

Máster en Biología Molecular, Celular y Genética

Memoria del Trabajo de Fin de Máster

Caracterización de 2 bacteriófagos líticos, vB_Kp-VAC110 y vB_Kp-VAC70, frente cepas clínicas de *Klebsiella pneumoniae*

Caracterización de 2 bacteriófagos líticos, vB_Kp-VAC110 e vB_Kp-VAC70, fronte cepas clínicas de *Klebsiella pneumoniae*.

Characterization of two lytic bacteriophages, vB_Kp-VAC110 and vB_Kp-VAC70, against *Klebsiella pneumoniae* clinical strains.

Antía Baña Castro

Julio, 2021

La directora y codirectora del presente trabajo de fin de máster, Dña. María del Mar Tomás Carmona, licenciada en Medicina por la Facultad de Granada, Doctora en Microbiología por la Universidad de A Coruña, Facultativa Especialista en Microbiología e Investigadora del Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC) del complejo Hospitalario Universitario A Coruña (CHUAC) y Dña. Lucía Blasco Otero, Doctora en Biotecnología por la Universidad de Santiago de Compostela e Investigadora del Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC).

CERTIFICAN:

Que Dña. Antía Baña Castro, graduada en Biología por la Universidad de A Coruña, ha realizado en el Servicio de Microbiología y en el Instituto de Investigación Biomédica (INIBIC) del Complejo Hospitalario Universitario A Coruña (CHUAC), bajo su dirección y tutela, el trabajo titulado: “Caracterización de 2 bacteriófagos líticos, vB_Kp-VAC110 y vB_Kp-VAC70, frente cepas clínicas de *Klebsiella pneumoniae*”, el cual, reúne todos los requisitos necesarios para su defensa.

Y para que así conste, y surta los efectos oportunos, firmamos el presente certificado en A Coruña, julio de 2021.

**TOMAS
CARMONA
MARIA DEL
MAR -
74645550Q**

Firmado digitalmente por
TOMAS CARMONA
MARIA DEL MAR -
74645550Q
Fecha: 2021.07.15
16:36:57 +02'00'

Firmado por Antía
Baña Castro el día
16/07/2021 con un
certificado emitido
por Antía Baña
Castro

Dra. María del Mar Tomás Carmona

Directora

Dra. Lucía Blasco Otero

Codirectora

Dña. Antía Baña Casto

Alumna

«Cada día prefería morirme y, sin embargo, cada día luchaba por sobrevivir »

Shlomo Venezia, superviviente de Auschwitz

Índice

1. Introducción.....	1
2. Objetivos	4
3. Material y métodos	4
3.1. Origen de las muestras	4
3.2. Preparación de medios de cultivo.....	6
3.3. Extracción y propagación de los fagos.....	6
3.4. Extracción y secuenciación del ADN y análisis de las secuencias genómicas.....	7
3.5. Rango de huésped (<i>host range</i>).....	8
3.6. Cuantificación o titulación de los fagos	8
3.7. Eficiencia de plaqueo (EOP).....	9
3.8. Curva de adsorción.....	9
3.9. Curva de crecimiento en un paso (<i>One step growth curve</i>).....	10
3.10. Curvas de infección.....	11
4. Resultados	12
5. Discusión	21
6. Conclusiones	23
7. Bibliografía	24

Resumen

Klebsiella pneumoniae es una bacteria patógena oportunista causante de graves infecciones nosocomiales provocando elevadas tasas de mortalidad y morbilidad en los pacientes afectados. Al elevado grado de patogenicidad, que provoca cuadros clínicos graves principalmente en pacientes inmunodeprimidos o individuos de edades avanzadas, se le suma el aumento del número de cepas resistentes a carbapenémicos y β -lactámicos, antibióticos de espectro extendido empleados en el tratamiento de infecciones causadas por este patógeno.

Es por ello que en este escenario emergente de resistencia antimicrobiana surge la necesidad de desarrollar nuevos enfoques para hacer frente a infecciones cada vez más difíciles de tratar, donde la terapia con fagos está ganando gran atención por el aumento de estudios que respaldan su gran eficacia y seguridad en humanos, aumentando las tasas de supervivencia.

Sabiendo esto, en el presente trabajo se llevan a cabo estudios *in vitro* con el objetivo de caracterizar dos fagos líticos frente a una colección de cepas de *K. pneumoniae*, determinando los parámetros principales de crecimiento de bacteriófagos como son el período de adsorción, período de latencia, el tamaño de expulsión de partículas virales y la capacidad infectiva, mediante curvas de muerte. También se llevó a cabo la secuenciación del genoma de los fagos así como el análisis del mismo con el objetivo de conocer la función de determinadas proteínas potencialmente relevantes para su uso en terapia fágica.

Los resultados obtenidos permitieron caracterizar la capacidad infectiva de ambos fagos así como determinar la ausencia de genes de virulencia y resistencia, que hacen de ellos unos candidatos aptos para su uso en terapia fágica.

Resumo

Klebsiella pneumoniae é unha bacteria patóxena oportunista causante de graves infeccións nosocomiais provocando elevadas taxas de mortalidade e morbilidade nos pacientes afectados. Ao elevado grado de patoxenicidade, que provoca cadros clínicos graves principalmente en pacientes inmunodeprimidos ou individuos de idades avanzadas, súmaselle o aumento do número de cepas resistentes a carbapenémicos e β -lactámicos, antibióticos de espectro estendido empregados no tratamento de infeccións causadas por este patóxeno.

E por isto que neste escenario emerxente de resistencia antimicrobiana xorde a necesidade de desenvolver novos enfoques para facer fronte a infeccións cada vez máis difíciles de tratar, onde a terapia con fagos está gañando gran atención polo aumento de estudos que respaldan a súa gran eficacia e seguridade en humanos, aumentando as taxas de supervivencia.

Sabendo isto, no presente traballo lévase a cabo estudos *in vitro* co obxectivo de caracterizar dous fagos líticos fronte unha colección de cepas de *K. pneumoniae*, determinando os parámetros principais do crecemento de bacteriófagos, como son o período de adsorción, período de latencia, tamaño de expulsión de partículas virais e a capacidade infectiva, mediante curvas de morte. Tamén se levou a cabo a secuenciación do xenoma dos fagos así coma a análise do mesmo co obxectivo de coñecer a función de determinadas proteínas potencialmente relevantes para o seu uso en terapia fájica.

Os resultado obtidos permitiron caracterizar a capacidade infectiva de ambos fagos así como determinar a ausencia de xenes de virulencia e resistencia, que fan deles uns candidatos aptos para o seu uso en terapia fájica.

Abstract

Klebsiella pneumoniae is an opportunistic pathogenic bacterium that causes serious nosocomial infections with high mortality and morbidity rates in affected patients. In addition to the high degree of pathogenicity, which causes severe clinical conditions mainly in immunosuppressed patients or elderly individuals, it is added the increase in the number of strains resistant to carbapenems and β -lactams, extended-spectrum antibiotics used in the treatment of infections caused by this pathogen.

That is why in this emerging scenario of antimicrobial resistance there is a need to develop new approaches to deal with infections that are increasingly difficult to treat, where phage therapy is gaining great attention due to the increase in studies that support its high efficacy and safety in humans, increasing survival rates.

Knowing this, in the present work *in vitro* studies are carried out in order to characterize two lytic phages against a collection of *K. pneumoniae* strains, determining the main parameters of bacteriophage growth such as the adsorption rate, latent rate, viral particle expulsion size and infective capacity, using death curves. Phage genome sequencing was also carried out as well as its analysis in order to know the function of certain potentially relevant proteins for use in phage therapy.

The results obtained made it possible to characterize the infective capacity of both phages as well as to determine the absence of virulence and resistance genes, which make them suitable for use in phage therapy.

1. Introducción

K. pneumoniae es un bacilo Gram- negativo fermentador de lactosa con una cápsula prominente, que constituye una de las especies de mayor relevancia clínica dentro de la familia Enterobacteriaceae (Li et al., 2014). Se caracteriza por ser un tipo de bacteria no móvil, que tiene capacidad para crecer en un rango de temperaturas que oscilan entre los 18-47°C, en un rango de pH 4-8 y a unas concentraciones salinas de 0-5%. Su morfología en placa se caracteriza por producir colonias mucoides (Figura 1) debido a su elevada producción de cápsula de polisacárido (Madueño, 2017).



Figura 1. Crecimiento en placa de *K. pneumoniae* en medios MacConkey, Agar sangre y Müller-Hinton (de izquierda a derecha).

Es un microorganismo ubicuo que coloniza multitud de ambientes, como puede ser el agua, el suelo o el intestino de los mamíferos. En el ser humano habita como saprófito en la nasofaringe, en el tracto gastrointestinal y es un colonizador transitorio en la piel (Madueño, 2017).

No obstante, el tipo de colonización más alarmante de este patógeno oportunista es la diseminación por las superficies sanitarias y los dispositivos médicos invasivos, donde causa infecciones nosocomiales potencialmente mortales, como neumonía, bacteriemia o sepsis. Las características asociadas a estas infecciones son las elevadas tasas de morbilidad y mortalidad, que son consecuencia de la respuesta inflamatoria exacerbada que provoca junto con su elevada capacidad proliferativa en cualquier tejido (Abdel-Aziz, 2017).

Los factores de virulencia asociados a este patógeno que potencian la gravedad con la que cursa su infección son la cápsula, el lipopolisacárido (LPS), las fimbrias y los sideróforos.

