

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD CIENCIAS QUÍMICAS



CARACTERIZACIÓN DE BACTERIÓFAGOS AISLADOS DE AGUAS  
RESIDUALES CON POTENCIAL USO EN TERAPIA DE FAGOS

Por

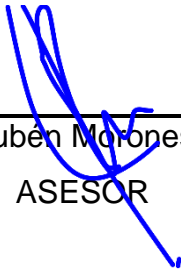
L.B.G. FRANCISCO RICARDO RODRIGUEZ RECIO

Como requisito parcial para obtener el Grado de MAESTRÍA EN CIENCIAS  
CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA APLICADA

Abril, 2021

CARACTERIZACIÓN DE BACTERIÓFAGOS AISLADOS DE AGUAS  
RESIDUALES CON POTENCIAL USO EN TERAPIA DE FAGOS

Revisión de tesis:



---

Dr. José Rubén Morones Ramírez  
ASESOR

---

Dra. Pilar del Carmen Morales San Claudio  
COMITÉ TUTORIAL

---

Dra. María Elena Cantú Cárdenas  
COMITÉ TUTORIAL

---

Dr. Jesús Alberto Gómez Treviño  
COMITÉ TUTORIAL

---

Dr. Gustavo Raúl Reyna Martínez  
COMITÉ TUTORIAL

---

Dra. María Elena Cantú Cárdenas  
SUBDIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mi asesor de tesis, el Dr. José Rubén Morones Ramírez, quien aceptó que formara parte de su grupo de investigación, muchas gracias por todo el apoyo otorgado.

A todos mis colegas del laboratorio de Biología Sintética y de Sistemas del CIBYN por sus consejos y enseñanzas. Especialmente agradezco al cDr. Francisco Balderas, al Dr. Angel Leon y a mi colega LBG. Carlos Ávila, por todo el apoyo que me dieron durante toda mi travesía experimental, por cada consejo y palabra de ánimo que me brindaron, muchas gracias por plaequear conmigo tanto agar y tantos fagos a mi lado, sabemos que en algunas ocasiones parecían infinitos, pero a pesar de esto nunca me negaron la ayuda. Máster, Vaic; estoy muy agradecido con ustedes por aceptar trasladarme todos los días al laboratorio sin ustedes no me hubiese sido posible avanzar a tiempo en mis experimentos.

A mí novia, la LCA. Mariana Lozano, gracias brindarme tanto apoyo y tranquilidad durante estos 2 años, gracias por tener la paciencia para lidiar conmigo cuando era más estrés que persona y, sobre todo, gracias por siempre ayudarme a levantarme cada vez que tropezaba.

Finalmente, agradezco a CONACyT por haberme otorgado la beca durante estos dos años de Maestría y a la Facultad de Ciencias Químicas de la UANL ya que sin sus instalaciones y equipos de laboratorio no hubiera realizado el presente trabajo de tesis.

## DEDICATORIA

*El presente trabajo de tesis es dedicado especialmente a mis padres: **Francisco Javier Rodríguez Martínez y Elisa Recio Montalvo**. Ya que sin su apoyo desde que inicie mi travesía como estudiante, no sería el profesional que actualmente soy. Los amo, muchas gracias por todo su apoyo y amor incondicional, por siempre dejar todo de lado con tal de ayudarme, por cada consejo, por cada palabra de ánimo, por ayudarme a seguir en mi camino cuando daba todo por perdido, gracias por cada abrazo, por cada beso, gracias por TODO, estoy eternamente agradecido con ustedes.*

*Adicionalmente dedico este trabajo a mis hermanos: Alejandra, Rodrigo y Almendra. Gracias por soportarme y por estar conmigo en los momentos más difíciles de mi vida.*

## TABLA DE CONTENIDO

CAPITULO 1 .....	9
INTRODUCCIÓN .....	9
CAPITULO 2 .....	11
ANTECEDENTES .....	11
2.1. Bacteriófagos .....	11
2.1.1. Breve historia de los Bacteriófagos .....	11
2.1.1. Biología de los Bacteriófagos .....	13
2.2. Clasificación de los bacteriófagos .....	17
2.2.1. Clasificación por tipo de replicación .....	17
2.2.2. Clasificación por material genético .....	19
2.2.4. Clasificación por información genómica .....	24
2.2. Terapia de fagos en modelos de estudio.....	26
2.3. Terapia de fagos en humanos.....	28
CAPÍTULO 3 .....	33
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....	33
3.1 Hipótesis.....	33
3.2 Objetivos .....	33
3.2.1 Objetivo general: .....	33
CAPITULO 4 .....	34
METODOLOGÍA .....	34
4.1. Estrategia general .....	34
4.2. Propagación de cepas de interés .....	34
4.3. Toma de muestra Arroyo Topo Chico .....	35
4.4. Enriquecimiento y procesamiento de las muestras .....	35
4.5. Aislamiento de bacteriófagos por agar de doble capa (DLA). .....	35
4.6. Ensayos de confirmación viral (“spot-test”) por DLA. ....	36

4.7. Cuantificación de los títulos virales por DLA. ....	37
4.8. Producción de poblaciones clonales virales. ....	37
4.9. Reactivación de cepas <i>PaR</i> y <i>P. aeruginosa</i> ATCC-27853.....	38
4.10. Reactivación de stocks virales en cepas <i>PaR</i> y <i>PA</i> . ....	38
4.11. Amplificación de bacteriófagos por placa lisada. ....	39
4.12. Determinación de dilución óptima con mejores rendimientos virales vía placa lisada. ....	40
4.13. Amplificación racional de bacteriófagos vía placa lisada.....	40
4.13. Conteo de células viables en placa (UFC) .....	41
4.14. Co-cultivos de Fagos con <i>PA</i> .....	42
4.15. Amplificación racional de bacteriófagos en cultivos por lote.....	42
4.16. Concentración de las partículas virales. ....	43
4.17. Tratamiento de las partículas virales para SDS-PAGE y extracción de ADN viral. ....	43
4.18. Extracción de ADN viral.....	44
4.19. Determinación de proteínas estructurales mediante SDS-PAGE.....	45
4.20. Secuenciación de genomas virales por NGS. ....	45
4.21. Análisis bioinformáticos sobre datos genómicos crudos. ....	46
4.21.1. Análisis y control de calidad de datos genómicos crudos.....	46
4.21.2. Determinación de homología viral por alineamiento local en MegaBlastn. ....	47
4.21.2. Predicción estructural de los marcos de lectura abiertos en los genoma virales. ....	47
CAPITULO 5 .....	48
RESULTADOS.....	48
5.1 Aislamiento de bacteriófagos por agar de doble capa (DLA). ....	48
5.2 Ensayos de confirmación viral (“spot-test”) por DLA. ....	49
5.3. Infección y titulación de los bacteriófagos .....	50
5.4. Reactivación de stocks virales en cepas <i>PaR</i> y <i>PA</i> .....	51
5.5. Amplificación de bacteriófagos por placa lisada.....	53
5.6. Determinación de dilución óptima con mejores rendimientos virales vía placa lisada .....	55
5.7. Co-cultivos de Fagos con <i>PA</i> .....	57
5.8. Amplificación racional de bacteriófagos en cultivos por lote.....	58

5.9. Extracción de ADN viral.....	59
5.10. Determinación de proteínas estructurales mediante SDS-PAGE.....	60
5.11. Análisis y control de calidad de datos genómicos crudos. ....	61
5.12. Determinación de homología viral por alineamiento local en MegaBlastn. .....	61
5.13. Predicción estructural de marcos de lectura abiertos en los genoma virales. ....	62
CAPITULO 6.....	68
DISCUSIÓN.....	68
CAPITULO 7.....	75
CONCLUSIONES.....	75
CAPITULO 8.....	76
REFERENCIAS.....	76
MATERIAL SUPLEMENTARIO.....	92

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Curva de crecimiento de un paso para bacteriófagos.....	16
Figura 2. Esquema de los 2 ciclos virales para la replicación de fagos..	18
Figura 3, Clasificación de Baltimore.....	20
Figura 4. Estrategia general del proyecto de investigación.....	34
<i>Figura 5. Ensayo de DLA en Pseudomonas aeruginosa multirresistente.</i> .....	49
Figura 6. Ensayo de spot-test con P. aeruginosa multirresistente..	50
Figura 7. Factores de dilución empleados para la determinación del título viral.. .....	51
Figura 8. Reactivación de bacteriófagos posterior a la cuarentena en las cepas PaR y PA..	52
Figura 9. Factores de dilución empleados para la determinación del título viral de fagos reactivados.....	53
Figura 10. Amplificación de bacteriófagos por placa lisada en cepa PA. ....	54
Figura 11. Titulación viral de las muestras amplificadas por placa lisada en la cepa PA. .	55
Figura 12. Determinación de dilución óptima que genera máximos rendimientos virales en el fago M8-2.....	56
Figura 13. Determinación de dilución óptima que genera máximos rendimientos virales en el fago M8-3.....	57
Figura 14. Curva de infección de la cepa PA con el fago M8-3. Las barras de error representan la desviación estándar..	58
Figura 15. Análisis de la extracción de ADN viral. ....	60



Figura 16. Análisis de proteínas estructurales..	60
Figura 17. BLASTn del genoma del fago M8-2.....	62
Figura 18. BLASTn del genoma del fago M8-3.....	63
Figura 19. Mapa genómico del fago M8-2 desplegado en DNA Master.....	65
Figura 20. Mapa genómico del fago M8-3 desplegado en DNA Master. ....	66

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Simetrías morfológicas de clasificación de fagos a nivel Familia (Akermann 2006). ....	22
Tabla 2. Sistema de clasificación actual de fagos por caracteres morfológicos (Akermann, 2006). ....	23
Tabla 3. Estudios de TDF en modelos de infección pulmonar y de piel.....	26
Tabla 4. Determinación del título viral en los stock de fagos. ....	51
Tabla 5. Determinación del título viral en las muestras de fagos reactivadas...	53
Tabla 6. Determinación del título viral en las muestras amplificadas por placa lisada en la cepa PA. ....	55
Tabla 7. Determinación del título viral en las de las muestras amplificadas en cultivo por lote en la cepa PA.....	59
Tabla 8. Marcos de lectura abiertos predichos por Glimmer3 en el genoma del fago M8-2.....	64
Tabla 9. Marcos de lectura abiertos predichos por Glimmer3 en el genoma del fago M8-3.....	67

## Nomenclatura

%	Por ciento, porcentaje
°C	Grados centígrados
μL	Microlitro
μm	Micrómetro
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNbc	Ácido desoxirribonucleico bicatenario
ADNmc	Ácido desoxirribonucleico monocatenario
ARN	Ácido ribonucleico
ARNbc	Ácido ribonucleico bicatenario
ARNmc	Ácido ribonucleico monocatenario
H <sub>2</sub> O	Agua
ANOVA	Análisis de varianza
ATCC	American Type Culture Collection
CaCl <sub>2</sub>	Cloruro de Calcio divalente
MgCl <sub>2</sub>	Cloruro de Magnesio divalente
DR	Drogo resistente
<i>et al.,</i>	Y otros
H	hora
LB	Luria-Bertani
M	Molar
mm	Milímetro
mM	Milimolar

MOI	Multiplicidad de infección: Relación entre la concentración de virus con respecto a la concentración de células bacterianas.
NaCl	Cloruro de Sodio
OD	Densidad óptica
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>PaR</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> multirresistente
pH	Potencial de Hidrógeno
RPB	Proteína de unión a receptor
rpm	Revoluciones por minuto
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>SaR</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> multirresistente
MgSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	Sulfato de magnesio heptahidratado
Tris-HCl	Tris ácido clorhídrico
UFC•ml <sup>-1</sup>	Unidad formadora de colonia por mililitro
UFP•ml <sup>-1</sup>	Unidad formadora de placa por mililitro

## RESUMEN

**LBG Francisco Ricardo Rodríguez Recio Fecha de graduación: Julio, 2021**

**Universidad Autónoma de Nuevo León**

**Facultad de Ciencias Químicas**

**Título de Estudio: CARACTERIZACIÓN DE BACTERIÓFAGOS AISLADOS DE AGUAS RESIDUALES CON POTENCIAL USO EN TERAPIA DE FAGOS**

**Número de páginas: 92 Candidato para el grado de Maestría en Ciencias con orientación en Microbiología Aplicada**

**Área de estudio: Desarrollo de Agentes Terapéuticos**

**Propósito y Método del Estudio:** Las infecciones por bacterias multirresistentes han incrementado drásticamente en las últimas décadas. Por lo tanto, es necesario el desarrollo de otras alternativas terapéuticas. Los bacteriófagos (fagos) son virus predadores de bacterias. Estos virus son los mejores agentes terapéuticos antimicrobianos dada su alta especificidad y eficacia. En el presente trabajo, se aislaron y secuenciaron fagos endémicos del estado de Nuevo León capaces de lisar una cepa multirresistente de *Pseudomonas aeruginosa* endémica del estado de Nuevo León.

**Contribuciones y Conclusiones:** Se aislaron y secuenciaron 2 fagos capaces de lisar las cepas *P. aeruginosa* multirresistente y *P. aeruginosa* ATCC 27853. La infección de estos virus a multiplicidades de infección bajas propicia una producción viral sin afectar la plataforma de amplificación, mientras se producen partículas virales. Se lograron amplificar los fagos para conseguir stock virales de almacenamiento a largo plazo para sus posteriores estudios.

**Firma del Asesor:** \_\_\_\_\_

# CAPITULO 1

## INTRODUCCIÓN

Las enfermedades por infecciones bacterianas han sido de las principales problemáticas de salud a nivel mundial. El descubrimiento de los antibióticos y su efecto antimicrobiano revolucionó la medicina moderna. Sin embargo, la rápida tasa de adaptación bacteriana conllevó a la generación de múltiples mecanismos de resistencia antibiótica originando bacterias multirresistentes a antibióticos (BMA). Las BMA son una problemática creciente a nivel mundial, ya que son la causa de hasta 700,000 decesos al año (WHO, 2019). Sin embargo, se estima que esta cifra pueda aumentar hasta 10 millones de muertes para el año 2050 (I. C. . A. R., 2019).

Las cepas multirresistentes de *Pseudomonas aeruginosa* son consideradas como un patógeno crítico prioritario (WHO, 2017) debido a su resistencia a carbapenémicos y su alta prevalencia en hospitales, así mismo, las infecciones nosocomiales de esta cepa resultan en una mayor recurrencia hospitalaria, morbilidad y mortalidad (Khan, Ahmad, & Mehboob, 2015). Por otra parte, *Staphylococcus aureus* es un patógeno de prioridad elevada (WHO, 2017) debido a que es resistente a casi todos los betalactámicos y con frecuencia porta resistencia a otras clases importantes de antimicrobianos (De Sousa, 2012), adicionalmente, esta cepa presenta una alta prevalencia en infecciones de la piel

y de tejidos blandos, infecciones de las vías respiratorias inferiores, así como del torrente sanguíneo (David & Daum, 2010).

Debido a la problemática anterior, es necesario el desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas personalizadas para el tratamiento de infecciones por BMA. Es necesario que estos nuevos agentes terapéuticos presenten una alta especificidad para minimizar los daños realizados a la microbiota nativa del humano, dado que agentes no selectivos como los antibióticos perturban la estructura y funciones de las comunidades de la microbiota humana, lo cual resulta en una susceptibilidad prolongada a patógenos (Stecher et al., 2007).

Los bacteriófagos (fagos) son predadores nativos de bacterias altamente específicos y son los entes más abundantes en toda la biosfera (Hendrix et al., 1999). Desde su descubrimiento han sido aplicados como agentes terapéuticos (terapia de fagos; TDF) para el tratamiento de infecciones bacterianas (F. H. d'Herelle, 1917; d'Herelle, 1961). La TDF es una terapia personalizada que resuelve infecciones bacterianas causadas por diferentes BMA como *P. aeruginosa* (Courtwright et al., 2019; Wright et al., 2009) y *S. aureus* (Zhvanina et al., 2017). En la TDF se aprovecha la alta selectividad de los fagos, para realizar un control poblacional solo de sus correspondientes huéspedes sin afectar a las células humanas y bacterias nativas de la microbiota humana.

Por lo tanto, en el presente trabajo de tesis se describe el aislamiento, secuenciación y la genómica estructural de 2 bacteriófagos específicos de *P. aeruginosa* multirresistente nativos del área metropolitana de Monterrey (AMM) que podrían ser utilizados en TDF.

## **CAPITULO 2**

### **ANTECEDENTES**

#### **2.1. Bacteriófagos**

##### **2.1.1. Breve historia de los Bacteriófagos**

El primer registro de los fagos reportado por el bacteriólogo Ernest Hanbury Hankin en 1896, quien describió un efecto bactericida desconocido contra el cólera en el agua de los ríos Grandes y Jamuna en la India. Dicho efecto era producido por un agente en el agua, el cual podía pasar por un filtro de porcelana fina sin perder esta característica distintiva (Hankin, 1986).

Posteriormente, los bacteriólogos Twort y d'Herelle descubrieron de manera independiente a los fagos (d'Herelle, 1917; Twort, 1915). No obstante, d'Herelle reconoció la naturaleza viral de los fagos, por lo cual los definió como parásitos intracelulares obligatorios, fijando el término bacteriófago (“comedor de bacterias”) para hacer referencia a este agente antagonista. Adicionalmente propuso la filtración como el método de purificación de los fagos (d'Herelle, 1918).

Desde su descubrimiento d'Herelle resaltó la importancia del aislamiento de fagos tanto de heces fecales, así como de aguas residuales, dado que la contaminación fecal favorece el aislamiento de diferentes tipos de fagos (d'Herelle, 1925). Por lo cual, los primeros reportes de aislamientos de fagos provienen de este tipo de muestras (Arnold, 1925).

Los fagos son virus altamente específicos de su huésped, d'Herelle inspirado por su descubrimiento, determinó el potencial de los fagos como agentes terapéuticos contra infecciones bacterianas, explotando esta cualidad biológica viral para su aplicación en humanos y animales (Apartado 2.3 y 2.4). A partir de sus investigaciones y junto con George Eliava fundaron el Instituto George Eliava en Tibilis, Georgia en 1933, institución focalizada en el estudio y producción de bacteriófagos para su uso terapéutico. No obstante, posterior al descubrimiento de los antibióticos, la TDF se descartó en la medicina occidental, sin embargo, su investigación se mantuvo activa en la Unión Soviética, Polonia y Georgia (Lin et al., 2017).

Posterior a la introducción de los antibióticos, las investigaciones en occidente en la TDF fueron descontinuadas y focalizadas en el área biológica debido a su "simplicidad". El estudio de fagos estuvo implicado en roles importantes para la biología como en la determinación del ADN como el material genético de herencia (Hershey & Chase, 1952), la transducción celular (Zinder & Lederberg, 1952), la estructura y activación génica (Benzer, 1955), el descifrado del código genético (Crick, Barnett, Brenner & Watts-Tobin, 1961), así mismo estuvieron fuertemente involucrados en el descubrimiento de herramientas para la biología molecular como la ADN ligasa (Weiss, B. & Richardson, 1967), las enzimas de restricción (Smith & Welcox, 1970) y el "phage display" la cual es una técnica de búsqueda de bibliotecas de péptidos y proteínas con alta relevancia biológica (Smith, 1985). Adicionalmente, se ha resaltado su importancia en la ecología en el ciclado de nutrientes, puesto que la lisis celular es ecológicamente significativa al estructurar poblaciones y comunidades microbianas con fuertes



presiones selectivas, así mismo, esta lisis libera nutrientes que otros organismos pueden emplear, por lo tanto, los fagos desvían materia orgánica en tróficos más bajos de la cadena alimentaria hacia reservas de materia orgánica disuelta y particulada, cortando el soporte a niveles tróficos más altos (Weynberg, 2018)

### **2.1.1. Biología de los Bacteriófagos**

Los fagos están presentes en todos los entornos naturales y son los entes más abundantes, se estima que existen  $10^{31}$  bacteriófagos en toda la biosfera (Hendrix et al., 1999). Este valor es derivado de la correlación entre las  $4-6 \times 10^{30}$  células procariontas estimadas en toda la biosfera (Whitman, Coleman & Wiebe, 1998) con la concentración promedio de fagos aislados en muestras ambientales, ya que son 10 veces mayor que células procariontas (Bergh, Børsheim, Bratbak & Heldal, 1989).

Los bacteriófagos son divididos en líticos y lisogénicos de acuerdo con el tipo de replicación viral que emplean para propagarse (Apartado 2.2.1). Las estructuras virales de los fagos son constituidas bajo un mismo principio: Un núcleo de ácido nucleico rodeado por una cubierta proteica (cápside) conformado por subunidades proteicas (capsómeros). Adicionalmente, algunos presentan estructuras que facilitan su reconocimiento a una diana específica y que les permiten liberar su material genético dentro de la célula.

Para iniciar la infección, el fago necesita reconocer y unirse a 1 o más receptores celulares presentes en su huésped mediante proteínas de unión a receptores (RBP). La unión de fagos específicos de Gram (-) está limitada a proteínas de la membrana externa y al exopolisacárido (Washizaki et al., 2016).

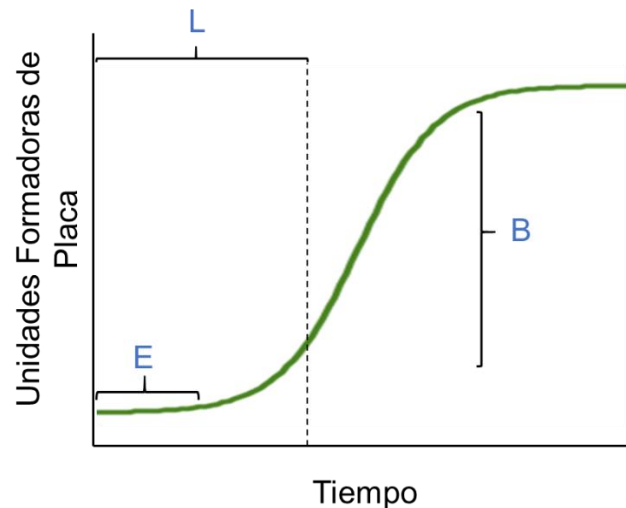
Por otra parte, los fagos específicos de Gram (+) preferentemente se unen a los ácidos teicoicos o carbohidratos del peptidoglicano (Dowah & Clokie, 2018). Posterior a su anclaje el material genético del fago es inyectado y transportado dentro del huésped para la replicación viral. Los fagos más abundantes y caracterizados pertenecen al orden *Caudovirales*, por lo cual las estrategias de inyección de las Familias de este orden son las más estudiadas. La Familia *Myoviridae* emplea un mecanismo de “tipo jeringa” para perforar mecánica y químicamente la pared celular (Leiman et al., 2004). Por otra parte, los fagos de cola no contráctil de la Familia *Shiiviridae*, posterior al anclaje, transmiten cambios conformacionales en la proteína de cinta métrica (TPM) liberándola de su estado metaestable dentro del tubo de la cola del fago, para que pueda internalizarse en la pared celular bacteriana para la inyección del material genético (Arnaud et al., 2017). Finalmente, en la Familia *Podoviridae* posterior a su anclaje, se genera un canal que atraviesa toda la pared celular, el cual es derivado del cambio conformacional de las proteínas centrales ubicadas en la cápside (Lupo et al., 2015). Una vez internalizado el ADN, se inicia la síntesis del genoma viral, así como las proteínas estructurales del mismo para continuar con el ciclo viral (Figura 2).

La estructura genómica de los fagos es dividida en módulos, los cuales están directamente relacionados con la biología viral (Brüssow & Hendrix, 2002). Principalmente se dividen en módulo de replicación, módulo estructural y módulo de lisis, adicionalmente, en los fagos temperados se integra un cuarto módulo, el de lisogenia. Finalizada la síntesis de las estructuras virales del módulo

estructural, así como la replicación del genoma viral se inicia el proceso de empaquetamiento.

Durante el empaquetamiento, la proteína terminasa tiene como objetivo la introducción específica del genoma viral en la cápside. En base a la secuencia genómica viral, se procederá a realizar un mecanismo de empaquetamiento en particular. Los fagos de ADN bicatenario (ADNbc) estructurados en concatémeros son cortados por la enzima terminasa en los “sitios cos”, los cuales son complementarios y delimitan las copias de los genomas virales (Feiss et al., 1983). Otro método es el reconocimiento de repeticiones terminales directas derivadas de la síntesis y extensión del extremo 3' del genoma, estas secuencias son de tamaños variables y permiten reconocer una posición fija para cortar una copia del concatámero (Dunn & Studier, 1983). Por otra parte, el mecanismo de cápside repleta se lleva a cabo cuando la terminasa inicia el empaquetamiento en un sitio de empaquetamiento específico (sitio pac) del concatámero, los cortes subsiguientes se realizan en posiciones variables hasta que toda la cápside se encuentre repleta (Tye, Huberman & Botstein, 1974). Una variante de este método es el empaquetamiento del fago T4, ya que su terminasa no reconoce ni un sitio pac, por lo que el empaquetamiento es completamente al azar (Kalinski, Andrej, & Black, 1986). Finalizado el ensamblaje de los viriones, comienza la activación del módulo de lisis, el cual expresa proteínas formadoras de poros en la membrana celular (holinas) y enzimas degradadoras del peptidoglicano (endolisinas) (Jassim & Limoges, 2017) para proceder a la liberación de los viriones formados.

Las curvas de un paso (one-step growth) se emplean para cuantificar y determinar la eficacia viral de un fago ante un huésped dado (Kropinski, 2018), puesto que permiten determinar el tiempo de eclipse, latencia y la cantidad de viriones liberados por célula infectada (Figura 1).



