organic acids and supercritical carbon dioxide treatments against nonpathogenic Escherichia coli, Listeria monocytogenes, Salmonella typhimurium and E. coli O157:H7 in fresh pork. *Lett Appl Microbiol*. 49: 510-515.
- Clokie, M. R. J. & A. M. Kropinski. .2009. *Bacteriophages : methods and protocols*. Humana Press, New York.
- Comeau A, Tetart F, Trojet S. 2007. Phage-Antibiotic Synergy (PAS):  $\beta$ -lactam and quinolone antibiotics stimulate virulent phage growth. *PLoS One*. 2:799.
- Deresinski, S. 2009. Bacteriophage therapy: exploiting smaller fleas. *Clin. Infect. Dis*. 48: 1096-1101.
- Enright M.C., Day N.P.J., Davies C.E., Peacock S.J., Spratt B.J. 2000. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol*. 38: 1008-1015.
- Fischetti, V.A. 2005. Bacteriophage lytic enzymes: novel antiinfectives. *Trends Microbiol*. 13:491–496.
- Foster, T.J. 2004. The *Staphylococcus aureus* “superbug”. *J. Clin. Invest*. 114: 1693 –1696.
- Gilot P., Lina G., Cochard T., Poutrel B. 2002. Analysis of the genetic variability of genes encoding the RNA III-activating components Agr and Trap in a population of *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows with mastitis. 40: 4060-4067.

- Güler, L., Ok, Ü., Gündüz, K., Gülcü, Y., y Hadimli, H.H. 2005. Antimicrobial susceptibility and coagulase gen typing of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine clinical mastitis cases in Turkey. *J. Dairy Sci.*
- Hamilton, C., Emanuelson, U., Forslund, K., Hansson, I., Ekman, T. 2006. Mastitis and related management factors in certified organic dairy herds in Sweden. *Acta Vet. Scand.* 48: 11.
- Harmsen D., Claus H., Witte W., Röthganger J., Claus H., Turnwald D., Vogel U. 2003. Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital setting by use of novel software for *spa* repeat determination and database management. *J. Clin. Microbiol.* 41: 5442-5448.
- Hiramatsu, K., Ito, T., Tsubakishita, S., Sasaki, T., et al. 2013. Genomic basis for methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Infect Chemother.* 45(2):117-136.
- Inal, J. M. 2003. Phage therapy: a reappraisal of bacteriophages as antibiotics. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 51: 237-244.
- Jassim, S. A., Limoges, R.G. 2014. Natural solution to antibiotic resistance: bacteriophages 'The Living Drugs'World. *J Microbiol Biotechnol.* 30(8):2153–2170.
- Kochetkova, V. A., A. S. Mamontov, R. L. Moskovtseva, E. I. Erastova, E. I. Trofimov, M. I. Popov, and S. K. Dzhubalieva. 1989. Phagotherapy of postoperative suppurative-inflammatory complications in patients with neoplasms. *Sov. Med.* 6:23–26.
- Kutateladze M., Adamia R. 2010. Bacteriophage as potential new therapeutics to replace or supplement antibiotics. *Trends Biotechnol.* 28: 591-595.
- Kutter, E. & A. Sulakvelidze. 2005. *Bacteriophages : biology and applications*, p. 510 p. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Kwarcinski, W., B. Lazarkiewicz, B. Weber-Dabrowska, J. Rudnicki, K. Kaminski, and M. Sciebura. 1994. Bacteriophage therapy in the treatment of recurrent subphrenic and subhepatic abscess with jejunal fistula after stomach resection. *Pol. Tyg. Lek.* 49:535.