La patogenicidad de *K. pneumoniae* viene determinada tanto por la cápsula como por el LPS que tienen una función protectora frente a la respuesta inmune del huésped a través del bloqueo de la lisis mediada por el complemento y de la reducción de los niveles de citocinas proinflamatorias. De hecho, el aumento en la producción de material capsular está directamente correlacionado con la virulencia de la cepa. Con respecto a las fimbrias, estas participan en la adhesión a las superficies del huésped, por lo que están involucradas en su invasión (Herridge et al., 2020). Finalmente, los sideróforos son moléculas que presentan mayor afinidad al hierro que las proteínas de transporte del huésped, lo que les permite robar el hierro de las mismas o eliminarlo del medio. Concretamente, las cepas de *K.pneumoniae* codifican varios sideróforos, lo que optimiza su colonización en diferentes tejidos o bien permite evadir la neutralización de un sideróforo por parte del huésped (Paczosa & Meccas, 2016).

A pesar de ser un patógeno hipervirulento, la preocupación actual se centra en el elevado número de cepas resistentes a antibióticos, que muestra una tendencia ascendente, lo que limita cada vez más las opciones terapéuticas disponibles para los pacientes infectados, suponiendo un problema de salud pública a nivel mundial (Bengoechea & Sa Pessoa, 2019).

Es por ello que es un integrante del grupo ESKAPE (*Enterococcus faecium* , *Staphylococcus aureus* , *Klebsiella pneumoniae* , *Acinetobacter baumannii* , *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter*), designado por la OMS como patógenos de “estado prioritario” por la urgente necesidad de desarrollar nuevas estrategias efectivas antimicrobianas debido a su elevada capacidad de generar resistencia contra oxazolidinonas, lipopéptidos, macrólidos, fluoroquinolonas, tetraciclinas, β -lactámicos y carbapenémicos, destacando estos últimos como la última línea de defensa para tratar infecciones de *K.pneumoniae* (De Oliveira et al., 2020).

Entre los principales mecanismos implicados en la resistencia a antibióticos empleados por este patógeno destacan (Madueño, 2017):

- La producción de β -lactamasas, unas enzimas que hidrolizan con rapidez el anillo β -lactámico del antibiótico, provocando la inactivación del mismo.
- La alteración de la permeabilidad de membrana a través de cambios en la conformación de las porinas, unas proteínas multiméricas presentes en la membrana externa que regulan el paso de moléculas hidrófilas y de diversas sustancias al espacio periplásmico.

- La activación de bombas de expulsión o la alteración en la diana de actuación del antibiótico.

En el contexto actual de pérdida de efectividad de los antibióticos, resurge la terapia fágica como una prometedora alternativa para paliar una serie de infecciones que se están volviendo cada vez más difíciles e incluso imposibles de tratar. Este tipo de terapia consiste en la administración de bacteriófagos (virus que infectan bacterias) directamente a un paciente con el objetivo de lisar al patógeno bacteriano causante de una infección clínicamente relevante (Gordillo Altamirano & Barr, 2019).

Esta terapia está evolucionando favorablemente con resultados positivos en el tratamiento frente enfermedades multirresistentes junto con la realización de múltiples ensayos clínicos. No obstante, a pesar de que su uso está integrado en los sistemas sanitarios de algunos países de Europa del Este y la ex Unión Soviética, en la mayoría de países su aplicación se limita a la terapia compasiva como último recurso para tratar a pacientes que se encuentran en una situación crítica ante el agotamiento de las opciones terapéuticas autorizadas (Furfaro et al., 2018).

Los bacteriófagos, también denominados fagos, son virus que infectan y se replican dentro de las células bacterianas de forma específica. Son los microorganismos más abundantes y diversos del planeta, superando 10 veces en número a las células microbianas al contar con un número total de más de 10^{30} . Representan una de las fuentes más habituales de presión depredadora sobre las comunidades bacterianas, pudiendo determinar su tamaño, composición, estructura y desarrollo (Tan et al., 2019).

De hecho, la dinámica de su replicación es fundamental para su aplicación terapéutica. Los fagos que siguen un ciclo de vida lítico van a infectar y a lisar rápidamente a la célula huésped, lo que los hace más fiables para su uso en terapia fágica puesto que el resultado final va a ser la completa destrucción de las células bacterianas. Por el contrario, los fagos lisogénicos, van a integrarse con el genoma de su huésped, llegando a modificar el fenotipo bacteriano mediante la expresión de genes virales, proceso que se conoce como conversión lisogénica (Gordillo Altamirano & Barr, 2019).

Además, estos fagos pueden entrar en un ciclo de vida lítico bajo determinadas condiciones ambientales estresantes, permitiendo su replicación activa a expensas del huésped. Es por ello que los fagos con ciclos de vida lisogénicos no siguen un patrón controlable, lo que los convierte en candidatos poco confiables para su uso en terapia.

Esto junto con la posibilidad de que pueden transferir genes al huésped que le permitan adquirir resistencia o producción de toxinas, suponen su total descarte puesto que pueden conferir mayor virulencia a la bacteria dificultando el tratamiento de la infección (Herridge et al., 2020).

El uso terapéutico de los bacteriófagos presenta multitud de ventajas frente al tratamiento convencional con antibióticos. Los fagos muestran una elevada especificidad por sus huéspedes, pudiendo lisar solo un subconjunto de una especie bacteriana, por lo que se elimina el impacto sobre la microbiota del paciente. La capacidad de los fagos para proliferar en la zona de la infección es otra ventaja frente a los antibióticos. Además, los fagos co-evolucionan con los huéspedes de manera que cada vez que las células bacterianas evolucionan para evadir la infección fágica, los fagos desarrollan nuevos mecanismos de infección. Por tanto, bacterias y fagos se encuentran en una co-evolución constante entre sus mecanismos de defensa e infectividad (Pirnay et al., 2018).

2. Objetivos

Objetivo general

El objetivo del presente trabajo es caracterizar dos fagos líticos aislados a partir de aguas residuales, que poseen actividad frente a diferentes cepas clínicas de *K. pneumoniae*.

Objetivos específicos

- Estudiar la capacidad lítica de los fagos a través de ensayos *in vitro*.
- Secuenciar el ADN de los fagos para identificar proteínas con funciones que puedan resultar de interés.
- Determinar si son candidatos óptimos para uso en clínica.

3. Material y métodos

3.1. Origen de las muestras

3.1.1. Bacteriófagos

En el presente estudio se ha empleado un total de 175 bacteriófagos, proporcionados por el grupo de la Dra. Pilar Domingo-Calap de la Universitat de Valencia que se ha encargado de su aislamiento y transporte.

Dado el elevado grado de especificidad que muestran los fagos por su hospedador, dichas muestras se aislaron del hábitat de sus hospedadores bacterianos habituales, en este caso al tratarse de bacterias clínicamente relevantes, se han obtenido de fuentes humanas: aguas residuales.

3.1.2. Cepas clínicas

En cuanto a las cepas clínicas, en este estudio se empleó una colección de 45 cepas clínicas de *K. pneumoniae* procedentes de diversos hospitales Españoles. Dichas cepas fueron aisladas a partir de diversas muestras biológicas como sangre, esputo u orina (Tabla 1).

Tabla 1. Recopilación de los orígenes biológicos de las diferentes cepas de *K. pneumoniae* testadas.

Cepa	Origen biológico	Cepa	Origen biológico
SCISP4C	Sangre	K2783	Sangre
SCISP2C	Sangre	K2715	Sangre
K3667	Sangre	K2707	Sangre
K3579	Sangre	K2691	Sangre
K3575	Sangre	K2597	Sangre
K3574	Sangre	K2535	Sangre
K3573	Sangre	ST974-OXA48	Orina
K3571	Sangre	ST899-OXA48	Sangre
K3509	Sangre	ST258-KPC3	Orina
K3416	Sangre	ST11-OXA48	Orina
K3325	Sangre	ST512-KPC3	Frotis axilar
K3324	Sangre	ST13-OXA48	Rectal
K3323	Sangre	ST340-VIM1	Rectal
K3322	Sangre	ST846-OXA48	Esputo
K3321	Sangre	ST11-VIM1	Respiratorio
K3320	Sangre	ST147-VIM1	Rectal
K3318	Sangre	ST101-KPC2	Rectal
K2990	Sangre	ST16-OXA48	Orina
K2989	Sangre	ST437-OXA245	Rectal
K2986	Sangre	ST11-OXA245	Herida
K2984	Sangre	ST15-VIM1	Sangre
K2983	Sangre	ST405-OXA48	Herida
K2791	Sangre	Nº Total cepas	45

3.2. Preparación de medios de cultivo

Medio Luria-Bertani (LB) líquido

Fórmula en gramos por 1 L de agua destilada:

5 g NaCl

10 g Triptona

5 g Levadura

Nota: Para el manejo de bacteriófagos, este tipo de medios suele suplementarse con 1mM de CaCl₂.

