

Máster en Biología Molecular, Celular y Genética

Memoria del Trabajo de Fin de Máster

Combinación de inhibidores de *Quorum Sensing* con bacteriófagos como terapia frente a las bacterias resistentes

Combinación de inhibidores de *Quorum Sensing* con bacteriófagos como terapia fronte as bacterias resistentes

Combination of Quorum Sensing inhibitors with bacteriophages as therapy against resistant bacteria

Pablo Barja Fernández

Julio, 2022

Director/a académico/a: Maria del Mar Tomas Carmona

Codirector/a: Lucía Blasco Otero

1. Resumen	3
2. Introducción	6
3. Objetivos.....	10
3.1. Objetivo general.....	10
3.2. Objetivos específicos.....	10
4. Material y métodos	11
4.1. Fagos y cepas bacterianas	11
4.2. Preparación medios de cultivo.....	11
4.3. Análisis genómico	12
4.4. Cuantificación y titulación de los fagos	12
4.5. Comparativa fagos.....	12
4.5.1. Microscopia electrónica de transmisión (TEM)	12
4.6. Optimización de la infección.....	13
4.7. Curva de adsorción.....	13
4.8. Curva de crecimiento en un paso (<i>One-step growth curve</i>).....	14
4.8.1. Cálculo del <i>Burst size</i>	15
4.9. Curvas infección a distintas MOI	15
4.10. Curvas de infección combinando fago y furanona	15
5. Resultados	16
5.1. Comparación fagos	16
5.1.1. Análisis del genoma	16
5.1.2. Morfología en placa	19
5.1.3. Microscopía electrónica de transmisión	20
5.2. Optimización de la infección	21
5.3. Curva adsorción.....	21
5.4. Curvas de crecimiento en un paso (<i>One step growth curve</i>).....	22
5.5. Curvas de infección a distintas MOI.....	23
5.6. Curvas de infección combinando fago y furanona	24
6. Discusión.....	25
7. Conclusiones.....	29
8. Bibliografía.....	30

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 Don Pablo Barja Fernández, graduado en Biología por la Universidad de Santiago de Compostela, 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: “Combinación de inhibidores de *Quorum Sensing* con bacteriófagos como terapia frente a las bacterias resistentes”, 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 2022.

TOMAS
CARMONA
MARIA DEL
MAR -
74645550Q

Firmado digitalmente por TOMAS CARMONA MARIA DEL MAR - 74645550Q
Fecha: 2022.07.14 23:24:04 +02'00'

Dra. María del Mar Tomás Carmona

Directora

BLASCO
OTERO
LUCIA -
328341
11R

Firmado digitalmente por BLASCO OTERO LUCIA - 32834111R
Fecha: 2022.07.14 16:32:31 +02'00'

Dra. Lucía Blasco Otero

Codirectora

Firmado por
BARJA
FERNANDEZ
PABLO -
34279846W e1

Pablo Barja Fernández

Alumno

1. Resumen

Klebsiella pneumoniae es un patógeno nosocomial que empeora el pronóstico de la gran mayoría de pacientes inmunocomprometidos. En líneas generales, se trata de una bacteria patógena oportunista capaz de colonizar una gran variedad de ambientes, especialmente los hospitalarios. Pertenece al grupo de bacterias gram-negativas y, debido a su elevada patogenicidad, es capaz de provocar cuadros clínicos graves que aumentan las tasas de mortalidad y morbilidad.

El creciente incremento del número de bacterias multirresistentes a antibióticos de amplio espectro, como β -lactámicos o carbapenémicos, ha supuesto la búsqueda de nuevos métodos para combatir estas bacterias. En este contexto, la experimentación con fagoterapia está despertando un gran interés, gracias a su eficacia y seguridad, que se traducen en un incremento de las tasas de supervivencia.

Es por ello que el presente TFM se centra en la caracterización de la actividad antimicrobiana de dos fagos líticos vB_KpnS_VAC35 y vB_KpnM_VAC36, así como de la combinación de estos fagos con inhibidores del QS, mecanismo de comunicación bacteriano que favorece la resistencia a los fagos.

Para el desarrollo de este trabajo, en primer lugar, se realizó un análisis del genoma de los fagos con el objetivo de asegurar la ausencia de genes potencialmente virulentos. En segundo lugar, se caracterizó la capacidad de infección de los fagos vB_KpnS_VAC35 y vB_KpnM_VAC36 frente a sus sus cepas huésped: K3574 y K3573. Para ello se ha determinado la familia a la que pertenecen los fagos mediante el estudio morfológico empleando la técnica de Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) y se han determinado diversos parámetros de infección, como el tiempo de adsorción, el tamaño de explosión (*burst size*) o el período de latencia. Por último, se realizó el ensayo de infección e inhibición de QS empleando la molécula furanona 4-Metoxi-2(5H) con el objetivo de aumentar la capacidad de infección de los fagos frente a *K. pneumoniae* y mejorar su potencial uso en fagoterapia.