**Figura 1. Curva de crecimiento de un paso para bacteriófagos.** El tiempo de eclipse (E) es el periodo de tiempo transcurrido desde el inicio de la infección viral, hasta el ensamblaje de los primeros viriones (E). La latencia (L) es el periodo de tiempo que abarca desde la infección viral hasta la liberación de partículas virales derivadas de la lisis del huésped. El tamaño de estallido es la cantidad de virus liberada por célula infectada (B)

En estas curvas, se controla la cantidad disponible de huéspedes para infectar. Se comienza con una relación específica fago/bacteria, la cual posterior a un breve tiempo de incubación es diluida drásticamente para limitar los huéspedes disponibles. Posteriormente, se realizan cuantificaciones virales a intervalos específicos. En los primeros muestreos, el recuento viral será constante dada la disponibilidad del huésped. No obstante, posterior a un intervalo de tiempo se producirá un aumento en las unidades formadoras de placa (UFP) a un nivel de meseta, puesto que los fagos liberados permanecen en el

medio dado que no tienen disponible un huésped que infectar. A partir de estos datos, se calcula la eficacia lítica al cuantificar la media de fagos liberados por bacteria.

## **2.2. Clasificación de los bacteriófagos**

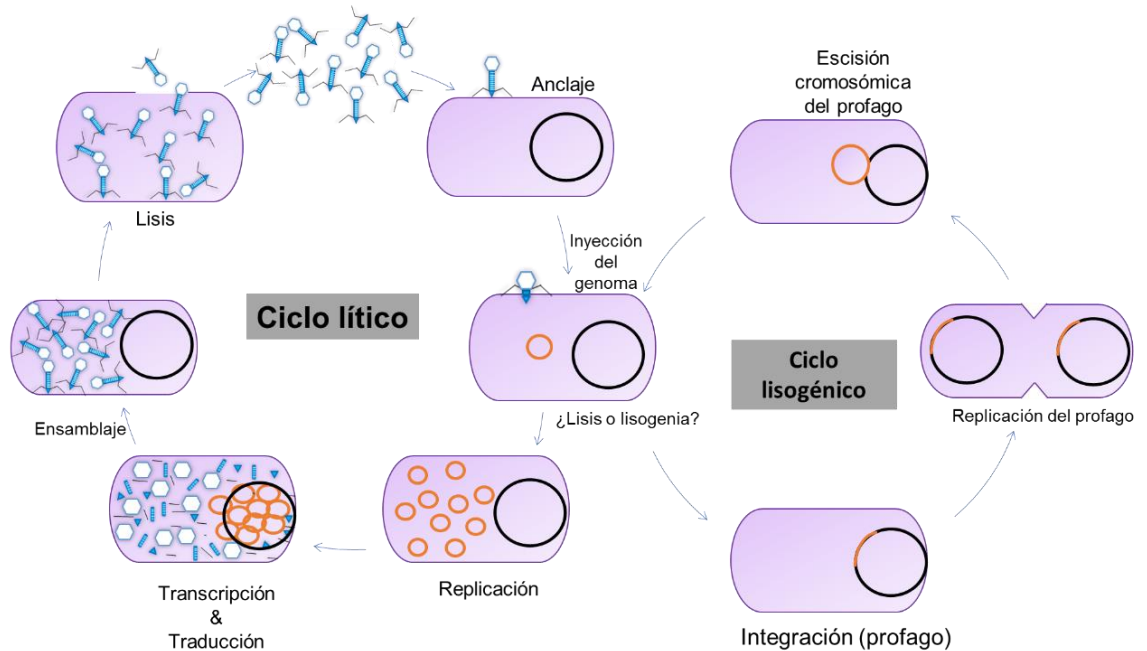
### **2.2.1. Clasificación por tipo de replicación**

Los fagos se dividen en 2 grupos de acuerdo con el tipo de ciclo viral que efectúan para su replicación (Figura 2). Los fagos líticos son aquellos que posterior al anclaje e inyección de su material genético en su huésped, secuestran la maquinaria celular para producir nuevas réplicas virales, convirtiendo a la célula en una “fabrica” viral. Posteriormente, se realiza el ensamble viral, finalizando con la lisis celular.

Los fagos temperados (lisogénicos) pueden propagarse como virus líticos, lisogénicos (integración al genoma del huésped) o bien permanecer como un elemento episomal. En los últimos dos casos, son replicados y transmitidos a las células hijas sin lisarlas (Figura 2). Los fagos integrados se denominan profagos, mientras que las células bacterianas que los portan son conocidos como lisógenos. El proceso de decisión entre lisis/lisogenia es regulado por un switch genético de 2 proteínas (activador/represor). Anteriormente, se había postulado a este switch como el factor decisivo para la propagación de los fagos temperados (Echols. H, 1986).

No obstante, el ciclo lisogénico es regido por diferentes factores. Sin embargo, la biología detrás de esta decisión es compleja, por lo cual se han determinado diferentes factores que lo benefician. En el sistema Piggyback-the-

Winner se postula que, los ambientes con altas densidades poblacionales bacterianas son explotados por los fagos para propagarse como lisógenos, dado que, a mayor densidad poblacional, menor densidad viral (Silveira et al., 2016). Adicionalmente, la lisogenia está altamente regulada por los sistemas de comunicación peptídica entre fagos (Dou et al., 2018; Erez et al., 2017).



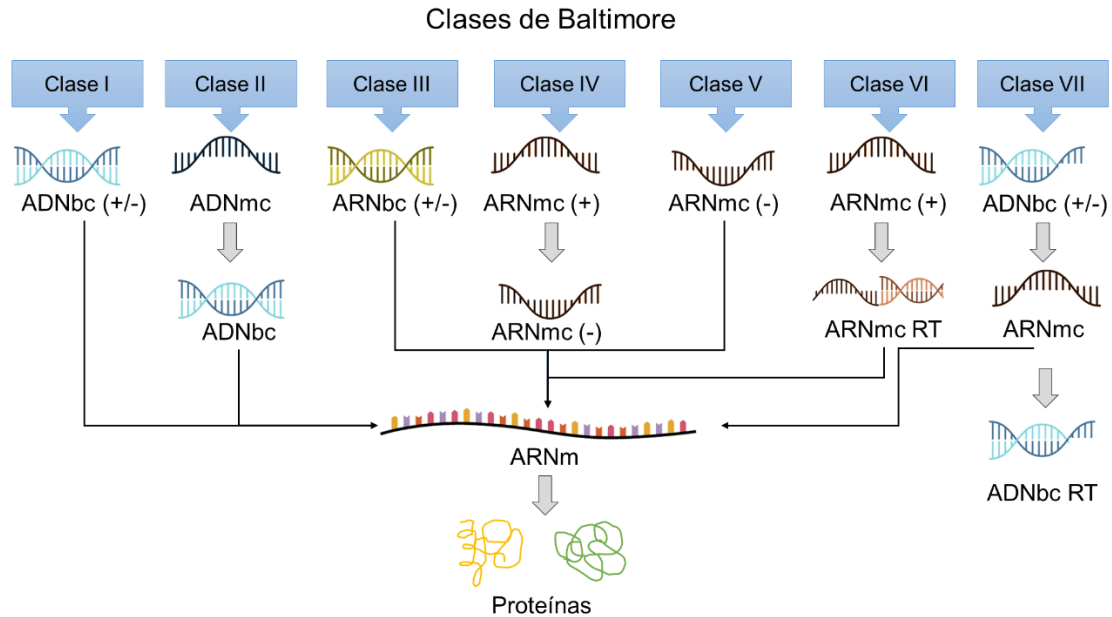
**Figura 2. Esquema de los 2 ciclos virales para la replicación de fagos.** Los fagos líticos posterior al anclaje e inyección del material genético comienzan la síntesis de ADN, la producción de nuevas partículas virales síntesis y el ensamblaje de estos componentes para finalizar con la lisis celular; los fagos temperados posterior a su anclaje, pueden entrar en lisogenia al integrarse en el genoma del huésped para replicarse por ciclos lisogénicos. Bajo ciertas condiciones de estrés, el genoma viral es escindido del cromosoma e inicia el ciclo lítico.

La integración genómica del fago puede ser estable durante miles de generaciones, por lo cual, se presenta una relación simbiótica fago/bacteria. Esta relación conlleva al cambio fenotípico de la bacteria, en un proceso denominado conversión lisogénica. Este cambio fenotípico es derivado de la expresión de

productos génicos del fago que aumentan el fitness de la bacteria al conferirle resistencia al ataque de otros fagos (Coetzee., 1961), al eliminar propiedades de la misma cepa (Lee & landolo, 1986; Winkler, De Waart, Grooten, Zegers, Tellier & Vertregt, 1965) o al otorgarle nuevos factores de virulencia (Kraushaar et al., 2017; Van der Vijver, Van Es-Boon, & Michel, 1972; Waldor & Mekalanos, 1996). No obstante, la lisogenia puede ser detenida si el lisógeno se encuentra en condiciones de estrés (radiación ionizante, inanición de timina, radiación UV, antibióticos y estrés oxidativo) que conlleven a la activación del sistema SOS y a la proteína RecA, la cual degrada los represores virales que mantienen silenciado al profago (Roberts, Roberts, & Craig, 1978).

### **2.2.2. Clasificación por material genético**

Los fagos son clasificados de acuerdo con su grupo Baltimore (Baltimore, 1971). Este sistema de clasificación divide a los virus en 7 clases (I-VII), cada una está sustentada en la naturaleza del material genético viral y a su método de replicación (Figura 3). Los fagos incluyen grupos de ADNbc, de cadena sencilla (ADNmc), así como ADN lineal. Adicionalmente, se incluyen fagos de ARN de doble cadena (ARNbc), de cadena sencilla (ARNmc). Las clases de Baltimore son complementarias con la clasificación del Comité Internacional de Taxonomía de Virus (CITV).



**Figura 3, Clasificación de Baltimore.** C (I): virus de ADNbc; C (II): virus de ADNmc; C (III): virus de ARNbc; C (IV): virus de ARN<sup>(+)</sup>; C (V): virus de ARN<sup>(-)</sup>; C (VI): virus de ARN<sup>+</sup>, emplean ADN intermediario producido por transcripción inversa para replicarse; C (VII): virus con genomas de ADNbc, se replican mediante transcripción inversa y empaquetan un híbrido de ARN-ADN en los viriones.

### 2.2.3. Clasificación por estructura morfológica

El desarrollo del microscopio electrónico en 1940 permitió determinar la naturaleza viral de los bacteriófagos. Como se mencionó anteriormente, la cápside rodea y protege al genoma viral. Esta red proteica está conformada por subunidades proteicas llamadas capsómeros. El arreglo proteico de la cápside alrededor del material genético es diferente entre los grupos de fagos, esto conlleva a la formación de diferentes simetrías morfológicas. Estas simetrías son empleadas como parámetros validados para la clasificación viral (Lwoff, Horne, & Tournier, 1962).



Las simetrías morfológicas de clasificación de fagos a nivel Familia son descritas en la Tabla 1. Los fagos de simetría binaria se caracterizan por presentar una cápside de simetría cubica en forma de poliedros y una cola de simetría helicoidal en forma de varilla (Lwoff, Horne, & Tournier, 1962). Los miembros de la simetría binaria presentan cápsides icosaédricas; por otra parte, la simetría helicoidal en la cápside de los fagos filamentosos es formada debido a la combinación de la rotación y traslación paralela de los capsómeros alrededor del genoma viral. Los fagos de simetría pleomórfica a diferencia de los 3 grupos descritos anteriormente carecen de cápsides, por lo cual se encuentran envueltos por una cubierta lipídica (Ackermann, 2009).

En la actualidad los fagos se clasifican por su estructura morfológica y por el tipo de ácido nucleico que presentan como genoma. La clasificación morfológica de fagos es derivada de 6 grupos morfológicos (Tabla 2), los cuales son representados por los fagos T4,  $\lambda$ , T7,  $\Phi$ X174, MS2 y fd respectivamente (Ackermann, 2006). No obstante, el CITV emplea cualquier característica viral para clasificar a los fagos, tales como propiedades físicas (peso y longitud), químicas (bases nitrogenadas inusuales, azúcares asociados a el genoma, composición aminoacídica, etc.), serológicas (neutralización por Ac), ensayos de inactivación (luz UV, cloroformo, calor etc.), por replicación y ensamblaje (transposiciones, reparación por recombinación, integración, estrategia de empaquetamiento, translocación del ADN, circularización del ADN, circularización, etc), datos fisiológicos (tiempo latente, tamaño de estallido, rango






de huésped, lítico/lisogénico, etc.) así como por la información genómica (Ackermann, 2009).

Tabla 1. Simetrías morfológicas de clasificación de fagos a nivel Familia (Ackermann 2006).

Simetría	Familias pertenecientes		Genoma	Características distintivas
Binaria	Caudovirales	<i>Myoviridae</i>	ADNbc, L	Cola contráctil separadas de la cápside por un cuello.
		<i>Siphoviridae</i>	ADNbc, L	Cola larga no contráctil
		<i>Podoviridae</i>	ADNbc, L	Cola corta
Cubica	<i>Microviridae</i>	ADNmc C	Sin envoltura	
	<i>Corticoviridae</i>	ADNbc, C, S	Presentan 2 capas proteicas como cubierta las cuales están intercaladas por una bicapa lipídica.	
	<i>Tectiviridae</i>	ADNbc, L	Envueltos y de cápside rígida. La vesícula lipoproteica es el dispositivo de inyección.	
	<i>Leviviridae</i>	ARNmc, L	Sin envoltura y específicos de plii sexual.	
	<i>Cystoviridae</i>	ARNbc, L, seg	Fagos envueltos que contienen 3 moléculas de ADNbc (análogo a cromosomas).	
Helicoidal	<i>Inoviridae</i>	ADNmc, C	Filamentosos, largos y pueden ser rígidos o flexibles	
	<i>Lipothrixviridae</i>	ADNbc, L	Envueltos con forma de varilla	
	<i>Rudiviridae</i>	ADNbc, L	Rígidos sin envoltura con forma de barras rectas.	
Pleomórfica	<i>Plasmaviridae</i>	ADNbc, C, S	Fagos envueltos sin cápside	
	<i>Fuselloviridae</i>	ADNbc, C, S	Fagos lisogénicos envueltos con una cubierta proteica hidrofóbica y lípidos del huésped	
	<i>Guttavirus</i>	ADNbc	Fagos con forma de gota específicos de arqueas	

bc) bicatenario; mc) monocatenario; L) lineal; C) circular; seg) segmentado; S) superhelicoidal.

Tabla 2. Sistema de clasificación actual de fagos por caracteres morfológicos (Akermann, 2006).

Grupo	Descripción	Morfología
<b>T4</b>	Fagos de cola contráctil	
<b><math>\lambda</math></b>	Fagos de cola larga no contráctil	
<b>T7</b>	Cola corta no contráctil	
<b><math>\Phi</math>X174</b>	Sin cola; con capsómeros largos	
<b>MS2</b>	Sin cola, capsómeros cortos	
<b><i>fd</i></b>	Sin cabeza; filamento flexible	

Dado que hay una mayor disponibilidad de información genómica, se han desarrollado diversas herramientas para clasificar los fagos de acuerdo con esto. No obstante, los fagos al ser un grupo polifilético no permiten el desarrollo de análisis filogenéticos basados en marcadores ortólogos (16S, 18S y secuencias de múltiples locus) que agrupan grupos monofiléticos, puesto que solo los grupos de fagos que contengan dichos marcadores podrán ser agrupados, generando un sesgo en la clasificación. Por lo tanto, no se pueden realizar árboles

filogenéticos basados en estos marcadores para colocarlos en el árbol de la vida (Rohwer, & Edwards, 2002). Adicionalmente, la naturaleza genómica de mosaico de los fagos representa una problemática para estos análisis, como alternativa a estos hechos, se han desarrollado diversos sistemas de clasificación.

#### **2.2.4. Clasificación por información genómica**

Rohwer & Edwards (2002) propusieron el método del árbol proteómico de los fagos, el cual es un sistema de clasificación genómica que emplea 105 genomas secuenciados para determinar la presencia y similitud de proteínas entre fagos empleando matrices de distancias proteicas. No obstante, el método propuesto presenta problemas con las matrices BLASP dado que no logra resolver relaciones entre proteínas distalmente relacionadas. Actualmente, se han propuesto y empleado enfoques de clasificación basados en información genómica con el método de búsqueda y agrupación basado en el modelo oculto de Markov (HMM).

Los perfiles de HMM son modelos estadísticos que actualmente en clasificación viral son empleados en matrices de alineamiento múltiples para convertir la información del alineamiento en un conjunto de valores probabilísticos, los cuales revelan niveles específicos de variación posicional entre todos los miembros de secuencias relacionadas evolutivamente (Reyes et al., 2017). Por lo tanto, son métodos más sensibles y efectivos para detectar secuencias virales divergentes.

Chibani et al. 2019 reportan el método ClassiPhage sustentado en un conjunto de perfiles HMM (grupos de proteomas relacionados) generados a partir

de genomas relacionados de ADNbc y ADNmc de vibriofagos. El método de clasificación está correlacionado con la organización genómica de los fagos, dado que fagos con una organización genómica conservada son agrupados juntos. Así mismo, el método es eficiente para la clasificación de genomas sin clasificación en diferentes familias y revela la relación entre la distancia filogenética de los fagos con su rango de hospedadores. Adicionalmente, es consistente con los estándares del CITV.

Los métodos de aprendizaje automático (por sus siglas en inglés ML) también han sido empleados para la clasificación viral. Chibani et al., 2019 desarrollaron una red neuronal artificial (ANN) derivada de la matriz de puntuación de 5,920 perfiles HMM generados a partir de 8,721 secuencias de fagos clasificadas en 12 familias (ClassiPhage 2.0). La ANN desarrollada es alimentada con múltiples perfiles HMM derivados de proteínas de fagos de 12 familias virales. Por lo cual, la clasificación se genera en función de las puntuaciones del perfil HMM en una de las 12 familias de fagos. Sin embargo, el rendimiento del método depende de la calidad de la matriz de entrada, dado que puede presentar sobre representaciones de las familias virales si la mayoría de las fuentes de entrada provienen de una familia en particular.

## 2.2. Terapia de fagos en modelos de estudio

Como se describió anteriormente, los hallazgos de d'Herelle lo impulsaron a emplear la TDF para tratar infecciones bacterianas como la disentería (d'Herelle & Smith, 1922), el cólera (Meissner, 1924), la peste bubónica (d'Herelle, 1925), la gangrena gaseosa (Kokin, 1941) y tifoidea (Karpov, 1950). Sin embargo, previo al uso de la TDF como terapia, d'Herelle determinó la inocuidad de esta en animales, en diferentes grupos de médicos y en sí mismo, demostrando que no existe ningún efecto adverso en ninguna vía de administración incluyendo la intravenosa (Davison, 1922; Meladze et al., 1982).

La eficacia de la fagoterapia es igual o mejor que el tratamiento antibiótico en algunos casos para tratar infecciones en modelos de estudio (Chhibber et al., 2013). En la Tabla 3 se describe brevemente la aplicación de TDF en algunos de los principales modelos de infección. La TDF es un complemento para la resolución de infecciones bacterianas, dado que actúan de manera sinérgica con el sistema complemento para eliminar las infecciones (Abd El-Aziz, Elgaml, & Ali, 2019), así mismo, la TDF se ve potenciada por la proliferación y diseminación sistémica de los fagos en plasma (Chang et al., 2018). Por otra parte, la TDF también se emplea como medida profiláctica ante infecciones bacterianas, demostrando tener efectos protectores ante estas (Ding et al., 2018; Kokin, 1941).

Tabla 3. Estudios de TDF en modelos de infección pulmonar y de piel

Patógeno	Tipo de infección	Fago empleado	Dosis	Efecto terapéutico	Cita
SA37 MSSA & MRSA	Infección de piel	Profago $\phi$ MR11	1 dosis Ip/B	Supervivencia del 100% durante todo el estudio.	(Matsuzaki et al., 2003)
<i>P. aeruginosa</i> cepa PAKlumi	Infección pulmonar	PAK_PA1	1 dosis In/B	Supervivencia del 90% a partir del 2º día post tratamiento	(Roach et al., 2017)
<i>S. aureus</i> SA325	Absceso dérmico	JD007	1 dosis Sc/B	Inhibición de la formación de absceso dérmico	(Ding et al., 2018)
<i>P. aeruginosa</i> (m/nm)	Infección pulmonar aguda	MMI-Ps <sub>1</sub>	1 dosis In/P	Supervivencia del 100% durante todo el estudio	(Abd El-Aziz, Elgaml, & Ali, 2019)
<i>P. aeruginosa</i> DR FADDI-PA001	Infección pulmonar aguda	PEV20	1 dosis It/P	Reducción de 5.3 log de la carga bacteriana a las 24 h	(Chang et al., 2018)

<i>MRSA ST5 y</i>	Infección de piel	VB_SauS	1 dosis	Supervivencia del	(Ji et al.,
<i>MRSA ST59,</i>		_SH-St	Sc/B	100% en grupo	2020)
		15644		tratado	

P = suspensión en polvo; B= Buffer; R = reducción significativa de la carga bacteriana; (m) = fenotipo mucoso; (nm) = fenotipo no mucoso; Sc = subcutánea; Ip = intraperitoneal; In = intranasal; It = intratraqueal. DR= Drogo resistente

### 2.3. Terapia de fagos en humanos.

La era histórica de la TDF abarcó los años 1920-1930, durante esta década, las preparaciones de fagos provenían directamente de filtrados de cultivos lisados. d'Herelle a partir de estas preparaciones logró tratar y curar la disentería en 4 pacientes (d'Herelle, & Smith, 1922). Adicionalmente, d'Herelle y George Eliava en 1931 fueron los primeros en tratar el cólera con fagos en humanos, logrando disminuir hasta 90% la tasa de mortalidad de la enfermedad (Kazhal & Iftimovich, 1968).

La TDF se elevó durante la segunda guerra mundial para darle tratamiento a los soldados heridos (Chanishvili, 2012). Sin embargo, esta fue descontinuada debido a su ineffectividad por malas prácticas de purificación y almacenamiento, además de que se solían aplicar soluciones virales para tratar infecciones contra bacterias que no eran sus huéspedes nativos (Lin et al., 2017). Por lo que la TDF fue descartada en la medicina occidental después de la introducción de los antibióticos en 1940.

No obstante, las investigaciones de la TDF permanecieron activas en la antigua Unión Soviética, Polonia y Georgia. Slopek et al. (1983) reportan el éxito de la TDF en infecciones supurativas de la piel en 138 pacientes con infecciones sépticas derivadas de complicaciones postoperatorias e infecciones idiopáticas,



causadas por los géneros *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Klebsiella* y *Escherichia*. La TDF consistía en un coctel de 112 fagos administrados vía oral (3 veces al día) o *in situ* (cada 24 h) por un total de 14 días. Posterior a la terapia, se reporta una resolución de la infección del 93.5% de los casos tratados.

Cislo et al. (1987) determinan que la aplicación de la TDF en infecciones supurativas de la piel promueve la eliminación del tejido necrótico, así como una supresión de la inflamación local. Por otra parte, Slopek et al., (1987) reportan la aplicación de la TDF en 550 pacientes, de los cuales el 94.2% presentaban resistencia al tratamiento antibiótico. En el 92.4 % de los casos se observaron resultados positivos del tratamiento y solo en 0.7 % no se presentó alguna mejoría. Adicionalmente, Weber-Dąbrowska, Mulczyk & Górski (2001) presentan los resultados de la TDF aplicada en 1307 pacientes con infecciones de la piel causadas por los géneros *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* y la cepa *Staphylococcus aureus*. La terapia fue administrada durante 1-12 semanas con un promedio de 31 días vía oral e *in situ*. En 1123 pacientes, se observó una mejoría completa de las lesiones locales, teniendo un 100% efectividad en meningitis purulenta y forunculosis, adicionalmente, se observó una mejoría transitoria en 134 pacientes. No obstante, en 50 casos de estudio no se presentó mejora alguna. Estos hallazgos confirman la eficacia de la TDF para el tratamiento de infecciones a largo plazo por BMA.

Actualmente se ha retomado la TDF en occidente para el tratamiento de enfermedades por BMA. Wright et al. (2009), reportaron el primer ensayo clínico controlado para el tratamiento de *P. aeruginosa* resistente con el empleo de un coctel de 6 fagos. Międzybrodzki et al. (2012) realizaron un resumen de los

hallazgos de la TDF en 153 pacientes infectados con BMA en un periodo del 2008-2010 en el Instituto Hirsfeld de Terapia Experimental e Inmunología, donde reportan un total de 28 pacientes curados completamente, mientras que 59 pacientes presentaron una buena respuesta al tratamiento.

Zhvanina et al. 2017 reportan el caso de un paciente de 16 años con síndrome de Netherton con una infección estafilocócica persistente durante 4 años, la cual era multirresistente. La situación del paciente era complicada dada su alergia a múltiples antibióticos ( $\beta$ -lactámicos, cefalosporinas y macrólidos), por lo cual, fue candidato para TDF con los cocteles *Staphylococcus* Sb1 y *Pyobacteriophage*. Siete días post tratamiento (40 días totales), la sintomatología de la infección fue erradicada. A pesar de que la cepa generó resistencia al coctel *Pyobacteriophage*, se logró resolver la infección al aplicar el coctel Fersis. Tras 6 meses de observación, el paciente continuó sin desarrollar anomalías clínicas y no volvió a requerir hospitalización después del inicio de la terapia.

Schooley et al. (2017) desarrollaron una TDF personalizada para un paciente de 68 años con diabetes, pancreatitis necrotizante complicada y una infección de *Acinetobacter baumannii*. Al paciente se le administró por vía intravenosa y percutánea un coctel de 9 bacteriófagos (AB-Navy1, AB-Navy4, AB-Navy71, AB-Navy97, AbTP3 $\Phi$ 1, C1P12, C2P21, C2P24, y AC4). La TDF aplicada se asoció con una mejoría clínica del paciente, así como la erradicación de la infección y la recuperación de salud.

Dedrick et al, (2019) aplicaron un coctel de 3 bacteriófagos genéticamente modificados vía intravenosa para tratar a una paciente de 15 años con una infección crónica de *P. aeruginosa* y una infección diseminada de *M. abscessus*.

Posterior a la TDF, se mejoró el estatus clínico del paciente, se erradicó la infección de *M. abscessus*, y se comprobó la propagación sistémica de los fagos.