Medio Triptona-Agar (TA)

Fórmula en gramos para 100 mL de agua destilada:

0,5 g NaCl

1 g Triptona

1,5 g Agar técnico

Medio Triptona-Agar Semisólido (TA *Soft*)

Fórmula en gramos para 100 mL de agua destilada:

0,5 g NaCl

1 g Triptona

0,4 g Agar técnico

***Sault-Magnesium Buffer* (SM Buffer)**

0,1 M NaCl,

10 mM MgSO₄

20 mM tris-HCl (pH 7)

3.3. Extracción y propagación de los fagos

Con el fin de obtener un *stock* de fagos, se procedió en primer lugar a la propagación de los mismos. Para ello se preparó un inóculo bacteriano con la cepa de *K. pneumoniae* empleada como huésped, que es aquella en la que se aisló el fago.

Para ello se seleccionó una colonia, y se inoculó en 5 mL de medio Luria-Bertani (LB) líquido que se incubó durante toda la noche a 37 °C en agitación a 180 rpm (*overnight*).

A continuación, se preparó una dilución 1/100 del cultivo *overnight* en 15 mL de LB líquido (suplementada con 1 mM CaCl₂), hasta que el cultivo alcanzó la fase de crecimiento exponencial temprana correspondiente a una densidad óptica (DO_{600nm}) ~ 0,3, que se corresponde con una concentración bacteriana de 1*10⁶-10⁷ unidades formadoras de colonias por mL (UFC/mL).

Tras llegar a esta DO_{600nm}, se procedió a la infección del cultivo bacteriano mediante la inoculación de una pequeña cantidad de muestra fágica que se recuperó del tubo de criopreservación con un asa de siembra y se dejó incubando hasta que se alcanzó la lisis completa del cultivo, aproximadamente al cabo de 2-3 horas tras la infección. Esto puede observarse a simple vista por la pérdida de turbidez asociada a la muerte bacteriana además de la presencia de restos celulares en el medio.

Una vez lisado el cultivo, se añadió cloroformo a una concentración final del 1 % y se dejó incubando a temperatura ambiente durante 20 min con períodos de agitación cada 10 min con el fin de eliminar los restos bacterianos. Una vez realizado este paso, se centrifugaron los tubos a 3500 rpm durante 15 min y se recuperó el sobrenadante, que se filtró por un filtro de 0,45 µm de poro.

El sobrenadante filtrado con los fagos, se trasladó a un tubo de criopreservación para su congelación con glicerol en una proporción 1:1 y se almacenó a – 80 °C. El volumen restante se mantuvo a 4 °C para su uso rutinario en los experimentos que prosiguen.

3.4. Extracción y secuenciación del ADN y análisis de las secuencias genómicas

El ADN de los fagos se extrajo siguiendo el protocolo de extracción del fenol-cloroformo-isoamilo (PCI) / SDS (phagesdb.org). Una vez extraído el ADN se procedió a su cuantificación mediante Nanodrop (Nanodrop Technologies, Waltham, MA, USA). A continuación, las librerías genómicas se prepararon usando Nextera XT Library prep kit (Illumina), siguiendo las instrucciones del fabricante, y se comprobó la distribución de las longitudes de los fragmentos con el Bioanalizador Agilent 2100, usando el kit Agilent Hight sensitivity DNA. Las librerías fueron purificadas usando Mag-Bind RXNPure plus magnetic beads (Omega Biotek) y finalmente, el *pool* se secuenció utilizando la plataforma Miseq (Illumina Inc, USA).

Los archivos FASTQ fueron comprobados utilizando el software FastQC y resumidos mediante MultiQC (Ewels et al., 2016). Las lecturas cortas de 300 bp *paired-end* de cada aislados fueron ensambladas *de novo* con Spades V.3.15.2 (Bankevich et al., 2012).

Finalmente, se procedió a la anotación de los genomas mediante las herramientas de Patric 3.6.9 (<http://www.Patricbcr.org>), Blastx (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>), HHmer (<http://hhmer.org>) y HHpred (<http://toolkit.tuebingen.mpg.de/tools/hhpred>).

3.5. Rango de huésped (*host range*)

Este experimento se llevó a cabo para establecer la variedad de cepas que un fago es capaz de infectar, permitiendo seleccionar aquellos con mayor capacidad infectiva para estudios posteriores. Para determinar este rango se recurrió al test de la gota (*spot test*, en inglés).

Para llevar a cabo este protocolo, se partió de 200 μL de cultivo bacteriano en fase de crecimiento exponencial tardía ($\text{DO}_{600\text{nm}} = 0,7$), que se corresponde con una concentración bacteriana de $1 \cdot 10^8$ UFC/mL, a los que se le añadió 4 mL de medio TA *soft* para posteriormente verter toda la mezcla en placas de TA suplementadas previamente con 1 mM de CaCl_2 , para facilitar la adhesión del fago a las células. Tras su solidificación, se añadió una gota de 10 μl del fago que interesaba testar con el fin de determinar su capacidad infectiva. Todas las placas resultantes de la realización de este experimento se realizaron por duplicado.

Transcurrido un período de incubación de 24 h a 37 °C se procedió a examinar y a clasificar las gotas (*spots*). El criterio empleado para la clasificación de las gotas obtenidas tras la experimentación es el que prosigue:

++	<i>Spot</i> claro
+	<i>Spot</i> claro en todas partes pero con un fondo ligeramente brumoso
+/-	<i>Spot</i> turbio sustancial en toda la zona despejada
+--	<i>Spot</i> muy turbio
-	<i>Spot</i> negativo

3.6. Cuantificación o titulación de los fagos

Tras seleccionar los fagos con mayor capacidad infectiva, se prepararon una serie de diluciones seriadas 1/10 de los mismos en una disolución tamponada de SM (composición de sales que favorecen el entorno del fago). Posteriormente, se prepararon placas de lisis por el método de doble placa, que consiste en infectar 200 μL de cultivo bacteriano en fase exponencial tardía ($\text{DO}_{600\text{nm}} = 0,7$) con 10 μL de la dilución de fago correspondiente.

Finalmente, se añaden 4 mL de medio TA *soft* y se vierte toda la mezcla en placas de TA suplementadas previamente con 1 mM de CaCl₂. Al igual que en el caso anterior durante la realización de este experimento se realizaron réplicas biológicas por duplicado.

Las placas se dejan 20 min a T^a ambiente para favorecer la adhesión de los fagos a la superficie bacteriana puesto que se evita que esta se divida de forma activa. Transcurrido este período las placas se incuban durante 24 h a 37 °C.

Posteriormente se procedió a la cuantificación del número de placas de lisis o también llamadas calvas de lisis, para determinar la concentración en unidades formadoras de placas por mL (UFP/mL), y a la observación de la morfología de las mismas para detectar cualquier tipo de contaminación indeseada.

3.7. Eficiencia de plaqueo (EOP)

La eficiencia de plaqueo es una prueba que permite determinar la capacidad infectiva de un fago en distintas cepas en relación a la cepa considerada huésped natural. Esta prueba se llevó a cabo con las cepas que mostraron un *spot* positivo tras la realización del análisis de rango de huésped, y que se basa en la relación del título de fago en una línea celular bacteriana determinada frente a la titulación de fago en la cepa huésped.

Para realizar esta prueba se prepararon placas de doble capa que se incubaron durante 24 h a 37 °C, para posteriormente cuantificar la formación de placas de lisis, para determinar la concentración (UFP/mL) en cada una de las cepas bacterianas seleccionadas. Tras realizar el experimento, se determinó que cepa bacteriana era la mejor candidata para los experimentos que prosiguen.

3.8. Curva de adsorción

Para determinar el tiempo de adsorción de los fagos se realizó una dilución 1/100 del *overnight* de la cepa bacteriana seleccionada en un matraz con 25 mL de cultivo LB con 1 mM CaCl₂, y su incubación en agitación hasta alcanzar una DO_{600nm} = 0,7. A continuación se procedió a la infección del cultivo a una multiplicidad de infección (MOI) de 0,01.

Inmediatamente después de la infección se retiró 1mL del matraz, correspondiente al tiempo 0. A partir de este momento, todo el proceso se realizó a temperatura ambiente y en estático, prosiguiendo con sucesivas alícuotas de 1 mL a períodos de 1 min que se traspasaron a viales mantenidos en hielo y con 10 µL de cloroformo.

Las condiciones de frío permiten frenar el crecimiento evitando una posible unión reversible, lo que favorece la actuación del cloroformo, cuya función es eliminar las células bacterianas permitiendo suprimir los centros infecciosos (Clokier *et al.*, 2009).

Finalizado el tiempo de extracción, se procedió a la centrifugación de los viales a 12000 rpm durante 2 min. Finalmente, se recogió el sobrenadante y se traspasó a nuevos viales, de los que se prepararon diluciones seriadas 1/10 para realizar placas de lisis por el método de doble capa. Transcurridas 24 h de incubación a 37 °C se realizó un recuento del número de UFP/mL para determinar el número de fagos libres frente al tiempo.

3.9. Curva de crecimiento en un paso (*One step growth curve*)

Este experimento se realizó para determinar el número de viriones liberados por la bacteria infectada, lo que se denomina tamaño de explosión (*Burst size*), y la duración de la fase de latencia, permitiendo conocer la interacción existente entre el fago y la bacteria.