Resumo

Klebsiella pneumoniae é un patóxeno nosocomial que empeora o pronóstico da gran maioría de pacientes inmunocomprometidos. En liñas xerais, trátase dunha bacteria patóxena oportunista capaz de colonizar unha gran variedade de ambientes, especialmente os hospitalarios. Pertenece ao grupo de bacterias gram-negativas e, debido a súa elevada patogenicidade, é capaz de provocar cadros clínicos graves que aumentan as taxas de mortalidade e morbilidade.

O crecente incremento do número de bacterias multirresistentes a antibióticos de amplo espectro, como β -lactámicos ou carbapenémicos, supuxo a búsqueda de novos métodos para combater estas bacterias. Neste contexto, a experimentación con fagoterapia está despertando unha gran interese, grazas á súa eficacia e seguridade que se traduce nun incremento das taxas de supervivencia.

É por isto que o presente TFM se centra na caracterización da actividade antimicrobiana dos fagos líticos vB_KpnS_VAC35 e vB_KpnM_VAC36, así como da combinación destes fagos con inhibidores do *Quorum sensing*, mecanismo de comunicación bacteriano que favorece a resistencia aos fagos.

Para o desenvolvemento deste traballo, no primeiro lugar realizouse unha análise do xenoma dos fagos co obxectivo de asegurar a ausencia de xenes potencialmente virulentos. En segundo lugar, caracterizouse a capacidade de infección dos fagos vB_KpnS_VAC35 e vB_KpnM_VAC36 fronte as súas cepas huésped: K3574 e K3573. Para elo se determinou a familia á que pertencen os fagos mediante o estudo morfológico empregando a técnica de Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) e se han determinado diversos parámetros de infección, como o tempo de adsorción, o tamaño de explosión (*burst size*) o período de latencia. Por último, realizouse o ensayo de infección e inhibición de *Quorum Sensing* empregando a molécula furanona 4-Metoxi-2(5H) co obxectivo de aumentar a capacidade de infección dos fagos fronte a *K. pneumoniae* e mellorar o seu potencial uso en fagoterapia.

Abstract

Klebsiella pneumoniae is a nosocomial pathogen that worsens the prognosis of the vast majority of immunocompromised patients. In general, it is an opportunistic pathogenic bacterium capable of colonizing a wide variety of environments, especially hospital ones. It belongs to the group of gram-negative bacteria and, due to its high pathogenicity, is able to cause serious clinical conditions that increase mortality and morbidity rates.

The growing number of multidrug-resistant antibiotic-resistant bacteria, such as β -lactams or carbapenems, has led to the search for new methods to combat these bacteria. In this context, experimentation with phage therapy is arousing great interest, thanks to its effectiveness and safety which translate into an increase in survival rates.

This is why the present TFM focuses on the characterization of the antimicrobial activity of two lytic phages vB_KpnS_VAC35 and vB_KpnM_VAC36, as well as the combination of these phages with inhibitors of *Quorum sensing*, a bacterial communication mechanism that promotes resistance to phages.

For the development of this work, an analysis of the phage genome was first performed with the aim of securing the lack of potentially virulent genes. Second, the infection capacity of the phages vB_KpnS_VAC35 and vB_KpnM_VAC36 was characterized against their host strains: K3574 and K3573. To this end, the family to which the phages belong has been determined by morphological study using the technique of Transmission Electron Microscopy (TEM) and various infection parameters have been determined, such as adsorption time, *burst size*, or the latency period. Finally, the *Quorum Sensing* infection and inhibition assay was performed using the furanone 4-Methoxy-2 (5H) molecule with the aim of increasing the infectivity of phages against *K. pneumoniae* and improving their potential use in phage therapy.

2. Introducción

El incremento en los últimos años de los llamados microorganismos multirresistentes (MDR), resistentes al tratamiento con los distintos antibióticos actuales como las penicilinas, aminoglucósidos, fluoroquinolonas, cefalosporinas, carbapenémicos..., ha evidenciado la necesidad urgente de encontrar nuevas clases de agentes antimicrobianos. (Bragg et al., 2018). La Organización mundial de la Salud (OMS) publicó en 2018 una lista de “patógenos prioritarios” que incluye una serie de microorganismos que suponen una amenaza grave para la salud humana y para los que se necesitan urgentemente nuevos tratamientos antiinfecciosos (Tacconelli et al., 2018), entre los que se incluyen patógenos del grupo ESKAPE: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *K. pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter* (De Olivera et al., 2020).

Dentro de la familia Enterobacteriaceae se encuentra el patógeno *K. pneumoniae*, descrita por primera vez por Carl Friedlander en 1882 como una bacteria aislada de los pulmones de pacientes que habían muerto por neumonía (Martin et al., 2018). Se trata de un patógeno bacteriano oportunista gram-negativo, fermentador de lactosa, inmóvil, capaz de crecer en un rango de temperaturas que fluctúan entre los 18-47°C, en un rango de pH 4-8 y a unas concentraciones salinas de 0-5%, y que característicamente presenta una cápsula prominente (Gorrie et al., 2018). En cuanto a su crecimiento en placa, la mayoría de aislados de *K. pneumoniae* forman colonias mucoides debido a su elevada producción de cápsula de polisacárido (Madueño et al., 2017), estas colonias se pueden apreciar en la Figura 1.