Maddocks et al. (2019) reportaron la resolución de una infección pulmonar necrotizante causada por *P. aeruginosa* multirresistente en un paciente de 77 años con el coctel de fagos AB-PAO1. Cuatro días post tratamiento, se resensibilizó la cepa y el paciente logró salir de cuidados intensivos. Finalizada la terapia, el paciente fue dado de alta sin volver a presentar signos de infección de la cepa post terapia.

El trasplante de pulmón es un procedimiento necesario en enfermedades pulmonares en etapa terminal, por lo que, el uso profiláctico de antibióticos previo a una cirugía es ampliamente utilizado para prevenir el riesgo de una infección por BMA (Bratzler et al., 2013). No obstante, estas infecciones son las principales complicaciones post trasplante pulmonar, causando al menos el 50% de las muertes de los receptores del trasplante (Ramaprasad & Pursell, 2016) aún y cuando se emplearon antibióticos como medidas profilácticas. Como alternativa a estos hechos, se ha propuesto y determinado el potencial profiláctico de la TDF en modelos de estudios (Ding et al., 2018) y en humanos.

Courtwright et al. (2019) por medio de TDF con el coctel AB-PAO1 y Navy 2 eliminaron infecciones pulmonares causadas por *P. aeruginosa* multirresistente en 3 candidatos a trasplante de pulmón que padecían fibrosis quística y neumonía, de los cuales 2 eran dependientes de ventilación mecánica. La TDF fue administrada vía intravenosa e inhalada de 2-4 semanas. Finalizada la terapia, las infecciones de *P. aeruginosa* multirresistente fueron eliminadas, sin

ningún signo de reinfección por la cepa, por lo cual se procedió a realizar los trasplantes pulmonares.

## CAPÍTULO 3

### HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

#### 3.1 Hipótesis

Los bacteriófagos aislados y caracterizados de aguas residuales del área metropolitana de Monterrey tienen un efecto lítico contra aislados clínicos multirresistentes de *P. aeruginosa* y *S. aureus*.

#### 3.2 Objetivos

##### 3.2.1 Objetivo general:

Caracterizar bacteriófagos aislados de aguas residuales con potencial uso en terapia de fagos y evaluar su capacidad lítica sobre *P. aeruginosa* y *S. aureus* multirresistentes.

##### 3.2.2 Objetivos específicos

1. Aislar los fagos de muestras de agua residual con filtros de 0.22  $\mu\text{m}$ .
2. Determinar el efecto lítico y el título viral de los fagos aislados en las cepas clínicas *P. aeruginosa* y *S. aureus* por la técnica de agar de doble capa.
3. Secuenciar los genomas virales por medio de secuenciación de nueva generación de Illumina.

## CAPITULO 4

### METODOLOGÍA

#### 4.1. Estrategia general

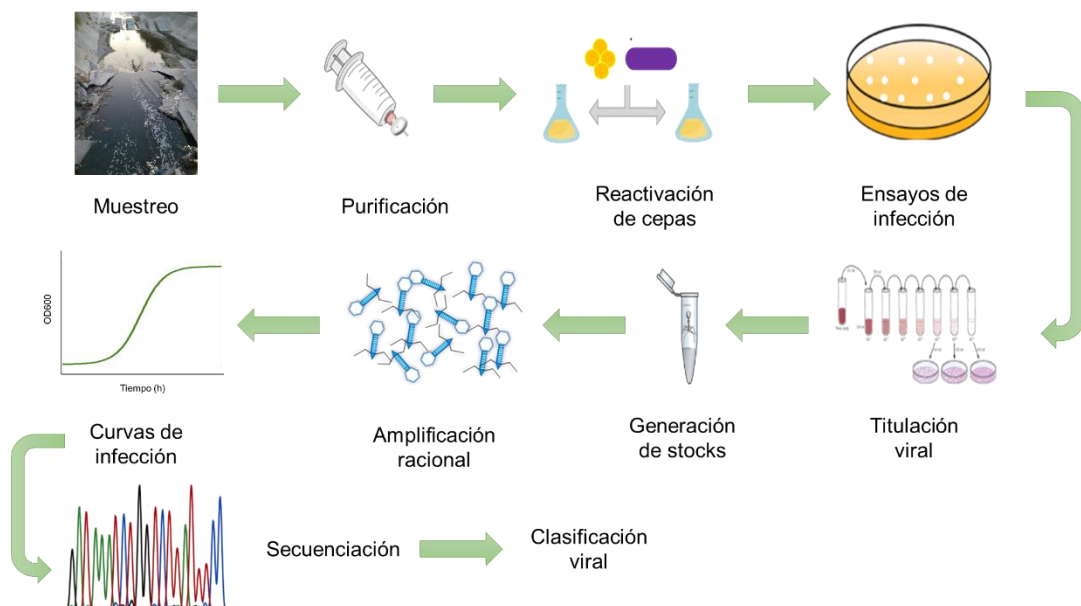


Figura 4. Estrategia general del proyecto de investigación.

#### 4.2. Propagación de cepas de interés

Previamente 2 aislados clínicos multirresistentes *Staphylococcus aureus* (SaR) y *Pseudomonas aeruginosa* (PaR) fueron donados amablemente al laboratorio por la responsable del departamento de bacteriología del hospital San Vicente de Monterrey, Nuevo León, México. Los stock de trabajo se realizaron inoculando 200 µl del stock almacenado de cada cepa en 5 mL de caldo LB, se

incubaron durante 16 h, 37°C a 150 rpm. Finalizada la incubación, las cepas se almacenaron a 4°C hasta su previo uso.

#### **4.3. Toma de muestra Arroyo Topo Chico**

Diez muestras de 15 ml de agua fueron colectadas del Arroyo Topo Chico en el cruce de Av. Universidad y Av. Jorge Treviño en tubos de 50 mL (*Nest*) nuevos y estériles. El muestreo se realizó a las 8:00 am, a 13°C con un 78% humedad relativa. Previo a la toma de muestra, los tubos colectores fueron lavados 3 veces con el efluente del arroyo. Posteriormente, las muestras fueron transportadas en refrigeración hasta su manipulación en el laboratorio.

#### **4.4. Enriquecimiento y procesamiento de las muestras**

Las muestras fueron enriquecidas en 5 mL de caldo LB (*Difco*), se incubaron por 2 h en agitación a 150 rpm. Finalizado el tiempo de incubación, se reposaron 1 h a 4 °C para posteriormente filtrar el volumen total con filtros de 0.22 µm (*Whatman*). El volumen filtrado se dispuso en tubos de 15 mL (*Nest*) nuevos y estériles los cuales se almacenaron a 4 °C hasta su posterior uso.

#### **4.5. Aislamiento de bacteriófagos por agar de doble capa (DLA).**

El preinóculo de la cepa *PaR* se realizó conforme a lo descrito en el apartado 4.2. El inóculo de trabajo se llevó a cabo diluyendo 1:20 el preinóculo en caldo LB, posteriormente se incubó a 37 °C a 150 rpm hasta lograr una densidad óptica ( $OD_{600nm}$ )  $0.6\pm 0.02$ . A partir de esto, se realizó la técnica de DLA reportada por Adams (1959), con algunas modificaciones. Brevemente, se tomaron e inocularon 125 µl de la cepa en 10 tubos de 15 mL (*Nest*), los cuales contenían 500 µl de las muestras purificadas del apartado 4.4 (1 tubo por

muestra); la mezcla se incubó por 20 minutos para posteriormente depositar 5 mL de agar LB (agar 0.5%) suplementado con CaCl<sub>2</sub> 5 mM. El volumen se mezcló 3 veces por inversión y se vertió en placas Petri con agar base LB (agar 2%); solidificado el agar, las placas fueron incubadas invertidamente a 37 °C durante 24 h. Finalizado el tiempo de incubación, once zonas turbulentas (placas líticas) fueron colectadas punzando el agar con una punta amarilla estéril e inmediatamente, se resuspendieron en buffer SM (NaCl 100 mM; MgSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O 8 mM; Tris-HCl pH 7.5 50 mM), subsiguientemente se almacenaron a 4 °C hasta su posterior uso.

#### **4.6. Ensayos de confirmación viral (“spot-test”) por DLA.**

El preinóculo y el inóculo de trabajo de la cepa *PaR* se realizaron según lo determinado en los apartados 4.2 y 4.5 respectivamente. Partiendo del inóculo de trabajo, se depositaron 125 µl de la cepa *PaR* en un tubo *Nest* de 15 mL al cual se le agregó 5 ml de agar suave LB (agar 0.5%) suplementado con CaCl<sub>2</sub> 5 mM, el volumen se mezcló 3 veces por inversión y se vertió en una placa Petri con agar base LB (agar 2%). Solidificado el agar, 10 µl de cada una de las once placa líticas recolectadas en el apartado 4.5 fueron depositados encima del agar doble capa, como control (-) se añadieron 10 µl de buffer SM sobre el agar. Las placas Petri se dejaron incubar por 30 minutos para posteriormente incubarlas a 37 °C por 16 h. Finalizado la incubación, las placas líticas obtenidas fueron recolectadas punzando el agar con una punta amarilla estéril e inmediatamente, se resuspendieron en buffer SM y subsiguientemente se almacenaron a 4 °C hasta su posterior uso.



#### **4.7. Cuantificación de los títulos virales por DLA.**

El cultivo de la cepa *PaR* se realizó conforme lo predispuesto en la sección 4.6. Lograda la densidad óptica deseada, se depositaron 125 µl de la cepa en 24 tubos de 15 mL (*Corning*). Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas ( $10^{-1}$ - $10^{-8}$ ) de los fagos M7-1; M8-2 y M8-3 en buffer SM (100 µl volumen final). A partir de esto, se añadieron 10 µl de cada dilución en los tubos que contenían la cepa, la mezcla se dejó incubar por 20 minutos para permitir la adsorción del fago; posteriormente se agregaron 5 ml de agar suave LB (agar 0.5%) suplementado con CaCl<sub>2</sub> 25 mM en cada tubo. El volumen se mezcló 3 veces por inversión y se vertió en placas Petri con agar base LB (agar 2%); solidificado el agar, las placas fueron incubadas invertidamente a 37 °C por 16 h. Finalizado el tiempo de incubación, se realizó el conteo de las unidades formadoras de placa (UFP) en las diluciones que presentan de 20-200 UFP por placa Petri para determinar el título viral empleando la siguiente fórmula:

$$UFP \cdot ml^{-1} = \frac{UFP \text{ en placa}}{Vol. de la dilución \text{ en } \mu l \text{ agregado}} \times \frac{1000 \mu l}{1 mL} \times \text{Factor de dilución}$$

#### **4.8. Producción de poblaciones clonales virales.**

A partir de la última dilución seriada que presentó UFP en el apartado 4.7 se colectó una sola placa lítica de los fagos M8-2 y M8-3 punzando el agar con una punta amarilla estéril, estas placas inmediatamente se resuspendieron en buffer SM y subsiguientemente se almacenaron a 4 °C hasta su posterior uso. Para lograr una sola población clonal de cada fago, el proceso de dilución, titulación y colecta se repitió 3 veces más.

#### **4.9. Reactivación de cepas *PaR* y *P. aeruginosa* ATCC-27853**

Posterior al tiempo de cuarentena por COVID-19 y el regreso autorizado al laboratorio, se reactivaron los stock de almacenamiento a -70 °C de la cepas *PaR* y *P. aeruginosa* ATCC-27853 (PA). Se inocularon 200 µl de cada cultivo glicerinado en 5 mL de caldo LB. El cultivo se dejó incubar por 20 h a 37 °C a 150 rpm. Así mismo, se realizaron estriados en 4 cuadrantes de cada cultivo en placas Petri con agar LB (agar 2%), las cuales se incubaron invertidamente por 20 h a 37 °C. Finalizado el tiempo de incubación, los cultivos líquidos y placas Petri se almacenaron a 4 °C hasta su posterior uso.

#### **4.10. Reactivación de stocks virales en cepas *PaR* y *PA*.**

Los stocks virales generados en el apartado 4.8 fueron reactivados con la cepa *PaR*. El preinóculo de la cepa se realizó inoculando 200 µl del stock de trabajo generado en el apartado 4.9 en 5 mL de caldo LB. El cultivo se incubó por 20 h, 37°C a 150 rpm. El inóculo de trabajo se generó diluyendo el preinóculo 1:10 en caldo LB, posteriormente el cultivo se incubó a 37 °C a 150 rpm hasta lograr una densidad óptica (OD<sub>600</sub>) 0.6±0.02. A partir de esto, se realizó el ensayo de spot-test por la técnica de DLA según lo descrito en el apartado 4.6, aumentando el tiempo de incubación a 20 h. Finalizado el tiempo de incubación, el título viral se cuantificó conforme a lo determinado en el apartado 4.7. Posteriormente, se generaron poblaciones clonales de cada muestra según lo determinado en el apartado 4.8. Una vez generada la población clonal, los fagos fueron propagados en la cepa PA siguiendo los parámetros establecidos anteriormente con la cepa *PaR*.

#### **4.11. Amplificación de bacteriófagos por placa lisada.**

El preinóculo e inóculo de trabajo de la cepa *PA* se realizaron según lo determinado en el apartado 4.10. A partir de este cultivo, se realizó un ensayo de DLA del stock de los fagos M8-2 y M8-3 siguiendo la metodología reportada por Bonilla et al. (2016) con algunas modificaciones. Brevemente, se inocularon 125  $\mu$ l de la cepa *PA* en tubos 15 mL (*Nest*) a los cuales se les agregaron 10  $\mu$ l de cada fago reactivado en la sección 4.10. La mezcla se incubó por 20 minutos para permitir la adsorción del fago; posteriormente se agregaron 3 ml de agar suave LB (agar 0.5%) suplementado con  $\text{CaCl}_2$  5 mM y  $\text{MgCl}_2$  5 mM. El volumen se mezcló 3 veces por inversión y se vertió en placas Petri con agar base LB (agar 2%); una vez solidificado el agar, las placas fueron incubadas verticalmente a 37 °C durante 24 h. Finalizado el tiempo de incubación, el agar suave se colectó y dispuso en tubos de 50 mL los cuales contenían 3 ml de buffer SM suplementado con  $\text{CaCl}_2$  5 mM y  $\text{MgCl}_2$  5 mM. Los tubos fueron mezclados por vortex 10 s y se centrifugaron a 4,000 g  $\times$  20 minutos a 4 °C. El sobrenadante se colectó y filtró con filtros de 0.22  $\mu$ m (*Whatman*). Posteriormente, el título viral fue cuantificado conforme a lo determinado en el apartado 4.7. Finalizada la incubación, las placas Petri se almacenaron a 4 °C hasta su posterior uso. Adicionalmente, se realizó una titulación viral por spot-test en DLA de ambas muestras. Brevemente, el preinóculo e inóculo de trabajo se realizó conforme a lo descrito en la sección 4.10. Una vez obtenido el inóculo de trabajo, este se manipuló según lo determinado en el apartado 4.6. Continuamente, se realizaron diluciones seriadas de  $10^{-1}$ - $10^{-6}$  (de cada factor de dilución de ambas muestras) en buffer SM (100  $\mu$ l volumen final). Solidificado el agar, 10  $\mu$ l de cada dilución

fueron depositados encima del agar doble capa. Las placas Petri se incubaron por 30 minutos para posteriormente incubarlas de manera invertida a 37 °C por 20 h. Finalmente, el título viral fue cuantificado conforme a lo determinado en el apartado 4.7.

#### **4.12. Determinación de dilución óptima con mejores rendimientos virales vía placa lisada.**

El agar suave de las placas Petri correspondientes al título viral de ambas muestras generado en el apartado 4.11 (cada placa Petri correspondiente a un factor de dilución dado) fue colectado y dispuesto en tubos de 50 mL (*Corning*), los cuales contenían 3 ml de buffer SM suplementado con CaCl<sub>2</sub> 5 mM y MgCl<sub>2</sub> 5 mM. Los tubos fueron mezclados por vortex 10 s y centrifugados a 4,000 g × 20 minutos a 4 °C. El sobrenadante de cada tubo correspondiente a un factor de dilución de cada muestra se colectó y filtró con filtros de 0.22 µm (*Whatman*). Posteriormente, se cuantificó la concentración viral por triplicado en cada uno de los factores de dilución de ambas muestras por la técnica de DLA según lo determinado en el apartado 4.11. El rendimiento viral se determinó relacionando las UFP presentes en cada placa de titulación del apartado 4.11 con respecto a la concentración viral total presente en estas placa lisada (correspondiente a un factor de dilución).

#### **4.13. Amplificación racional de bacteriófagos vía placa lisada**

Se realizaron los preinóculos e inóculos de la cepa PA según lo determinado en el apartado 4.10. A partir de esto, se inocularon 1250 µl del cultivo en 2 tubos de 50 mL (*Nest*) los cuales contenían 100 µl de los fagos M8-2 y M8-

3 diluidos en un factor de dilución  $10^{-1}$ , esta mezcla se incubó por 20 minutos para permitir la adsorción del fago. Continuamente, 30 mL de agar suave LB (agar 0.5%) suplementado con  $\text{CaCl}_2$  25 mM y  $\text{MgCl}_2$  25 mM fueron depositados en cada tubo. El volumen fue mezclado 3 veces por inversión, posteriormente, 3 mL de la mezcla fueron depositados en 10 placas Petri (para cada muestra) con agar base LB (agar 2%). Posteriormente, las placas Petri fueron incubadas verticalmente a  $37\text{ }^\circ\text{C}$  por 20 h. Al concluir el tiempo de incubación, el agar suave de las 10 placas de cada muestra fue colectado en 1 tubo de 50 mL (*Corning*), continuamente, las muestras se procesaron conforme los parámetros determinados en la sección 4.11 para posteriormente cuantificar el título viral por la técnica DLA según lo determinado en la sección 4.12

#### **4.13. Conteo de células viables en placa (UFC)**

La concentración bacteriana de la cepa PA tanto en los preinóculos como en los inóculos de trabajo fue determinada mediante cuenta viable en placa. Brevemente, se realizó un preinóculo de la cepa en 5 mL de caldo LB, el cual se incubó a  $37\text{ }^\circ\text{C}$  a 150 rpm por 20 h. Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas ( $10^{-2}$  a  $10^{-8}$ ) de 1 mL del cultivo en tubos de 15 mL (*Neptune*) nuevos y estériles con 9 mL de buffer de fosfatos (*Gibco, Invitrogen*). Se inoculó por duplicado 1 mL de cada dilución en tubos 15 mL (*Neptune*), a los cuales se les agregaron 10 mL de agar LB (agar 2%). El volumen se mezcló por inversión y se vertió sobre placas Petri; secado el agar se incubaron las placas por 24 h de manera invertida. Adicionalmente, se realizó un preinóculo de la cepa diluyendo 1:10 el cultivo en caldo LB, se incubó el cultivo a  $37\text{ }^\circ\text{C}$  a 150 rpm hasta lograr

una densidad óptica ( $OD_{600nm}$ )  $0.6 \pm 0.2$ . A partir de esto, el cultivo fue procesado como se describió anteriormente para realizar la cuenta viable en placa. Finalizado el tiempo de incubación, se seleccionaron los duplicados de las diluciones que presentaron un total de 30-300 colonias para realizar el conteo en placa con la siguiente fórmula:

$$UFC \cdot ml^{-1} = \frac{\text{Promedio del \# colonias en ambas placas} \times \text{Factor de dilución}}{\text{Volumen de cultivo plaqueado}}$$

#### **4.14. Co-cultivos de Fagos con PA**

Se realizó un preinóculo de la cepa PA en 5 mL de caldo LB, el cual se incubó a 37 °C a 150 rpm por 20 h. Posteriormente, se realizó un inóculo de la cepa diluyendo 1:10 el preinóculo en caldo LB suplementado con  $CaCl_2$  5 mM y  $MgCl_2$  5 mM, el cultivo se incubó a 37 °C a 150 rpm hasta lograr una densidad óptica ( $OD_{600nm}$ )  $0.6 \pm 0.2$ . A partir de esto, se realizaron ensayos de infección en microplaca de 96 pocillos (*Corning*) por triplicado a diferentes multiplicidades de infección (MOI) de 10, 1 y 0.1 para el fago M8-3. La microplaca fue incubada de manera estática a 37 °C con 10 s de agitación antes de la medición de la  $OD_{600}$  cada hora durante 21 h en el lector de microplacas MultiskanGo (*Thermo Fisher*) para determinar la dinámica de crecimiento de la cepa en presencia de fagos a bajas MOI.

#### **4.15. Amplificación racional de bacteriófagos en cultivos por lote.**

Se realizaron los preinóculos e inóculos de la cepa PA según lo determinado en la apartado 4.10. A partir del inóculo, se prepararon ensayos de infección para ambos fagos (M8-2 y M8-3) a una MOI de 0.1. La mezcla fago-bacteria se dejó incubar por 15 minutos, finalizado el tiempo de incubación, la

mezcla de cada ensayo fue inoculada en un matraz con 750 mL de caldo LB suplementado con CaCl<sub>2</sub> 5 mM y MgCl<sub>2</sub> 5 mM. Los matraces fueron incubados por 20 h a 37 °C a 150 rpm. Finalizado el tiempo de incubación, se agregó a cada matraz 1 mL de cloroformo por cada 100 mL de cultivo. Nuevamente, se dejaron los matraces en agitación a 150 rpm × 10 minutos a 37°C. Posteriormente, el cultivo fue eliminado por centrifugación a 4,000 g × 20 minutos a 25 °C. Finalmente, los sobrenadantes de ambos ensayos fueron transferidos en matraces de 1 L estériles para su almacenamiento a 4 °C hasta su posterior uso.

#### **4.16. Concentración de las partículas virales.**

Las partículas virales generadas apartado 4.15 fueron concentradas empleando la metodología propuesta por Armon, Arella & Payment (1988) con algunas modificaciones. Brevemente, se agregó a cada matraz Tween 80 al 3% (v/v) y (NH<sub>4</sub>)SO<sub>4</sub> al 35% (m/v). La mezcla se agitó a 2,000 rpm hasta la solubilización del (NH<sub>4</sub>)SO<sub>4</sub>. Posteriormente, el volumen total fue centrifugado a 3,000 g × 20 minutos a 4 °C. Finalizado el proceso de centrifugación, la película formada en la fracción superior del sobrenadante fue recuperada y transferida a frascos de vidrio (*Pyrex*) de 250 mL. Posteriormente, las películas fueron resuspendidas en 50 mL de Buffer SM y se cuantificó el título viral de cada fago concentrado según lo establecido en el apartado 4.7.

#### **4.17. Tratamiento de las partículas virales para SDS-PAGE y extracción de ADN viral.**

Previo al proceso de SDS-PAGE y de extracción de ADN viral, se realizó un tratamiento de las muestras virales según lo reportado por Kerketta et al.

(2014) con algunas modificaciones. Diez mililitros de cada stock viral generados en el apartado 4.16 fueron esterilizados con filtros de 0.22  $\mu\text{m}$  (*Whatman*). El volumen filtrado fue recolectado en tubos de 50 mL (*Nest*) nuevos y estériles a los cuales se les agrego 4 volúmenes de acetona previamente enfriada a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Los tubos se envolvieron en aluminio y se dejaron incubar por 1 h a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Finalizado el tiempo de incubación, el volumen total fue centrifugado a  $5,000\text{ g} \times 20$  minutos a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , este proceso se repitió 2 veces más. Finalizado el proceso de centrifugación, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla viral en 1 mL de buffer SM. Posteriormente, los fagos resuspendidos fueron dializados en 2 etapas continuas empleando una membrana de diálisis de 34 mm (*Biobasic*) con valor de corte de 14 KDa. En ambas etapas, la diálisis se llevó a cabo en relación 1:1000 en buffer SM (previamente enfriado a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) y en agitación magnética a 200 rpm a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . La primera etapa de diálisis se realizó por 24 h, al término de esta, se reemplazó el buffer SM para comenzar la segunda etapa de diálisis por 2 h adicionales. Finalizado el proceso, el volumen de las membranas de diálisis de ambos fagos fue transferido a tubos de 1.5 mL para su almacenamiento a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior uso.

#### **4.18. Extracción de ADN viral**

Se empleó 1 mL de cada fago dializado en el apartado anterior para la extracción del ADN viral. Este proceso se realizó por medio del kit Phage DNA Isolation (Norgen Biotek) siguiendo las instrucciones del fabricante. Continuamente, se cuantificó la concentración de ADN por BioSpec-nano



(Shimadzu) y se visualizó la calidad e integridad de las bandas genómicas por electroforesis en gel de agarosa al 0.8%.

#### **4.19. Determinación de proteínas estructurales mediante SDS-PAGE.**

A partir de los fagos dializados en el apartado 14.17 se realizó un SDS-PAGE para la visualización de las proteínas estructurales según lo reportado por Beer & Speicher, (2018) con algunas modificaciones. Brevemente, se depositaron 28  $\mu$ L de cada muestra en tubos de 0.2 mL nuevos y estériles (*Neptune*), los cuales se mezclaron con 4  $\mu$ L de Buffer de carga para SDS 4x (1.5 M Tris pH 6.8; SDS 20%; Glicerol 40%; DTT 0.4 M; Azul de Bromofenol 1% (m/v); H<sub>2</sub>O), la mezcla se calentó a 100 °C por 10 minutos. Se empleó un gel concentrador (4%) y un gel separador (12%) el cual se corrió a 180 Voltz durante 60 minutos. Finalizado el tiempo de corrida, se realizaron 3 lavados del gel con agua bidestilada. De manera continua, se agregó solución de tinción al gel (50% (v/v) de metanol absoluto; 0.1% (p/v) Coomassie brilliant blue R-250 y 10% (v/v) ácido acético absoluto), dejándolo en agitación en el Orbit 1000 (*Labnet*) a 60 rpm toda la noche. Finalizado el tiempo de tinción, se realizaron 3 lavados del gel con agua bidestilada. Posteriormente, se agregó solución de destinción (15% (v/v) metanol absoluto; 10% (v/v) ácido acético absoluto) al gel, el cual se dejó en agitación por 2 horas adicionales en el Orbit 1000.