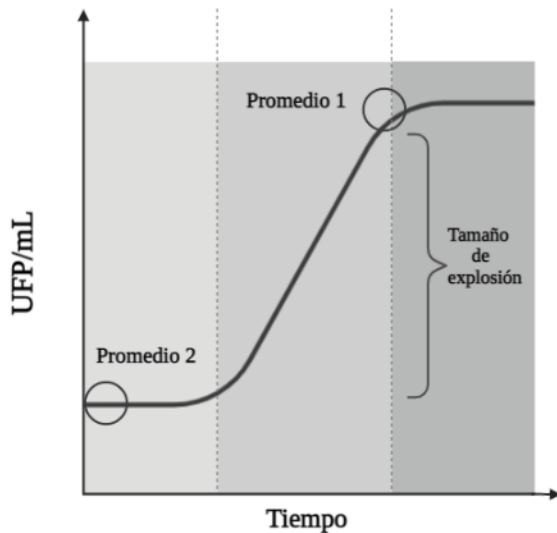
Se partió de una dilución 1/100 del *overnight* de la cepa bacteriana seleccionada en un tubo Falcon con 10 mL de cultivo LB suplementado con 1mM CaCl₂ líquido hasta que alcanzó una DO_{600nm} = 0,7. Llegado a este punto se extrajo 1 mL del cultivo a un vial para proceder a su infección con el fago a una MOI de 0,01. A continuación, se dejó en estático durante el tiempo de adsorción determinado por el experimento anterior, para posteriormente lavar sucesivamente dos veces el cultivo mediante centrifugación de 10 min a 6000xg. De esta muestra resultante se realizó una dilución 1/100 en un matraz con 25 mL de LB.

Tras inocular el contenido del vial en el matraz se extrajo 1mL de muestra, correspondiente al el tiempo 0. Este proceso se repitió a períodos de 5 min, durante los cuales el matraz se dejaba en incubación a 37 °C y bajo agitación a 180 rpm. Simultáneamente, entre estos períodos de incubación, se llevó a cabo la realización de placas de lisis por medio del método de doble placa de las diluciones 0 y -1 del contenido de los viales con sus respectivas réplicas biológicas (placas por duplicado). Este proceso se repitió inicialmente hasta un tiempo final de 60 min, el cual se fue ajustando tras las sucesivas rondas de repetición del experimento, que en este caso fueron un total de 3.

3.9.1. Cálculo del tamaño de explosión (*Burst size*)

El *Burst size* representa el número de fagos liberados por célula bacteriana, y se determina tras la realización de la curva de crecimiento en un paso, donde se mide el aumento de la concentración de fagos con el tiempo (Šivec & Podgornik, 2020).

Para determinar el *Burst size*, se emplea la fórmula que prosigue (Figura 2).



$$\frac{\text{Promedio 1}}{\text{Promedio 2}} = \frac{\text{UFP/mL final}}{\text{UFP/mL inicial}}$$

Figura 2. Esquema representativo del *Burst size* tras la obtención de la curva de crecimiento de un paso junto con la fórmula experimental para obtener el número de viriones liberados por célula.

3.10. Curvas de infección

Este tipo de curvas se llevan a cabo para observar la relación existente entre depredador-presa que siguen los fagos y sus bacterias huéspedes.

Cada condición de estudio cuenta con una réplica biológica por triplicado para que los resultados sean lo más representativos posibles. Se estudia una situación control, donde no se lleva a cabo la infección fágica, es decir, se corresponde a la referencia de crecimiento bacteriano en condiciones óptimas; y se estudia la infección de la cepa bacteriana a diferentes MOI para establecer cuál sería la más óptima para la terapia fágica, es decir, cual es la que produce la mejor infección y genera la menor resistencia.

Antes de iniciar las curvas se estableció la fase de crecimiento óptima de las bacterias para cada fago, la cual se determinó mediante la obtención de curvas de infección a una MOI de 0,1 y distintas DOs correspondientes a distintas fases de crecimiento de los cultivos bacterianos. Esto permitió establecer que las infecciones posteriores se iniciase a una $DO_{600nm} = 0,7$ para ambos fagos, que se corresponde con una concentración bacteriana de $1 \cdot 10^8$ UFC/mL.

Una vez hecho esto, se realizó una dilución 1/100 del cultivo *overnight* de la cepa bacteriana de interés en 15 mL de cultivo LB líquido que se incubó hasta una $DO_{600nm} = 0,7$.

Transcurrido el tiempo necesario para alcanzar esta fase de crecimiento se procedió a realizar una medición inicial de la DO_{600nm} mediante un espectrofotómetro para asegurarse de que todos los tubos partían de la misma concentración bacteriana y a continuación se llevó a cabo la infección a las diferentes multiplicidades de infección que se pretendían estudiar, en este caso 0,01; 0,1; 1 y 10.

Una vez infectados los tubos, estos se mantuvieron en incubación, y se retiraron cantidades de 1 mL de cada tubo a períodos de 1 h durante un período total de 6 h con una medición final a las 22 h tras la infección.

4. Resultados

Secuenciación del genoma del fago VAC70

El fago VAC70 presenta un genoma de ADN circular de unas 49758 pares de bases (pb), constituido por 87 secuencias codificantes y un contenido en Guanina-Citosina (G+C) del 50,70 %. Los resultados de homología aportados por el BLAST indican que es un virus perteneciente al orden Caudovirales y a la familia *Drexlerviridae*.

El análisis de las proteínas mostró la organización típica de los fagos con las proteínas agrupadas por función, conocida como la unidad mínima básica de un bacteriófago caudoviridal, que se constituye por genes de estructura, regulación, replicación y transcripción junto con un grupo de proteínas de lisis que suelen ir asociadas en bloque, la holina, endolisina y espanina (Tabla 2). La ausencia de proteínas relacionadas con la lisogenia como son las integrasas, recombinasas y los reguladores del ciclo lisogénico (Cro, CI, CII...) permitieron identificar el fago VAC70 como un fago lítico o virulento.

En particular se encontraron proteínas involucradas en la estructura y ensamblaje como son las proteínas de la longitud de la cola, de la cápside, proteínas del portal y subunidades pequeñas y largas de la terminasa. Junto a estas, también se identificaron genes que codificaban módulos de regulación y replicación del ADN, como proteínas de unión, subunidad pequeña de ADN polimerasa II, helicasa y primasa. Alrededor del 65 % de las proteínas restantes estudiadas no presentan una función caracterizada (*hypothetical proteins*).

Cuando se realizó este estudio el genoma del fago VAC110 se encontraba en proceso de secuenciación.

Tabla 2. Funciones de determinadas proteínas estudiadas en función de la base de datos utilizada.

Contig_id	Feature_id	Función_BLAST	Valor E
vB_Kpn-VAC70_contig_1	fig 1915306.133.peg.11	Holin	4,00E-41
vB_Kpn-VAC70_contig_1	fig 1915306.133.peg.12	Endolysin	6,00E-108
vB_Kpn-VAC70_contig_1	fig 1915306.133.peg.13	u-spannin	1,00E-83
vB_Kpn-VAC70_contig_1	fig 1915306.133.peg.15	Helicase	0,00E+00
vB_Kpn-VAC70_contig_1	fig 1915306.133.peg.56	Terminase small subunit	1,00E-125
vB_Kpn-VAC70_contig_1	fig 1915306.133.peg.57	Terminase large subunit	0,00E+00
vB_Kpn-VAC70_contig_1	fig 1915306.133.peg.58	Portal protein	0,00E+00
vB_Kpn-VAC70_contig_1	fig 1915306.133.peg.59	Putative head morphogenesis	0,00E+00
vB_Kpn-VAC70_contig_1	fig 1915306.133.peg.60	Capsid protein	0,00E+00

Contig_id	Feature_id	Función_HHMER	Valor E
vB_Kpn-VAC70_contig_1	fig 1915306.133.peg.11	Holin	3.3E-39
vB_Kpn-VAC70_contig_1	fig 1915306.133.peg.12	Lysin	7.6E-104
vB_Kpn-VAC70_contig_1	fig 1915306.133.peg.13	Hypothetical protein	2.8E-84
vB_Kpn-VAC70_contig_1	fig 1915306.133.peg.15	Hypothetical protein	0,00E+00
vB_Kpn-VAC70_contig_1	fig 1915306.133.peg.56	Terminase small subunit	1.9E-112
vB_Kpn-VAC70_contig_1	fig 1915306.133.peg.57	Terminase_6C domain-containing protein	0,00E+00
vB_Kpn-VAC70_contig_1	fig 1915306.133.peg.58	Hypothetical protein	2.6E-288
vB_Kpn-VAC70_contig_1	fig 1915306.133.peg.59	Head morphogenesis protein	1.5E-166
vB_Kpn-VAC70_contig_1	fig 1915306.133.peg.60	Major head subunit	2.2E-242

Contig_id	Feature_id	Función_HHPred	Valor E
vB_Kpn-VAC70_contig_1	fig 1915306.133.peg.11	Holin	-
vB_Kpn-VAC70_contig_1	fig 1915306.133.peg.12	Lysin	-
vB_Kpn-VAC70_contig_1	fig 1915306.133.peg.13	Hypothetical protein	-
vB_Kpn-VAC70_contig_1	fig 1915306.133.peg.15	Dominio Helicasa	8,00E-14
vB_Kpn-VAC70_contig_1	fig 1915306.133.peg.56	Dominio Terminase small subunit	2.5E-29
vB_Kpn-VAC70_contig_1	fig 1915306.133.peg.57	Large terminase	5.1E-34
vB_Kpn-VAC70_contig_1	fig 1915306.133.peg.58	Phage portal protein	7.6E-24
vB_Kpn-VAC70_contig_1	fig 1915306.133.peg.59	Head morphogenesis protein	-
vB_Kpn-VAC70_contig_1	fig 1915306.133.peg.60	Hypothetical protein	-

Rango de huésped (*Host range*)

Para determinar el rango de huésped se seleccionaron 31 bacteriófagos de los 175 extraídos para testar frente a la colección de 45 cepas clínicas de *K. pneumoniae*. El criterio empleado para la clasificación de las gotas obtenidas tras la experimentación es el que prosigue:

++	<i>Spot</i> claro
+	<i>Spot</i> claro en todas partes pero con un fondo ligeramente brumoso
+/-	<i>Spot</i> turbio sustancial en toda la zona despejada
+--	<i>Spot</i> muy turbio
-	<i>Spot</i> negativo

Teniendo en cuenta esta clasificación se muestran a continuación los resultados obtenidos del rango de huésped de los diferentes fagos frente a las cepas bacterianas del laboratorio (Tabla 3).