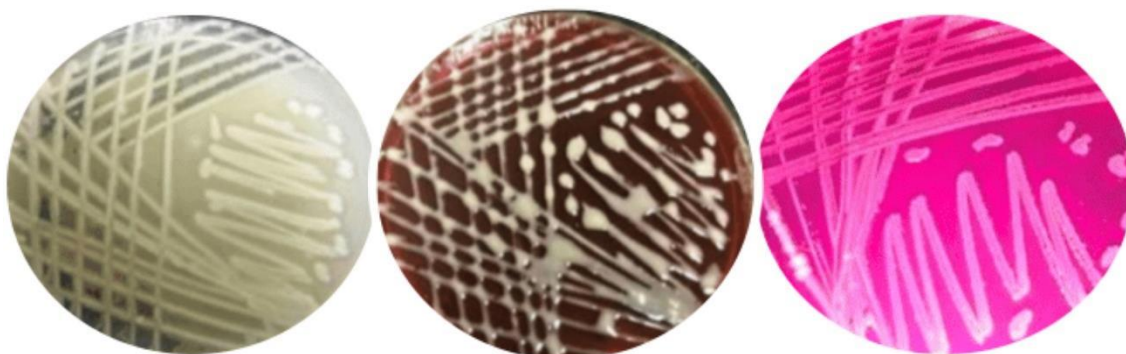


Figura 1. Crecimiento en placa de *Klebsiella pneumoniae* en; medio Müller-Hinton, agar sangre y medio MacConkey (de izquierda a derecha) (Ahmed et al., 2018)

Por otro lado, *K. pneumoniae* tiene la capacidad de colonizar superficies sanitarias y dispositivos médicos invasivos, causando enfermedades nosocomiales con tasas elevadas de mortalidad y morbilidad (Abdel-Aziz et al., 2017). Clásicamente, estas infecciones ocurren en pacientes hospitalizados o inmunocomprometidos y comúnmente son infecciones del tracto urinario, neumonía y septicemia, además de infecciones de heridas. El éxito de *K. pneumoniae* como patógeno nosocomial reside también en su virulencia intrínseca, atribuida a su capacidad de crear una infección invasiva a través de adhesinas fimbriales, a la presencia de una cápsula gruesa que actúa como factor antifagocítico y de defensa al estrés, al antígeno O de su lipopolisacárido (LPS) y a los sideróforos (compuestos quelantes de hierro secretados por microorganismos) (Podschun et al., 1998).

K. pneumoniae posee una alta capacidad para crecer formando biopelículas o *biofilms*, además de para adquirir multitud de plásmidos que confieren resistencia a un amplio rango de antibióticos utilizados en clínica. De forma rutinaria, las infecciones causadas por esta bacteria se tratan con β -lactámicos además de otros antibióticos efectivos contra las bacterias de la familia Enterobacteriaceae, como piperacilina o tazobactam (Vuotto et al., 2014).

En la actualidad, distintas cepas de esta especie han adquirido diversos mecanismos que les han permitido incrementar en gran medida la resistencia a los antibióticos (Madueño et al., 2017). Dentro de ellos destacan:

1. Producción de genes que codifican para β -lactamasas, enzimas que son capaces de inactivar el antibiótico al provocar la destrucción del anillo β -lactámico.
2. Cambios de conformación y disminución en el número de porinas, provocando una alteración de la permeabilidad de membrana haciendo que esta sea menor. Las porinas son unas proteínas multiméricas localizadas en la membrana externa que actúan regulando el paso de moléculas hidrófilas y distintos compuestos al espacio periplásmico.
3. Activación de bombas de expulsión mediante las cuales se reduciría el efecto del antibiótico.
4. Modificación de la diana sobre la cual actúa el antibiótico.

En el contexto actual de resistencia hacia casi todos los antibióticos utilizados en el entorno hospitalario, las distintas alternativas terapéuticas son bienvenidas, y el uso

clínico de bacteriófagos, conocido como fagoterapia, se incluye entre ellas. Los bacteriófagos, también denominados fagos, son los depredadores naturales de las bacterias, su único huésped. Además, son los organismos más abundantes de la biosfera, encontrándose en todos los nichos naturales colonizados por éstas (Shabbir et al., 2016). Los bacteriófagos contienen genomas muy diversos y se ha sugerido que representan la mayor fuente de diversidad de genes en el medioambiente. Prueba de ello es la gran cantidad de nuevos genes de función desconocida a raíz de la secuenciación del genoma y del metaviroma (Brister et al., 2012).

La administración de fagos directamente a un paciente con el propósito de lisar el patógeno bacteriano que está causando una infección clínicamente relevante se conoce como fagoterapia. De este modo, la dinámica de replicación de los fagos juega un papel muy importante en su aplicación terapéutica. Los fagos lisogénicos integran su genoma en el genoma del huésped, pudiendo modificar el fenotipo bacteriano a través de la expresión de genes virales, lo que se conoce como conversión lisogénica. A diferencia de estos, los fagos líticos no integran su genoma en el cromosoma bacteriano, sino que utilizan la maquinaria de la célula huésped para la traducción de sus genes virales con el fin de producir nuevas partículas (viriones), que se ensamblan y se liberan de la bacteria, provocando su lisis (Figura 2). Los fagos líticos son mejores candidatos para su uso en fagoterapia, puesto que su resultado final es la destrucción completa de las células bacterianas sin el riesgo de integrar su genoma en el del hospedador (Gordillo Altamirano et al., 2019).