- Kwiatek, M.; Parasion, S.; Mizak, L.; Gryko, R.; Bartoszcze, M.; Kocik, J. 2011. Characterization of a bacteriophage, isolated from a cow with mastitis, that is lytic against *Staphylococcus aureus* strains. *Arch. Virol.* 157: 225–234.
- Krylov VN. 2011. Use of live phages for therapy on a background of coevolution of bacteria and phages. *International Research Journal of Microbiology.* 2 (9):315-332.
- LactoData. Boletín de Información sobre el sector lechero 2014
- LactoData, Boletín de Información sobre el sector lechero 2016
- López Meza, J. E. *et al.* 2006. Caracterización molecular de aislamientos de *Staphylococcus* spp. asociados a mastitis bovina en Tarímbaro, Michoacán. *Téc Pecu Méx.* 44: 91–106.
- Ma YL, Lu CP. 2008. Isolation and identification of a bacteriophage capable of infecting *Streptococcus suis* type 2 strains. *Vet Microbiol.* 132: 340-347
- Maiden MC. 2006. Multilocus sequence typing of bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 60:561–588
- Matsuzaki, S., Yasuda, M., Nishikawa, H., Kuroda, M., Ujihara, T., Shuin, T., 2003. Experimental protection of mice against lethal *Staphylococcus aureus* infection by novel bacteriophage phi MR11. *J. Infect. Dis.* 187: 613-624.
- Marza, J.A., Soothill, J.S., Boydell, P. and Collyns, T.A. 2006. Multiplication of therapeutically administered bacteriophages in *Pseudomonas aeruginosa* infected patients. *Burns.* 32, 644–646
- Meladze, G. D., M. G. Mebuke, N. S. Chkhetia, N. I. Kiknadze, G. G. Koguashvili, I. I. Timoshuk, N. G. Larionova, and G. K. Vasadze. 1982. The efficacy of staphylococcal bacteriophage in treatment of purulent diseases of lungs and pleura. *Grudn. Khir.* 1:53–56.
- Milheirico C., Oliveira D.C., de Lencastre H., 2007. Update to the multiplex PCR strategy for assignment of *mec* element types in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 51: 3374-3377.
- Murchan S., Kaufmann M.E., Deplano A., de Ryck R., Struelens M., Zinn C.E., Fusing V., Salmenlinna S., Vuopio-Varkila J., El-Sohl N., Cuny C.,

Witte W., Tassios P.T., Legakis N., Van Leeuwen W., Van Belkum A., Vindel A., Laconcha I., Garaizar J., Haeegman S., Olsson-Liljequist B., Ransjö U., Coombes G., Cookson B. 2003. Harmonization of pulse-field gel electrophoresis protocols for epidemiological typing of strains of methicillinresistant *Staphylococcus aureus*: a single approach developed by consensus in 10 European laboratories and its application for tracing the spread of related strains. *J. Clin. Microbiol.* 41: 1574-1585.

- National Mastitis Council. 1999. Laboratory Handbook on Bovine Mastitis. Rev. ed. National Mastitis Council, Madison, WI.
- NORMA Oficial Mexicana NOM-243-SSA1-2010, Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba.
- O’Flaherty, S., Ross, R.P., Flynn, J., Meaney, W.J., Fitzgerald, G.F., Coffey, A. 2005. Isolation and characterization of two anti-staphylococcal bacteriophages specific for pathogenic *Staphylococcus aureus* associated with bovine infections. *Lett. Appl. Microbiol.* 41: 482-486.
- O’Flaherty S., Ross R.P., Coffey A. 2009. Bacteriophage and their lysins for elimination of infectious bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 33: 801-819.
- O’Neill, E., Pozzi, C., Houston, P., Humphreys, H., Robinson, D.A., Loughman, A., Foster, T.J., O’Gara, J.P. 2008. A novel *Staphylococcus aureus* biofilm phenotype mediated by the fibronectin-binding proteins, FnBPA and FnBPB. *J bacteriol.* 190(11):3835-3850.
- Pantucek, R., Rosypalová, A., Doskar, J., Kailerová, J., Ruzicková, V., Borecká, P. 1998. The polyvalent staphylococcal phage Ø812: its host-range mutants and related phages. *Virology* 246: 241-252.
- Parracho, H. M., Burrowes, B. H., Enright, M. C., McConville, M. L. & Harper, D. R. 2012. The role of regulated clinical trials in the development of bacteriophage therapeutics. *J. Mol. Genet. Med.* 6: 279–286
- Pincus NB, Reckhow JD, Saleem D, Jammeh ML, Datta SK, et al. 2015. Strain Specific Phage Treatment for *Staphylococcus aureus* Infection Is