Tabla 3. Resultados del Rango de huésped.

Cepa	vB_Kp-VAC14	vB_Kp-VAC15	vB_Kp-VAC16	vB_Kp-VAC17	vB_Kp-VAC18	vB_Kp-VAC19	vB_Kp-VAC20	vB_Kp-VAC21	vB_Kp-VAC22	vB_Kp-VAC23	vB_Kp-VAC24	vB_Kp-VAC25	vB_Kp-VAC26	vB_Kp-VAC27	vB_Kp-VAC28
SCISP4C	+	+	+	+	+	.	.	.
SCISP2C	++	++	++	++
K3667	+	++	++
K3579	+	.	.	.
K3575	++
K3574	+	+	.	.	+	+	.	.	+	+	.
K3573
K3571	++
K3509	++	++	++	.
K3416
K3325
K3324
K3323
K3322
K3321
K3320
K3318
K2990
K2989
K2986
K2984	+	++	++	+
K2983	+	.	.	.	+
K2791	.	.	+
K2783	+-	++	.
K2715	+	.	.	.
K2707
K2691	.	.	+
K2597
K2535
ST974-OXA48	+	.	.	.
ST899-OXA48
ST258-KPC3	+-	+-	+	+
ST11-OXA48	+	.	.	.
ST512-KPC3	+-	+-	+	+	+	.	.	.
ST13-OXA48
ST340-VIM1
ST846-OXA48
ST11-VIM1	.	.	+	+	.	.	.
ST147-VIM1	+	.	.	.
ST101-KPC2
ST16-OXA48	+	.	.	.
ST437-OXA245	?	.
ST11-OXA245	.	.	+	+	.	.	.
ST15-VIM1	+	.	.	.
ST405-OXA48	.	.	.	+	+	++	++	+
N° cepas infectadas	5	3	7	4	5	4	3	3	3	2	1	12	2	3	1

Cepa	VB_Kp-VAC29	VB_Kp-VAC30	VB_Kp-VAC09	VB_Kp-VAC50	VB_Kp-VAC51*	VB_Kp-VAC52	VB_Kp-VAC69	VB_Kp-VAC70	VB_Kp-VAC71	VB_Kp-VAC75	VB_Kp-VAC76	VB_Kp-VAC77*	VB_Kp-VAC110*	VB_Kp-VAC111	VB_Kp-VAC112	VB_Kp-VAC113
SCISP4C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SCISP2C	-	-	-	-	-	-	++	++	++	-	-	-	-	-	-	-
K3667	-	-	-	-	-	-	++	++	++	-	-	-	-	-	-	-
K3579	-	-	-	-	+-	+-	+-	+-	+-	+-	+-	-	-	-	-	-
K3575	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
K3574	-	-	-	-	+	+	+-	+-	+-	-	-	-	+	-	-	-
K3573	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
K3571	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
K3509	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
K3416	-	-	-	-	-	-	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-
K3325	-	-	++	++	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
K3324	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
K3323	-	-	-	-	-	-	++	++	++	-	-	-	-	-	-	-
K3322	-	-	-	-	-	-	++	++	++	-	-	-	-	-	-	-
K3321	++	-	-	-	-	-	++	++	++	-	-	-	+	-	-	-
K3320	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-
K3318	+	-	-	-	+	-	+	+	++	-	-	-	+	-	-	-
K2990	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
K2989	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
K2986	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
K2984	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
K2983	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
K2791	-	-	-	-	-	-	+	+	+	++	++	-	++	++	++	++
K2783	+	++	-	-	+	-	++	++	++	-	-	-	-	-	+	-
K2715	-	-	-	-	++	-	+	+	-	++	++	-	++	++	+	++
K2707	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
K2691	-	-	-	-	-	-	+	+	+-	-	+	+	++	++	++	+
K2597	+	-	-	-	-	-	+	+	++	-	-	-	-	-	-	-
K2535	+	-	-	-	-	-	+-	++	++	-	-	-	-	-	-	-
ST974-OXA48	-	-	-	-	-	-	+-	+-	-	-	-	-	+	-	-	-
ST899-OXA48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ST258-KPC3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ST11-OXA48	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	++	+	-	+
ST512-KPC3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ST13-OXA48	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ST340-VIM1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ST846-OXA48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ST11-VIM1	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	++	+
ST147-VIM1	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
ST101-KPC2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ST16-OXA48	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	++	++	-	-
ST437-OXA245	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
ST11-OXA245	-	-	-	-	-	-	+	+	-	++	++	-	++	++	++	++
ST15-VIM1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+
ST405-OXA48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
Nº cepas infectadas	8	4	2	1	15	4	19	19	13	8	9	2	20	9	9	10

Según los resultados presentados puede observarse que se han contabilizado como cepas infectadas aquellas que no muestran un *spot* negativo para obtener mayor variabilidad de muestreo. Del total de fagos estudiados, 16 de ellos consiguieron infectar entre un 0-10 % de las cepas bacterianas, 8 entre un 10-20 %, 4 entre un 20-30 % y finalmente solamente 3 fagos consiguieron superar el 40 % de cepas infectadas. Estos tres fagos han obtenido los mejores resultados infectando entre 21 y 22 cepas bacterianas. De entre ellos se seleccionaron para realizar el resto de los ensayos los fagos VAC70 y el VAC110, ya que presentaron un rango de huésped distinto, lo que podría hacer de ellos buenos candidatos para combinar en terapia fágica. El fago VAC69 no fue seleccionado debido a que presentó un rango de huésped similar al del fago VAC70.

Eficiencia de plaqueo (EOP)

Tras la cuantificación y determinación de la concentración fágica en UFP/mL en cada una de las cepas bacterianas testadas se presentan a continuación los resultados asociados a la EOP procedentes de las cepas que mostraron unos *spots* positivos (Tabla 4).

Tabla 4. Valores de EOP obtenidos para los fagos VAC 110 y VAC70.

VAC110			VAC70		
Cepa	Media pfu/ml	EOP	Cepa	Media pfu/ml	EOP
K3574	1,07E+06	0,00043	SCISP2C	0,00E+00	0
K3320	0,00E+00	0	K3667	0,00E+00	0
K2990	0,00E+00	0	K3416	0,00E+00	0
K2989	7,00E+06	0,0028	K3323	0,00E+00	0
K2791	1,25E+09	0,5	K3322	0,00E+00	0
K2715	3,00E+06	0,0012	K3321	1,85E+07	0,22424
K2691	2,50E+09	1	K3318	8,25E+07	1
ST11-OXA48	6,50E+07	0,026	K2783	0,00E+00	0
ST11-VIM1	1,30E+09	0,52	K2715	0,00E+00	0
ST147-VIM1	1,10E+05	4,4E-05	K2597	0,00E+00	0
ST16-OXA48	1,90E+05	7,6E-05	K2535	0,00E+00	0
ST11-OXA245	3,00E+07	0,012	ST16-OXA48	0,00E+00	0

En la realización de este experimento se seleccionaron como cepas bacterianas potenciales para los experimentos la cepa clínica K2691 para el fago VAC110 y la cepa clínica K3318 para el fago VAC70, puesto que además de mostrar una buena eficiencia de infección se corresponden con sus cepas huéspedes naturales.

En este estudio también se puede observar que determinadas cepas bacterianas que mostraban inicialmente un *spot* positivo, no presentaron un valor de EOP favorable. Esto se debe a un fenómeno conocido como *lysis from without* que ocurre con frecuencia en las pruebas de lisis en gota (D'Andrea et al., 2020). La *lysis from without* se basa en el efecto de las lisinas, unas enzimas líticas que degradan la pared celular bacteriana, presentes en el sobrenadante de lisis de los fagos, de modo que la lisis se debería al efecto de estas enzimas y no a una infección activa producida por los fagos.

Con respecto a la morfología en placa observada, ambos fagos forman placas uniformes bien visibles con una correcta identificación de actividad despolimerasa al observarse la formación de unos halos alrededor de las placas de fago (Figura 3).

Las despolimerasas son unas enzimas características de los fagos con potencial para degradar las barreras de carbohidratos en las superficies de las células bacterianas de Gram-negativas, exponiendo a las bacterias a un ataque inmunitario (Wang et al., 2019), proceso que se observa en placa mediante la formación de dichos halos característicos.