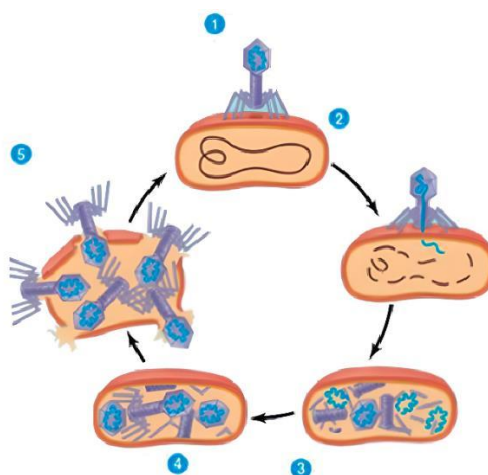


Figura 2. Esquema general del ciclo lítico de un fago 1: Adsorción a la superficie bacteriana; 2: Inyección de genoma viral y interrupción del genoma bacteriano; 3: Producción de estructuras virales; 4: Ensamble y formación de progenie viral; y 5: Lisis celular y liberación de viriones. (Jorquera et al., 2015)

A pesar de que la importancia de la fagoterapia se redujo con la época dorada de los antibióticos, recientemente se ha recuperado el interés en la misma, debido a las altas tasas de resistencia que presentan las bacterias a los antibióticos tradicionales. Los ensayos clínicos que se han llevado a cabo empleando fagos líticos contra diferentes infecciones humanas revelan perfiles de seguridad favorables y, en algunos casos, evidencias de eficacia alentadoras (Zhou et al., 2018).

Las bacterias pueden adquirir resistencia a la infección por fagos, y en esta adquisición interviene diversos mecanismos entre ellos el *Quorum Sensing* (QS), que es el proceso de comunicación de célula a célula que permite a las bacterias modificar colectivamente su patrón de expresión génica en respuesta a los cambios en la densidad celular y a la composición de especies de la comunidad microbiana. La posibilidad de modular esta comunicación bacteriana se ha propuesto en la actualidad como una nueva alternativa para controlar la resistencia de los patógenos. De este modo, la activación del QS se lleva a cabo mediante la producción de moléculas autoinducidas conocidas como acilhomoserinalactonas (AHL), AI-2, AI-3, el factor difusible de señalización (DSF), la 2-heptil-3-hidroxi-4(1H)-quinolona (PQS)... El papel de estas moléculas está relacionado con la inducción de genes implicados en la producción de enzimas líticas, toxinas y exopolisacáridos, así como en la producción de biofilm (Vuotto et al., 2014).

K. pneumoniae pero si produce AI-2 como señal (un autoinductor), de forma similar a *E. coli* utilizando ambos receptores para captar señales liberadas por otras bacterias productoras de AHL. Se ha visto que el QS se también actúa como un mecanismo de defensa antifago (mediante la producción de *biofilm* o cápsula), puesto que, la detección de las señales de AHL provocan una disminución de la susceptibilidad de la bacteria al fago haciendo que este infecte peor (Høyland-Kroghsbo et al., 2013).

De este modo, mediante la inhibición del QS, se puede modificar el comportamiento bacteriano sin efectos biocidas. Esta inhibición se puede lograr de diversas formas; bloqueando la biosíntesis de los autoinductores, mediante su degradación por enzimas específicas o evitando su interacción con el receptor (Guo et al., 2013). Muchos compuestos naturales, al interrumpir o atenuar el QS, se han empleado como inhibidores de este proceso, con el objetivo de hacer frente a las infecciones bacterianas y la resistencia a antibióticos en una gran variedad de patógenos. Algunos derivados de la furanona han mostrado actividad antagónica frente a sistemas QS en diversas bacterias como *Pseudomonas aeruginosa*, para ello, estos compuestos disminuyen la señalización

QS basada en las AHL y en el autoinductor-2 (AI-2). Además, los derivados de las furanonas también pueden interrumpir el QS al interactuar con reguladores transcripcionales que suprimen la virulencia sin afectar al crecimiento bacteriano, por ello en el presente TFM se ha empleado la molécula furanona 4-Metoxi-2(5H) (Figura 3) (Zhang et al., 2021).

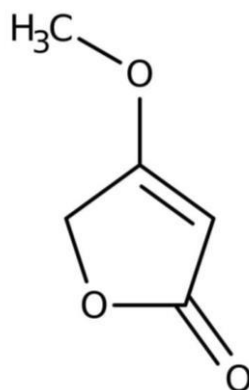


Figura 3. Formulación química de la furanona 4-Metoxi-2(5H).