#### **4.20. Secuenciación de genomas virales por NGS.**

Previo a la secuenciación, el ADN viral de ambos fagos obtenido en el apartado 4.18 fue concentrado. Brevemente, se agregó 1/10 de volumen de

acetato de sodio 3 M pH 5.0 y 3 volúmenes de etanol absoluto (99%) a cada muestra de ADN. Posteriormente la mezcla fue homogenizada por vórtex e incubada a -20 °C por 24 h. Finalizado el tiempo de incubación, se centrifugaron las muestras a 16,000 rpm por 30 minutos, continuamente, el sobrenadante fue decantado para secar por 20 minutos la pastilla formada. Ambas muestras fueron resuspendidas en 20 µL de buffer TE 1x pH 8.0 (Tris-HCl 10 mM; 1mM EDTA•Na<sub>2</sub>). El servicio de secuenciación de nueva generación (NGS) fue realizado por la empresa Macrogen (Seul, Korea). Se solicitó como protocolo de generación de librerías el kit TrueSeq DNA (*Illumina*) con un rendimiento de 1 Gb de datos crudos por genoma.

#### **4.21. Análisis bioinformáticos sobre datos genómicos crudos.**

Todos los análisis bioinformáticos fueron desarrollados en la plataforma Galaxy CPT Public disponible en: <https://cpt.tamu.edu/galaxy-pub> (Ramsey et al., 2020).

##### **4.21.1. Análisis y control de calidad de datos genómicos crudos.**

Para determinar los valores de calidad Phred en ambos archivos de secuenciación crudos, así como la eliminación de adaptadores de secuenciación y el ensamblaje de los genomas, se ejecutaron un set de algoritmos almacenados dentro de un flujo de trabajo (workflow) en Galaxy CTP Public denominado “Phage genome assembler v2021.01”. Previo al método de ensamblaje, se eliminaron las lecturas que se encontraban repetidas, sobrerrepresentadas y aquellas con valores Phred <Q33 empleando la herramienta Trimmomatic

(Bolger, Lohse & Usadel, 2014). En el método de ensamblaje con SPAdes (Bankevich et al., 2012), se ajustó el algoritmo para que ensamblara solo lecturas con un valor Phred >33. Finalizado el proceso, se extrajo del workflow los archivos de contig y scaffold generados, donde se verificó que la longitud de NODES entre ambos archivos fueran similar.

#### **4.21.2. Determinación de homología viral por alineamiento local en MegaBlastn.**

A partir del análisis generado en el apartado 4.21.1. se extrajo el NODE\_1\_ del archivo de los contigs ensamblados para ambos genomas, puesto que en ambos representan el contig más largo con longitudes de 27,610 pb y 27,404pb para los fagos M8-2 y M8-3 respectivamente. Posteriormente, se ejecutó en cada genoma un megaBLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para determinar su porcentaje de similitud con respecto a otros genomas virales reportados, empleando como parámetro de selección un valor de corte en el E-value  $\leq 10^{-10}$ .

#### **4.21.2. Predicción estructural de los marcos de lectura abiertos en los genoma virales.**

Los archivos de los genomas extraídos en el apartado 4.21.1 fueron analizados con el programa DNA Master versión 5.0.2 para aplicar la herramienta bioinformática Glimmer3 para la predicción de los marcos de lectura abierto (ORFs) dentro de ambos genomas, empleando como código genético estándar al reportado para Bacterias y Arqueas, adicionalmente, se agregaron como

posibles codones de inicio las secuencias TTG y GTG. Finalizado el proceso, se creó un mapa genómico de cada fago con sus respectivos ORFs.

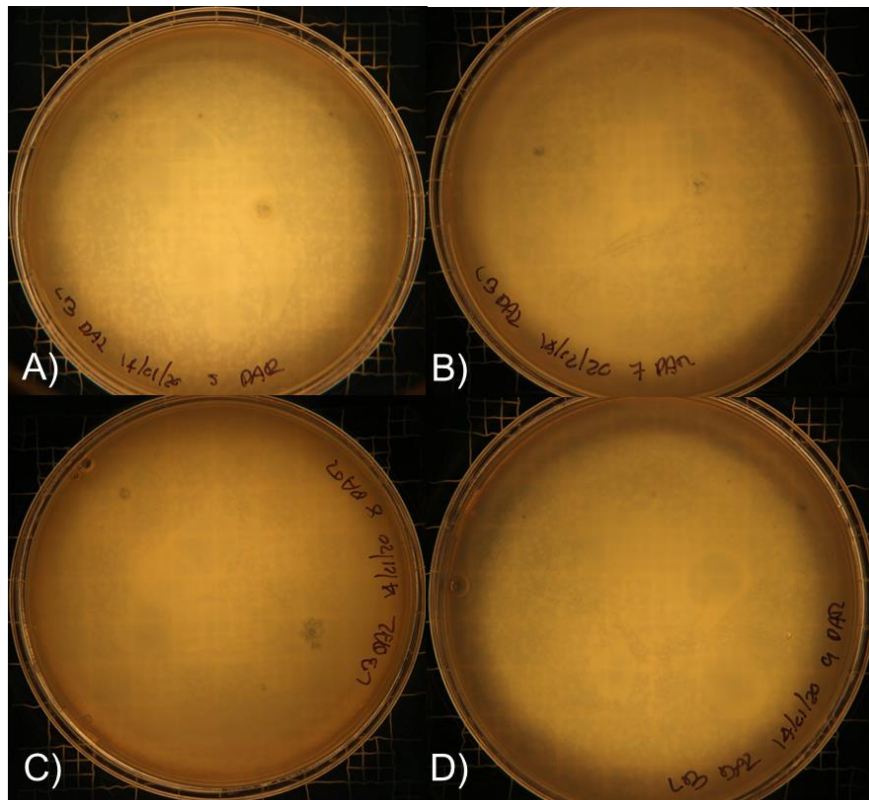
## **CAPITULO 5**

### **RESULTADOS**

#### **5.1 Aislamiento de bacteriófagos por agar de doble capa (DLA).**

A partir de las muestras de agua del Arroyo Topo Chico, se realizaron ensayos de infección con las cepas *PaR* y *SaR* por DLA para determinar la presencia de fagos. Las placas correspondientes al cultivo *PaR* (figura 5)

presentan once placas turbias. Sin embargo, no se obtuvieron resultados en el cultivo SaR.

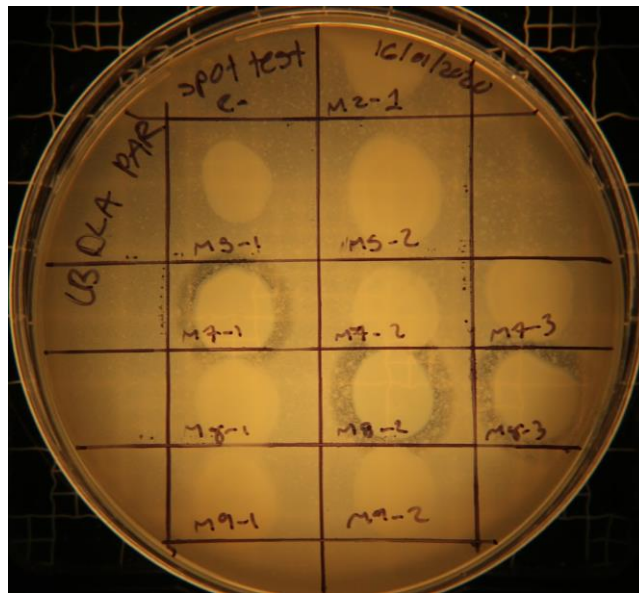


**Figura 5. Ensayo de DLA en *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente. A) Muestra 5; B) Muestra 7; C) Muestra 8 y D) Muestra 9.**

## **5.2 Ensayos de confirmación viral (“spot-test”) por DLA.**

Para determinar si las zonas turbias presentes en la figura 5 son derivadas por la acción de fagos, se realizó un ensayo de spot-test por DLA. En la figura 6 se confirma el aislamiento de 3 fagos específicos contra la cepa *PaR*, presentes en las muestras M7-1; M8-2 y M8-3, dada la zona de inhibición exhibida. Estas placas presentan una mayor densidad celular en el centro de la placa con un margen claro circundante. Adicionalmente, en el ensayo de cada muestra, hay

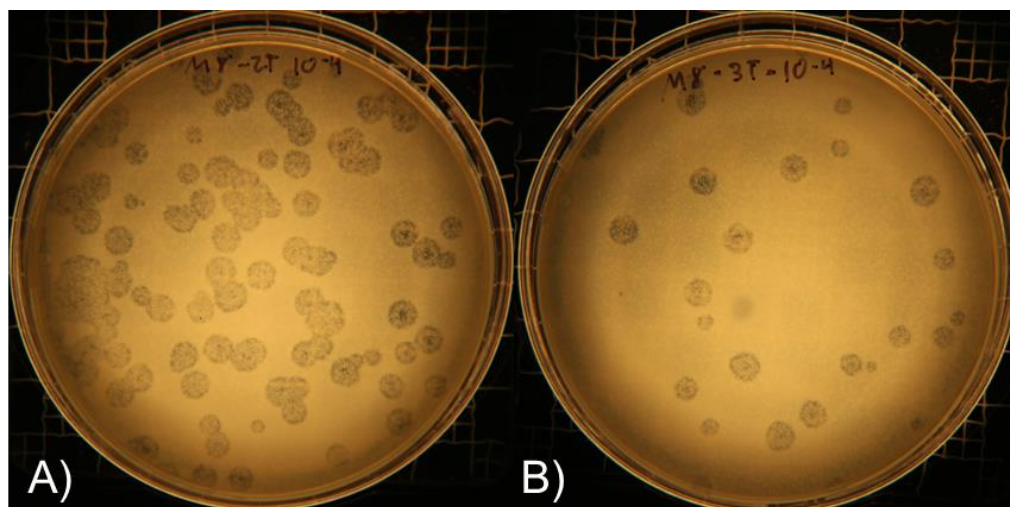
presencia de lisógenos dentro de las zonas de lisis, así como contaminación de la cepa PaR. (Figura 6 y Figura 8A-D).



**Figura 6. Ensayo de spot-test con *P. aeruginosa* multirresistente.** Se confirmó la presencia de fagos temperados en las muestras M7-1; M8-2 y M8-3. Así mismo, las muestras presentan contaminación cruzada de la cepa PaR así como lisógenos dentro de las zonas turbias de lisis.

### 5.3. Infección y titulación de los bacteriófagos

La cuantificación viral de los stock de fagos M7-1; M8-2 y M8-3 se realizó por diluciones seriadas en DLA. Este proceso además de determinar el título viral, permitió el aislamiento de placas líticas homogéneas de cada muestra. El factor de dilución  $10^{-4}$  de los fagos M8-2 (Figura 7A) y M8-3 (Figura 7B) fue seleccionado para el conteo de las UFP (Figura 7). La determinación del título viral se muestra en la Tabla 4.



**Figura 7. Factores de dilución empleados para la determinación del título viral.** A) Fago M8-2; B) Fago M8-3. Dentro de diferentes placas lisogénicas en ambas muestras, se observan un halo de inhibición <1mm de diámetro.

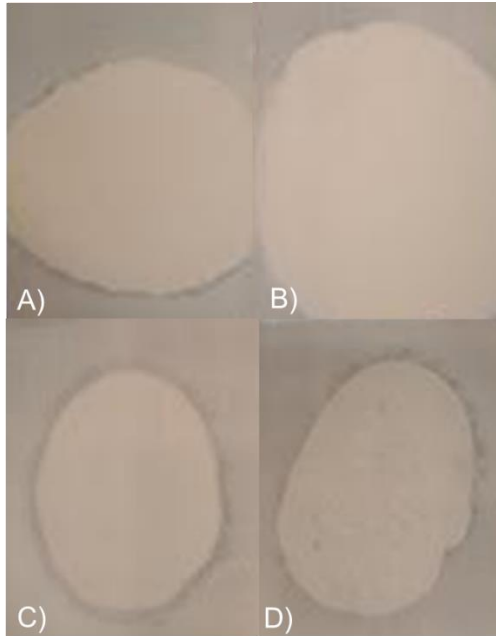
Tabla 4. Determinación del título viral en los stock de fagos.

Fago	UFP	Volumen inoculado	Factor de dilución	Título viral
M8-2	61	10 $\mu$ L	$10^4$	$6.1 \times 10^7$ UFP $\cdot$ ml $^{-1}$
M8-3	26	10 $\mu$ L	$10^4$	$2.6 \times 10^7$ UFP $\cdot$ ml $^{-1}$

#### 5.4. Reactivación de stocks virales en cepas *PaR* y *PA*

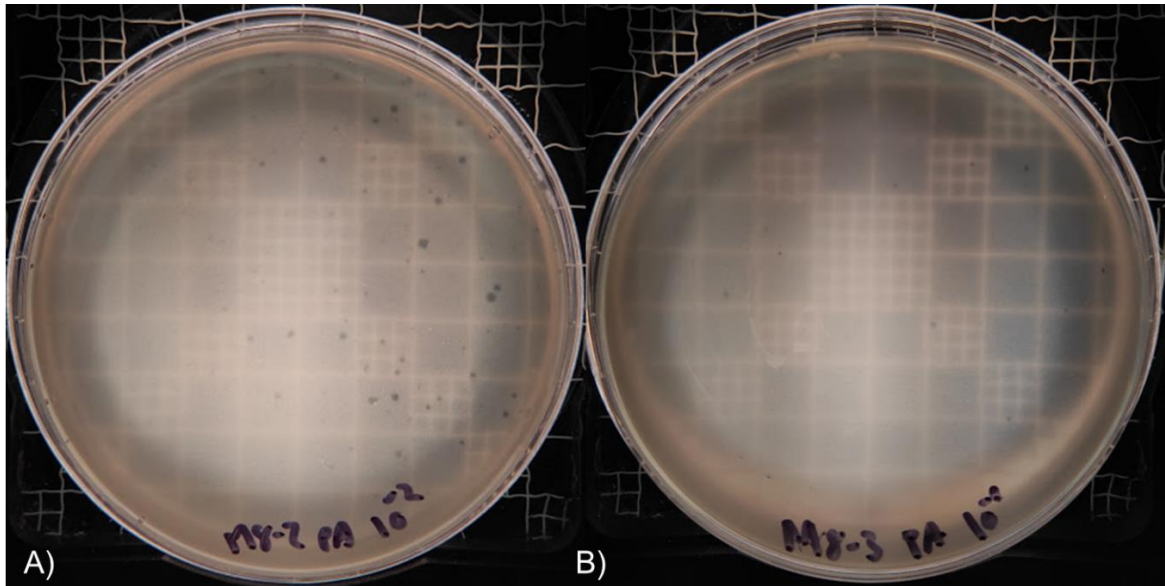
Posterior al tiempo de cuarentena por COVID-19 y el regreso autorizado a los laboratorios, los stock de los fagos se reactivaron por ensayo de spot-test en las cepa *PaR* y *PA*. La figura 8 se muestra el ensayo de spot-test de ambas muestras sobre la cepa *PaR* (Figura 8A y Figura 8B) y *PA* (Figura 8C y Figura

8D) correspondientes a la primera reactivación de los fagos. En ambas muestras se presenta una alta densidad celular tanto dentro y fuera del ensayo. Ambos fagos presentan una baja concentración viral (M8-2:  $9.2 \times 10^5$  UFP $\cdot$ ml $^{-1}$  y M8-3:  $13 \times 10^4$  UFP $\cdot$ ml $^{-1}$ ), puesto que en ambas placas hay números de UFP muy bajos (Figura 9 y Tabla 5).



**Figura 8. Reactivación de bacteriófagos posterior a la cuarentena en las cepas PaR y PA.** Ensayo de spot-test en la cepa PaR de los fagos M8-2 y M8-3 (A y B respectivamente). Ensayos de spot-test en la cepa PA de los fagos M8-2 y M8-3 (C y D respectivamente). Se presenta contaminación cruzada de la cepa PaR de A-D.





**Figura 9. Factores de dilución empleados para la determinación del título viral de fagos reactivados.** A) Fago M8-2; B) Fago M8-3. En ambos factores de dilución, se presentan placas líticas <1mm de diámetro.

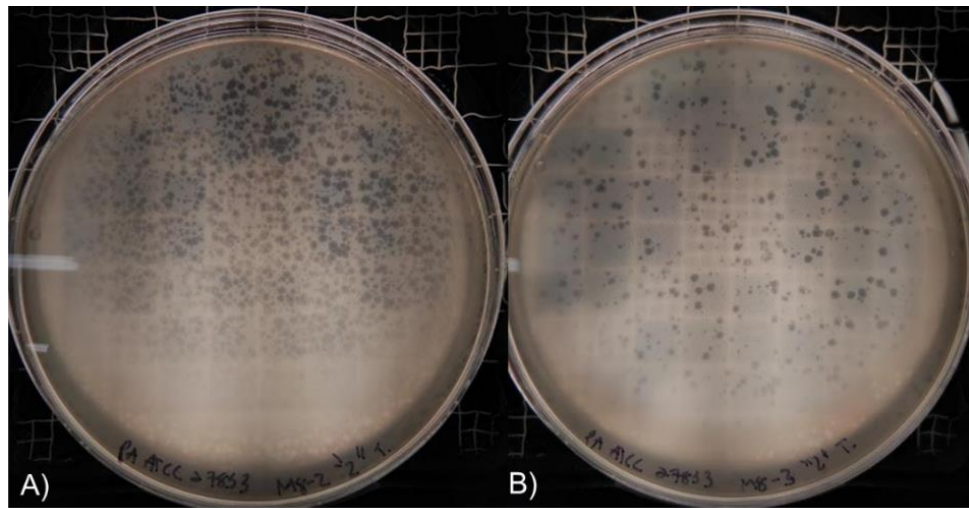
Tabla 5. Determinación del título viral en las muestras de fagos reactivadas.

Fago	UFP	Volumen inoculado	Factor de dilución	Título viral
M8-2	92	10 $\mu$ L	$10^2$	$9.2 \times 10^5$ UFP $\cdot$ ml $^{-1}$
M8-3	13	10 $\mu$ L	$10^1$	$13 \times 10^4$ UFP $\cdot$ ml $^{-1}$

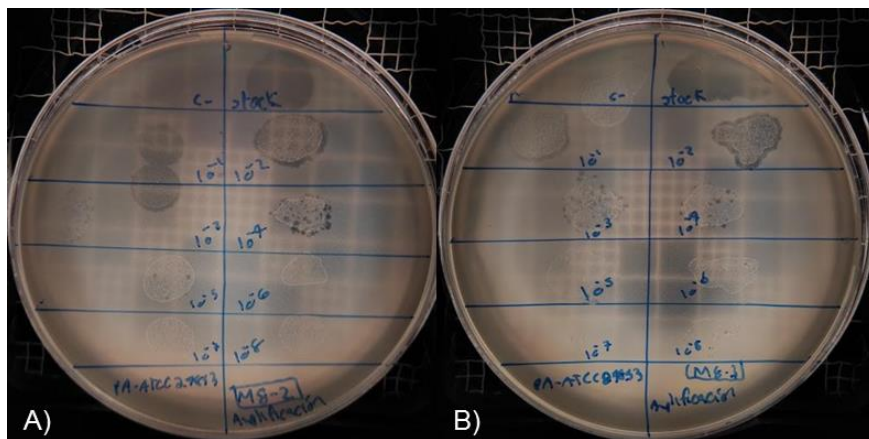
### 5.5. Amplificación de bacteriófagos por placa lisada

Se realizó una amplificación viral en placa lisada para aumentar el título viral de las muestras, así como para obtener una población clonal de fagos. La placa Petri del ensayo DLA de cada muestra presentan una alta formación de UFP totalmente líticas (Figura 10). Partiendo de esto, los fagos en el agar suave

fueron recuperados, filtrados y titulados. En la Figura 11 y Tabla 6 se determina el título viral de ambas muestras. El fago M8-2 posterior a esta ronda de amplificación presenta un título viral de  $4.2 \times 10^7$  UFP $\cdot$ ml $^{-1}$ . Por otra parte, el título viral del fago M8-3 es de  $3.0 \times 10^7$  UFP $\cdot$ ml $^{-1}$ . La población clonal del stock de fagos M8-2 (Figura 11A “stock”) y M8-3 (Figura 11B “stock”) sobre la cepa PA se presenta un halo total de inhibición, así mismo presentan los mejores rendimientos virales para la amplificación de fagos (Figura 12 y Figura 13).



**Figura 10. Amplificación de bacteriófagos por placa lisada en cepa PA.** A) Placas líticas sin confluencia correspondientes al fago M8-2. B) Placas líticas sin confluencia correspondientes al fago M8-3.



**Figura 11. Titulación viral de las muestras amplificadas por placa lisada en la cepa PA.** A) Fago M8-2; B) Fago M8-3. La población clonal de fagos M8-2 (“stock”) y M8-3 (“stock”) presenta un halo de inhibición 100% lítico a diferencia de los demás factores de dilución sobre cepa PA.

Tabla 6. Determinación del título viral en las muestras amplificadas por placa lisada en la cepa PA.

Fago	UFP	Volumen inoculado	Factor de dilución	Título viral
M8-2	42	10 µL	10 <sup>4</sup>	4.2×10 <sup>7</sup> UFP•ml <sup>-1</sup>
M8-3	13	10 µL	10 <sup>4</sup>	3.0×10 <sup>7</sup> UFP•ml <sup>-1</sup>

### 5.6. Determinación de dilución óptima con mejores rendimientos virales vía placa lisada

A partir de los stock de las muestras generadas en el apartado 4.11, se realizaron ensayos de titulación por DLA, en los cuales todos los fagos presentes en el agar suave en los diferentes factores de dilución fueron recuperados y titulados de nuevo con el fin de realizar una amplificación racional. En este proceso, se determinó la cantidad de fagos necesaria para lograr lisar una mayor cantidad de huésped sin su completa erradicación, de modo que cada fago presente en la muestra tenga la posibilidad de infectar a una bacteria.

Los resultados de la amplificación racional de los fagos M8-2 y M8-3 se describen la Figura 12, Figura 13 respectivamente. Los fagos recuperados del

factor de dilución  $10^1$  [ $4.1 \times 10^6$  UFP $\cdot$ ml $^{-1}$ ] de M8-2 generada en el apartado 4.11 exhiben un rendimiento máximo de  $1.3 \times 10^8$  UFP $\cdot$ ml $^{-1}$  (Figura 12). La prueba de Tueky ( $\alpha = 0.05\%$ ) determina que el rendimiento obtenido al emplear una concentración viral alta en los ensayos de amplificación es significativamente diferente con respecto al rendimiento obtenido a una concentración viral baja  $\leq 4.1 \times 10^4$  UFP $\cdot$ ml $^{-1}$  (Apéndice 1).

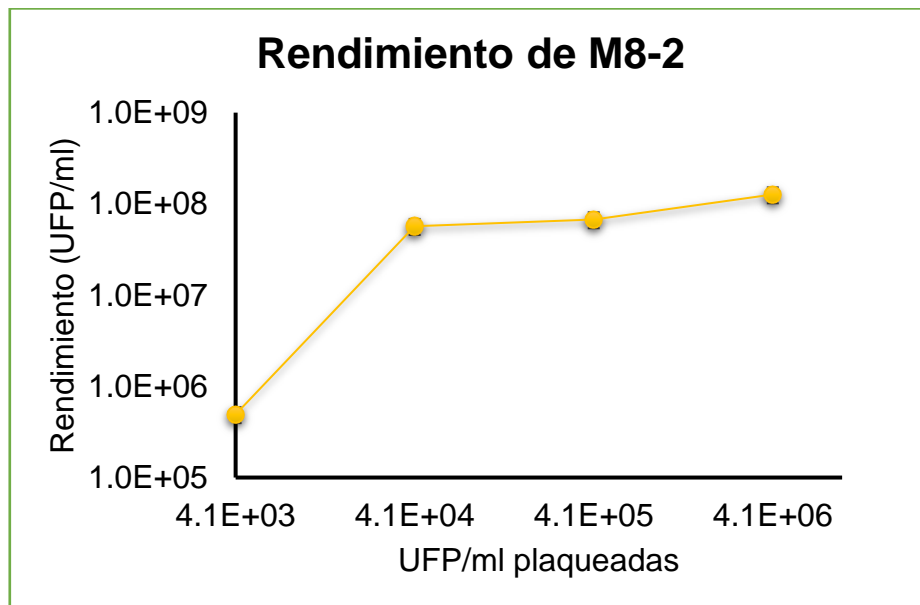


Figura 12. Determinación de dilución óptima que genera máximos rendimientos virales en el fago M8-2. El plaqueo  $4.1 \times 10^6$  UFP $\cdot$ ml $^{-1}$  en los ensayos de amplificación viral generan un rendimiento máximo de  $1.3 \times 10^8$  UFP $\cdot$ ml $^{-1}$ . Las barras de error representan la desviación estándar. Cada experimento se realizó por triplicado.

Por otra parte, los fagos recuperados del factor de dilución  $10^1$  (concentración viral  $3.1 \times 10^6$  UFP $\cdot$ ml $^{-1}$ ) de M8-3 generada en el apartado 4.11 exhiben un rendimiento máximo de  $4.5 \times 10^7$  UFP $\cdot$ ml $^{-1}$  (Figura 13). De igual forma la prueba de Tueky ( $\alpha = 0.05\%$ ) determina que el rendimiento obtenido al emplear

una concentración viral alta en los ensayos de amplificación es significativamente diferente con respecto al rendimiento obtenido a una concentración viral baja  $\leq 3.6 \times 10^4$  UFP $\cdot$ ml $^{-1}$  (Apéndice 2).