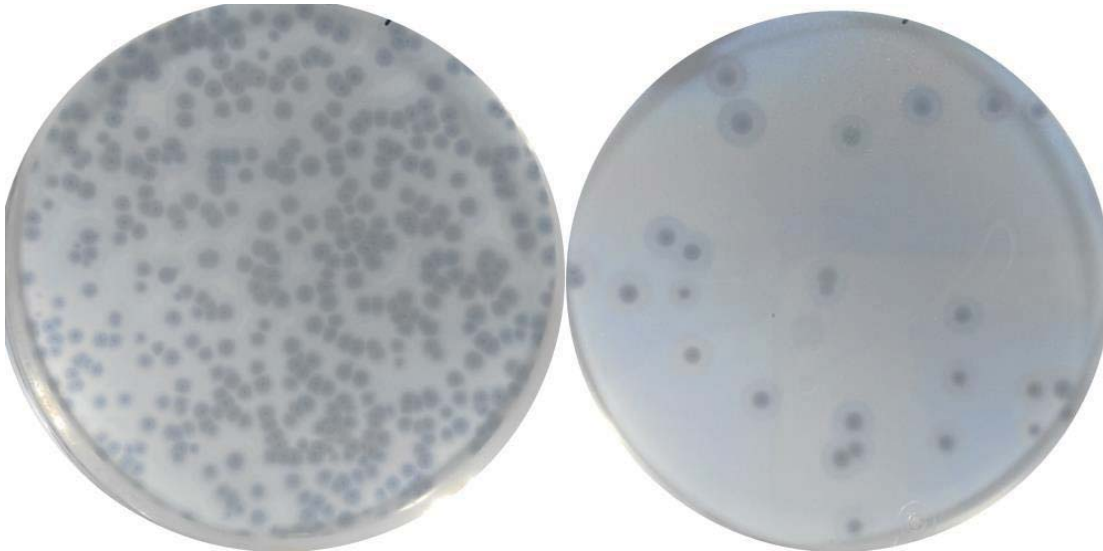


Figura 3. Visualización de las placas de lisis del fago VAC70 con su respectivo halo en condiciones más concentradas (izquierda) y más diluídas (derecha).

Estas características se corresponden con el tipo de morfología asociada a los fagos líticos o virulentos, corroborando los resultados del análisis genómico. Esta identificación del mecanismo de acción que emplean para realizar la lisis del huésped permite continuar con la experimentación puesto que al tratarse de fagos líticos pueden ser utilizados en terapia.

Curvas de adsorción

Esta prueba se lleva a cabo para determinar el tiempo que tarda un determinado fago en unirse a las células bacterianas antes de iniciar la infección.

Ambos fagos presentan diferencias significativas en sus respectivos tiempos de adsorción, el VAC110 infecta con mayor rapidez las células bacterianas, presentando un tiempo de adsorción de 5 min con una eficacia próxima al 90 %. Sin embargo, a pesar de que el VAC70 también alcanza una buena eficacia con casi el 90 %, tarda el doble en adquirir dicho valor al mostrar un tiempo de adsorción de 11 min (Figura 4).

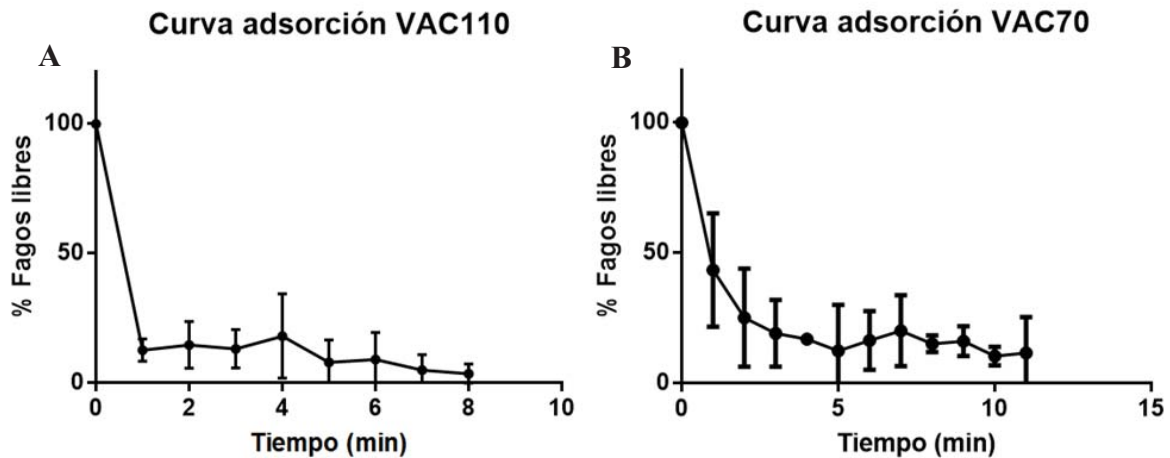


Figura 4. Curvas de adsorción. A) fago VAC110 B) fago VAC70.

Curvas de un paso (*One step*)

Con la realización de esta curva se establecen el período de latencia y el tamaño de explosión (*Burst size*), ambas características importantes para la selección de fagos útiles en terapia donde se buscan períodos de latencia cortos y valores de *Burst size* altos. Además, cabe destacar que durante las sucesivas repeticiones de este experimento, también se pudo demostrar que en el caso concreto de estos dos fagos, no necesitan requerimientos de sales.

Esto se ha podido observar cuando tras múltiples curvas de resultados poco esperados, se suprimió la aportación de sales al medio de cultivo, lo que resultó en unas curvas de un solo paso óptimas. El conocimiento de este dato supuso la repetición de las curvas de adsorción bajo las mismas condiciones, que se corresponden con las mostradas en el apartado anterior.

Los resultados mostrados a continuación indican que el período de latencia del VAC110 es de 10 min, junto con un promedio de 9 partículas de fagos expulsadas por célula huésped infectada. Por el contrario, el VAC70 muestra tanto un período de latencia mayor, con 15 min, y un promedio de 26 partículas de fagos expulsadas por célula huésped infectada (Figura 5). Los valores promedio de partículas virales expulsadas se corresponden con los resultados del *Burst size* que han sido calculados en base a la fórmula mostrada en apartados anteriores.

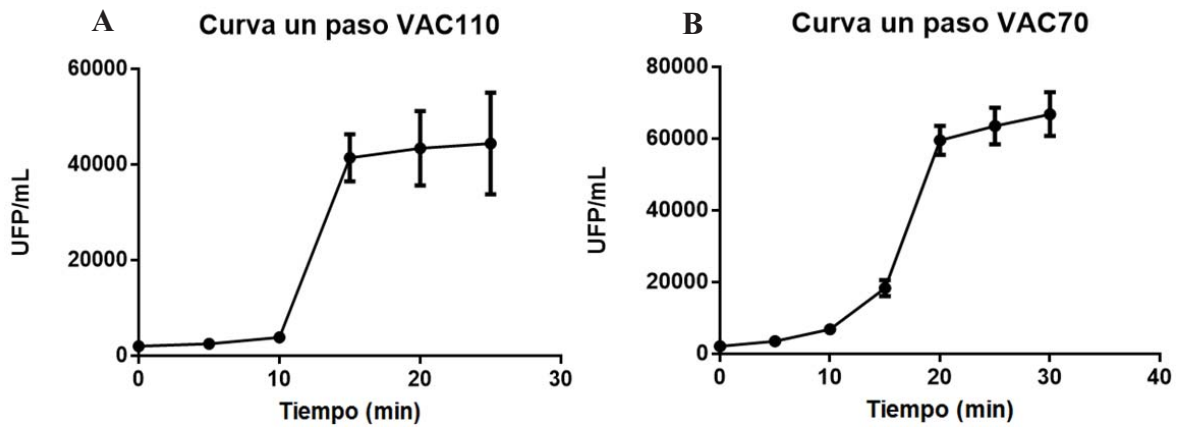


Figura 5. Curva en un paso. A) fago VAC110. B) fago VAC70.

Curvas de infección o Curvas de MOI

Los resultados de estas curvas permiten evaluar la dinámica de la infección fágica mediante el monitoreo del crecimiento bacteriano tras determinados tiempos post-infección.

Atendiendo a los resultados de las curvas de optimización de ambos fagos, se puede observar que no hay diferencias significativas entre las diferentes DOs analizadas con respecto la $DO_{600nm} = 0,7$ que mejoren la capacidad infectiva de los respectivos fagos de estudio (Figura 6). Es por ello que las siguientes curvas que prosiguen se corresponden con el proceso experimental a una $DO_{600nm} = 0,7$.

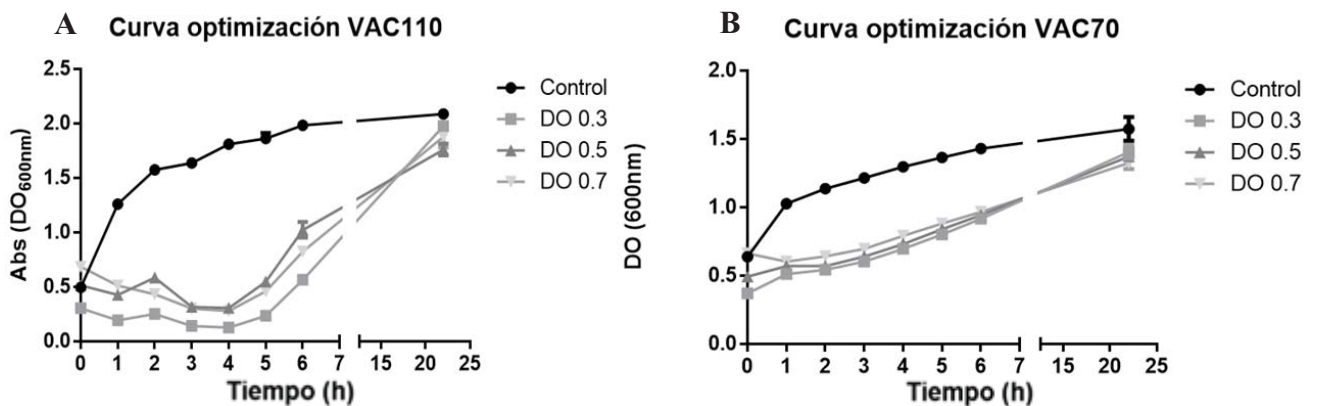


Figura 6. Curvas de optimización de la infección de ambos fagos. A) fago VAC110. B) fago VAC70.

