



**Aislamiento de bacteriófagos líticos específicos contra *Escherichia coli*  
productora de Betalactamasas de espectro extendido (BLEE) a partir de muestras  
de agua residual**

Valentina Giraldo Carmona  
Linsey Lorena Pico Arias

Trabajo de grado presentado para optar al título de Microbiólogas y Bioanalistas

Asesoras

Judy Natalia Jiménez Quiceno, Doctor (PhD) en Ciencias Básicas Biomédicas  
Lorena Salazar Ospina, Magíster (MSc) en Microbiología

Universidad de Antioquia  
Escuela de Microbiología  
Microbiología y Bioanálisis  
Medellín, Antioquia, Colombia  
2023

Cita	Giraldo Carmona y Pico Arias (1)
<b>Referencia</b>	(1) Giraldo Carmona V, Pico Arias LL. Aislamiento de bacteriófagos líticos específicos contra <i>Escherichia coli</i> productora de Betalactamasas de espectro extendido (BLEE) a partir de muestras de agua residual.
<b>Estilo Vancouver/ICMJE (2018)</b>	[Trabajo de grado profesional]. Medellín, Colombia. Universidad de Antioquia; 2023.

---



Grupo de Investigación Microbiología Básica y Aplicada (MICROBA).



**Repositorio Institucional:** <http://bibliotecadigital.udea.edu.co>

Universidad de Antioquia - [www.udea.edu.co](http://www.udea.edu.co)

El contenido de esta obra corresponde al derecho de expresión de los autores y no compromete el pensamiento institucional de la Universidad de Antioquia ni desata su responsabilidad frente a terceros. Los autores asumen la responsabilidad por los derechos de autor y conexos.

## **Agradecimientos**

Queremos expresar nuestro agradecimiento al grupo de investigación en Microbiología Básica y Aplicada (MICROBA) por la experiencia adquirida durante el desarrollo de este proyecto y a todas las personas que participaron en él. Apreciamos la oportunidad brindada por nuestras asesoras para ser partícipes en esta iniciativa, que no solo ha enriquecido nuestra experiencia académica, sino que también ha tenido un impacto significativo a nivel personal. Estamos agradecidas por su orientación y apoyo, fundamentales para el éxito de este proyecto. Este trabajo no solo representa un logro académico, sino también un primer paso hacia la solución de una problemática tan relevante como la resistencia bacteriana en nuestro país.

## Tabla de contenido

Resumen .....	7
Abstract .....	8
Introducción .....	9
2 Justificación .....	11
3 Objetivos.....	12
4 Metodología.....	13
5 Resultados.....	19
6 Discusión .....	26
7 Conclusiones .....	29
Referencias .....	30

## Lista de tablas

**Tabla 1** Características genotípicas de los aislados utilizados como bacterias hospederas..... ¡Error! Marcador no definido.4

**Tabla 2** Cepas evaluadas en el rango de hospedero intra-especie. ¡Error! Marcador no definido.17

**Tabla 3** Resultados del rango de hospedero intra-especie de los bacteriófagos aislados contra *E coli* BLEE..... ¡Error! Marcador no definido.2

**Tabla 4** Selección de los bacteriófagos aislados para su combinación en cocteles.....23

**Tabla 5** Resultados de la evaluación de cuatro cócteles de bacteriófagos aislados específicamente contra *E. coli* BLEE.....25

## Lista de figuras

**Figura 1.** Morfología de los bacteriófagos aislados contra *E. coli* productora de BLEE 20

## Resumen

**Objetivo:** Determinar la presencia de bacteriófagos líticos específicos contra *Escherichia coli* productora de Betalactamasas de espectro extendido (BLEE) en aguas residuales.

**Metodología:** Estudio experimental donde se utilizó *E. coli* productora de BLEE como bacteria hospedera. Los bacteriófagos fueron obtenidos a partir de efluentes de agua residual hospitalaria y plantas de tratamiento de agua residual. El aislamiento se realizó empleando el método de agar en doble capa, posteriormente los fagos fueron purificados y concentrados. Para determinar la especificidad de infección se llevó a cabo el rango de hospedero inter-género utilizando aislados de diferentes géneros bacterianos (n=26) e intra-especie, empleando aislados de *E. coli* (n=100). Adicionalmente, se evaluaron cocteles de fagos para ampliar el rango de infección.

**Resultados:** Inicialmente se obtuvieron 16 unidades formadoras de placa, después de los procesos de purificación y concentración se seleccionaron 6 bacteriófagos. Los resultados del rango de hospedero evidenciaron una especificidad de infección de género del 100%, donde los fagos aislados no presentaron actividad contra ninguna de las 26 cepas de otros géneros evaluados. La evaluación intra-especie mostró un rango de infección estrecho, siendo el fago FEC1 el más activo contra el 14% de las 100 cepas de *E. coli*. Finalmente, se evaluaron 4 cocteles de bacteriófagos, no obstante, la actividad se mantuvo contra el 14% de las cepas.

**Conclusión:** Este trabajo permitió establecer una metodología estandarizada para el aislamiento de bacteriófagos activos contra bacterias resistentes, lo que permitió la obtención de fagos específicos para *E. coli* productora de BLEE con alta preferencia por cepas del filogrupo B2, altamente patógenas. Estos bacteriófagos son candidatos con gran potencial para continuar su caracterización y futura aplicación.

**Palabras clave:** Bacteriófagos; *Escherichia coli*; Betalactamasas de espectro extendido (BLEE); Resistencia Bacteriana.

## Abstract

**Objective:** Determine the presence of specific lytic bacteriophages against extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* in wastewater.

**Methodology:** Experimental study where ESBL-producing *E. coli* was used as host bacteria. Bacteriophages were obtained from hospital wastewater effluents and wastewater treatment plants. Isolation was carried out using the double layer agar method, subsequently the phages were purified and concentrated. To determine the specificity of infection, inter-genus host range was carried out using isolates from different bacterial genera (n=26) and intra-species, using *E. coli* isolates (n=100). Additionally, phage cocktails were evaluated to expand the range of infection.

**Results:** Initially, 16 plaque-forming units (PFU) were obtained; however, after the purification and concentration processes, 6 bacteriophages were selected. The host range results showed a genus infection specificity of 100%, where the isolated phages did not present activity against any of the 26 strains of other genera evaluated. Intra-species evaluation showed a narrow infection range, with phage FEC1 being the most active against 14% of the 100 *E. coli* strains. Finally, 4 bacteriophage cocktails were evaluated; however, the activity was maintained against 14% of the strains.

**Conclusion:** This work allowed us to establish a standardized methodology for the isolation of bacteriophages active against resistant bacteria, which allowed the obtaining of specific phages for ESBL-producing *E. coli* with high preference for highly pathogenic phylogroup B2 strains. These bacteriophages are candidates with great potential to continue their characterization and future application.