3. Objetivos

3.1. Objetivo general

- ✓ El principal objetivo de este trabajo ha consistido en la caracterización de la capacidad antimicrobiana de dos fagos líticos vB_KpnS_VAC35 (VAC35) y vB_KpnM_VAC36 (VAC36) así como del incremento en su capacidad infecciosa mediante el uso combinado de los mismos con un inhibidor de QS, para determinar su potencial uso para tratar infecciones causada por el patógeno *K. pneumoniae*.

3.2. Objetivos específicos

- ✓ Determinar si los fagos son candidatos óptimos para su uso en clínica mediante el estudio genómico.
- ✓ Testar la capacidad lítica de ambos fagos frente a su cepa huésped mediante ensayos in vitro.
- ✓ Estudiar el papel inhibitor de la furanona 4-Metoxi-2(5H) en combinación con los fagos VAC35 y VAC36 frente a diversas cepas clínicas y comprobar si supone una mejora para el tratamiento de *K. pneumoniae*.

4. Material y métodos

4.1. Fagos y cepas bacterianas.

Las tres cepas clínicas de *K. pneumoniae* empleadas (K3573, K3574 y K3325) fueron aisladas a partir de muestras de sangre y proceden del Hospital Universitario Virgen Macarena (Sevilla, España) y del Centro Nacional de Microbiología (CNM; Instituto de Salud Carlos III, España). Por otro lado, los fagos (VAC35 y VAC36) fueron aislados de muestras de aguas residuales,

4.2. Preparación 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

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)

4.3. Análisis proteínas genoma

Después de la secuenciación de ambos fagos y a través de los programas SnapGene y VipTree se realizó un análisis y agrupación de las proteínas del genoma de los fagos VAC35 y VAC36. Para ello se introduce en este programa la secuencia del fago obtenida de GenBank la cual había sido depositada previamente por el grupo de investigación en el que realicé el presente TFM.

4.4. Cuantificación y titulación de los fagos

Una vez que seleccionados los fagos VAC35 y VAC36, se prepararon disoluciones seriadas 1/10 de los mismos en una disolución tampón de SM. A continuación, se empleó el método de doble placa (Figura 4) para preparar placas de lisis, este proceso se basa en infectar 200 μL de cultivo bacteriano en fase exponencial tardía ($\text{DO}_{600\text{nm}} = 0,7$) con 10 μL de la correspondiente dilución de fago. A continuación, se mezcló con agar *soft* a 56°C (el cual había sido fundido previamente a 200°C durante 15 minutos) y se depositó sobre una placa de agar TA, una vez solidificado se incubó a 37°C durante 24h. Al día siguiente se procedió al recuento de PFU (placas de lisis).

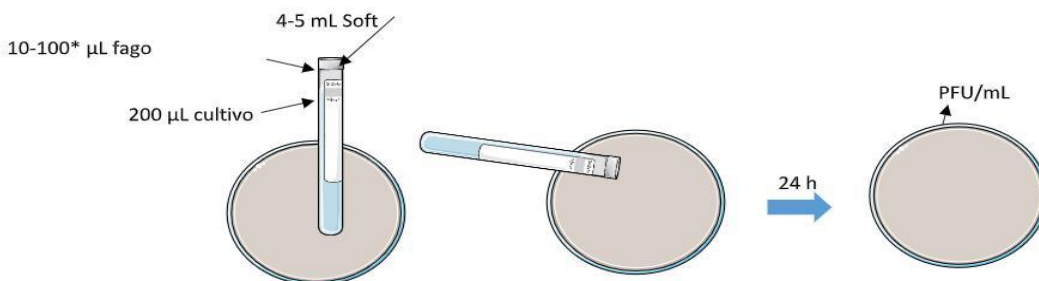


Figura 4. Esquema del método de doble capa

4.5. Comparativa fagos

4.5.1. Microscopía electrónica de transmisión

Una cantidad de 600 μL de los fagos que contenía aproximadamente 10^9 unidades formadoras de placas (PFU) fue teñida negativamente con acetato de uranilo acuoso al 1% para posteriormente ser examinada bajo un microscopio electrónico de transmisión (TEM JEOL 1011).

4.6. Optimización de la infección

Inicialmente se realizaron ensayos para establecer cuál era la densidad óptica del cultivo a la que los fagos infectaban mejor. En primer lugar, se prepararon cultivos de las cepas K3573 y K3574 de *K. pneumoniae* en medio líquido LB que se incubaron en agitación a 180 rpm y 37°C durante toda la noche. Transcurrido este tiempo, se prepararon 20 ml de LB líquido con una dilución 1:100 del cultivo preparado el día anterior, y se mantuvo en agitación a 180 rpm a 37°C hasta que alcanzaron la DO_{600nm} de 0,4 y 0,6 esperadas. Una vez transcurrido este tiempo, se extrajo 1 mL de cada tubo y se determinó la DO en un espectrofotómetro (ZUZI 4250/20). En ese momento los cultivos fueron infectados con los fagos a multiplicidad de la infección 1 (MOI 1), que hace referencia al número de partículas virales que infecta una célula. Se mantuvo la infección durante 6 horas, en las cuales se tomaron alícuotas cada hora. El cultivo se mantuvo en agitación a 180 rpm y 37°C durante las 6 horas. Los ensayos se realizaron por triplicado y empleando cultivos sin infectar como controles.