Influenced by Host Immunity and Site of Infection. *PLoS ONE* 10(4): e0124280

- Pyörälä, S., Taponen, S. 2009. Coagulase-negative staphylococci-emerging mastitis pathogens. *Vet Microbiol.* 134:3-8.
- Rohwer F & Edwards R. 2002. The phage proteomic tree: a genome-based taxonomy for phage. *J Bacteriol* 184: 4529–4535.
- Sabat, A., Krzyszton-Russjan, J. 2003. Method for typing *Staphylococcus aureus* strains: multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of polymorphism and genetic relationships of clinical isolates. *J. Clin. Microbiol.* 41: 1801–1804.
- Saran, A., Chaffer, M. 2000. Mastitis y calidad de la leche. Ed. Inter-Medica. Buenos Aires. pp. 14-16, 31-42.
- Secretaria de Economía Análisis del sector lácteo en México 2011.
- Segundo N.A., Hernández E.B., López O.V., Torres O.A. 2010. Los bacteriofagos como una alternativa en el tratamiento de enfermedades infecciosas bacterianas (Fagoterapia). *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas.* 41(3):17-26
- Slopek, S., I. Durlakowa, B. Weber-Dabrowska, A. Kucharewicz-Krukowska, M. Dabrowski, and R. Bisikiewicz. 1983. Results of bacteriophage treatment of suppurative bacterial infections. I. General evaluation of the results. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 31:267–291.
- Slopek, S., A. Kucharewicz-Krukowska, B. Weber-Dabrowska, and M. Dabrowski. 1985. Results of bacteriophage treatment of suppurative bacterial infections. VI. Analysis of treatment of suppurative staphylococcal infections. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 33:261–273.
- Son JS, Kim EB, Lee SJ, Jun SY, Yoon SJ, Kang SH, Choi YJ. 2010. Characterization of *Staphylococcus aureus* derived from bovine mastitis and isolation of two lytic bacteriophages. *J Gen Appl Microbiol* 56:347–353
- Stone, R. 2002. Stalin's forgotten cure. *Science* 298: 728-31.

- Stroj, L., B. Weber-Dabrowska, K. Partyka, M. Mulczyk, and M. Wojcik. 1999. Successful treatment with bacteriophage in purulent cerebrospinal meningitis in a newborn. *Neurol. Neurochir. Pol.* 3:693–698.
- Sulakvelidze, A., Alavidze, Z., Morris Jr., J.G. 2001. Bacteriophage therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 649-659.
- Tamariz, J. H., Lezameta, L., Guerra, H. 2014. Fagoterapia frente a infecciones por *Staphylococcus aureus* meticilino resistente en ratones. *Rev. perú. med. exp. salud pública.* 31:69-77.
- Tanji, Y., T. Shimada, H. Fukudomi, K. Miyanaga, Y. Nakai & H. Unno. 2005. Therapeutic use of phage cocktail for controlling *Escherichia coli* O157:H7 in gastrointestinal tract of mice. *J Biosci Bioeng.* 100: 280-287.
- Tortora, G. J., B. R. Funke & C. L. Case. 2010. *Microbiology: a introduction*, p. 1 v. Pearson Benjamin Cummings, San Francisco, CA.
- Unnerstad, H.E., Bengtsson, B., Horn af Rantzien, M., Börjesson, S. 2013. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* containing *mecC* in Swedish dairy cows. *Acta Vet Scand.* 55:6.
- Valdez-Alarcón, J.J., Bustos-Martínez, J.A., Solorio-Rivera, J.L., Gutiérrez-Vázquez, E., Baizabal-Aguirre, V.M., Bravo-Patiño, A., Cajero-Juarez, M. 2012. Comunidades microbianas complejas en modelos bovinos: retos para la salud pública y la producción pecuaria. In M. del P. Carreón Abud, Yazmín; Mendoza de Guives, Pedro; Rodríguez Guzmán, ed. *Los microorganismos y su importancia Biotecnológica y Ecológica*. Morelia, Michoacán, México, pp. 29–34.
- Wills, Q.F., Kerrigan, C., Soothill, J.S. 2005. Experimental bacteriophage protection against *Staphylococcus aureus* abscesses in a rabbit model. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49: 1220-1221
- Weber-Dabrowska, B., M. Dabrowski, and S. Slopek. 1987. Studies on bacteriophage penetration in patients subjected to phage therapy. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 35:563–568.

- Wong, S.M., Chng, C.G., Lee, Y.H., Tan, K., Zettler, F.W., 1994. Incidence of cymbidium mosaic and odontoglossum ringspot viruses and their significance in orchid cultivation in Singapore. *Crop Protection*. 13, 235–239
- Wurtz, M. 1992. Bacteriophage structure. *Electron Microsc. Rev.* 5:283-309.
- Zadoks, R. N., Middleton, J. R., McDougall, S., Katholm, J. & Schukken, Y. H. 2011. Molecular epidemiology of mastitis pathogens of dairy cattle and comparative relevance to humans. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*. 16: 357–72 .
- Zaneveld, J.R., Nemergut, D.R., Knight, R. 2008. Are all horizontal gene transfers created equal? prospects for mechanism-based studies of HGT patterns. *Microbiol.* 154:1-15.
- Zhukov-Verezhnikov, N. N., L. D. Peremitina, E. A. Berillo, V. P. Komissarov, V. M. Bardymov, A. G. Khvoles, and L. B. Ugryumov. 1978. A study of the therapeutic effect of bacteriophage agents in a complex treatment of suppurative surgical diseases. *Sov. Med.* 12:64–66.