En el caso del fago VAC110 muestra una dinámica infectiva caracterizada por una alta eficiencia en la reducción del crecimiento de su cepa huésped, al observarse en la primera hora tras la infección que el cultivo presenta una DO_{600nm} tan baja que se corresponde con un cultivo carente de turbidez.

Los datos más representativos de este comportamiento se corresponden con una MOI de 10 puesto que cuanto mayor sea la MOI mayor será la probabilidad de que una misma bacteria sea infectada por mayor número de fagos, incrementando por ende el número total de fagos por centro infeccioso (Fernández Espinel, 2017). No obstante, también se puede apreciar que su cepa huésped desarrolla resistencia a una elevada velocidad (Figura 7).

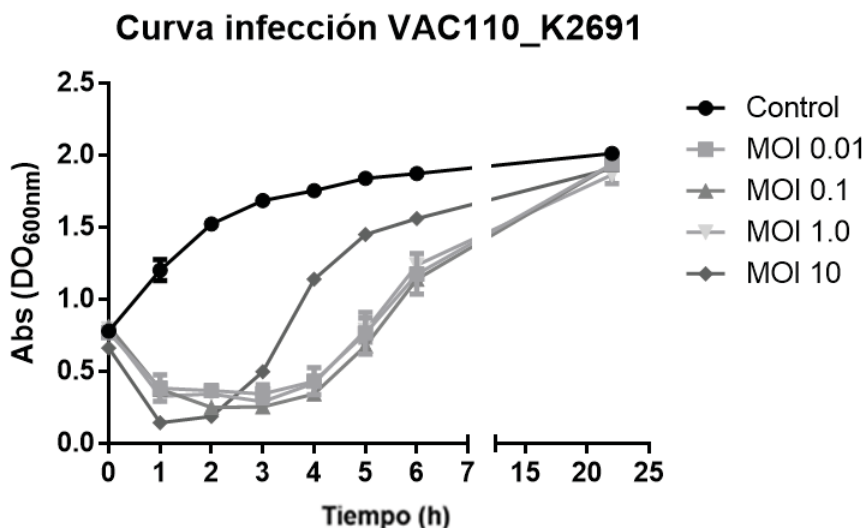


Figura 7. Curva de infección del fago VAC110 obtenida tras 22 horas de incubación tras la infección

En el caso del fago VAC70 se puede observar que provoca una reducción en la tasa de crecimiento de su cepa huésped sin diferencias significativas entre las diferentes MOI aplicadas, no obstante, la velocidad de infección no es lo suficientemente elevada como para reducir la población bacteriana a niveles mínimos (Figura 8). Además, cabe destacar que en este caso no se llevó a cabo una infección a una MOI=10 debido a que la concentración a la que se obtuvo el fago tras la propagación era insuficiente para infectar a esta MOI.

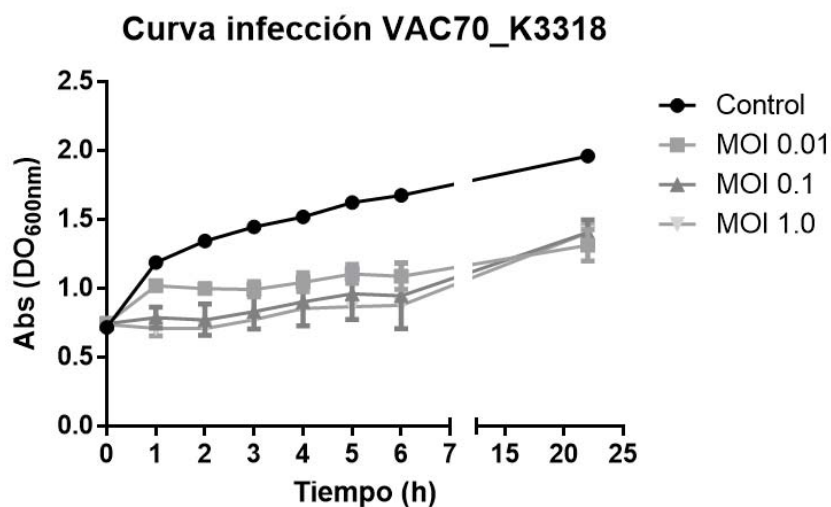


Figura 8. Curva de infección del fago VAC70 obtenida tras 22 horas de incubación tras la infección

5. Discusión

Klebsiella pneumoniae es una bacteria patógena responsable de infecciones nosocomiales en el tracto urinario, pulmones, tejidos blandos y área quirúrgica (Anand et al., 2020). El uso excesivo de antibióticos va asociado al aumento de la propagación de la resistencia a los mismos. Este hecho se está observando en multitud de cepas de esta especie, la cual se está volviendo cada vez más difícil de tratar, empeorando aún más un pronóstico clínico que en algunos casos, como en pacientes inmunodeprimidos o individuos de edades avanzadas, es de por sí muy grave (Anand et al., 2020).

La persistencia y adquisición de genes de resistencia frente a antibióticos de este patógeno en el entorno hospitalario provoca una gran necesidad de desarrollar nuevas estrategias alternativas a los antibióticos para controlar y frenar su avance. Es por ello que la investigación en terapia con fagos ha aumentado de forma significativa proporcionando resultados prometedores que podrían suponer un gran impacto en el nivel de densidad bacteriana, permitiendo reducir las tasas de mortalidad y morbilidad en los pacientes (Tan et al., 2019).

El aumento del número de estudios en este campo permite identificar y aislar cada vez mayor número de bacteriófagos específicos para este patógeno, lo cual puede observarse en la base de datos de GenBank, que cuenta con más de 120 genomas de fagos de *Klebsiella* que han sido identificados (Morozova et al., 2019). Cuanto mayor sea la cantidad muestral de bacteriófagos identificados, mayores serán las probabilidades de encontrar características idóneas para su uso terapéutico de forma eficaz y segura. Es por ello que se requiere seguir investigando en el desarrollo de este tipo de terapia para mejorar el entendimiento en la mecánica de las estrategias moleculares asociadas a las interacciones entre bacteriófagos y bacterias.

En este estudio se ha llevado a cabo la caracterización de dos fagos líticos frente a una amplia variedad de cepas bacterianas de esta especie, con el fin de estudiar *in vitro* las interacciones entre fago-huésped para así evaluar la posibilidad de su utilización potencial en la terapia con fagos como tratamiento eficaz.

Los resultados de los análisis morfológicos y genómicos mostraron que ambos fagos eran líticos, lo que inicialmente los convertía en posibles candidatos viables para su utilización en terapia debido a su mecanismo de acción.

Además, la realización del *host range* también resultó ser un indicativo positivo para su utilización en terapia puesto que el elevado porcentaje de infección de las diferentes cepas bacterianas analizadas determinaba que se trataba de fagos que abarcarían un amplio rango de huésped. Este último aspecto fue decisivo para continuar con su estudio.

Las curvas de adsorción y de un solo paso demostraron que ambos fagos mostraban unos buenos tiempos de adsorción y latencia favorables para la infección, mientras que sus valores de *burst size* eran bajos.

Los experimentos de crecimiento posteriores mostraron una fuerte actividad bacteriolítica inicial del fago VAC 110 contra su cepa huésped K2691. No obstante, también se pudo observar la rapidez con la que la bacteria desarrolló resistencia frente a el fago, al mostrar un aumento significativo en su densidad poblacional al cabo de 2 horas post-infección. Estos datos pueden asociarse al tiempo de latencia del fago, es decir, un período latente corto permitiría infectar con mayor rapidez a las células huésped del entorno, pero su tamaño de explosión se vería reducido como resultado, lo que supondría un efecto ventajoso para la bacteria, explicando la rápida aparición de resistencia (Shao & Wang, 2008).

El fago VAC70 provocó la lisis de la cepa huésped K3318 al observarse un ralentizamiento en el crecimiento bacteriano, lo que se tradujo en el mantenimiento de la DO sin cambios significativos durante 4 horas, a partir de las cuales se monitorizó un incremento en la misma que implicaba la aparición de resistencia. Estos resultados pueden ser debidos a que la cepa K3318 pueda producir múltiples polisacáridos capsulares, que son componentes de la superficie celular que juegan un papel importante en la evasión o modulación de la inmunidad del huésped, lo que podría explicar la infección reducida observada en este caso (Porter et al., 2020).