4.7. Curva de adsorción

El objetivo de este ensayo es establecer el tiempo de adsorción de los fagos VAC35 y VAC36 a los receptores presentes en la superficie bacteriana. Para ello se realizó una dilución 1:100 de la cepa correspondiente al fago en un matraz con 25 mL de medio LB que se incubó en agitación (180 rpm) y a 37°C hasta alcanzar una $DO_{600nm} = 0,4$. Una vez alcanzada esta densidad óptica los cultivos se dejaron a temperatura ambiente en ausencia de agitación y se infectaron con su correspondiente fago a una MOI de 0,01.

Una vez infectado el cultivo se retiró 1mL del matraz, que correspondería al tiempo 0. A continuación, a periodos de 1 min, se tomaron alícuotas de 1mL que se traspasaron a viales de 1,5 ml mantenidos en hielo y con 10 μ L de cloroformo. La razón de mantener los viales en hielo es que las temperaturas frías frenan el crecimiento logrando evitar una posible unión reversible. Así el cloroformo puede ejercer su función de eliminar las células bacterianas suprimiendo los centros infecciosos.

Al terminar el período de extracción los viales se centrifugaron a 12000 rpm durante 2 min para sedimentar los restos celulares y el fago adsorbido. A continuación, se realizaron diluciones seriadas 1:100 del sobrenadante obtenido para realizar placas de lisis por el método de doble capa en placas de TA. Las placas se incubaron durante 24h a 37°C, para

finalmente realizar un recuento del número de UFP/mL, estableciendo el número de fagos libres frente al tiempo.

4.8. Curva de crecimiento en un paso (*one-step growth curve*)

Se preparó un cultivo de cada cepa huésped en 5 ml de LB líquido que se incubó a 180 rpm y 37°C durante toda la noche. Transcurrido este período de tiempo, se preparó una dilución 1:100 del cultivo en 10 ml de LB y se dejó crecer hasta alcanzar una $DO_{600nm} = 0,4$. Una vez alcanzada esta fase de crecimiento, se extrajeron dos alícuotas de 1mL del cultivo bacteriano y se depositaron en sendos viales para infectarlos con el fago correspondiente a una MOI de 0,01. Posteriormente, se dejaron en estático a temperatura ambiente hasta que concluyese el tiempo de adsorción determinado previamente, posteriormente se realizaron dos lavados (en suero salino) del cultivo mediante centrifugación de 10 min a 6000 rpm. A partir de las muestras resultante se realizó una dilución 1:100 en dos matraces con 25 mL de LB.

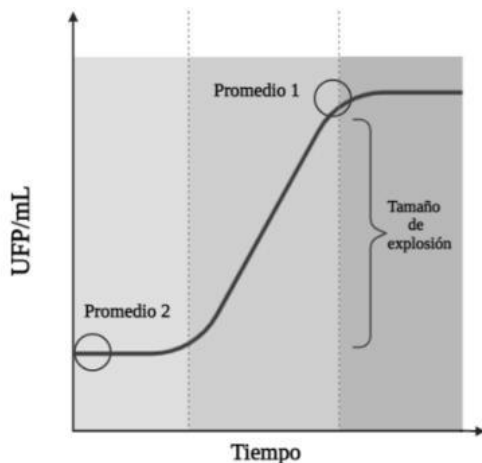
Una vez inoculado el contenido de los viales en sus respectivos matraces, al igual que en la curva de adsorción, se extrajo 1 mL de muestra que correspondería al tiempo 0. Mediante la realización varias veces de esta prueba, se determina el tiempo de espera entre extracción y extracción, no obstante, los matraces se dejaron siempre en incubación a 37 °C y bajo agitación a 180 rpm.

- VAC35: Las 5 primeras extracciones se realizaron a tiempos espaciados de 5 minutos mientras que las 5 siguientes en tiempos de 10 minutos.
- VAC36: Las 5 primeras extracciones se realizaron a tiempos espaciados de 2 minutos mientras que las 5 siguientes en tiempos de 5 minutos.

Entre los períodos de incubación, se prepararon placas para el recuento placas de lisis en placas de TA por el método de doble capa tomando diluciones del contenido de los viales: 0, -1 y -2 (placas por duplicado o por triplicado). La duración del experimento varió en función del fago.

4.8.1. Cálculo del *burst size*

Una vez realizada la *one step growth curve* y a partir del recuento de UFP/mL podemos determinar el *burst size* (Figura 5), que hace referencia al número de fagos liberados por célula bacteriana. Para ello hay que dividir el promedio de UFP/mL iniciales (tiempo 0) y el tiempo de máxima producción de UFP, antes de la estabilización de la curva.