**Keywords:** Bacteriophages; *Escherichia coli*; extended-spectrum beta-lactamases (ESBL); Antimicrobial resistance.

## Introducción

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) la resistencia bacteriana se ha considerado como uno de los problemas de salud pública más importantes a nivel mundial. El panorama es preocupante, pues en los últimos años se ha evidenciado un aumento de bacterias resistentes especialmente de Enterobacterias como *Escherichia coli* productora de betalactamasas de espectro extendido (BLEE). El manejo de infecciones causadas por estas bacterias resistentes se ha tornado complejo debido a la falta de desarrollo de nuevas moléculas antimicrobianas, lo que ha llevado a un incremento en el uso de antibióticos de amplio espectro como los carbapenémicos, ocasionando mayor selección de bacterias resistentes. Así mismo, estas infecciones suponen un aumento en la morbilidad, la mortalidad, ocasionan estancias hospitalarias más prolongadas y aumentan los costos de atención en salud.<sup>1,2</sup> En América latina las frecuencias de *E. coli* portadora de BLEE son altas, cercanas al 25%<sup>3</sup> y a nivel local para el año 2021, según el grupo GERMEN, los porcentajes de aislamiento de *E. coli* BLEE fueron del 24,7%, 21,1% y del 13,3% para UCI, servicios NO UCI y pacientes ambulatorios respectivamente.<sup>4</sup>

Teniendo en cuenta lo anterior, el uso de bacteriófagos (fagos) se ha vuelto a considerar como una alternativa para el control de bacterias resistentes a antibióticos en diferentes entornos. Estos virus se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza y presentan diversas ventajas para el tratamiento de infecciones, en comparación con otras moléculas antimicrobianas. Los bacteriófagos son altamente específicos por lo que se ha descrito que no afectan la microbiota acompañante, ni las células eucariotas durante el tratamiento; además, se replican de forma exponencial y de forma autolimitada utilizando el metabolismo bacteriano. No obstante, a pesar de sus grandes ventajas, en algunos casos se ha reportado la aparición de bacterias resistentes a los bacteriófagos, sobre todo cuando se usan en monoterapia; por lo que se recomienda su uso en cocteles o combinaciones (antibióticos, probióticos etc.).<sup>5</sup>

En la actualidad, varias investigaciones han demostrado el potencial uso de los colifagos (fagos para *E. coli*) principalmente para el control de *E. coli* en animales y humanos.<sup>6,7</sup> Sin embargo, la mayoría de investigaciones se han enfocado en la

caracterización e implementación de estos virus contra *E. coli* de serotipos específicos de importancia como el O157:H7<sup>8-10</sup>, mientras que los estudios relacionados con la búsqueda y caracterización de bacteriófagos activos contra *E. coli* resistente a los Betalactámicos y su potencial uso terapéutico son escasos.<sup>11,12</sup> Recientemente, Pouillot *et al* en el 2012, demostraron el uso de fagos en combinación con probióticos para el tratamiento de infecciones por esta bacteria en modelos murinos con meningitis neonatal.<sup>13</sup> También, Gundogdu *et al* en el 2016 mostraron la efectividad *in vitro* de cocteles de bacteriófagos sobre diversas cepas de *E. coli* productoras de BLEE, lo cual amplía su espectro de actividad y facilita su uso en diversas infecciones.<sup>14</sup> Así mismo, Porter *et al* en el 2022 describieron la descolonización de *E. coli* BLEE del tracto gastrointestinal empleando estos virus.<sup>15</sup>

En Colombia, los estudios de bacteriófagos dirigidos a este modelo bacteriano son aún más escasos; la Universidad de los Andes ha adelantado trabajos sobre bacteriófagos específicos contra *E. coli* uropatógena MDR.<sup>16</sup> Sin embargo, la mayoría de los estudios en el país están dirigidos en proveer soluciones en el entorno agrícola y en el cuidado de animales de granja.<sup>17-19</sup>

## 2 Justificación

En este contexto, resulta de gran importancia desarrollar nuevos estudios que se enfoquen en el aislamiento y la caracterización de bacteriófagos activos contra *E. coli* productora de BLEE; lo cual, constituye el primer paso para su uso en aplicaciones futuras como el control de infecciones en el área clínica o ambiental y abre un campo de investigación poco explorado en el país. Los procesos de caracterización de bacteriófagos son amplios e incluyen diversos parámetros; sin embargo, para determinar si los bacteriófagos son promisorios en futuras aplicaciones es indispensable evaluar el grado de infectividad, empleando el rango de hospedero y confirmar que los bacteriófagos sean virulentos; es decir, que posean exclusivamente un ciclo de infección lítico. En este sentido el objetivo principal de este trabajo se enfoca en determinar la presencia de bacteriófagos líticos específicos contra *Escherichia coli* productora de BLEE en aguas residuales.

### 3 Objetivos

#### 3.1 Objetivo general

Determinar la presencia de bacteriófagos líticos específicos contra *Escherichia coli* productora de Betalactamasas de espectro extendido en aguas residuales.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Evaluar efluentes de aguas residuales hospitalarias y de la comunidad para la detección de bacteriófagos líticos contra *E. coli* productora de Betalactamasas de espectro extendido (BLEE).
- Determinar la especificidad de infección de los bacteriófagos aislados contra diferentes géneros y especies bacterianas (especificidad inter-género).
- Determinar la especificidad de infección de los bacteriófagos aislados contra *E. coli* sensibles y resistentes portadoras de Betalactamasas de espectro extendido (BLEE) (especificidad intra-especie).
- Determinar la especificidad de infección intra-especie empleando cocteles de bacteriófagos.

## 4 Metodología

### Recolección de muestras

La búsqueda de bacteriófagos se realizó a partir de muestras de agua residual provenientes de efluentes de un hospital de alta complejidad y de una planta de tratamiento de agua residual municipal (PTAR) de la ciudad de Medellín. Se recolectaron 500 mL de cada muestra en frascos Schott estériles por duplicado. Las muestras se transportaron en refrigeración (2° a 8°C) y se procesaron dentro de las primeras 2 a 24h.<sup>20</sup>

### Selección de bacterias hospederas

Para la búsqueda de bacteriófagos se utilizaron como bacterias hospederas un total de 14 aislados de *E. coli* productora de BLEE, pertenecientes a diferentes clones de importancia clínica. Los aislados utilizados hacen parte de la colección de cepas del grupo de investigación en Microbiología básica y aplicada (MICROBA) e incluían aislados provenientes de individuos hospitalizados o de la comunidad; así mismo, de aguas residuales de plantas de tratamiento de agua residual (PTAR). De los 14 aislados; 8 portaban el gen *bla*- CTX-M-G1, 4 el *bla*- CTX-M-G9 y 2 presentaban coproducción de los genes *bla*-TEM + *bla*- CTX-M-G1. Adicionalmente, pertenecían a diferentes clones: ST2, ST131, ST101, ST394, ST638, ST893, ST4977 y a diversos filogrupos (A, B1, B2, D, E, F) (**Tabla 1**).