La observación de resistencia microbiana no supone el descarte de estos fagos como agentes terapéuticos, si no que precisamente podrían utilizarse como un cóctel de fagos para determinar si existe una sinergia entre ambos que erradique de forma más eficaz a las respectivas cepas. Al combinar ambos fagos se aumenta el número de patógenos potenciales por objetivo, al dirigirse a diferentes receptores en la superficie bacteriana, lo que se traduce en una disminución en la co-resistencia bacteriana en comparación con la monoterapia (Oechslin, 2018).

Otra posible alternativa, sería utilizarlos en combinación con antibióticos, puesto que numerosos estudios han testado su elevada capacidad para controlar a la bacteria huésped, junto con una reducción significativa en el desarrollo de resistencia al fago o al antibiótico.

Esta terapia podría obtener un efecto combinado donde se mejoraría la actividad antimicrobiana de ambos tratamientos, potenciando la sensibilidad de la bacteria al antibiótico y reduciendo la tasa de aparición de bacterias resistentes a los fagos (Blasco et al., 2019).

También se podría recurrir a la utilización de sus endolisinas o despolimerasas, tras su purificación, como agentes terapéuticos combinados para mejorar la eficacia bacteriolítica (Mirski et al., 2019).

Todas las características estudiadas y recopiladas en este estudio son de relevancia para desarrollar estrategias terapéuticas mediante la utilización de fagos, puesto que permiten determinar adecuadamente que se cumplan unos requisitos de efectividad y seguridad indispensables para tratar a los pacientes afectados con *Klebsiella*.

6. Conclusiones

- De un total de 31 fagos testados se seleccionaron dos (vB_Kp-VAC110 y vB_Kp-VAC70) que infectaron un 42 y 44 % de las cepas clínicas de *K. pneumoniae* utilizadas en este estudio.
- En ningún caso se han encontrado genes relacionados con la lisogenia lo que indica que ambos fagos son líticos.
- Ambos fagos presentan endolisinas y depolimerasas, enzimas potencialmente útiles en terapia fágica.
- Ambos fagos, VAC110 y VAC70, tienen actividad bacteriolítica frente a las cepas clínicas de *K. pneumoniae* en las que se caracterizaron, aunque se genera resistencia tras varias horas de infección.
- El amplio rango de huesped, el ciclo de vida lítico y la actividad bacteriolítica de los fagos VAC110 y VAC70, hacen de ellos unos posibles candidatos para su uso en terapia fágica formando parte de cócteles o en combinación con antibióticos, reduciendo de este modo la aparición de resistencia.
- Es necesario continuar estudiando dichos fagos para testar la actividad bacteriolítica en más cepas o para comprobar la aparición de resistencia, así como realizar combinaciones de los mismos o con antibióticos para determinar si se observa un efecto sinérgico.

7. Bibliografia

- Abdel-Aziz, M. M., Yosri, M., & Amin, B. H. (2017). Control of imipenem resistant-*Klebsiella pneumoniae* pulmonary infection by oral treatment using a combination of mycosynthesized Ag-nanoparticles and imipenem. *Journal of radiation research and applied sciences*, 10(4), 353-360. <https://doi.org/10.1016/j.jrras.2017.09.002>
- Anand, T., Virmani, N., Kumar, S., Mohanty, A. K., Pavulraj, S., Bera, B. C., . . . Tripathi, B. N. (2020). Phage therapy for treatment of virulent *Klebsiella pneumoniae* infection in a mouse model. *J Glob Antimicrob Resist*, 21, 34-41. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.09.018>
- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A. A., Dvorkin, M., Kulikov, A. S., . . . Pevzner, P. A. (2012). SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol*, 19(5), 455-477. <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>
- Bengoechea, J. A., & Sa Pessoa, J. (2019). *Klebsiella pneumoniae* infection biology: living to counteract host defences. *FEMS Microbiol Rev*, 43(2), 123-144. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuy043>
- Blasco, L., Ambroa, A., Lopez, M., Fernandez-Garcia, L., Bleriot, I., Trastoy, R., . . . Tomas, M. (2019). Combined Use of the Ab105-2 ϕ Δ CI Lytic Mutant Phage and Different Antibiotics in Clinical Isolates of Multi-Resistant. *Microorganisms*, 7(11). <https://doi.org/10.3390/microorganisms7110556>
- Clokic, M. R., & Kropinski, A. (2009). Bacteriophages. Methods and protocols. Volume 1: Isolation, characterization, and Interactions. Methods in molecular biology. Humana press, 69-81.
- D'Andrea, M. M., Frezza, D., Romano, E., Marmo, P., Henrici De Angelis, L., Perini, N., . . . Di Lallo, G. (2020). The lytic bacteriophage vB_EfaH_EF1TV, a new member of the Herelleviridae family, disrupts biofilm produced by *Enterococcus faecalis* clinical strains. *J Glob Antimicrob Resist*, 21, 68-75. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.10.019>
- De Oliveira, D. M. P., Forde, B. M., Kidd, T. J., Harris, P. N. A., Schembri, M. A., Beatson, S. A., . . . Walker, M. J. (2020). Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *Clinical microbiology reviews*, 33(3). <https://doi.org/10.1128/CMR.00181-19>

- Ewels, P., Magnusson, M., Lundin, S., & Källér, M. (2016). MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics*, 32(19), 3047-3048. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw354>
- Fernández Espinel, C., Flores Dominick, V., & Medina Morillo, M. (2017). Aislamiento y caracterización del bacteriófago Va1 específico a *Vibrio alginolyticus*. *Revista peruana de biología*, 24(1), 93-100. <http://dx.doi.org/10.15381/rpb.v24i1.13103>
- Furfaro, L. L., Payne, M. S., & Chang, B. J. (2018). Bacteriophage Therapy: Clinical Trials and Regulatory Hurdles. *Front Cell Infect Microbiol*, 8, 376. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00376>
- Gordillo Altamirano, F. L., & Barr, J. J. (2019). Phage Therapy in the Postantibiotic Era. *Clinical microbiology reviews*, 32(2). <https://doi.org/10.1128/CMR.00066-18>
- Herridge, W. P., Shibu, P., O'Shea, J., Brook, T. C., & Hoyles, L. (2020). Bacteriophages of *Klebsiella* spp., their diversity and potential therapeutic uses. *Journal of medical microbiology*, 69(2), 176-194. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.001141>
- Li, B., Zhao, Y., Liu, C., Chen, Z., & Zhou, D. (2014). Molecular pathogenesis of *Klebsiella pneumoniae*. *Future microbiology*, 9(9), 1071-1081. <https://doi.org/10.2217/fmb.14.48>
- Madueño, A. (2017). Características epidemiológicas y microbiológicas de *klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasa en el complejo hospitalario universitario de canarias (Doctoral dissertation, Universidad de La Laguna).
- Mirski, T., Lidia, M., Nakonieczna, A., & Gryko, R. (2019). Bacteriophages, phage endolysins and antimicrobial peptides - the possibilities for their common use to combat infections and in the design of new drugs. *Annals of agricultural and environmental medicine: AAEM*, 26(2), 203-209. <https://doi.org/10.26444/aaem/105390>
- Morozova, V., Babkin, I., Kozlova, Y., Baykov, I., Bokovaya, O., Tikunov, A., . . . Tikunova, N. (2019). Isolation and Characterization of a Novel *Klebsiella pneumoniae* N4-like Bacteriophage KP8. *Viruses*, 11(12). <https://doi.org/10.3390/v11121115>
- Oechslin, F. (2018). Resistance Development to Bacteriophages Occurring during Bacteriophage Therapy. *Viruses*, 10(7). <https://doi.org/10.3390/v10070351>
- Paczosa, M. K., & Meccas, J. (2016). *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(3), 629-661. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00078-15>
- Pirnay, J. P., Verbeken, G., Ceysens, P. J., Huys, I., De Vos, D., Ameloot, C., & Fauconnier, A. (2018). The Magistral Phage. *Viruses*, 10(2). <https://doi.org/10.3390/v10020064>

- Porter, N. T., Hryckowian, A. J., Merrill, B. D., Fuentes, J. J., Gardner, J. O., Glowacki, R. W. P., . . . Martens, E. C. (2020). Phase-variable capsular polysaccharides and lipoproteins modify bacteriophage susceptibility in *Bacteroides thetaiotaomicron*. *Nature microbiology*, *5*(9), 1170-1181. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0746-5>
- Shao, Y., & Wang, I. N. (2008). Bacteriophage adsorption rate and optimal lysis time. *Genetics*, *180*(1), 471-482. <https://doi.org/10.1534/genetics.108.090100>
- Tan, D., Zhang, Y., Cheng, M., Le, S., Gu, J., Bao, J., . . . Zhu, T. (2019). Characterization of *Klebsiella pneumoniae* ST11 Isolates and Their Interactions with Lytic Phages. *Viruses*, *11*(11). <https://doi.org/10.3390/v11111080>
- The Actinobacteriophage Database (s.f).. PCI/SDS DNA Extraction Protocol. Recuperado de <https://phagesdb.org/workflow/Extraction/>
- Wang, C., Li, P., Niu, W., Yuan, X., Liu, H., Huang, Y., . . . Bai, C. (2019). Protective and therapeutic application of the depolymerase derived from a novel KN1 genotype of *Klebsiella pneumoniae* bacteriophage in mice. *Research in microbiology*, *170*(3), 156-164. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2019.01.003>
- Šivec, K., & Podgornik, A. (2020). Determination of bacteriophage growth parameters under cultivating conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *104*(20), 8949-8960. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10866-8>