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

Figura 5. Esquema indicativo del Burst size junto con su fórmula

4.9. Curvas infección a distintas MOI

De forma similar a las primeras curvas de infección a diferentes DO, se realizaron curvas de infección para cada fago a diferentes multiplicidades de infección: 0,1 y 1. Ambos fagos se testaron sobre sus cepas huésped, pero en el caso del VAC35 también se monitoreó su actividad bacteriolítica sobre una cepa clínica con distinta capacidad de infección, la K3325.

Inicialmente se preparó un cultivo de cada cepa huésped en 5 ml de LB líquido que se incubó a 180 rpm y 37°C durante toda la noche. Al día siguiente se preparó una dilución de cada cultivo hasta alcanzar una $DO_{600nm} = 0,4$. Transcurrido el tiempo necesario para alcanzar esta fase, se extrae 1mL de cada cultivo para asegurarse a través del uso del espectrofotómetro de que todos parten de la concentración bacteriana. Posteriormente se procedió a infectar los cultivos con el volumen de fago correspondiente a cada una de las MOI que se iban a testar. El experimento se realizó por triplicado.

4.10. Curvas de infección combinando fago y furanona

También se han testado los efectos del fago a distintas MOI en combinación con la furanona 4-Metoxi-2(5H). Los efectos de la furanona también fueron testados empleando controles con furanona, en los que no había fago.

Previamente a la realización de los ensayos de combinación con la furanona, se seleccionaron distintas concentraciones de furanona para testar la actividad bacteriolítica de la misma. De este modo se han testado 3 concentraciones: 15 $\mu\text{g/mL}$, 30 $\mu\text{g/mL}$ y 60 $\mu\text{g/mL}$ quedándonos finalmente con las dos primeras.

El procedimiento es similar al del apartado anterior, pero añadiendo la furanona a concentraciones de 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sola y combinada con el fago a MOI 1. Estas son las condiciones que se han testado:

5. Resultados

5.1. Comparación fagos

5.1.1. Análisis del genoma

El análisis gnómico de ambos fagos mostró que el tamaño del genoma del VAC35 es de 112.862 bp mientras que el VAC36 es mayor, concretamente de 169.970 bp. Las proteínas codificadas en ambos genomas, previamente anotados mediante RAST, BLAST y Hmmer, se analizaron funcionalmente observándose en el caso de VAC35 una organización funcional en bloques que incluyen un bloque de lisis, proteínas estructurales, DNA y empaquetamiento, y de defensa. En el caso de VAC36 la disposición es más particular, con los bloques intercalándose a lo largo del genoma (Figura 6). Este tipo de genoma, que no está muy bien organizado en grupos funcionales, si no que muestra aglomerados dispersos, ha sido descrito previamente para grandes fagos de *K. pneumoniae* (Pacios et al. 2021).

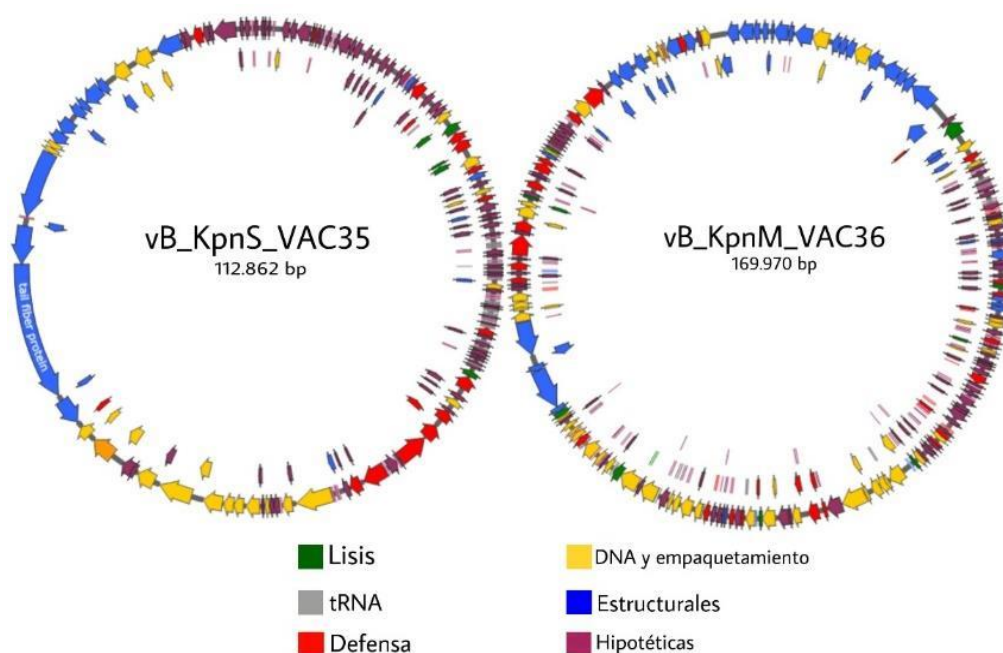


Figura 6. Genomas de los fagos VAC35 y VAC36 y distribución en bloques de sus proteínas. Imagen obtenida con el programa SnapGene

El análisis de las proteínas presentes en ambos fagos no mostró la presencia de ninguna proteína cuya función se pudiese asociar a virulencia o resistencia lo que hace de estos fagos buenos candidatos para la terapia fágica.