**Tabla 1.** Características genotípicas de los aislados utilizados como bacterias hospederas.

Bacteria hospedera	Tipo de BLEE	Tipificación molecular	Número de cepas	Filogrupos	Origen de los aislados
<i>Escherichia coli</i>	<i>bla</i> -CTX-M-G1	ST131	3	F (n=1) B2 (n=2)	Clínico
		Otros ST	5	E (n=2) D (n=1) B1 (n=1) Desconocido (n=1)	Comunidad y PTAR
	<i>bla</i> -CTX-M-G9	ST131	4	B2 (n=3) E (n=1)	Clínico
	<i>TEM</i> y <i>bla</i> -CTX-M-G1	ST2	2	A (n=1) Desconocido (n=1)	PTAR
Total			14		

BLEE: Betalactamasas de espectro extendido.

Filogrupos A, B1, C y E: cepas comensales.

Filogrupos B2, F y D: cepas potencialmente patógenas, asociadas a posibles infecciones extraintestinales.

Otros ST diferentes al ST131: (ST638, ST893, ST4977, ST394, ST101).

PTAR: plantas de tratamiento de agua residual municipal.

## Aislamiento de bacteriófagos

**Procesamiento de las muestras:** Las muestras de agua residual fueron tratadas con cloroformo en una proporción 1:10 según una modificación del protocolo de Clokie y colaboradores<sup>21</sup>, posteriormente la fase acuosa fue centrifugada (4500 rpm por 10 minutos a 4°C) y filtrada utilizando un filtro de 0.22µm (Minisart® Syringe Filter).

**Enriquecimiento de las muestras:** Con el objetivo de incrementar la cantidad de bacteriófagos presentes en la muestra, 5 mL de cada muestra procesada se adicionaron a 45 mL de caldo LB (CaCl<sub>2</sub>, 2 mM) y se añadieron 200µL de las bacterias hospederas en fase exponencial ajustada a una concentración de 0.1 a 600 nm. Se realizó un

enriquecimiento múltiple, el cual consiste en emplear como máximo 4 bacterias hospederas de la misma especie en un mismo enriquecimiento. El cultivo se incubó a  $35\pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas en agitación. Transcurrido el tiempo las muestras fueron centrifugadas (4500 rpm por 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ ) y filtradas utilizando un filtro de  $0.22\mu\text{m}$  (Minisart® Syringe Filter).<sup>22</sup>

**Detección de la presencia de bacteriófagos:** Las muestras enriquecidas se tamizaron de forma cualitativa para evaluar la presencia de bacteriófagos mediante la prueba de la gota. Cada bacteria hospedera utilizada en el enriquecimiento se evaluó por separado. A partir de un cultivo en fase exponencial de la bacteria hospedera ajustado a 0.1 (600 nm), se tomó 1 mL y se puso en contacto con un medio semisólido ([0.7% agar] [CaCl<sub>2</sub>, 2 mM]), se mezcló y se vertió en un medio sólido LB (Agar LB [1.5% agar] [CaCl<sub>2</sub>, 2mM]). Posteriormente, se depositaron 5  $\mu\text{L}$  de la muestra enriquecida en la capa superior después de que estuviera sólida, se dejó secar y se incubó a  $35\pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas. Transcurrido el tiempo de incubación se revisó la presencia de zonas de lisis; las cuales indican la presencia de bacteriófagos en la muestra.<sup>23</sup>

Con el fin de obtener unidades formadoras de placa (UFP) aisladas, se realizó el método de agar en doble capa para las muestras positivas por la prueba de la gota. Las muestras fueron diluidas de forma seriada (1:10) y 100  $\mu\text{L}$  de cada dilución se puso en contacto con 500  $\mu\text{L}$  de la bacteria hospedera en fase exponencial ajustada a 0.1 (600 nm). Posteriormente, esta mezcla se depositó en el medio semisólido ([0.7% agar] [CaCl<sub>2</sub>, 2 mM]), se mezcló y se sirvió sobre un medio sólido LB (Agar LB [1.5% agar] [CaCl<sub>2</sub>, 2mM]). Los medios de cultivo se incubaron a  $35\pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 18-24 horas. Las UFP obtenidas se seleccionaron de acuerdo con sus características (mayor tamaño y translucidez) y fueron almacenadas en Buffer SM a  $4^{\circ}\text{C}$  hasta su purificación.<sup>24</sup>

**Purificación de bacteriófagos:** Con el objetivo de obtener un bacteriófago puro, cada UFP fue purificada mediante aislamiento 3 veces, utilizando el método de agar en doble capa. Brevemente, cada UFP obtenida fue suspendida en Buffer SM, se realizaron diluciones seriadas 1:10 de esa suspensión y se sembraron en agar en doble capa como se indicó previamente. Después de 24 horas de incubación se tomó una UFP aislada y

se almacenó en buffer SM. Este procedimiento se repitió dos veces más hasta completar 3 aislamientos.<sup>24,25</sup>

**Concentración de bacteriófagos:** Para preparar un Stock de bacteriófagos se realizó una concentración empleando el método de agar en doble capa. Cada UFP obtenida después del proceso de purificación se suspendió en Buffer SM, se realizaron diluciones seriadas 1:10 y se sembraron en agar en doble capa 10 réplicas de la dilución que presentaba una lisis casi completa. Transcurrido el tiempo de incubación se recolectó todo el medio semisólido de los cultivos en un tubo falcón con Buffer SM. Finalmente, las muestras fueron mezcladas, centrifugadas (4500 rpm por 10 minutos a 4°C) y filtradas (Filtro de 0.22µm (Minisart® Syringe Filter)).<sup>24,26</sup>

**Cuantificación y almacenamiento de los bacteriófagos:** Los stocks de bacteriófagos fueron cuantificados utilizando el método de agar en doble capa descrito previamente. Este procedimiento se realizó para conocer la cantidad de bacteriófagos presentes en el stock y para identificar posibles bacteriófagos temperados cuyas cuantificaciones fueran inconsistentes. La cuantificación se realizó dos veces en días independientes y cada dilución se sembró por duplicado. Finalmente, los bacteriófagos se almacenaron a 4°C en Buffer SM, en caldo LB y a -80°C (Glicerol 50%).<sup>24,26</sup>

## Caracterización de bacteriófagos

**Evaluación del rango de hospedero:** Para determinar la especificidad de infección de los bacteriófagos y su grado de infectividad en diferentes cepas bacterianas se realizó el rango de hospedero. Para su evaluación se utilizó la prueba de la gota, como se describió previamente.<sup>27</sup> La evaluación se realizó por triplicado. Para la evaluación inter-género se seleccionaron 26 cepas bacterianas de diferentes géneros como: *Enterobacter cloacae* (n=3), *Pseudomonas aeruginosa* (n=3), *Acinetobacter baumannii* (n=3), *Aeromonas* spp (n=2), *Serratia* spp (n=4), *Klebsiella oxytoca* (n=3), *Ralstonia paucula* (n=2), *Citrobacter freundii* (n=3) y *Staphylococcus aureus* (n=3). Además, para la evaluación intra-especie se seleccionaron 100 aislados de la misma especie

incluyendo bacterias sensibles y resistentes a Betalactámicos (productoras de BLEE) pertenecientes a clones de importancia y con características moleculares específicas. Los aislados utilizados hacen parte de la colección de cepas del grupo de investigación en Microbiología básica y aplicada (MICROBA). Las características de las cepas evaluadas se muestran en la **Tabla 2**.