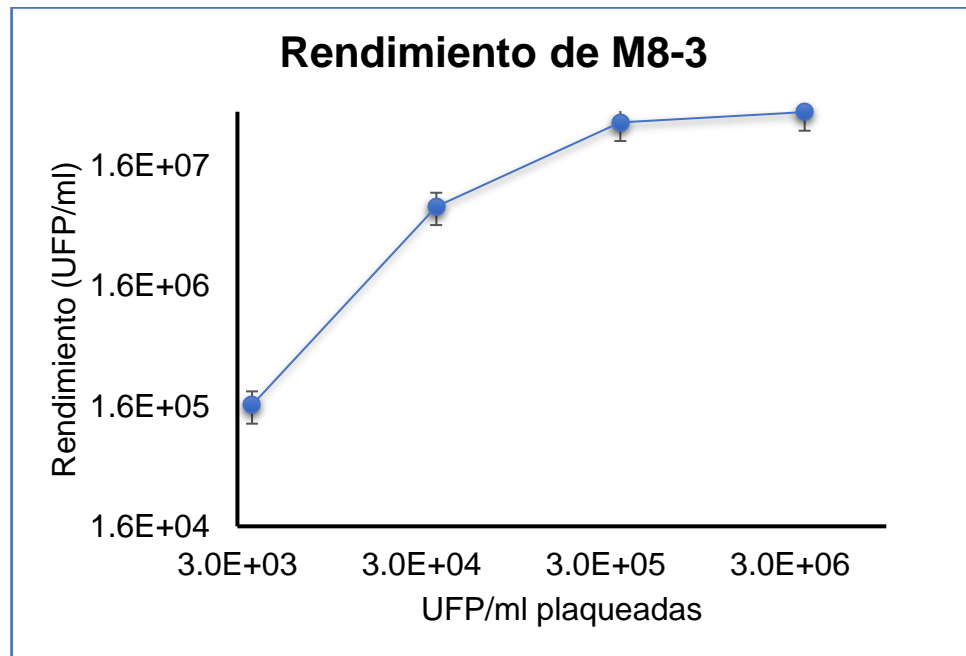


Figura 13. Determinación de dilución óptima que genera máximos rendimientos virales en el fago M8-3. El plaqueo de  $3.1 \times 10^6$  UFP $\cdot$ ml $^{-1}$  en los ensayos de infección viral generan un rendimiento máximo viral de  $4.5 \times 10^7$  UFP $\cdot$ ml $^{-1}$ . Las barras de error representan la desviación estándar. Cada experimento se realizó por triplicado.

### 5.7. Co-cultivos de Fagos con PA

Para determinar si la cantidad de células empleadas durante los ensayos de infección promueve el proceso de lisogenia por parte de los fagos, se realizó una curva infectiva de la cepa PA en fase media logarítmica ( $OD_{600} = 6.5 \times 10^8$  UFC $\cdot$ ml $^{-1}$ ). La curva infectiva del fago M8-3 se presenta en la Figura 14. El cultivo PA en presencia de fagos en las 3 MOI empleadas, presenta un desfase en el

crecimiento estadísticamente significativo con respecto al control (Tukey  $\alpha=0.05$ ; Apéndice 2). Adicionalmente, las curvas de crecimiento de todas las MOI presentan un crecimiento lineal.

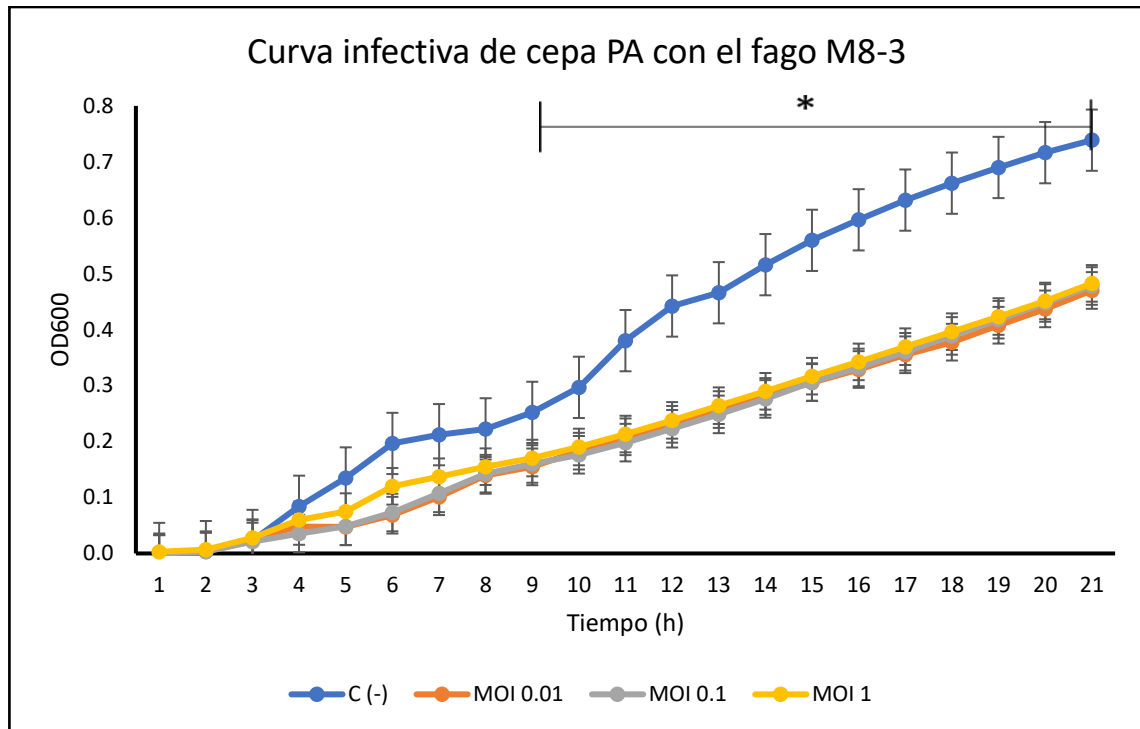


Figura 14. Curva de infección de la cepa PA con el fago M8-3. Las barras de error representan la desviación estándar. Cada experimento, así como los controles se realizaron por triplicado; \*  $\alpha=0.05$ .

### 5.8. Amplificación racional de bacteriófagos en cultivos por lote.

Debido a los bajas concentraciones virales obtenidas en las amplificaciones por placa lisada, se realizó una amplificación en cultivo por lote. La producción viral se realizó conforme a lo establecido en la amplificación racional, puesto que, la concentración total de virus obtenida al final del ensayo es inversamente proporcional a la concentración inicial en el ensayo de infección. Por lo tanto, se realizó el ensayo de infección a una MOI de 0.1. Los resultados de la amplificación racional por lote para ambos fagos se resumen en la Tabla 7. La producción viral por este método generó concentraciones virales más altas a

los obtenidos por placa lisada (Tabla 6), logrando generar rendimientos de  $8.0 \times 10^7$  UFP•ml<sup>-1</sup> y  $1.03 \times 10^9$  UFP•ml<sup>-1</sup> para el fago M8-2 y M8-3 respectivamente.

Tabla 7. Determinación del título viral en las de las muestras amplificadas en cultivo por lote en la cepa PA.

Fago	UFP	Volumen inoculado	Factor de dilución	Título viral
M8-2	128	10 µL	$10^5$	$8.0 \times 10^7$ UFP•ml <sup>-1</sup>
M8-3	80	10 µL	$10^4$	$1.03 \times 10^9$ UFP•ml <sup>-1</sup>

### 5.9. Extracción de ADN viral

Los resultados del análisis en gel de agarosa de los genomas virales de los fagos M8-2 y M8-3 se muestran en la Figura 15. Los stock virales de cada muestra (Figura 15; Carril 2 y 4) presentan bandas tenues degradadas. No obstante, el peso molecular de estas no se relaciona con el peso molecular de las bandas de los genomas virales.

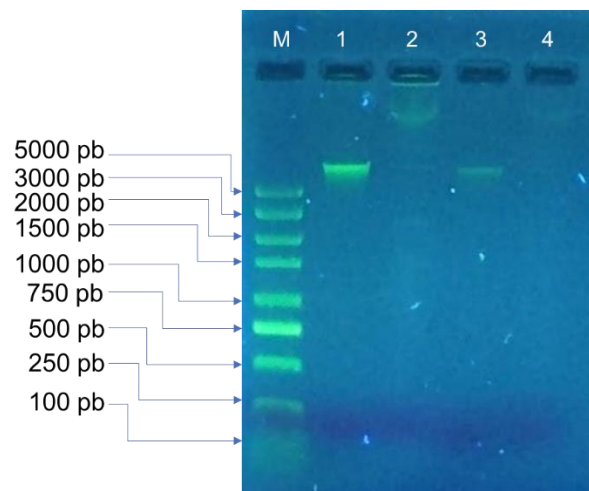


Figura 15. Análisis de la extracción de ADN viral. Electroforesis en gel de agarosa 0.8% en TBE 1X. M: Marcador de peso molecular 100-5000 pb DNA Marker Plus (Bio line); Carril 1 ADN viral del fago M8-2; Carril 3 ADN viral del fago M8-3. El carril 2 y 4 corresponden al stock del lisado celular de los fagos M8-2 y M8-3 respectivamente.

### 5.10. Determinación de proteínas estructurales mediante SDS-PAGE

El perfil de proteínas estructurales de ambos fagos se muestra en la Figura 16. En ambos fagos se logran resolver 5 proteínas estructurales, las cuales corresponden a pesos moleculares aproximados de: 95 kDa, 65 kDa, 50kDa, 40-45 kDa y una de 30 kDa.

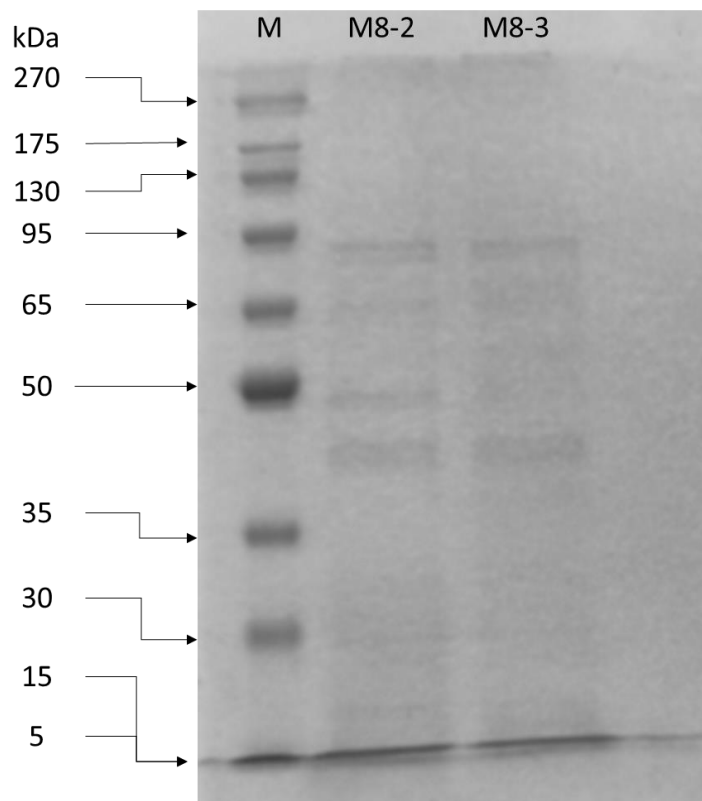


Figura 16. Análisis de proteínas estructurales. Electroforesis en gel de poliacrilamida empleando un gel concentrador (4%) y gel separador agarosa (12%). M: Marcador de peso molecular Broad Multi Color Pre-Stained Protein Estándar (GenScript); M8-2: bacteriófago M8-2 y M8-3: bacteriófago M8-3. Ambos fagos presentan patrones de bandeado similares, donde se resuelven 5 proteínas estructurales las cuales corresponden a pesos moleculares aproximados de 95 kDa, 65 kDa, 50kDa, 40-45 kDa y 30 kDa.



### **5.11. Análisis y control de calidad de datos genómicos crudos.**

Los datos de NGS crudos de los genomas virales fueron analizados para la revisión de las métricas de calidad de los archivos. En la Figura S1 y Figura S2 se presenta un resumen de los resultados de calidad obtenidos para las lecturas crudas del genoma viral M8-2 y M8-3 respectivamente. En ambas secuenciaciones, los grupos de lecturas presentan altos valores Phred >Q30 (Figura S1 A-B y Figura S2 A-B), adicionalmente presentan poca variación de bases y de contenido "N" a lo largo de la lectura (Figura S1 C-D y Figura S2 C-D). Sin embargo, ambas secuenciaciones contienen lecturas repetidas y sobrerrepresentadas (Figura S3), por lo cual fueron eliminadas previo al ensamblaje del genoma.

### **5.12. Determinación de homología viral por alineamiento local en MegaBlastn.**

Los resultados de BLASTn para ambos genomas presentan altos porcentajes de similitud ( $\geq 95\%$ ) contra diferentes entradas (hits) de fagos pertenecientes al orden de los *Caudoviridae* que infectan a diferentes géneros de bacterias Gram (-) como: *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Yersinia*, *Salmonella*, *Escherichia* y *Serratia* (Figura 17 y Figura 18).

El fago M8-2 presenta una genoma con una longitud de 27,610 pb. Los resultados del BLASTn determinan que el fago M8-2 está relacionado contra el fago vB\_KpnP\_IME305 (No. Acceso: OK149215.1) ya que presenta en este hit el máximo puntaje total con un 96.95% de similitud y un E-value de 0.0 (Figura 17).

Por otra parte, el fago M8-3 presenta un genoma con una longitud de 27,404 pb. Los resultados del BLASTn determinan que el fago está relacionado contra el fago KNP3 (No. Acceso: NC\_047856.1) ya que presenta en este hit el máximo puntaje total con un 96.72% de similitud y un E-value de 0.0 (Figura 18).

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
✓	<a href="#">Klebsiella phage vB_KpnP_IME305_complete genome</a>	<a href="#">Klebsiella phage vB_KpnP_IME305</a>	14111	45388	98%	0.0	96.95%	38641	<a href="#">OK149215.1</a>
✓	<a href="#">Enterobacter phage KNP3_complete genome</a>	<a href="#">Enterobacter phage KNP3</a>	29082	44799	93%	0.0	96.72%	44911	<a href="#">NC_047856.1</a>
✓	<a href="#">Klebsiella phage 066044_complete genome</a>	<a href="#">Klebsiella phage 066044</a>	25929	44681	97%	0.0	97.02%	38704	<a href="#">MZ359670.1</a>
✓	<a href="#">Klebsiella phage KPP-5_complete genome</a>	<a href="#">Klebsiella phage KPP-5</a>	28683	44668	98%	0.0	96.31%	38245	<a href="#">MW600722.1</a>
✓	<a href="#">Yersinia phage phiYe-F10_complete genome</a>	<a href="#">Yersinia phage phiYe-F10</a>	28877	44026	98%	0.0	96.50%	39210	<a href="#">NC_047755.1</a>
✓	<a href="#">Klebsiella phage Kpn-11mx_complete genome</a>	<a href="#">Klebsiella phage Kpn-11mx</a>	28984	43949	98%	0.0	96.62%	38774	<a href="#">MW296877.1</a>
✓	<a href="#">Klebsiella phage NL_ZS_3_complete genome</a>	<a href="#">Klebsiella phage NL_ZS_3</a>	21643	43676	98%	0.0	96.87%	38741	<a href="#">MT813142.1</a>
✓	<a href="#">Salmonella phage phiSG-JL2_complete genome</a>	<a href="#">Salmonella phage phiSG-JL2</a>	17704	43663	96%	0.0	96.02%	38815	<a href="#">EU547803.1</a>
✓	<a href="#">Escherichia phage ECA2_complete genome</a>	<a href="#">Escherichia phage ECA2</a>	18338	43390	98%	0.0	95.60%	38890	<a href="#">NC_047766.1</a>
✓	<a href="#">Klebsiella phage Patroon_complete genome</a>	<a href="#">Klebsiella phage Patroon</a>	28810	43333	97%	0.0	96.43%	39442	<a href="#">MK608335.1</a>
✓	<a href="#">Serratia phage SM9-3Y_complete genome</a>	<a href="#">Serratia phage SM9-3Y</a>	18127	43286	94%	0.0	96.52%	39631	<a href="#">NC_047774.1</a>
✓	<a href="#">Klebsiella phage vB_KpnP_Emp27_complete genome</a>	<a href="#">Klebsiella phage vB_KpnP_Emp27</a>	17682	43148	97%	0.0	95.79%	38603	<a href="#">MN013074.1</a>
✓	<a href="#">Enterobacter phage E-3_complete genome</a>	<a href="#">Enterobacter phage E-3</a>	19128	42891	93%	0.0	96.23%	31522	<a href="#">KF791806.1</a>
✓	<a href="#">Leclercia phage 10164RH_complete genome</a>	<a href="#">Leclercia phage 10164RH</a>	18172	42819	94%	0.0	96.60%	39300	<a href="#">MF285617.1</a>
✓	<a href="#">Leclercia phage 10164-302_complete genome</a>	<a href="#">Leclercia phage 10164-302</a>	18172	42819	94%	0.0	96.60%	39064	<a href="#">NC_047843.1</a>
✓	<a href="#">Bacteriophage phiYeO3-12_complete genome</a>	<a href="#">Yersinia phage phiYeO3-12</a>	11858	42660	98%	0.0	95.58%	39600	<a href="#">AJ251805.1</a>
✓	<a href="#">Enterobacter phage E-2_complete genome</a>	<a href="#">Enterobacter phage E-2</a>	17522	42564	96%	0.0	95.52%	36051	<a href="#">KF791805.1</a>
✓	<a href="#">Enterobacter phage E-4_complete genome</a>	<a href="#">Enterobacter phage E-4</a>	17494	42536	96%	0.0	95.48%	39142	<a href="#">KF791807.1</a>
✓	<a href="#">Yersinia phage vB_YenP_AP5_complete genome</a>	<a href="#">Yersinia phage vB_YenP_AP5</a>	14916	42464	97%	0.0	94.48%	38646	<a href="#">KM253764.1</a>
✓	<a href="#">Serratia phage SALSA_complete genome</a>	<a href="#">Serratia phage SALSA</a>	17703	42443	96%	0.0	95.82%	39933	<a href="#">MT419366.1</a>
✓	<a href="#">Klebsiella phage vB_KpnP-VAC1_complete genome</a>	<a href="#">Klebsiella phage vB_KpnP-VAC1</a>	12013	42437	96%	0.0	95.96%	39371	<a href="#">MZ428229.1</a>
✓	<a href="#">Citrobacter phage SH1_complete genome</a>	<a href="#">Citrobacter phage SH1</a>	17518	42395	95%	0.0	95.71%	39434	<a href="#">KU687347.1</a>

Figura 17. BLASTn del genoma del fago M8-2. Los resultados del alineamiento local demuestran un alto porcentaje de similitud (>95%) contra diferentes fagos que infectan a bacterias Gram (-). No obstante, la entrada correspondiente al fago vB\_KpnP\_IME305 presenta el puntaje máximo del análisis.

### 5.13. Predicción estructural de marcos de lectura abiertos en los genoma virales.

EL algoritmo de predicción Glimmer3 aplicado al genoma de M8-2 identificó 36 ORF (Tabla 8) los cuales se encuentran mapeados a lo largo del genoma (Figura 19). Todos los ORF se encuentran codificando en la cadena reversa (3'→5'). Así mismo, el genoma posee un alto grado de empaquetamiento ya que los ORF15-20 y los ORF27-32 se encuentran traslapados uno con otro

(Tabla 8). No obstante, Glimmer3 determino un overlap total del ORF 25 dentro del ORF 24 (Tabla 8 y Figura 19).

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Enterobacter phage KNP3_complete genome</a>	<a href="#">Enterobacter phage KNP3</a>	29082	44799	94%	0.0	96.72%	44911	<a href="#">NC_047856.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Klebsiella phage Kpn-11mx_complete genome</a>	<a href="#">Klebsiella phage Kpn-11mx</a>	28984	43301	97%	0.0	96.62%	38774	<a href="#">MW296877.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Yersinia phage phiYe-F10_complete genome</a>	<a href="#">Yersinia phage phiYe-F10</a>	28877	43378	97%	0.0	96.50%	39210	<a href="#">NC_047755.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Klebsiella phage Patroon_complete genome</a>	<a href="#">Klebsiella phage Patroon</a>	28810	42663	96%	0.0	96.43%	39442	<a href="#">MK608335.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Klebsiella phage KPP-5_complete genome</a>	<a href="#">Klebsiella phage KPP-5</a>	28683	44031	97%	0.0	96.31%	38245	<a href="#">MW600722.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Klebsiella phage 066044_complete genome</a>	<a href="#">Klebsiella phage 066044</a>	25929	44556	97%	0.0	97.02%	38704	<a href="#">MZ359670.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Klebsiella phage NL_ZS_3_complete genome</a>	<a href="#">Klebsiella phage NL_ZS_3</a>	21643	43881	99%	0.0	96.87%	38741	<a href="#">MT813142.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Citrobacter phage SH2_complete genome</a>	<a href="#">Citrobacter phage SH2</a>	20572	39321	95%	0.0	96.24%	39158	<a href="#">KU687348.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Enterobacter phage E-3_complete genome</a>	<a href="#">Enterobacter phage E-3</a>	19128	42891	94%	0.0	96.23%	31522	<a href="#">KP791806.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Escherichia phage ECA2_complete genome</a>	<a href="#">Escherichia phage ECA2</a>	18338	42742	97%	0.0	95.60%	38890	<a href="#">NC_047766.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Leclercia phage 10164RH_complete genome</a>	<a href="#">Leclercia phage 10164RH</a>	18172	42722	95%	0.0	96.60%	39300	<a href="#">MF285617.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Leclercia phage 10164-302_complete genome</a>	<a href="#">Leclercia phage 10164-302</a>	18172	42722	95%	0.0	96.60%	39064	<a href="#">NC_047843.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Serratia phage SM9-3Y_complete genome</a>	<a href="#">Serratia phage SM9-3Y</a>	18127	43155	95%	0.0	96.52%	39631	<a href="#">NC_047774.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Salmonella phage phiSG-JL2_complete genome</a>	<a href="#">Salmonella phage phiSG-JL2</a>	17704	43538	96%	0.0	96.02%	38815	<a href="#">EU547803.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Serratia phage SALSa_complete genome</a>	<a href="#">Serratia phage SALSa</a>	17703	41860	95%	0.0	95.82%	39933	<a href="#">MT419366.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Klebsiella phage vB_KonP_Emp27_complete genome</a>	<a href="#">Klebsiella phage vB_KonP_Emp27</a>	17682	42505	96%	0.0	95.79%	38603	<a href="#">MN013074.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Escherichia phage LL2_complete genome</a>	<a href="#">Escherichia phage LL2</a>	17573	40848	95%	0.0	95.61%	39382	<a href="#">NC_048063.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Enterobacter phage E-2_complete genome</a>	<a href="#">Enterobacter phage E-2</a>	17522	41910	96%	0.0	95.52%	36051	<a href="#">KP791805.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Citrobacter phage SH1_complete genome</a>	<a href="#">Citrobacter phage SH1</a>	17518	42264	95%	0.0	95.71%	39434	<a href="#">KU687347.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Enterobacter phage E-4_complete genome</a>	<a href="#">Enterobacter phage E-4</a>	17494	41883	96%	0.0	95.48%	39142	<a href="#">KP791807.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Yersinia phage vB_YenP_AP5_complete genome</a>	<a href="#">Yersinia phage vB_YenP_AP5</a>	14312	41860	96%	0.0	94.44%	38646	<a href="#">KM253764.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Klebsiella phage vB_KonP_IME305_complete genome</a>	<a href="#">Klebsiella phage vB_KonP_IME305</a>	14111	44745	98%	0.0	96.95%	38641	<a href="#">OK149215.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Klebsiella phage vB_KonP-VAC1_complete genome</a>	<a href="#">Klebsiella phage vB_KonP-VAC1</a>	12013	41789	95%	0.0	95.96%	39371	<a href="#">MZ428229.1</a>

Figura 18. BLASTn del genoma del fago M8-3. Los resultados del alineamiento local demuestran un alto porcentaje de similitud (>95%) contra diferentes fagos que infectan a bacterias Gram (-). No obstante, la entrada correspondiente al fago KNP3 presenta el puntaje máximo del análisis

Por otra parte, el algoritmo de predicción Glimmer3 identificó 35 ORF (Tabla 9) en el genoma de M8-3, los cuales se encuentran desplegados en el mapa genómico de la Figura 20. De manera similar al fago M8-2, todos los ORF se encuentran en la cadena reversa (3'→5') y poseen un alto grado de empaquetamiento y traslape de ORFs como el reportado en M8-2 (Tabla 9 y Figura 20).

Tabla 8. Marcos de lectura abiertos predichos por Glimmer3 en el genoma del fago M8-2 (R: Cadena reversa (3'→5'); L: Longitud; PM: Peso molecular).

ORF	Dirección	Inicio	Final	L. del ORF (pb)	L. de proteína (aa)	PM proteína (kDa)
M8-2-ORF1	R	3	611	609	203	22.32
M8-2-ORF2	R	661	4623	3963	1321	143.94
M8-2-ORF3	R	4642	6885	2244	748	85.4
M8-2-ORF4	R	6888	7481	594	198	21.35
M8-2-ORF5	R	7484	7894	411	137	15.88
M8-2-ORF6	R	7967	10372	2406	802	90.19
M8-2-ORF7	R	10388	10978	591	197	22.29
M8-2-ORF8	R	11091	11324	234	78	7.45
M8-2-ORF9	R	11363	12406	1044	348	36.94
M8-2-ORF10	R	12563	13495	933	311	33.75
M8-2-ORF11	R	13597	15204	1608	536	58.76
M8-2-ORF12	R	15215	15535	321	107	10.93
M8-2-ORF13	R	15562	15813	252	84	8.88
M8-2-ORF14	R	15818	16063	246	82	9.37
M8-2-ORF15	R	16156	16269	114	38	4.16
M8-2-ORF16	R	16248	17162	915	305	35.03
M8-2-ORF17	R	17159	17341	183	61	6.83
M8-2-ORF18	R	17338	17547	210	70	7.28
M8-2-ORF19	R	17547	17663	117	39	4.43
M8-2-ORF20	R	17663	17965	303	101	11.1
M8-2-ORF21	R	17982	20096	2115	705	80.18
M8-2-ORF22	R	20164	20448	285	95	10.77
M8-2-ORF23	R	20459	20671	213	71	7.72
M8-2-ORF24	R	20768	22468	1701	567	63.08
M8-2-ORF25	R	22279	22434	156	52	5.61
M8-2-ORF26	R	22647	23102	456	152	17.02
M8-2-ORF27	R	23095	23556	462	154	17.66
M8-2-ORF28	R	23556	24254	699	233	26.01
M8-2-ORF29	R	24306	24542	237	79	8.88
M8-2-ORF30	R	24539	24676	138	46	5.32
M8-2-ORF31	R	24663	25154	492	164	18.37
M8-2-ORF32	R	25154	25411	258	86	9.91
M8-2-ORF33	R	25581	26627	1047	349	39.8
M8-2-ORF34	R	26722	26997	276	92	10.62
M8-2-ORF35	R	26997	27137	141	47	5.94
M8-2-ORF36	R	27229	27501	273	91	10.4

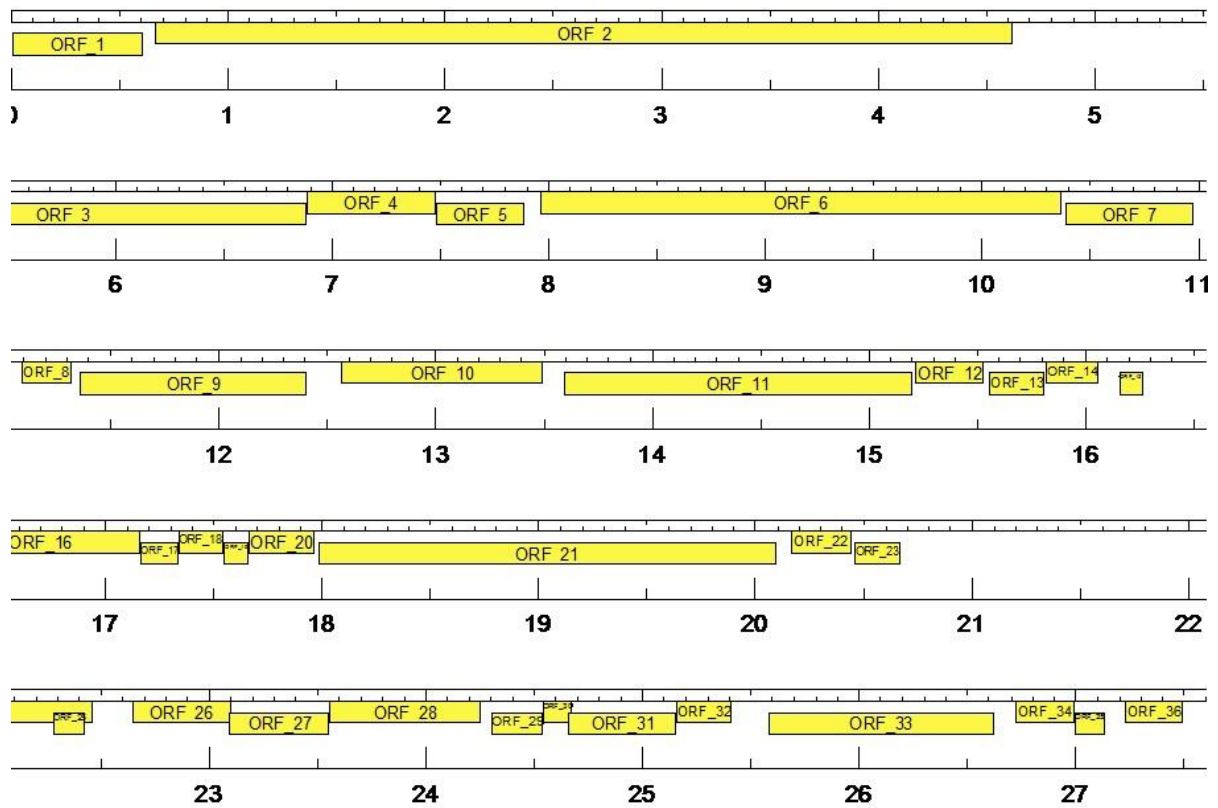


Figura 19. Mapa genómico del fago M8-2 desplegado en DNA Master. El algoritmo Glimmer3 predijo 36 ORFs dentro del genoma viral. Todos los ORF presentan un alto grado de empaquetamiento y se encuentran codificando en la cadena reversa (3'→5').

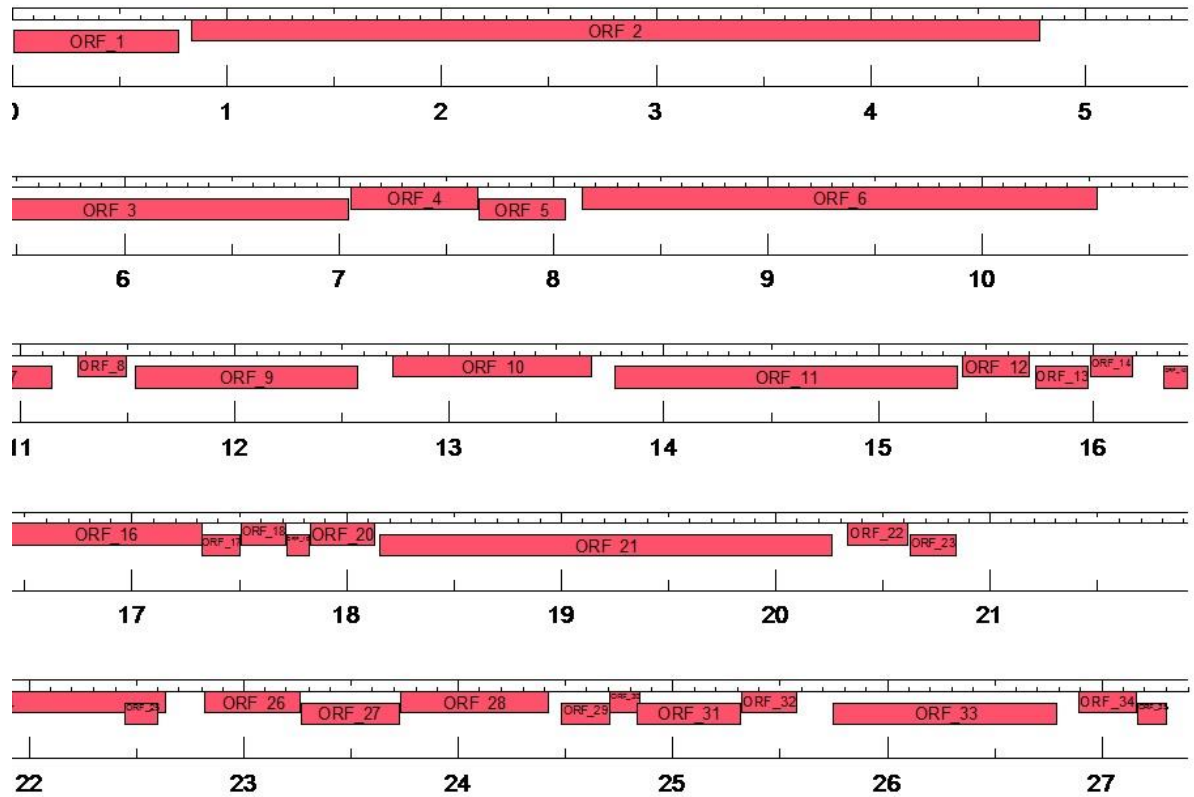


Figura 20. Mapa genómico del fago M8-3 desplegado en DNA Master. El algoritmo Glimmer3 predijo 35 ORFs dentro del genoma viral. Todos los ORF presentan un alto grado de empaquetamiento y se encuentran codificando en la cadena reversa (3'→5').

Tabla 9. Marcos de lectura abiertos predichos por Glimmer3 en el genoma del fago M8-3 (R: Cadena reversa (3'→5'); L: Longitud; PM: Peso molecular).

<b>ORF</b>	<b>Dirección</b>	<b>Inicio</b>	<b>Final</b>	<b>L. en pb</b>	<b>L. de proteína (aa)</b>	<b>PM proteína (kDa)</b>
<i>M8-3-ORF_1</i>	R	3	782	780	260	28.39
<i>M8-3-ORF_2</i>	R	832	4794	3963	1321	143.94
<i>M8-3-ORF_3</i>	R	4813	7056	2244	748	85.4
<i>M8-3-ORF_4</i>	R	7059	7652	594	198	21.35
<i>M8-3-ORF_5</i>	R	7655	8065	411	137	15.88
<i>M8-3-ORF_6</i>	R	8138	10543	2406	802	90.19
<i>M8-3-ORF_7</i>	R	10559	11149	591	197	22.29
<i>M8-3-ORF_8</i>	R	11262	11495	234	78	7.45
<i>M8-3-ORF_9</i>	R	11534	12577	1044	348	36.94
<i>M8-3-ORF_10</i>	R	12734	13666	933	311	33.75
<i>M8-3-ORF_11</i>	R	13768	15375	1608	536	58.76
<i>M8-3-ORF_12</i>	R	15386	15706	321	107	10.93
<i>M8-3-ORF_13</i>	R	15733	15984	252	84	8.88
<i>M8-3-ORF_14</i>	R	15989	16183	195	65	7.46
<i>M8-3-ORF_15</i>	R	16327	16440	114	38	4.16
<i>M8-3-ORF_16</i>	R	16419	17333	915	305	35.03
<i>M8-3-ORF_17</i>	R	17330	17512	183	61	6.83
<i>M8-3-ORF_18</i>	R	17509	17718	210	70	7.28
<i>M8-3-ORF_19</i>	R	17718	17834	117	39	4.43
<i>M8-3-ORF_20</i>	R	17834	18136	303	101	11.1
<i>M8-3-ORF_21</i>	R	18153	20267	2115	705	80.18
<i>M8-3-ORF_22</i>	R	20335	20619	285	95	10.77
<i>M8-3-ORF_23</i>	R	20630	20842	213	71	7.72
<i>M8-3-ORF_24</i>	R	20939	22639	1701	567	63.08
<i>M8-3-ORF_25</i>	R	22450	22605	156	52	5.61
<i>M8-3-ORF_26</i>	R	22818	23273	456	152	17.02
<i>M8-3-ORF_27</i>	R	23266	23727	462	154	17.66
<i>M8-3-ORF_28</i>	R	23727	24425	699	233	26.01
<i>M8-3-ORF_29</i>	R	24477	24713	237	79	8.88
<i>M8-3-ORF_30</i>	R	24710	24847	138	46	5.32
<i>M8-3-ORF_31</i>	R	24834	25325	492	164	18.37
<i>M8-3-ORF_32</i>	R	25325	25582	258	86	9.91
<i>M8-3-ORF_33</i>	R	25752	26798	1047	349	39.8
<i>M8-3-ORF_34</i>	R	26893	27168	276	92	10.62
<i>M8-3-ORF_35</i>	R	27168	27308	141	47	5.94

## CAPITULO 6

### DISCUSIÓN

Las infecciones de BMA han incrementado drásticamente en las últimas décadas. Debido a que la tasa de resistencia ha superado el desarrollo de nuevos antibióticos, es necesaria la búsqueda de otras alternativas terapéuticas, tales como el uso de los predadores nativos de las bacterias (fagos). Estos virus presentan una alta selectividad que permite el control poblacional de sus respectivos huéspedes sin afectar a las células humanas y bacterias nativas de la microbiota humana, las cuales son usualmente afectadas por el uso de los antibióticos.

Los fagos son los entes más abundantes en la biosfera (Hendrix et al., 1999) y se encuentran directamente relacionados con su huésped, dado que ambos se pueden aislar de una misma zona de muestreo (Stenholm, Dalsgaard & Middelboe, 2008). En el presente proyecto, a partir de 10 muestras de aguas residuales del Arroyo Topo Chico, se aislaron 2 fagos (M8-2 y M8-3) con potencial lítico en una cepa BMA de *P. aeruginosa* endémica del estado de Nuevo León (Figura 6 y Figura 7). Las aguas residuales son una fuente primaria para el aislamiento de nuevos fagos, puesto que presentan una alta carga bacteriana (Azizian et al., 2015). Como se mencionó anteriormente, el aislamiento de fagos está directamente relacionado con la presencia de un huésped determinado, por lo cual son indicadores de contaminación por una cepa determinada (Mcminn et al., 2018). Por lo tanto, se sugiere la posible presencia de *P. aeruginosa* en las



muestras colectadas, dado que su prevalencia es alta en este tipo de efluentes (Crone et al., 2020). Por otra parte, no se logró aislar ningún fago específico contra la cepa clínica de *S. aureus* en ninguna de las muestras, ya que el material biológico en las aguas residuales es altamente heterogéneo y cambiante (Numberger et al., 2019) y por consiguiente, las poblaciones de fagos presentes también.

Los fagos M8-2 y M8-3 aislados son fagos temperados debido a las placas turbias que generan. Esta turbidez es derivada de las células parcialmente lisadas, así como de la acumulación de membranas plasmáticas, en las zonas de crecimiento del lisógeno. Se ha sugerido en la literatura que el aislamiento de este tipo de fagos está relacionado con la concentración de nutrientes presentes en el agua de muestreo, puesto que los fagos temperados son más comunes en aguas con una menor concentración de nutrientes (Jassim & Limoges, 2013).

Como se mencionó anteriormente, las poblaciones de fagos en aguas residuales son altamente dinámicas, por lo cual se pueden aislar diferentes fagos específicos a BMA como los fagos aislados en el presente trabajo. Bhetwal et al. (2017) reportan el aislamiento de 67 fagos a partir de muestras de agua de río con contaminación fecal. Reportan el fago  $\Phi$ SER1 de amplio espectro capaz de infectar hasta 17 diferentes cepas como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter spp.*, *Citrobacter koseri*, *Pseudomonas spp* y DR, así como las cepas *Klebsiella spp.* y *E. coli* productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido. Sitthisak et al. (2015) desarrollaron un coctel de 5 fagos ( $\Phi$ ABP-2/19/29/39/44) aislados a partir aguas residuales capaces de infectar 42 cepas de *Acinetobacter baumannii* multirresistente. Por lo tanto, es necesario

determinar las cualidades líticas de los fagos aislados sobre múltiples cepas clínicas de *P. aeruginosa*, dado que esto determina la utilidad de los mismos en la TDF (Hyman, 2019).

En el presente proyecto se empleó la cepa *PaR* como plataforma de asilamiento de los fagos debido al enfoque al cual se quieren aplicar. Posteriormente, se empleó la cepa *PA* como plataforma de caracterización y amplificación de los fagos aislados. Esto anterior se realizó con el objetivo de evitar la transferencia horizontal de genes de virulencia parte de la cepa resistente al genoma de los fagos (Haddad et al., 2014), así como para facilitar la amplificación viral. Adicionalmente, la generación de poblaciones clonales en esta cepa mejoró la eficacia lítica sobre la cepa *PA* (Figura 12 y Figura 13), además, este proceso fue necesario para la producción de fagos con aspectos biológicos homogéneos (tasa de crecimiento viral, morfología de placas líticas, tiempo de absorción etc.) que contengan secuencias genómicas con poca diversidad genética (L. Chen et al., 2020). No obstante, es necesario continuar con la caracterización biológica de los fagos (curva de un paso) para determinar que la amplificación viral en esta cepa no generó cambios en las características biológicas de los mismos. El proceso de decisión entre una ruta lisogénica y una lítica en fagos temperados es complejo y relacionado a múltiples factores. Sin embargo, el parámetro que más se le atribuye a la lisogenia es la MOI, la cual es relación entre la concentración viral empleada, con respecto a la concentración bacteriana. Esta relación es importante, ya que a una mayor MOI, habrá una mayor probabilidad de lisogenia por parte de los fagos ya sea por la baja cantidad de huéspedes disponibles para infectar (Zeng et al., 2011) o por la replicación

intracelular del mismo, puesto que el aumento del número de copias del genoma viral, conlleva a una mayor acumulación de proteínas de represión del proceso lítico (Coleman et al., 2021). Por lo cual, en las rondas de amplificación racional (Tabla 7, Figura 12 y Figura 13) se lograron obtener mejores rendimientos virales al emplear MOIs bajas. Adicionalmente, las curvas de infección realizadas (Figura 14) presentan un crecimiento lineal sin cambios abruptos en la OD, puesto que los fagos se están replicando proporcionalmente con respecto a su huésped (Wong et al., 2012). Esta dinámica de crecimiento determina que no se generaron poblaciones bacterianas resistentes al fago, dado que no se presentan cambios en la tasa de crecimiento en la cepa en presencia del fago (Olszak et al., 2019).

Las proteínas estructurales de ambos fagos en el gel de SDS-PAGE exhiben bandas proteicas tenues (Figura 16). Esto es debido a la baja concentración de virus cargada en el gel, ya que para un ensayo óptimo es necesario contar con títulos virales por encima de  $1.0 \times 10^9 \text{ UFP} \cdot \mu\text{l}^{-1}$  (Boulanger, 2009), mientras que en el presente proyecto la máxima concentración viral cargada en el gel fue de  $8.0 \times 10^5 \text{ UFP} \cdot \mu\text{l}^{-1}$  y  $1.0 \times 10^7 \text{ UFP} \cdot \mu\text{l}^{-1}$  para los fagos M8-2 y M8-3 respectivamente. No obstante, la resolución de las proteínas puede mejorarse empleando agentes de tinción más sensibles como el nitrato de plata (Simpson, 2007).

La secuenciación de los genomas virales determinó que ambos fagos presentan estructuras genómicas similares. Esto es derivado tanto de los resultados del megaBLASTn, de su arquitectura genómica, así como de la sintenia genética (Figura 17-20). Esta conservación génica entre ambos fago

puede ser derivada tanto de las diferentes presiones biológicas a las cuales son sometidos dentro de un nicho ecológico o por la falta de divergencia genómica (Sarkar, Soueidan & Nikolski, 2011). Por lo tanto, es importante ejecutar análisis bioinformáticos de ortología génica en ambos genomas virales (contra sus respectivos hits del Blastn) con el fin de obtener una inferencia evolutiva de los genomas con respecto a los fagos con los que están emparentados (Kristensen et al, 2013).

Los fagos aislado en el presente proyecto pertenecen al orden *Caudoviridae*. Esta clasificación fue inferida a partir de los hits con porcentajes de identidad  $\geq 95\%$  desplegados con ambos genomas (Figura 17 y Figura 18), ya que todos pertenecen a este orden. El orden *Caudoviridae* es el más extenso dentro de la clasificación de los bacteriófagos y está representado en su mayoría por miembros con genomas de ADNbc (Bhatt, Leiman & Taylor, 2009) como los genomas virales secuenciados en el presente proyecto. No obstante, es necesario realizar más análisis bioinformáticos para la asignación funcional de los ORF reportados en la Tabla 8 y Tabla 9, puesto que, para su correcta clasificación como miembros del orden *Caudoviridae*, los genomas deben presentar dentro del módulo estructural, proteínas con asignaciones funcionales de la placa base, una cola (contráctil o no contráctil), una proteína de tubo interno y de medición externa y proteínas de estabilización de la cola viral para su unión a la cápside (Fane et al., 2008). Adicionalmente, para la clasificación viral en taxones menores es necesario la realización de matrices de identidad proteica con las proteínas estructurales de los fagos M8-2 y M8-3 con respecto a los fagos con los cuales se encuentran emparentados, ya que, se ha determinado que si

un grupo de fagos comparten porcentajes de similitud proteica iguales al 40% en proteínas estructurales se pueden clasificar juntos dentro de un mismo género (Lavinge et al., 2008).

Por otra parte, el uso de fagos temperados en la TDF no ha sido investigado a fondo debido a que el fitness bacteriano en algunas ocasiones es mejorado cuando se realiza la conversión lisogénica (Kraushaar et al., 2017). No obstante, este proceso también afecta funciones que pueden beneficiar al lisógeno, debido a que la integración específica del profago puede inhibir genes asociados a factores de virulencia (Lee & Landolo, 1986; Winkler et al., 1965) y movilidad (Chung et al., 2012) al integrarse dentro de ellos.

Adicionalmente, los fagos temperados con procesos de pseudo lisogenia (elementos episomal) presentan características biológicas importantes para la TDF. Olszak et al. (2019) aislaron el fago lisogénico jumbo “PA5oct” a partir de aguas residuales, el cual tiene actividad antibiopelícula contra *P. aeruginosa*, así como potencial antibacteriano contra 35 diferentes cepas clínicas de *P. aeruginosa* aisladas de diferentes tipos de infecciones (urinarias, neumonía nosocomial, quemaduras y neumonía en pacientes con fibrosis quística). Reportan que a pesar de que la bacteria genere resistencia al fago, este puede permanecer dentro de las células como un pseudo lisógeno con la capacidad de reducir los factores de virulencia de la cepa (piocianina, pioverdina y motilidad), por lo tanto, las cepas que desarrollaron resistencia al fago eran significativamente menos patogénicas en modelos *in vivo*. Adicionalmente, las cepas infectadas por el fago propician un aumento de la respuesta inflamatoria para su posterior eliminación por monocitos.

Recientemente Chen et al. (2020) reportan que la integración específica del fago temperado vB\_BbrS\_PHB09 en el gen de pilina de *Bordetella bronchiseptica* disminuye significativamente la virulencia de la cepa *in vitro* e *in vivo*, incrementando la susceptibilidad de la cepa al ataque fagocítico. Así mismo, reportan que el lisógeno generado por este fago es candidato potencial como vacuna viva atenuada dado que su aplicación en ratones genera un efecto protector contra la cepa patogénica.

Adicionalmente, los fagos temperados se pueden modificar por ingeniería genética para eliminar sus módulos lisogénicos para poder ser aplicados en TDF. Dedrick et al. (2019) emplearon este enfoque en los fagos temperados ZoeJ y BPs específicos de *M. smegmatis* y *M. abscessus* GD01. Los investigadores eliminaron el gen codificante del represor viral (ZoeJ $\Delta$ 45; BPs $\Delta$ 33HTH) en ambos fagos por medio de la técnica BRED (por sus siglas en inglés Bacteriophage Recombineering of Electroporated DNA). Posterior a esta modificación, la capacidad lítica de ambos fagos sobre las cepas previamente mencionadas fue mejorada. Por lo cual, fueron aplicados como parte de un coctel de fagos modificados en una paciente con una infección diseminada de *M. abscessus* GD01. Posterior a la terapia, se corroboró la propagación sistémica de los fagos, los cuales no fueron neutralizados por el sistema inmune, así mismo, se mejoró la condición clínica de la paciente, así como la erradicación de la infección.

Por lo cual, es necesario continuar con las investigaciones biológicas y genómicas de los fagos aislados en el presente proyecto para determinar: 1) la anotación funcional de los ORF reportados; 2) reportar la actividad lítica de los fagos contra diferentes bacterias Gram (-); 3) que los fagos aislados no sean

acarreadores de genes de virulencia; 4) si su integración propicia la eliminación de estos genes en la cepa *PaR* y 5) el efecto que presentan sobre múltiples cepas DR de *P. aeruginosa* para determinar su posible aplicación en TDF.

## **CAPITULO 7**

## **CONCLUSIONES**

- Se lograron aislar 2 bacteriófagos endémicos del estado de Nuevo León a partir de muestras de agua residual del Arroyo Topo Chico.
- Se lograron aislar bacteriófagos específicos contra una cepa de *P. aeruginosa* multirresistente endémica del estado de Nuevo León.
- Se determinó que los bacteriófagos aislados pueden infectar al modelo de estudio *P. aeruginosa* ATCC 27853.
- Se determinó que el empleo de MOI bajas en las rondas de amplificación viral, propicia un crecimiento proporcional tanto para los fagos como para la cepa (ensayos de infección/curva de infección).
- Se lograron amplificar los bacteriófagos para conseguir stock virales de almacenamiento a largo plazo.
- Se lograron determinar las proteínas estructurales que conforman a 2 nuevos bacteriófagos endémicos del estado de Nuevo León.
- Se determinó la secuencia genómica y la genómica estructural codificante de 2 nuevos bacteriófagos endémicos del estado de Nuevo León.

## **CAPITULO 8**

## **REFERENCIAS**



- Abd El-Aziz, A. M., Elgaml, A., & Ali, Y. M. (2019). Bacteriophage therapy increases complement-mediated lysis of bacteria and enhances bacterial clearance after acute lung infection with multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Infectious Diseases*, 219, 1439–1447.
- Adams, M. H. (1959). Bacteriophages. *Bacteriophages*.
- Anton Bankevich and Sergey Nurk and Dmitry Antipov and Alexey A. Gurevich and Mikhail Dvorkin and Alexander S. Kulikov and Valery M. Lesin and Sergey I. Nikolenko and Son Pham and Andrey D. Prjibelski and Alexey V. Pyshkin and Alexander V. Sirotkin and Nikolay Vyahhi and Glenn Tesler and Max A. Alekseyev and Pavel A. Pevzner (2012). SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. In *Journal of Computational Biology*, 19 (5), pp. 455--477. doi:10.1089/cmb.2012.0021
- Anthony M. Bolger and Marc Lohse and Bjoern Usadel (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. In *Bioinformatics*, 30 (15), pp. 2114--2120. doi:10.1093/bioinformatics/btu170
- Arnaud, C., Effantin, G., Vivès, C., Engilberge, S., Bacia, M., Boulanger, P., Girard, E., Schoehn, G., & Breyton, C. (2017). Bacteriophage T5 tail tube structure suggests a trigger mechanism for Siphoviridae DNA ejection. *Nature Communications*, 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02049-3>
- Arnold, L. (1925). The Significance of Bacteriophage in Surface Water. *American Journal of Public Health*, 15(11), 950–952.