**Tabla 2.** Cepas evaluadas en el rango de hospedero intra-especie.

	Cepas evaluadas	Características	Filogrupo	Tipo de BLEE	Número de cepas	Total de cepas evaluadas
Intra-especie	<i>Escherichia coli</i>	Resistentes portadoras de BLEE	A	<i>bla</i> -CTX-M Grupo 1	9	18
				<i>bla</i> -CTX-M Grupo 2	1	
				<i>bla</i> -CTX-M Grupo 9	3	
				<i>bla</i> -CTX-M Grupo 8/25	2	
				BLEE no tipificada	3	
			B1	<i>bla</i> -CTX-M Grupo 1	11	23
				<i>bla</i> -CTX-M Grupo 2	3	
				<i>bla</i> -CTX-M Grupo 9	3	
				<i>bla</i> -CTX-M Grupo 8/25	1	
			B2	BLEE no tipificada	5	20
				<i>bla</i> -CTX-M Grupo 1	3	
				<i>bla</i> -CTX-M Grupo 9	16	
			Otros (D y E)	BLEE no tipificada	1	20
				<i>bla</i> -CTX-M Grupo 1	16	
	<i>bla</i> -CTX-M Grupo 1 y 9	1				
	<i>bla</i> -CTX-M Grupo 9	3				
	<i>Escherichia coli</i>	Sensibles	Desconocido	NA	19	
Total					100	

BLEE: Betalactamasas de espectro extendido.

Desconocido: mecanismo de resistencia, aislados sensibles a Betalactámicos

Filogramos A, B1, C y E: cepas comensales.

Filogramos B2, F y D: cepas potencialmente patógenas, asociadas a posibles infecciones extraintestinales.

**Evaluación de cocteles de bacteriófagos en el rango de hospedero:** Para evaluar la actividad de los bacteriófagos en combinación, se prepararon cocteles utilizando 2 y 3 bacteriófagos a una concentración final de  $3 \times 10^7$  UFP/mL cada uno. La

selección de los bacteriófagos para la preparación de los cocteles se realizó teniendo en cuenta los porcentajes de actividad de cada bacteriófago evaluado en el rango de hospedero intra-especie. La evaluación del rango de hospedero de los cocteles se realizó utilizando la prueba de la gota.<sup>27</sup>

## 5 Resultados

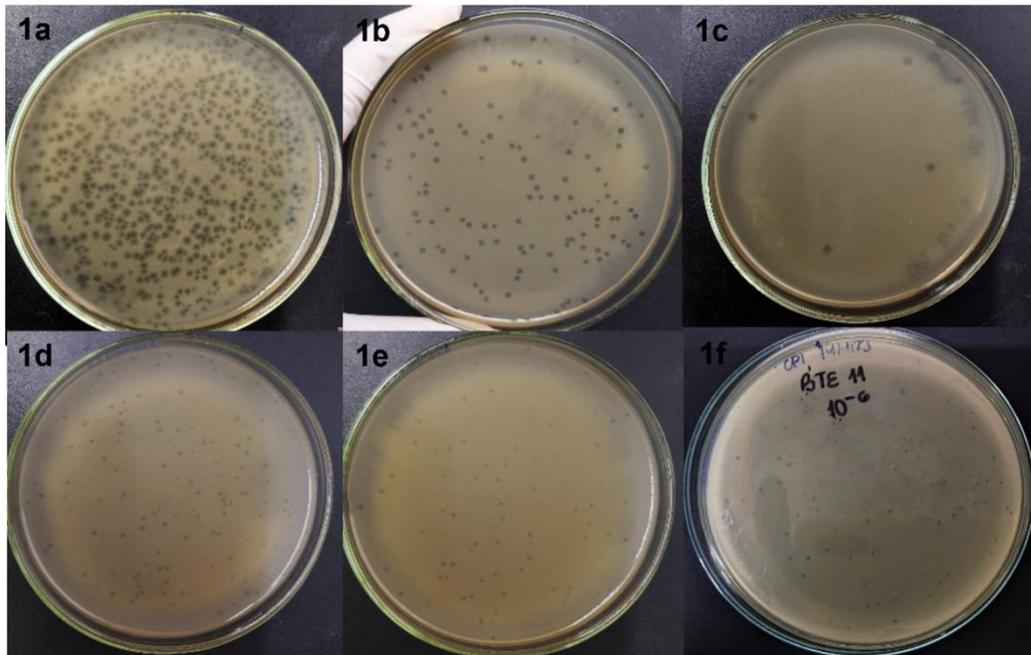
### Aislamiento de bacteriófagos

En total se recolectaron 8 muestras de agua residual; 4 de efluentes de agua residual hospitalaria y 4 provenientes de una planta de tratamiento de agua residual municipal (PTAR) [(Afluente (n=1), Efluente (n=3)]. De las 8 muestras recolectadas, 4 fueron positivas para la presencia de bacteriófagos mediante la tamización cualitativa por la prueba de la gota y todas provenían de la PTAR.

De estas muestras positivas se aislaron en total 16 unidades formadoras de placa (UFP) y después de los procesos de purificación, concentración y cuantificación se obtuvieron 6 bacteriófagos. Dos bacteriófagos fueron obtenidos empleando como bacteria hospedera *E. coli* del ST131 portadoras de *bla*-CTXM-G1 y *bla*-CTXM-G9, dos del ST2 con BLEE tipo *bla*-CTXM-G1 y dos a partir de *E. coli* pertenecientes a los ST638 y ST394, productoras de la *bla*-CTXM-G1.

### Características fenotípicas

La morfología de los bacteriófagos aislados se muestra en la **Figura 1**. En general, los bacteriófagos presentaron unidades formadoras de placa entre 1 y 3 mm de diámetro (1mm: FEC6; 2mm: FEC1, FEC2, FEC4 y FEC 5; 3mm: FEC3); además, presentaron placas traslúcidas y con borde definido. De forma particular, el bacteriófago FEC1 presentó UFPs con doble halo.

**Figura 1.** Morfología de los bacteriófagos aislados contra *E. coli* productora de BLEE

- 1a: FEC1 (Cuantificación  $5 \times 10^9$  UFP/ml)  
 1b: FEC2 (Cuantificación  $7,05 \times 10^{12}$  UFP/ml)  
 1c: FEC3 (Cuantificación  $1,6 \times 10^{11}$  UFP/ml)  
 1d: FEC4 (Cuantificación  $7,6 \times 10^8$  UFP/ml)  
 1e: FEC5 (Cuantificación  $2,2 \times 10^9$  UFP/ml)  
 1f: FEC6 (Cuantificación  $7,2 \times 10^{10}$  UFP/ml)

### Evaluación del rango de hospedero

Los resultados del rango de hospedero inter-género mostraron que ninguno de los 26 aislados diferentes a *E. coli*, pertenecientes a diversos géneros y especies bacterianas fueron susceptibles a la acción de los 6 bacteriófagos; lo cual muestra una alta especificidad de infección de género y especie.

Por su parte, los resultados del rango de hospedero intra-especie muestran que todos los bacteriófagos evaluados tuvieron un rango de hospedero estrecho, siendo el bacteriófago FEC1 el que presentó la mayor actividad lítica con un 14% (n=14), seguido del fago FEC2 con 8% (n=8), fagos FEC3 y FEC4 con un 3% (n=3) y fagos FEC5 y FEC6 con un 1% (n=1).

De forma interesante se observa que los fagos tuvieron una mayor acción contra aislados pertenecientes al filogrupo B2, portadores de *bla*-CTX-M-G1 y *bla*-CTX-M-G9

y algunas pertenecientes al grupo clonal ST131. Para este filogrupo, el fago FEC2 presentó mayor actividad lítica (8 cepas), seguido por el FEC1 (6 cepas), FEC3 (2 cepas) y los fagos FEC4 Y FEC5 (una cepa).

Además de la actividad lítica contra el filogrupo B2, el fago FEC1, presentó actividad en los filogrupos B1, D y E; y los fagos FEC3 y FEC4 en cepas de los filogrupos D y E. Los fagos FEC2 y FEC6 solo presentaron actividad frente a cepas pertenecientes al filogrupo B2 y A respectivamente. Ningún fago presentó actividad en cepas de *E. coli* sensibles. Estos resultados se detallan en la **Tabla 3**.

**Tabla 3.** Resultados del rango de hospedero intra-especie de los bacteriófagos aislados contra *E coli* BLEE.

CARACTERÍSTICAS GENOTÍPICAS DE LAS CEPAS EVALUADAS						BACTERIÓFAGOS AISLADOS					
	Filogrupo	Tipo de BLEE	n	Tipificación n molecular	Origen del aislado	FEC 1	FEC 2	FEC 3	FEC 4	FEC 5	FEC 6
<b>E. COLI RESISTENTES</b>	A	<i>bla</i> -CTX-M Grupo 1	18	SD (n=18)	Colonización pacientes hemodiálisis (n=17) Colonización comunidad (n=1)	0	0	0	0	0	1
		<i>bla</i> -CTX-M Grupo 2									
		<i>bla</i> -CTX-M Grupo 9									
		<i>bla</i> -CTX-M Grupo 8/25									
	B1	<i>bla</i> -CTX-M Grupo 1	23	SD (n=22) ST1304 (n=1)	Colonización pacientes hemodiálisis (n=18) Colonización comunidad (n=5)	2	0	0	0	0	0
		<i>bla</i> -CTX-M Grupo 2									
		<i>bla</i> -CTX-M Grupo 9									
		<i>bla</i> -CTX-M Grupo 8/25									
	B2	<i>bla</i> -CTX-M Grupo 1	20	SD (n=15) ST131 (n=5)	Colonización pacientes hemodiálisis (n=20)	6	8	2	1	1	0
		<i>bla</i> -CTX-M Grupo 2									
D y E	<i>bla</i> -CTX-M Grupo 1	20	SD (n=17) ST1294 (n=1) ST2531 (n=1) ST131 (n=1)	Colonización pacientes hemodiálisis (n=20)	4	0	1	2	0	0	
	<i>bla</i> -CTX-M Grupo 1 y 9										
	<i>bla</i> -CTX-M Grupo 9										
<b>E. COLI SENSIBLES</b>	A, C, E, D, F y B1	NA	19	SD (n=19)	Colonización pacientes hemodiálisis (n=19)	0	0	0	0	0	0
Total			100			14 (14%)	8 (8%)	3 (3%)	3 (3%)	1 (1%)	1 (1%)

BLEE: Betalactamasas de espectro extendido.

Características de las bacterias hospederas

FEC1: *E. coli bla-CTX-M-G1, ST394*

FEC2: *E. coli bla-CTX-M-G9, ST131*

FEC3: *E. coli bla-CTX-M-G1, ST131*

FEC4: *E. coli bla-CTX-M-G1, ST2*

FEC5: *E. coli bla-CTX-M-G1, ST638*

FEC6: *E. coli bla-CTX-M-G1, ST2*

NA: No aplica.

n: Número.

SD: aislado sin tipificación por MLST.

### Evaluación de cocteles

Con el fin de incrementar el rango de hospedero intra-especie en los bacteriófagos aislados, se realizaron 4 cocteles teniendo en cuenta el rango de hospedero individual y la bacteria hospedera de cada fago (**Tabla 4**).

**Tabla 4.** Selección de los bacteriófagos aislados para su combinación en cocteles

SELECCIÓN DE BACTERIÓFAGOS							
BACTERIÓFAGOS AISLADOS		BLEE expresada por las bacterias hospederas	Actividad en el rango de hospedero	COMBINACIÓN PARA COCTELES		Fagos seleccionados	BLEE expresadas por las bacterias hospederas en combinación
	FEC1	<i>E. coli bla-CTX-M-G1, ST394</i>	14%		Coctel 1	FEC 1 + FEC2 + FEC3	<i>E. coli bla- CTX-M-1, ST394 + E. coli bla CTX-M-9, ST131 + E. coli bla CTX-M-1, ST131</i>
	FEC2	<i>E. coli bla-CTX-M-G9, ST131</i>	8%		Coctel 2	FEC1 + FEC2 + FEC6	<i>E. coli bla- CTX-M-1, ST394 + E. coli bla CTX-M-9, ST131 + E. coli bla- CTX-M-1, ST2</i>
	FEC3	<i>E. coli bla-CTX-M-G1, ST131</i>	3%		Coctel 3	FEC1 + FEC2	<i>E. coli bla- CTX-M-1, ST394 + E. coli bla CTX-M-9, ST131</i>
	FEC4	<i>E. coli bla-CTX-M-G1, ST2</i>	3%		Coctel 4	FEC4 + FEC5 + FEC6	<i>E. coli bla-CTX-M-1, ST2 + E. coli bla-CTX-M-1, ST638 + E. coli bla-CTX-M-1, ST2.</i>
	FEC5	<i>E. coli bla-CTX-M-G1, ST638</i>	1%				
	FEC6	<i>E. coli bla-CTX-M-G1, ST2</i>	1%				

BLEE: Betalactamasas de espectro extendido.

En general, los resultados de la evaluación de los cocteles no mostraron un incremento en el rango de hospedero. El mayor porcentaje de actividad lo presentó el coctel 1 el cual se mantuvo en un 14% (n=14), seguido del coctel 3 con un 12% (n=12), coctel 2 con un 11% (n=11) y el coctel 4 con un 1% (n=1).

Adicionalmente, los cocteles también tuvieron una mayor acción frente aislados pertenecientes al filogrupo B2. El coctel 1 fue el que presentó mayor actividad lítica en 13 cepas evaluadas, seguido del coctel 3 con 11 cepas, coctel 2 con 10 cepas y el coctel 4 con una cepa, cabe destacar que fue el único filogrupo donde los cuatro cocteles tuvieron acción. Los cocteles 1, 2 y 3 tuvieron actividad frente a una cepa de los filogrupos D y E. No hubo ninguna actividad de los cuatro cocteles frente a cepas de los filogrupos A y B1 ni tampoco frente a las *E. coli* sensibles (**Tabla 5**).

**Tabla 5.** Resultados de la evaluación de cuatro cócteles de bacteriófagos aislados específicamente contra *E. coli* BLEE.