- Armon, R., Arella, M., & Payment, P. (1988). A highly efficient second-step concentration technique for bacteriophages and enteric viruses using ammonium sulfate and Tween 80. *Canadian journal of microbiology*, 34(5), 651-655.
- Azizian, R., Nasser, A., Askari, H., & Taheri, M. (2015). Biologicals Sewage as a rich source of phage study against *Pseudomonas aeruginosa* PAO. *Biologicals*, 43(4), 238–241.  
<https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2015.05.004>
- Baltimore., D. (1971). Expression of animal virus genomes. *Bacteriological Reviews*, 35, 235.
- Beer, L. A., & Speicher, D. W. (2018). Protein detection in gels using fixation. *Current protocols in protein science*, 91(1), 10-5
- Benzer, S. (1955). Fine structure of a genetic region in bacteriophage. *Proc. Natl Acad. Sci.*, 41, 344–354.
- Bergh, Ø. Børsheim, K. Y. Bratbak, G. & Heldal, M. (1989). High abundance of viruses found Function of identified. *Nature*, 340(6233), 467–468.
- Bhetwal, A., Maharjan, A., Shakya, S., Satyal, D., Ghimire, S., Khanal, P. R., & Parajuli, N. P. (2017). Isolation of Potential Phages against Multidrug-Resistant Bacterial Isolates : Promising Agents in the Rivers of Kathmandu , Nepal. *BioMed Research International*, 2017.
- Bonilla, N., Rojas, M. I., Cruz, G. N. F., Hung, S. H., Rohwer, F., & Barr, J. J. (2016). Phage on tap—a quick and efficient protocol for the preparation of bacteriophage laboratory stocks. *PeerJ*, 4, 2261.

- Boulanger, P. (2009). Purification of bacteriophages and SDS-PAGE analysis of phage structural proteins from ghost particles. In *Bacteriophages* (pp. 227-238). Humana Press.
- Bratzler, D. W., Dellinger, E. P., Olsen, K. M., Perl, T. M., Auwaerter, P. G., Bolon, M. K., ... & Steinberg, J. P. (2013). Clinical practice guidelines for antimicrobial prophylaxis in surgery. *Surgical Infections*, *14*, 73–156.
- Brüssow, H., & Hendrix, R. W. (2002). Phage genomics: small is beautiful. *Cell*, *108*(1), 13–16.
- Chang, R. Y. K., Chen, K., Wang, J., Wallin, M., Britton, W., Morales, S., & Chan, H. K. (2018). Proof-of-principle study in a murine lung infection model of antipseudomonal activity of phage PEV20 in a dry-powder formulation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *62*(2), 1–8.
- Chanishvili, N. (2012). Phage therapy—history from Twort and d’Herelle through Soviet experience to current approaches. In *Advances in virus research* (83rd ed.). Academic Press.
- Hershey, A. D., & Chase, M. (1952). Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage. *Journal of general physiology*, *36*(1), 39-56.
- Chen, L., Méheust, R., Crits-christoph, A., McMahon, K. D., Nelson, T. C., Slater, G. F., Warren, L. A., & Banfield, J. F. (2020). Large freshwater phages with the potential to augment aerobic methane oxidation. *Nature Microbiology*, *5*(December), 1504–1515. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0779-9>
- Chen, Y., Yang, L., Yang, D., Song, J., Wang, C., Sun, E., & Wu, B. (2020). Specific Integration of Temperate Phage Decreases the Pathogenicity of

- Host Bacteria. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10(February), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00014>
- Chhibber, S., Kaur, T., & Kaur, S. (2013). Co-Therapy Using Lytic Bacteriophage and Linezolid: Effective Treatment in Eliminating Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* ( MRSA ) from Diabetic Foot Infections. *PloS One*, 8(2), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056022>
- Chibani, C. M., Meinecke, F., Farr, A., Dietrich, S., & Liesegang, H. (2019). ClassiPhages 2.0: Sequence-based classification of phages using Artificial Neural Networks. *BioRxiv*.
- Chibani, C. M., Farr, A., Klama, S., Dietrich, S., & Liesegang, H. (2019). Classifying the Unclassified: A Phage Classification Method. *Viruses*. <https://doi.org/10.3390/v11020195>
- Chung, I., Sim, N., & Cho, Y. (2012). Antibacterial Efficacy of Temperate Phage-Mediated Inhibition of Bacterial Group Motilities. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(11), 5612–5617. <https://doi.org/10.1128/AAC.00504-12>
- Cisło, M., Dabrowski, M., Weber-Dabrowska, B., & Woytoń, A. (1987). Bacteriophage treatment of suppurative skin infections. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 35, 175–183.
- Coetsee., J. (1961). Lysogenic conversion in the genus *Proteus*. *Nature*, 189, 946–947.
- Coleman, S., Yao, T., Nguyen, T. V. P., Golding, I., & Igoshin, O. A. (2021). Bacteriophage self-counting in the presence of viral replication. *BioRxiv*.
- Courtwright, A., Koval, C., Lehman, S., Morales, S., Furr, C. L., Rosas, F., Brownstein, M., Fackler, J., Sisson, B. M., Biswas, B., Schooley, R. T., &

- Aslam, S. (2019). Safety and Efficacy of Bacteriophage Therapy in Lung Transplant Candidates and Recipients. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*, 38(4), S11–S12. <https://doi.org/10.1016/j.healun.2019.01.012>
- Crick, F. H., Barnett, L., Brenner, S. & Watts-Tobin, R. J. (1961). General nature of the genetic code for proteins. *Nature*, 192, 1227–1232.
- Crone, S., Vives-Flórez, M., Kvich, L., Saunders, A. M., Malone, M., Nicolaisen, Mette H., Esteban Martínez-García, Catalina Rojas-Acosta, Gomez-Puerto, M. C., Calum, H., Whiteley, M., Kolter, R., & Bjarnshol, T. (2020). The environmental occurrence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Apmis*, 128, 220–223. <https://doi.org/10.1111/apm.13010>
- d’Herelle, F., & Smith, G. H. (1922). The bacteriophage, its role in immunity. *Williams & Wilkins*.
- d’Herelle, F. (1918). Technique de la recherche du microbe filtrant bactériophage (Bacteriophagum intestinale). *CR Soc. Biol*, 81, 1160–1162.
- d’Herelle, F. (1925). Treatment of Bubonic Plague by Bacteriophage. *Presse Medicale*, 33(84).
- d’Herelle, F. H. (1917). Comptes Rendu. *Acad. Sci.*, 165, 373–375.
- d’Herelle, M. F. (1961). Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques. *Acta Kravsi*.
- David, M. Z., & Daum, R. S. (2010). Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic. *Clinical Microbiology Reviews*, 23(3), 616–687.

- Davison, W. C. (1922). The bacteriolysant therapy of bacillary dysentery in children: therapeutic application of bacteriolysants; d'herelle's phenomenon. *American Journal of Diseases of Children*, 23, 531–534.
- Dedrick, R. M., Guerrero-bustamante, C. A., Garlena, R. A., Russell, D. A., Ford, K., Harris, K., Gilmour, K. C., Soothill, J., Jacobs-sera, D., Schooley, R. T., Hatfull, G. F., & Spencer, H. (2019). Engineered bacteriophages for treatment of a patient with a disseminated drug-resistant *Mycobacterium abscessus*. *Nature Medicine*, 25(May). <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0437-z>
- Ding, B., Li, Q., Guo, M., Dong, K., Zhang, Y., & Guo, X. (2018). Prevention of Dermal Abscess Formation Caused by *Staphylococcus aureus* Using Phage JD007 in Nude Mice. 9(July), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01553>
- Dou, C., Xiong, J., Gu, Y., Yin, K., Wang, J., Hu, Y., Zhou, D., Fu, X., Qi, S., Zhu, X., Yao, S., Xu, H., Nie, C., Liang, Z., & Yang, S. (2018). Regulation of the lysis – lysogeny decision in viral communities. *Nature Microbiology*, 3(November). <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0259-7>
- Dowah, A. S. A., & Clokie, M. R. J. (2018). Review of the nature , diversity and structure of bacteriophage receptor binding proteins that target Gram-positive bacteria. *Biophysical Reviews*, 10(2), 535–542.
- Dunn, J. J., & Studier, F. W. (1983). Complete Nucleotide Sequence of Bacteriophage T7 D N A and the Locations of T7 Genetic Elements. *Journal of Molecular Biology*, 166, 477–535.
- Echols. H. (1986). Bacteriophage  $\lambda$  development: temporal switches and the choice of lysis or lysogeny. *Trends in Genetics*, 2, 26–30.
- Erez, Z., Steinberger-levy, I., Shamir, M., Doron, S., Stokar-avihail, A., Peleg, Y.,

- & Melamed, S. (2017). Communication between viruses guides lysis – lysogeny decisions. *Nature Publishing Group*, 541(7638), 488–493.  
<https://doi.org/10.1038/nature21049>
- Fane, B. A., Chen, M., Cherwa, J. E., & Uchiyama, A. (2008). Icosahedral ssDNA bacterial viruses. In *Encyclopedia of Virology* (pp. 13-20). Elsevier Ltd..
- Bhatt, S., Leiman, P. G., & Taylor, N. M. (2019). Tail Structure and Dynamics.
- Feiss, M., Widner, W., Miller, G., Johnson, G., & Christiansen, S. (1983). Structure of the bacteriophage ( cosB ) and nicking ( cosrv ) lambda cohesive end site : location of the sites of terminase binding. *Gene*, 24, 207–218.
- Haddad, L. El, Abdallah, N. Ben, Plante, P., Dumaresq, J., Katsarava, R., Labrie, S., Corbeil, J., St-gelais, D., & Moineau, S. (2014). Improving the Safety of *Staphylococcus aureus* Polyvalent Phages by Their Production on a *Staphylococcus xylosus* Strain. *PloS One*, 9(7), 1–10.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102600>
- Hankin, E. H. (1986). L'action bactericide des eaux de la Jumna et du Gange sur le vibron du cholera. *Ann. Inst. Pasteur*, 10(5).
- Hendrix, R. W., Hatfull, G. F., Ford, M. E., Smith, M. C., & Burns, R. N. (1999). Evolutionary relationships among diverse bacteriophages and prophages: All the world's a phage. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 96, 2192 –2197.
- Hyman, P. (2019). Phages for Phage Therapy : Isolation , Characterization , and Host Range Breadth. *Pharmaceuticals*, 12, 35.  
<https://doi.org/10.3390/ph12010035>
- Jassim, S. A. A., & Limoges, R. G. (2013). Impact of external forces on

- cyanophage – host interactions in aquatic ecosystems. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29, 1751–1762.  
<https://doi.org/10.1007/s11274-013-1358-5>
- Jassim, S. A. A., & Limoges, R. G. (2017). *Bacteriophages : Practical Applications for Nature 's Biocontrol*. Springer.
- Ji, J., Liu, Q., Wang, R., Luo, T., Guo, X., Xu, M., & Yin, Q. (2020). Identification of a novel phage targeting methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* In vitro and In vivo. *Microbial Pathogenesis*, 104317.  
<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104317>
- Kalinski. Andrej. & Black, W. (1986). End structure and mechanism of packaging of bacteriophage T4 DNA. *Virology*, 58, 951-954.
- Karpov, S. P. (1950). . Mechanism of prophylactic action of typhoid-paratyphoid bacteriophage (dynamics of the phage release from the organism of the parenterally phaged white mice). *Microbiology. Epidemiology. Immunology*, 7(June), 43–45.
- Kazhal, N., & Iftimovich, R. (1968). From the history of fight against bacteria and viruses. *Nauchnoe Izdatelstvo*.
- Kerketta, P., Agarwal, R. K., Rawat, M., Jain, L., Kumar, P. P., Dhanze, H., ... & Kumar, A. (2014). Isolation and characterization of lytic bacteriophage ( $\phi$ STIz1) against *Salmonella enterica* serovars Typhimurium. *J Pure Appl Microbiol*, 8, 4719-26.
- Khan, H. A., Ahmad, A., & Mehboob, R. (2015). Nosocomial infections and their control strategies. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 5(7), 509–514.



- Kokin, G. A. (1941). Phage therapy and phage prophylaxis of gas gangrene. Experience of the Soviet military medicine during the great patriotic wa. 56–63.
- Kraushaar, B., Hammerl, J. A., Kienöl, M., Heinig, M. L., Sperling, N., Thanh, M. D., Reetz, J., Jäckel, C., Fetsch, A., & Hertwig, S. (2017). Acquisition of virulence factors in livestock-associated MRSA: Lysogenic conversion of CC398 strains by virulence gene- containing phages. *Scientific Reports*, April, 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02175-4>
- Kristensen, D. M., Waller, A. S., Yamada, T., Bork, P., Mushegian, A. R., & Koonin, E. V. (2013). Orthologous gene clusters and taxon signature genes for viruses of prokaryotes. *Journal of bacteriology*, 195(5), 941-950.
- Kropinski, A. M. (2018). Chapter 3 Practical Advice on the One-Step Growth Curve. *1681*, 41–47.
- Lavigne, R., Seto, D., Mahadevan, P., Ackermann, H. W., & Kropinski, A. M. (2008). Unifying classical and molecular taxonomic classification: analysis of the Podoviridae using BLASTP-based tools. *Research in microbiology*, 159(5), 406-414.
- Lee, C. Y., & landolo, J. J. (1986). Lysogenic conversion of staphylococcal lipase is caused by insertion of the bacteriophage L54a genome into the lipase structural gene. *Bacteriology*, 166, 385–391.
- Leiman, P. G., Chipman, P. R., Kostyuchenko, V. A., Mesyanzhinov, V. V, Rossmann, M. G., Street, W. S., & Lafayette, W. (2004). Three-Dimensional Rearrangement of Proteins in the Tail of Bacteriophage T4 on Infection of Its

Host. *Cell*, 118, 419–429.

Lin, D. M., Koskella, B., Lin, H. C., Lin, D. M., Lin, H. C., & Gastroenterology, S. (2017). Phage therapy : An alternative to antibiotics in the age of multi-drug resistance. 8(3), 162–173. <https://doi.org/10.4292/wjgpt.v8.i3.162>

Lupo, D., Leptihn, S., Nagler, G., Haase, M., Molineux, I. J., & Kuhn, A. (2015). The T7 ejection nanomachine components gp15 – gp16 form a spiral ring complex that binds DNA and a lipid membrane. *Virology*, 486, 263–271. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.09.022>

Lwoff, A., Horne, R., & Tournier, P. (1962). A system of viruses. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 27, 51–55.

MA, D. S. (2012). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): a public health nightmare. *Salut Sci*, 4, 18–30.

Maddocks, S., Fabijan, A. P., Ho, J., Lin, R. C. Y., Nouri, L., Zakour, B., Dugan, C., Kliman, I., Branston, S., Morales, S., & Jonathan, R. (2019). Bacteriophage therapy of ventilator-associated pneumonia and empyema caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 200, 1179-1181.

Matsuzaki, S., Yasuda, M., Nishikawa, H., Kuroda, M., Ujihara, T., Shuin, T., Shen, Y., Jin, Z., Fujimoto, S., Nasimuzzaman, M. D., Wakiguchi, H., Sugihara, S., Sugiura, T., Koda, S., Muraoka, A., & Imai, S. (2003). Experimental Protection of Mice against Lethal *Staphylococcus aureus* Infection by Novel Bacteriophage f MR11. *Journal of Infectious Diseases*, 613–624.

Mcminn, B. R., Ashbolt, N. J., Korajkic, A., States, U., & Agency, E. P. (2018).

- Bacteriophages as indicators of fecal pollution and enteric virus removal. *Lett Appl Microbiol.*, 65, 11–26. <https://doi.org/10.1111/lam.12736>. Submit
- Meissner, G. (1924). Bacteriophages against cholera vibrios. *Zentralblatt Fur Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten Und Hygiene, I*, 149–154.
- Meladze, G. D., Mebuke, M. G., Chkhetiia, N. S., Kiknadze, N. I., & Koguashvili, G. G. (1982). Efficacy of staphylococcal bacteriophage in the treatment of purulent lung and pleural diseases. *Grudnaia Khirurgiia*, 1, 53–56.
- Międzybrodzki, R., Borysowski, J., Weber-Dąbrowska, B., Fortuna, W., Letkiewicz, S., Szufnarowski, K., ... & Górski, A. (2012). Clinical aspects of phage therapy. In *In Advances in virus research* (Vol. 83). Academic Press.
- Numberger, D., Ganzert, L., Zoccarato, L., Mühldorfer, K., Sauer, S., Grossart, H., & Greenwood, A. D. (2019). Characterization of bacterial communities in wastewater with enhanced taxonomic resolution by full-length 16S rRNA sequencing. *Scientific Reports*, February, 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46015-z>
- Olszak, T., Danis-wlodarczyk, K., Arabski, M., Gula, G., Maciejewska, B., Wasik, S., Lood, C., Higgins, G., Harvey, B. J., Lavigne, R., & Drulis-kawa, Z. (2019). *Pseudomonas aeruginosa* PA5oct Jumbo Phage Impacts Planktonic and Biofilm Population and Reduces Its Host Virulence. *Viruses*, 11, 1089.
- Ramaprasad, C., & Pursell, K. (2016). Bacterial Infections After Lung Transplantation. *Lung Transplantation*, 311.
- R. I. C. G. on A. (2019). No podemos esperar: asegurar el futuro contra las infecciones farmacorresistentes Informe para el Secretario General de las

Naciones Unidas. Disponible en: [https://www.who.int/antimicrobial-resistance/interagency-coordination-group/IACG\\_final\\_report\\_ES.pdf?ua=1](https://www.who.int/antimicrobial-resistance/interagency-coordination-group/IACG_final_report_ES.pdf?ua=1).

Ultimo acceso: 24/04/2021.

Reyes, A., Alves, J. M. P., Durham, A. M., & Gruber, A. (2017). Use of profile hidden Markov models in viral discovery: Current insights. *Advances in Genomics and Genetics*, 7, 29–45.

Roach, D. R., Leung, C. Y., Henry, M., Santo, J. P. Di, Weitz, J. S., Debarbieux, L., Roach, D. R., Leung, C. Y., Henry, M., Morello, E., Singh, D., & Santo, J. P. Di. (2017). Synergy between the Host Immune System and Bacteriophage Is Essential for Successful Phage Therapy against an Acute Respiratory Pathogen Article Synergy between the Host Immune System and Bacteriophage Is Essential for Successful Phage Therapy against an Acute Respiratory Pathogen. *Cell Host and Microbe*, 22(1), 38-48.e3. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.06.018>

Roberts, J. W., Roberts, C. W., & Craig, N. L. (1978). .*Escherichia coli* recA gene product inactivates phage lambda repressor. *National Academy of Sciences*, 75, 4714–4718.

Rohwer, F., & Edwards, R. (2002). The Phage Proteomic Tree: a genome-based taxonomy for phage. *Bacteriology*, 184, 4529–4535.

Sarkar, A., Soueidan, H., & Nikolski, M. (2011, December). Identification of conserved gene clusters in multiple genomes based on synteny and homology. In *BMC bioinformatics* (Vol. 12, No. 9, pp. 1-10). BioMed Central.

Schooley, R. T., Biswas, B., Gill, J. J., Hernandez-Morales, A., Lancaster, J.,

- Lessor, L., ... & Segall, A. M. (2017). Development and use of personalized bacteriophage-based therapeutic cocktails to treat a patient with a disseminated resistant *Acinetobacter baumannii* infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61, 954–17.
- Silveira, C. B., Bailey, B. A., Barott, K., Cantu, V. A., Coutinho, F. H., Dinsdale, E. A., Felts, B., Furby, K. A., George, E. E., Green, K. T., Gregoracci, G. B., Haas, A. F., Haggerty, J. M., Hester, E. R., Hisakawa, N., Kelly, L. W., Lim, Y. W., Little, M., Luque, A., ... Rohwer, F. (2016). Lytic to temperate switching of viral communities. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature17193>
- Simpson, R. J. (2007). Staining proteins in gels with silver nitrate. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2007(7), pdb-prot4727.
- Sitthisak, S., Kittit, T., Thummeepak, R., & Leungtongkam, U. (2015). Efficacy of *Acinetobacter baumannii* bacteriophage cocktail on *Acinetobacter baumannii* growth. [doi.org/10.5897/AJMR2015.7696](https://doi.org/10.5897/AJMR2015.7696)
- Slopek, S., Durlakowa, I., Weber-Dabrowska, B., Kucharewicz-Krukowska, A., Dabrowski, M., & Bisikiewicz, R. (1983). Results of bacteriophage treatment of suppurative bacterial infections. I. General evaluation of the results. *Arch. Immunol. Ther. Exp*, 31, 267–291.
- Slopek, S., Weber-Dabrowska, B., Dabrowski, M., & Kucharewicz-Krukowska, A. (1987). Results of bacteriophage treatment of suppurative bacterial infections in the years 1981-1986. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 35, 569–583.
- Smith, H. O., & Welcox, K. W. (1970). A restriction enzyme from *Hemophilus influenzae*: I. Purification and general properties. *Journal of Molecular*

*Biology*, 51(2), 379–391.

Smith, G. P. (1985). Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*, 228(1315–1317).

Stecher, B., Robbiani, R., Walker, A. W., Westendorf, A. M., Barthel, M., Kremer, M., Chaffron, S., Macpherson, A. J., Buer, J., Parkhill, J., Dougan, G., Von Mering, C., & Hardt, W. D. (2007). *Salmonella enterica* serovar typhimurium exploits inflammation to compete with the intestinal microbiota. *PLoS Biology*, 5(10), 2177–2189. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050244>

Stenholm, A. R., Dalsgaard, I., & Middelboe, M. (2008). Isolation and characterization of bacteriophages infecting the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 4070–4078.

Twort, F. W. (1915). An investigation on the nature of ultra-microscopic viruses. *The Lancet*, 186((4814)), 1241–1243.

Tye, Huberman & Botstein, D. (1974). Non-random Circular Permutation of Phage P22 DNA. *Journal of Molecular Biology*, 85(4), 501–527.

Van der Vijver, J. C., van Es-Boon, M., & Michel, M. F. (1972). Lysogenic Conversion in *Staphylococcus* Leucocidin Production. *Virology*, 10(2), 318–319.

Waldor, M. K., & Mekalanos, J. J. (1996). Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. *Science*, 272, 1910–1914.

Washizaki, A., Yonesaki, T., & Otsuka, Y. (2016). Characterization of the interactions between *Escherichia coli* receptors , LPS and OmpC , and bacteriophage T4 long tail fibers. *Microbiologyopen*, 5(6), 1003–1015.

<https://doi.org/10.1002/mbo3.384>

Weber-Dąbrowska, B., Mulczyk, M., & Górski, A. (2001). Bacteriophage therapy of bacterial infections: an update of our institute's experience. *Inflammation*, 201–209.

Weiss, B. & Richardson, C. C. (1967). Enzymatic breakage and joining of deoxyribonucleic acid, I. Repair of singlestrand breaks in DNA by an enzyme system from *Escherichia coli* infected with T4 bacteriophage. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 57, 1021–1028.

Weynberg., K. D. (2018). Viruses in marine ecosystems: from open waters to coral reefs. *Advances in Virus Research*, 101, 1–38.

Whitman, W. B., Coleman, D. C., & Wiebe, W. J. (1998). Prokaryotes: the unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(12), 6578–6583.

Winkler, K. C., De Waart, J., Grooten, C., Zegers, B. J. M., Tellier, N. F., & Vertregt, C. D. (1965). Lysogenic conversion of staphylococci to loss of  $\beta$ -toxin. *Microbiology*, 39, 321–333.

Wong, Sung-Hye H, Grieco. Ann Y. K, W. Scott Dunbar, Ross T. A. MacGillivray, Curtis, S. B. (2012). Optimization of fermentation parameters in phage production using response surface methodology. *Ind Microbiol Biotechnol*, 1515–1522. <https://doi.org/10.1007/s10295-012-1148-3>

World Health Organization.(2017). WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. Disponible en <https://www.who.int/es/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>. Ultimo acceso:

24/04/2021

- World Health Organization. (2019). New report calls for urgent action to avert antimicrobial resistance crisis. Disponible en: <https://www.who.int/news/item/29-04-2019-new-report-calls-for-urgent-action-to-avert-antimicrobial-resistance-crisis>. Ultimo acceso 24/04/2021
- Wright, A., Hawkins, C. H., Änggård, E. E., & Harper, D. R. (2009). A controlled clinical trial of a therapeutic bacteriophage preparation in chronic otitis due to antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*; A preliminary report of efficacy. *Clinical Otolaryngology*, 34(4), 349–357. <https://doi.org/10.1111/j.1749-4486.2009.01973.x>
- Zeng, L. , Samuel O. Skinner, Jean Sippy, Michael Feiss, and I. G. (2011). Decision Making at a Subcellular Level Determines the Outcome of Bacteriophage Infection. *Cell*, 141(4), 682–691. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.034>. Decision
- Zhvania, P., Hoyle, N. S., Nadareishvili, L., Nizharadze, D., & Kutateladze, M. (2017). Phage therapy in a 16-year-old boy with netherton syndrome. *Frontiers in Medicine*, 4(JUL), 1–5. <https://doi.org/10.3389/fmed.2017.00094>
- Zinder, N. D., & Lederberg, J. (1952). Genetic exchange in Salmonella. *Bacteriol.*, 64(5), 679–699.