CARACTERÍSTICAS GENOTÍPICAS DE LAS CEPAS EVALUADAS						COCTELES DE BACTERIÓFAGOS			
	Filogrupo	Tipo de BLEE	n	Tipificación molecular	Origen del aislado	COCTEL 1	COCTEL 2	COCTEL 3	COCTEL 4
<b>E. COLI RESISTENTES</b>	A	<i>bla</i> -CTX-M Grupo 1	18	SD (n=18)	Colonización pacientes hemodiálisis (n=17)	0	0	0	0
		<i>bla</i> -CTX-M Grupo 2							
		<i>bla</i> -CTX-M Grupo 9							
		<i>bla</i> -CTX-M Grupo 8/25							
	B1	<i>bla</i> -CTX-M Grupo 1	23	SD (n=22) ST1304 (n=1)	Colonización pacientes hemodiálisis (n=18) Colonización comunidad (n=5)	0	0	0	0
		<i>bla</i> -CTX-M Grupo 2							
		<i>bla</i> -CTX-M Grupo 9							
		<i>bla</i> -CTX-M Grupo 8/25							
	B2	<i>bla</i> -CTX-M Grupo 1	20	SD (n=15) ST131 (n=5)	Colonización pacientes hemodiálisis (n=20)	13	10	11	1
		<i>bla</i> -CTX-M Grupo 2							
D y E	<i>bla</i> -CTX-M Grupo 1	20	SD (n=17) ST1294 (n=1) ST2531 (n=1)	Colonización pacientes hemodiálisis (n=20)	1	1	1	0	
	<i>bla</i> -CTX-M Grupo 1 y 9								
	<i>bla</i> -CTX-M Grupo 9								
<b>E. COLI SENSIBLES</b>	A, C, E, D, F y B1	NA	19	SD (n=19)	Colonización pacientes hemodiálisis (n=19)	0	0	0	0
Total			100			14 (14%)	11 (11%)	12 (12%)	1 (1%)

BLEE: Betalactamasas de espectro extendido.

NA: No aplica.

n: Número.

SD: aislado sin tipificación por MLST

## 6 Discusión

Este estudio permitió establecer una metodología estandarizada para el aislamiento de bacteriófagos puros activos contra *E. coli* productora de BLEE a partir de muestras de agua residual. Estos resultados son el punto de partida en el proceso de caracterización biológica y estructural de bacteriófagos, requisito para la utilización de fagos en cualquier escenario de aplicación clínica, industrial o ambiental. En Colombia las investigaciones con fagos son escasas y en el contexto de bacterias resistentes aún más, por lo tanto este trabajo representa un avance significativo y una solución prometedora para combatir las infecciones por bacterias resistentes. Además, da paso a nuevas estrategias de control que pueden beneficiar la salud pública del país.

Dentro del proceso de aislamiento y caracterización de los bacteriófagos, es de gran importancia evaluar el rango de hospedero, dado que permite conocer la capacidad de los fagos para infectar aislados bacterianos. Algunos fagos tienen un rango de hospedero estrecho, por lo que solo pueden infectar ciertas especies bacterianas o un número reducido de aislados; mientras que otros fagos tienen un rango de hospedero amplio y pueden infectar a una gran variedad de bacterias<sup>28</sup>; no obstante, no existe un criterio claro para considerar si el rango de hospedero es amplio o estrecho y depende sobre todo del objetivo del investigador.

En este estudio, la evaluación del rango de hospedero inter-género de los bacteriófagos, mostró una alta especificidad de género del 100% considerando que los bacteriófagos no fueron activos contra géneros diferentes a *Escherichia* sp. Esto implica ciertas ventajas, puesto que los bacteriófagos aislados no alteran otros géneros bacterianos y pueden utilizarse de forma dirigida en diferentes escenarios donde hay microbiota acompañante; como es el caso de la microbiota intestinal en animales y humanos. Además, puede considerarse su uso en el medio ambiente para el biocontrol de patógenos, donde hay un gran número de comunidades microbianas.<sup>5</sup>

Por su parte la evaluación intra-especie frente aislados de *E. coli* mostró un rango de hospedero estrecho. Estos resultados pueden deberse a que *E. coli* presenta gran diversidad genética y está ampliamente distribuida en diversos escenarios: hospitalario,

comunitario y ambiental; lo cual muestra una gran capacidad de adaptación.<sup>29</sup> La alta diversidad genética en *E. coli* impacta directamente en la expresión de estructuras de superficie de este microorganismo (proteínas, lípidos, azúcares etc.), las cuales actúan como receptores claves en la adsorción de los bacteriófagos, definen su especificidad y rango de hospedero.<sup>30</sup> En el caso de *E. coli*, las proteínas de adhesión de la superficie aumentan la probabilidad de adsorción de los fagos; por lo tanto, los cambios en la estructura o expresión de estas proteínas ocasionan variaciones en la susceptibilidad a la infección por determinados bacteriófagos.<sup>31</sup> En este sentido, la alta especificidad que presentan estos fagos hacia *E. coli* puede deberse a la presencia de receptores de superficie específicos necesarios para la unión y entrada de los bacteriófagos, los cuales pueden estar presentes en las cepas de *E. coli* evaluadas, mientras que en las cepas de otros géneros y especies no.

Otro punto importante en la especificidad del rango de hospedero, es que debe cursar con una infección productiva, sin embargo, hay ocasiones en donde los bacteriófagos pueden reconocer los receptores bacterianos, pero no hay una infección productiva debido a sistemas de defensa que tienen las bacterias, los cuales evitan la entrada del material genético o la replicación viral; por lo que afecta la capacidad de los fagos para completar su ciclo de infección y producir partículas virales.<sup>32</sup> Hay estudios que sugieren que para que un fago pueda infectar múltiples géneros bacterianos debe cambiar múltiples hospederos y evadir mecanismos de resistencia bacterianos como los sistemas de modificación/restricción, sistemas de defensa CRISPR-Cas y cambios en los receptores de superficie.<sup>33</sup> También se ha descrito que la distancia filogenética de las bacterias hospederas, afecta la acción de los fagos, pues estos tienden a ser más específicos contra bacterias que están genéticamente más cercanas a sus bacterias hospederas.<sup>28</sup>

Otro hallazgo importante de este estudio es que los fagos más exitosos presentan una mayor especificidad por cepas de *E. coli* pertenecientes al filogrupo B2. Este filogrupo corresponde a aislados potencialmente patógenos de *E. coli* y se caracteriza por presentar factores de virulencia como sideróforos, adhesinas y exotoxinas, los cuales tienen un papel clave en su patogenicidad.<sup>34</sup> Hay estudios que demuestran una mayor

prevalencia de este filogrupo en climas tropicales<sup>35</sup>, además de una mayor presencia de éste en aguas residuales debido a la capacidad que tienen para sobrevivir en estas fuentes de agua en comparación con los otros filogrupos.<sup>36</sup> La importancia de estos hallazgos, radica en que a pesar de tener un rango de hospedero estrecho donde las aplicaciones prácticas se pueden ver reducidas, los bacteriófagos poseen una alta especificidad por *E. coli* productora de BLEE perteneciente al filogrupo B2; las cuales, son altamente patógenas. Además, los bacteriófagos que presentan un rango de hospedero estrecho e infectan un número limitado de aislados, ejercen una menor presión de selección en las bacterias en comparación a los bacteriófagos con un rango de hospedero amplio.<sup>37</sup> Es por esto, que estos bacteriófagos tienen un gran valor en futuras estrategias de aplicación, pues estos podrían emplearse en determinados escenarios, identificándose previamente la bacteria responsable de la infección, o utilizándose en combinación con otros fagos, antibióticos, desinfectantes o probióticos, según sea la aplicación.<sup>5</sup>

Si bien se han descrito formas de ampliar el rango de hospedero de un fago, ya sea, utilizando un mayor número de bacterias hospederas durante el aislamiento o mediante la combinación de diferentes fagos (cocteles), en el presente estudio se emplearon ambas estrategias y se obtuvo un rango de hospedero limitado. Los cocteles consisten en combinaciones de bacteriófagos con diferentes rangos de hospederos; que en conjunto infectan una amplia variedad de cepas bacterianas y, al mismo tiempo, reduzcan la posibilidad de que éstas desarrollen resistencia a los fagos.<sup>38</sup> Sin embargo, en algunos casos los fagos presentes en estos cócteles no tienen la sinergia suficiente. En este estudio, la diversidad genética de las cepas bacterianas utilizadas podría haber contribuido a la falta de sinergia, ya que algunas cepas pueden ser naturalmente resistentes o menos susceptibles a los fagos utilizados.

## 7 Conclusiones

Los resultados de este trabajo evidencian el aislamiento de bacteriófagos activos contra una bacteria de importancia clínica, y a pesar de contar con un rango de hospedero estrecho, tienen la capacidad de dirigirse específicamente a las cepas de *E. coli* productoras de BLEE, principalmente pertenecientes al filogrupo B2. En este sentido, los fagos FEC1 y FEC2, podrían tener una aplicación relevante en el contexto de *E. coli* patógena resistente a betalactámicos, ya que podrían ser candidatos prometedores en diferentes estrategias de control frente a estas bacterias.

## Referencias

1. Organización Mundial de la Salud. Plan de acción mundial sobre la resistencia a los antimicrobianos [Internet]. 2016. 30 p. Disponible en: <https://bit.ly/47wMUAK>
2. da Silva GJ, Mendonça N. Association between antimicrobial resistance and virulence in *Escherichia coli*. *Virulence* [Internet]. 2012 Ene 27;3(1):18–28. doi: 10.4161/viru.3.1.18382
3. Castanheira M, Simner PJ, Bradford PA. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: An update on their characteristics, epidemiology and detection. *JAC-Antimicrobial Resist*. 2021;3(3). doi: 10.1093/jacamr/dlab092
4. grupogermen.org [Internet]. Perfiles de sensibilidad a antibióticos de *Escherichia coli* 2019-2022. [Consultado 26 Jun 2023]. Disponible en: <https://www.grupogermen.org/pdf/escherichia-coli.pdf>
5. Jiménez JN, Gallego MA. Bacteriófagos más allá de la fagoterapia. *Hechos Microbiológicos*. 2022 Aug 16;13(1):20–36. doi: 10.17533/udea.hm.v13n1a03
6. Eid S, Tolba HMN, Hamed RI, Al-Atfeehy NM. Bacteriophage therapy as an alternative biocontrol against emerging multidrug resistant *E. coli* in broilers. *Saudi J Biol Sci* [Internet]. 2022;29(5):3380–9. doi: 10.1016/j.sjbs.2022.02.015.
7. Cepko LCS, Garling EE, Dinsdale MJ, Scott WP, Bandy L, Nice T, et al. Myoviridae phage PDX kills enteroaggregative *Escherichia coli* without human microbiome dysbiosis. *J Med Microbiol* [Internet]. 2020 Feb 1;69(2):309–23. doi: 10.1099/jmm.0.001162.
8. Necel A, Bloch S, Nejman-Faleńczyk B, Grabski M, Topka G, Dydecka A, et al. Characterization of a bacteriophage,  $\nu$ B\_Eco4M-7, that effectively infects many *Escherichia coli* O157 strains. *Sci Rep* [Internet]. 2020 Feb 28;10(1):3743. doi: 10.1038/s41598-020-60568-4.
9. Viazis S, Akhtar M, Feirtag J, Diez F. Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 viability on leafy green vegetables by treatment with a bacteriophage mixture and trans-cinnamaldehyde. *Food Microbiol* [Internet]. 2011 Feb;28(1):149–7. doi: 10.1016/j.fm.2010.09.009
10. Lee C, Choi IY, Park DH, Park MK. Isolation and characterization of a novel *Escherichia coli* O157:H7-specific phage as a biocontrol agent. *J Environ Heal Sci Eng* [Internet]. 2020 Feb 6;18(1):189. doi: 10.1007/s40201-020-00452-5
11. Skaradzińska A, Śliwka P, Kuźmińska-Bajor M, Skaradziński G, Rzasa A, Friese A, et al. The efficacy of isolated bacteriophages from pig farms against ESBL/AmpC-

- producing *Escherichia coli* from pig and Turkey farms. *Front Microbiol* [Internet]. 2017 Mar 29;8(530). doi: 10.3389/fmicb.2017.00530
12. Śliwka P, Weber-Dąbrowska B, Żaczek M, Kuźmińska-Bajor M, Dusza I, Skaradzińska A. Characterization and Comparative Genomic Analysis of Three Virulent *E. coli* Bacteriophages with the Potential to Reduce Antibiotic-Resistant Bacteria in the Environment. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2023 Mar 1;24(6):5696. doi: 10.3390/ijms24065696
  13. Pouillot F, Chomton M, Blois H, Courroux C, Noelig J, Bidet P, et al. Efficacy of bacteriophage therapy in experimental sepsis and meningitis caused by a clone O25b: H4-ST131 *Escherichia coli* strain producing CTX-M-15. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2012 Jul;56(7):3568–75. doi: 10.1128/AAC.06330-11
  14. Gundogdu A, Bolkvadze D, Kilic H. In vitro Effectiveness of Commercial Bacteriophage Cocktails on Diverse Extended-Spectrum Beta-Lactamase Producing *Escherichia coli* Strains. *Front Microbiol* [Internet]. 2016 Nov 3;7(1761): 1–8. doi: 10.3389/fmicb.2016.01761.
  15. Porter SB, Johnston BD, Kisiela D, Clabots C, Sokurenko E V., Johnson JR. Bacteriophage Cocktail and Microcin-Producing Probiotic *Escherichia coli* Protect Mice Against Gut Colonization With Multidrug-Resistant *Escherichia coli* Sequence Type 131. *Front Microbiol* [Internet]. 2022 Abr 25; 13:887799. doi: 10.3389/fmicb.2022.887799
  16. Londoño JP. Aislamiento y caracterización de bacteriófagos contra *E. coli* uropatógenas de la fundación Santa fe de Bogotá [tesis de pregrado]. Bogotá (Colombia): Universidad de los Andes; 2016.
  17. Prada-Peñaranda C, Holguin-Moreno AV, González-Barrios AF, Vives-Florez MJ. Fagoterapia, alternativa para el control de las infecciones bacterianas. *Perspectivas en Colombia. Univ Sci* [Internet]. 2014 Ago 14;20(1):43. doi: <https://doi.org/10.11144/Javeriana.SC20-1.faci>
  18. Clavijo V, Baquero D, Hernandez S, Farfan JC, Arias J, Arévalo A, et al. Phage cocktail SalmoFREE® reduces *Salmonella* on a commercial broiler farm. *Poult Sci* [Internet]. 2019 Oct 1;98(10):5054-63. doi: 10.3382/ps/pez251
  19. Ramírez M, Neuman BW, Ramírez CA. Bacteriophages as promising agents for the biological control of Moko disease (*Ralstonia solanacearum*) of banana. *Biol Control* [Internet]. 2020 Oct 1; 149:104238. doi: 10.1016/j.biocontrol.2020.104238
  20. Epa.gov. [Internet]. Wastewater Sampling; 2023. [Consultado 26 Jun 2023]. Disponible en: <https://bit.ly/3SOBBzt>