## MATERIAL SUPLEMENTARIO



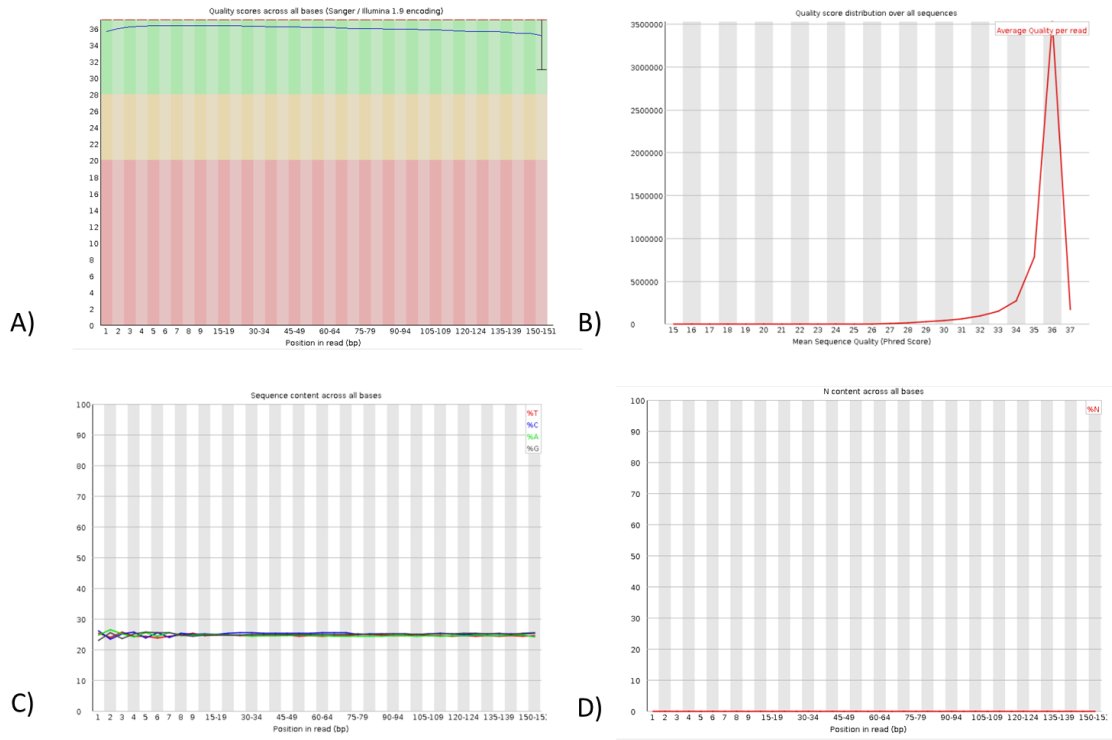


Figura S1. Análisis de calidad con FastQC de las lecturas crudas de secuenciación del fago M8-2. A) Promedio de valores Phred (Q-value) a lo largo de la longitud (151 pb) de la lectura de secuenciación: La línea en el área verde representa la calidad (eje y) a lo largo de la lectura de secuenciación (eje x); B) Distribución del Q-value en el total de las lecturas de secuenciación; C) Contenido de las bases nitrogenadas a lo largo del genoma: Se observan 4 líneas paralelas que indican que no se generaron discordancias en el llamado de bases en la lectura de secuenciación. D) Contenido de asignaciones “N” (cualquier nucleótido) a lo largo de la lectura de secuenciación.

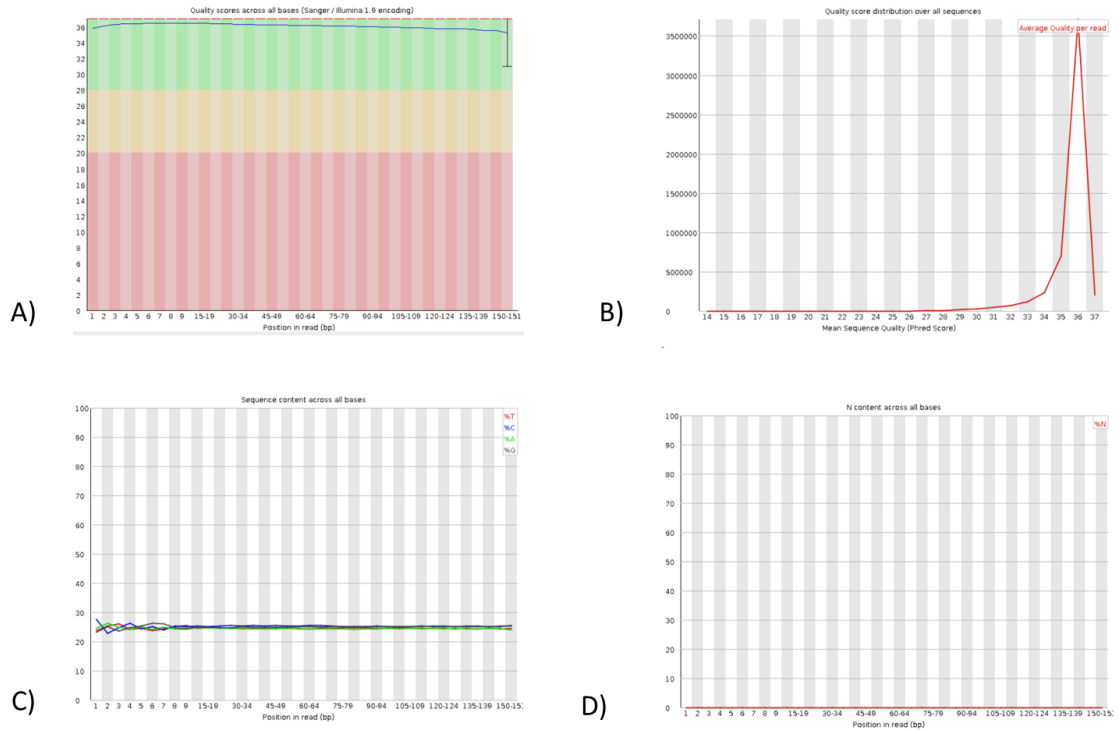
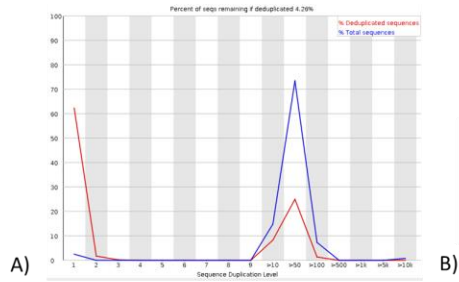
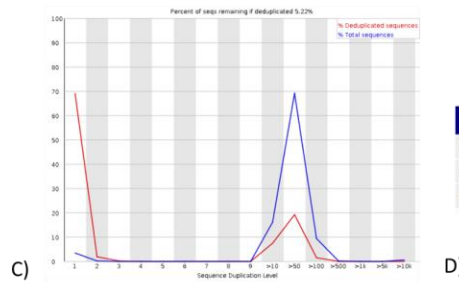


Figura S2. Análisis de calidad con FastQC de las lecturas crudas de secuenciación del fago M8-3. A) Promedio de valores Phred (Q-value) a lo largo de la longitud (151 pb) de la lectura de secuenciación: La línea en el área verde representa la calidad (eje y) a lo largo de la lectura de secuenciación (eje x); B) Distribución del Q-value en el total de las lecturas de secuenciación; C) Contenido de las bases nitrogenadas a lo largo del genoma: Se observan 4 líneas paralelas que indican que no se generaron discordancias en el llamado de bases en la lectura de secuenciación. D) Contenido de asignaciones “N” (cualquier nucleótido) a lo largo de la lectura de secuenciación.



Sequence	Count	Percentage	Possible Source
AGGGACACATAGAGATGACTATCGAACTGGTACACTAGGACACTTTTA	30301	0.5860216592645999	No Hit
TCTCACAGTTCAGAACCCTCAAGTACCCCCCATAGCCCTCTTAAAGCC	14020	0.2711469477208571	No Hit
TCTCACAGTTCAGAACCCTCAAGTACCCCCCATAGCCCTCTTAAAGCCA	6672	0.1290365502991126	No Hit



Sequence	Count	Percentage	Possible Source
TCTCACAGTTCAGAACCCTCAAGTACCCCCCATAGCCCTCTTAAAGCCA	16239	0.31237706849539054	No Hit
AGGGACACATAGAGATGACTATCGAACTGGTACACTAGGACACTTTTA	15961	0.30702939776186516	No Hit
CTCACAGTTCAGAACCCTCAAGTACCCCCCATAGCCCTCTTAAAGCCAC	5928	0.11403234571344756	No Hit

Figura S3. Métricas de calidad baja por FastQC en las las lecturas crudas de secuenciación del fago M8-2 y M8-3. A) Porcentaje de lectura duplicadas en los datos crudos de la secuenciación del fago M8-2; B) Secuencias sobrerrepresentadas en los datos crudos de la secuenciación del fago M8-2: Se encontraron 3 secuencias altamente repetitivas a lo largo de los datos de secuenciación para el fago M8-2. C) Porcentaje de lectura duplicadas en los datos crudos de la secuenciación del fago M8-3; D) Secuencias sobrerrepresentadas en los datos crudos de la secuenciación del fago M8-3: Se encontraron 3 secuencias altamente repetitivas a lo largo de los datos de secuenciación para el fago M8-3

## Apéndice 1

### ANOVA de un solo factor: Amplificación de fago M8-2

#### Método

Ho. - Todas las medias son iguales

Ha. - No todas las medias son iguales

Nivel de significancia  $\alpha = 0.05$

*Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.*

Tabla 9. Información del factor (Fago M8-2).

Factor	Niveles	Valores
Factor	4	4.1e+07, 4.1e+06, 4.1e+05, 4.1e+04

Tabla 10. Análisis de Varianza (Fago M8-2).

FUENTE	GL	SC AJUST.	MC AJUST.	VALOR F	VALOR P
<b>FACTOR</b>	3	2.45703E+16	8.19011E+15	6.60	0.015
<b>ERROR</b>	8	9.92073E+15	1.24009E+15		
<b>TOTAL</b>	11	3.44911E+16			

Tabla 11. Resumen del modelo (Fago M8-2).

S	R-CUAD.	R-CUAD.	R-CUAD.
		(AJUSTADO)	(PRED)
<b>35214932</b>	71.24%	60.45%	35.28%

Tabla 12. Medias (Fago M8-2).

FACTOR	N	MEDIA	DESV.EST.	IC DE 95%
4.1E+07	3	126666667	49328829	(79782488, 173550845)
4.1E+06	3	45000000	39230090	(-1884178, 91884178)
4.1E+05	3	57000000	31432467	(10115822, 103884178)
4.1E+04	3	493333	180093	(-46390845, 47377512)

*Desv.Est. agrupada = 35214932*

### Comparaciones en parejas de Tukey

Tabla 13. Agrupación de información utilizando el método de Tukey ( $\alpha=0.05\%$ ) (Fago M8-2).

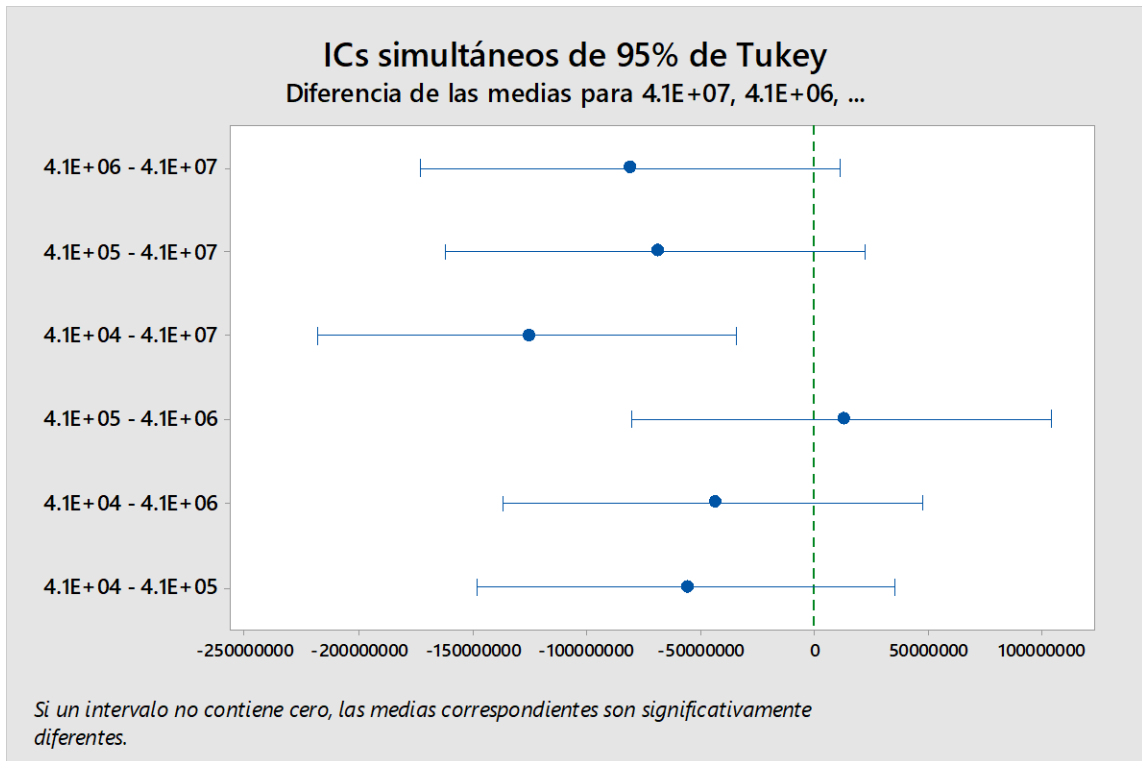
FACTOR	N	MEDIA	AGRUPACIÓN
4.1E+07	3	126666667	A
4.1E+05	3	57000000	A B
4.1E+06	3	45000000	A B
4.1E+04	3	493333	B

*Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.*

Tabla 14. Pruebas simultáneas de Tukey para diferencias de las medias (Fago M8-2).

DIFERENCIA DE NIVELES	DIFERENCIA DE LAS MEDIAS	EE DE DIFERENCIA	IC DE 95%	VALOR T	VALOR P AJUSTADO
4.1E+06 - 4.1E+07	-81666667	28752872	(-173767685, 10434351)	-2.84	0.083
4.1E+05 - 4.1E+07	-69666667	28752872	(-161767685, 22434351)	-2.42	0.150
4.1E+04 - 4.1E+07	-126173333	28752872	(-218274351, -34072315)	-4.39	0.010
4.1E+05 - 4.1E+06	12000000	28752872	(-80101018, 104101018)	0.42	0.974
4.1E+04 - 4.1E+06	-44506667	28752872	(-136607685, 47594351)	-1.55	0.456
4.1E+04 - 4.1E+05	-56506667	28752872	(-148607685, 35594351)	-1.97	0.276

*Nivel de confianza individual = 98.74%*



**Figura S4. Diferencia de medias para el fago M8-2 en los ensayos de amplificación viral.** La inoculación de una concentración  $\geq 4.1 \times 10^7$  UFP·ml<sup>-1</sup> en los ensayos de amplificación es significativamente diferente con respecto a la inoculación de títulos  $\leq 4.1 \times 10^4$  UFP·ml<sup>-1</sup>.

## Apéndice 2

### ANOVA de un solo factor: Amplificación de fago M8-3

#### Método

Hipótesis nula      Todas las medias son iguales

Hipótesis alterna    No todas las medias son iguales

Nivel de significancia       $\alpha = 0.05$

*Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.*

Tabla 5. Información del factor (Fago M8-3).

Factor	Niveles	Valores
Factor	4	3.6E+07, 3.6E+06, 3.6E+05, 3.6E+04

Tabla 6. Análisis de Varianza (Fago M8-3).

FUENTE	GL	SC AJUST.	MC AJUST.	VALOR F	VALOR P
<b>FACTOR</b>	3	4.26200E+15	1.42067E+15	5.80	0.021
<b>ERROR</b>	8	1.95801E+15	2.44751E+14		
<b>TOTAL</b>	11	6.22001E+15			

Tabla 17. Resumen del modelo (Fago M8-3).

S	R-CUAD.	R-CUAD.	R-CUAD.
		(AJUSTADO)	(PRED)
<b>15644512</b>	68.52%	56.72%	29.17%



Tabla 18. Medias (Fago M8-3).

FACTOR	N	MEDIA	DESV.EST.	IC DE 95%
3.6E+07	3	44666667	20207259	(23838000, 65495334)
3.6E+06	3	36666667	23797759	(15838000, 57495334)
3.6E+05	3	73333333	2081666	(-13495334, 28162000)
3.6E+04	3	1633333	55076	(-20665334, 20992000)

*Desv.Est. agrupada = 15644512*

### Comparaciones en parejas de Tukey

Tabla 19. Agrupación de información utilizando el método de Tukey ( $\alpha=0.05\%$ ) (Fago M8-3)

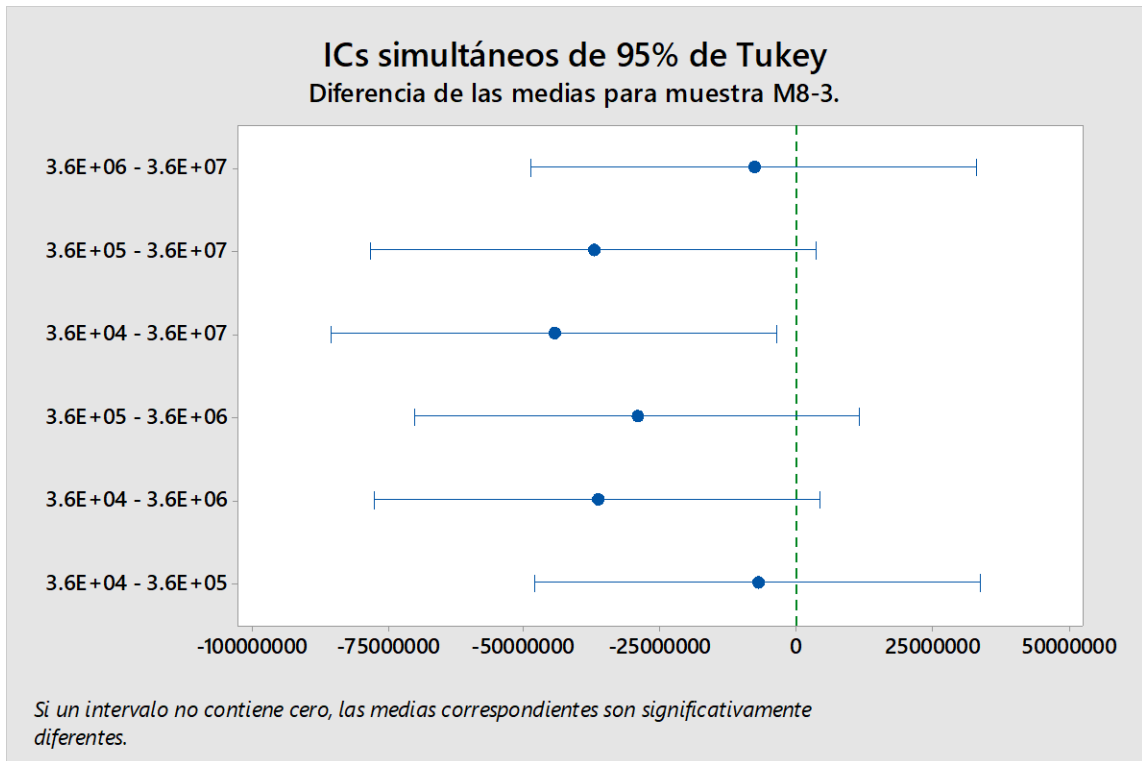
FACTOR	N	MEDIA	AGRUPACIÓN
3.6E+07	3	44666667	A
3.6E+06	3	36666667	A B
3.6E+05	3	73333333	A B
3.6E+04	3	1633333	B

*Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.*

Tabla 20. Pruebas simultáneas de Tukey para diferencias de las medias (Fago M8-3).

DIFERENCIA DE NIVELES	DIFERENCIA DE LAS MEDIAS	EE DE DIFERENCIA	IC DE 95%	VALOR T	VALOR P AJUSTADO
3.6E+06 - 3.6E+07	-8000000	12773691	(-48916606, 32916606)	-0.63	0.921
3.6E+05 - 3.6E+07	-37333333	12773691	(-78249939, 3583272)	-2.92	0.074
3.6E+04 - 3.6E+07	-44503333	12773691	(-85419939, -3586728)	-3.48	0.034
3.6E+05 - 3.6E+06	-29333333	12773691	(-70249939, 11583272)	-2.30	0.178
3.6E+04 - 3.6E+06	-36503333	12773691	(-77419939, 4413272)	-2.86	0.081
3.6E+04 - 3.6E+05	-7170000	12773691	(-48086606, 33746606)	-0.56	0.941

*Nivel de confianza individual = 98.74%*



**Figura S5. Diferencia de medias para el fago M8-3 en los ensayos de amplificación viral.** La inoculación de una concentración  $\geq 3.6 \times 10^7$  UFP $\cdot$ ml $^{-1}$  en los ensayos de amplificación es significativamente diferente con respecto a la inoculación de títulos  $\leq 3.6 \times 10^4$  UFP $\cdot$ ml $^{-1}$ .

ANOVA de un solo factor: Curva infectiva de fago M8-3

Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales

Hipótesis alterna No todas las medias son iguales

Nivel de significancia  $\alpha = 0.05$

*Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.*

Tabla 21. Información del factor (Curva infectiva de fago M8-3)

Factor	Niveles	Valores
Factor	4	C (-), MOI 0.01, MOI 0.1, MOI 1

Tabla 22. Análisis de Varianza (Curva infectiva de fago M8-3)

FUENTE	GL	SC AJUST.	MC AJUST.	VALOR F	VALOR P
<b>FACTOR</b>	3	0.3889	0.12963	3.94	0.011
<b>ERROR</b>	80	2.6330	0.03291		
<b>TOTAL</b>	83	3.0219			

Tabla 23. Resumen del modelo (Curva infectiva de fago M8-3)

S	R-CUAD.	R-CUAD.	R-CUAD.
		(AJUSTADO)	(PRED)
<b>0.181417</b>	12.87%	9.60%	3.94%

Tabla 24. Medias (Curva infectiva de fago M8-3)

FACTOR	N	MEDIA	DESV.EST.	IC DE 95%
<b>C (-)</b>	21	0.3726	0.2509	(0.2939, 0.4514)
<b>MOI 0.01</b>	21	0.2111	0.1502	(0.1323, 0.2899)
<b>MOI 0.1</b>	21	0.2117	0.1538	(0.1329, 0.2904)
<b>MOI 1</b>	21	0.2254	0.1498	(0.1466, 0.3042)

*Desv.Est. agrupada = 0.181417*

### Comparaciones en parejas de Tukey

Tabla 25. Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95% ( $\alpha=0.05\%$ ) (Curva infectiva de fago M8-3).

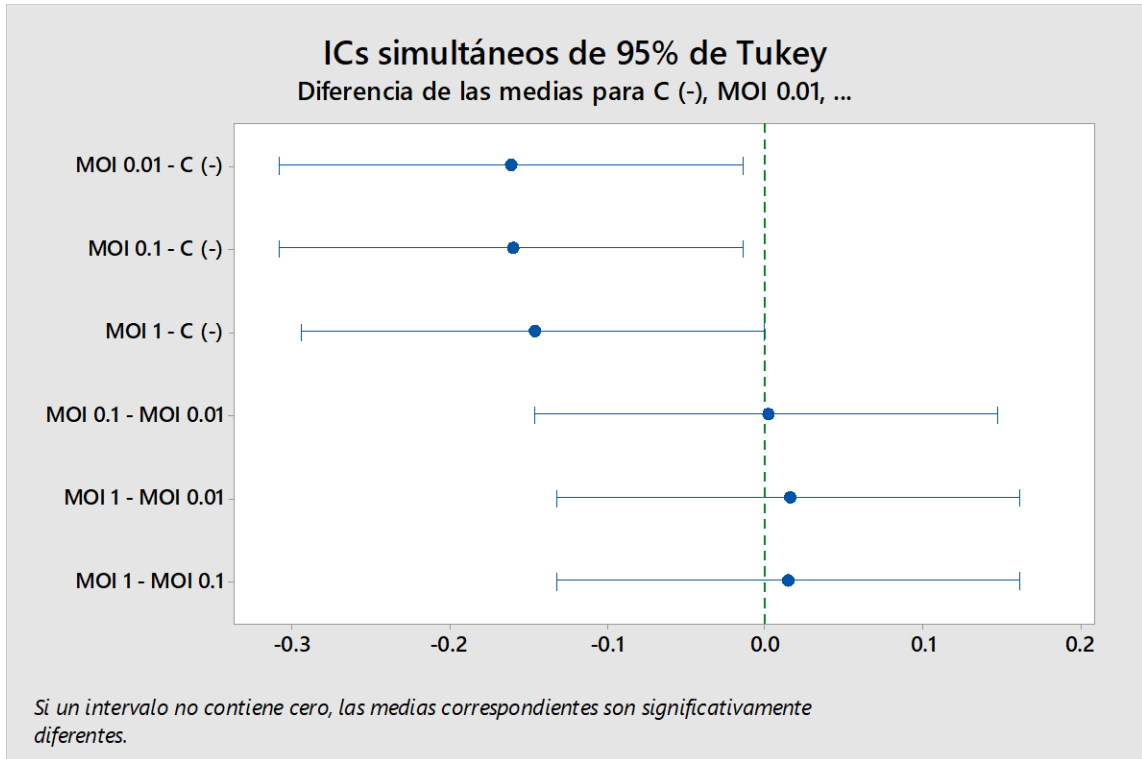
FACTOR	N	MEDIA	AGRUPACIÓN
<b>C (-)</b>	21	0.3726	A
<b>MOI 1</b>	21	0.2254	B
<b>MOI 0.1</b>	21	0.2117	B
<b>MOI 0.01</b>	21	0.2111	B

*Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.*

Tabla 26. Pruebas simultáneas de Tukey para diferencias de las medias (Curva infectiva de fago M8-3)

Diferencia de niveles	Diferencia de las medias	EE de diferencia	IC de 95%	Valor T	Valor p ajustado
MOI 0.01 - C (-)	-0.1615	0.0560	(-0.3084, -0.0146)	-2.88	0.025
MOI 0.1 - C (-)	-0.1610	0.0560	(-0.3079, -0.0141)	-2.88	0.026
MOI 1 - C (-)	-0.1472	0.0560	(-0.2941, -0.0003)	-2.63	0.049
MOI 0.1 - MOI 0.01	0.0005	0.0560	(-0.1463, 0.1474)	0.01	1.000
MOI 1 - MOI 0.01	0.0143	0.0560	(-0.1326, 0.1612)	0.26	0.994
MOI 1 - MOI 0.1	0.0138	0.0560	(-0.1331, 0.1606)	0.25	0.995

*Nivel de confianza individual = 98.96%*



**Figura S6. Diferencia de medias para la curva infectiva del fago M8-3.** El cultivo PA en presencia de fagos en las 3 MOI empleadas, presenta un desfase en el crecimiento estadísticamente significativo con respecto al control