21. Wommack KE, Williamson KE, Helton RR, Bench SR, Winget DM. Methods for the Isolation of Viruses from Environmental Samples. In: Clokie MR, Kropinski AM, editors. Bacteriophages: Methods and Protocols, Volume 1: Isolation, Characterization, and Interactions. New York: Humana Press. 2009. p. 3-14. doi:10.1007/978-1-60327-164-6 23
22. Twest RV, Kropinski AM. Bacteriophage Enrichment from Water and Soil. In: Clokie MR, Kropinski AM, editors. Bacteriophages: Methods and Protocols, Volume 1: Isolation, Characterization, and Interactions. New York: Humana Press. 2009. p. 15-21. doi:10.1007/978-1-60327-164-6 23
23. Mazzocco A, Waddell T, Lingohr E, Johnson RP. Enumeration of Bacteriophages Using the Small Drop Plaque Assay System. In: Clokie MR, Kropinski AM, editors. Bacteriophages: Methods and Protocols, Volume 1: Isolation, Characterization, and Interactions. New York: Humana Press. 2009. p. 81-85. doi:10.1007/978-1-60327-164-6 23
24. Kropinski AM, Mazzocco A, Waddell T, Lingohr E, Johnson RP. Enumeration of Bacteriophages by Double Agar Overlay Plaque Assay. In: Clokie MR, Kropinski AM, editors. Bacteriophages: Methods and Protocols, Volume 1: Isolation, Characterization, and Interactions. New York: Humana Press. 2009. p. 69-76. doi:10.1007/978-1-60327-164-6 23
25. Yu P, Mathieu J, Li M, Dai Z, Alvarez PJJ. Isolation of Polyvalent Bacteriophages by Sequential Multiple-Host Approaches. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 2016 Feb 2;82(3):808. doi:10.1128/AEM.02382-15. doi:10.1007/978-1-60327-164-6 23
26. Fortier LC, Moineau S. Phage Production and Maintenance of Stocks, Including Expected Stock Lifetimes. In: Clokie MR, Kropinski AM, editors. Bacteriophages: Methods and Protocols, Volume 1: Isolation, Characterization, and Interactions. New York: Humana Press. 2009. p. 203-219. doi:10.1007/978-1-60327-164-6 23
27. Kutter E. Phage Host Range and Efficiency of Plating. In: Clokie MR, Kropinski AM, editors. Bacteriophages: Methods and Protocols, Volume 1: Isolation, Characterization, and Interactions. New York: Humana Press. 2009. p. 141-149. doi:10.1007/978-1-60327-164-6 23
28. de Jonge PA, Nobrega FL, Brouns SJJ, Dutilh BE. Molecular and Evolutionary Determinants of Bacteriophage Host Range. *Trends Microbiol* [Internet]. 2019;27(1):51–63. doi: 10.1016/j.tim.2018.08.006
29. Yu D, Ryu K, Zhi S, Otto SJG, Neumann NF. Naturalized *Escherichia coli* in Wastewater and the Co-evolution of Bacterial Resistance to Water Treatment and Antibiotics. *Front Microbiol*. 2022 May 30; 13:810312. doi: 10.3389/fmicb.2022.810312.

30. Touchon M, Hoede C, Tenaillon O, Barbe V, Baeriswyl S, Bidet P, et al. Organised genome dynamics in the *Escherichia coli* species results in highly diverse adaptive paths. *PLoS Genet.* 2009;5(1). doi: 10.1371/journal.pgen.1000344.
31. Yazdi M, Bouzari M, Ghaemi EA, Shahin K. Isolation, Characterization and Genomic Analysis of a Novel Bacteriophage VB\_EcoS-Golestan Infecting Multidrug-Resistant *Escherichia coli* Isolated from Urinary Tract Infection. *Sci Rep* [Internet]. 2020;10(1):1–13. doi: 10.1038/s41598-020-63048-x.
32. Hyman P, Abedon ST. Bacteriophage Host Range and Bacterial Resistance. In: *Advances in Applied Microbiology* [Internet]. 1st ed. Elsevier Inc; 2010. p. 217-48. doi: 10.1016/S0065-2164(10)70007-1
33. Bernasconi OJ, Donà V, Tinguely R, Endimiani A. In vitro activity of three commercial bacteriophage cocktails against multidrug-resistant *Escherichia coli* and *Proteus* spp. strains of human and non-human origin. *J Glob Antimicrob Resist* [Internet]. 2017; 8:179–85. doi: 10.1016/j.jgar.2016.12.013
34. Matta-Chuquisapon J, Valencia-Bazalar E, Sevilla-Andrade C, Barrón-Pastor HJ. Filogenia y resistencia de cepas de *Escherichia coli* productoras de betalactamasas de espectro extendido a los antibióticos en pacientes con cáncer hospitalizados en Perú. *Biomédica.* 2022;42(3):470–8. doi: 10.7705/biomedica.6263
35. Stoppe NdC, Silva JS, Carlos C, Sato MIZ, Saraiva AM, Ottoboni LMM, et al. Worldwide Phylogenetic Group Patterns of *Escherichia coli* from Commensal Human and Wastewater Treatment Plant Isolates. *Frontiers in microbiology* [Internet]. 2017 8:2512. doi: 10.3389/fmicb.2017.02512
36. Anastasi EM, Matthews B, Gundogdu A, Vollmerhausen TL, Ramos NL, Stratton H, et al. Prevalence and persistence of *Escherichia coli* strains with uropathogenic virulence characteristics in sewage treatment plants. *Appl Environ Microbiol.* 2010;76(17):5882-6. doi:10.1128/AEM.00141-10
37. Loc-Carrillo C, Abedon ST. Pros and cons of phage therapy. *Bacteriophage.* 2011;1(2):111–4. doi: 10.4161/bact.1.2.14590
38. Hyman P. Phages for Phage Therapy: Isolation, Characterization, and Host Range Breadth. *Pharmaceuticals* [Internet]. 2019 Mar 11;12(1):35. doi: 10.3390/ph12010035