Ambos genomas fueron comparados y analizados filogenéticamente, así, se comprobó que existe un bajo grado de similitud entre ambos (Figura 7).

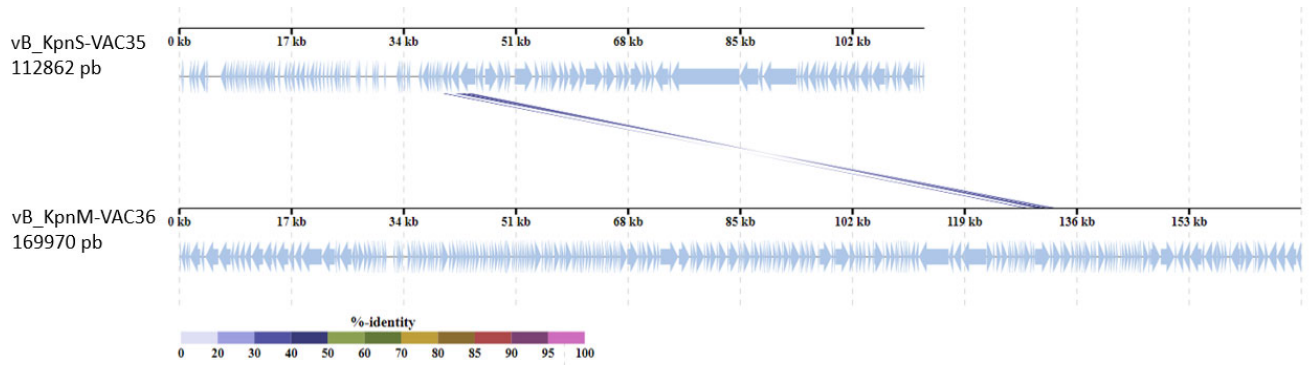


Figura 7. Comparativa fagos VAC35 y VAC 36 con el programa VipTree

El estudio filogenético confirmó la distancia existente entre ambos fagos (Figura 8).

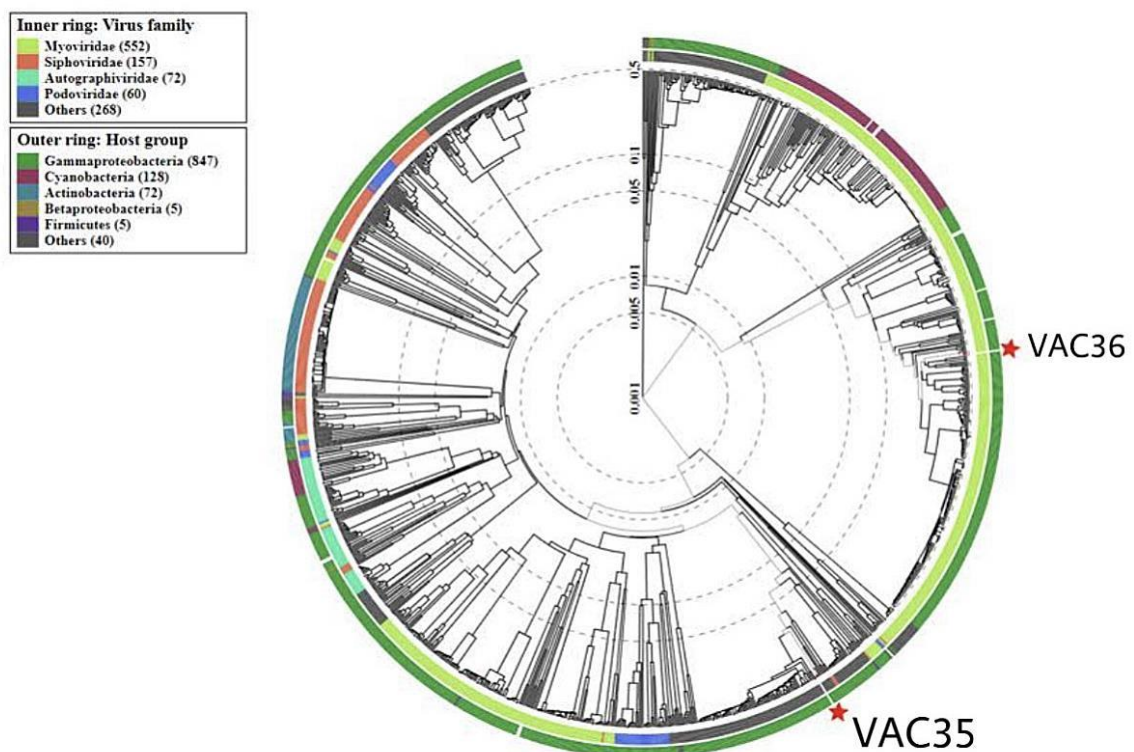


Figura 8. Árbol filogenético que contiene la posición de los fagos VAC35 y VAC36

También se estudió la homología de estos fagos frente a otros presentes en la base de datos NCBI. Para el VAC35 el fago con mayor similitud sería el vB_Kpn-IME260 mientras que para el VAC 36 sería el vB_Kpn-F48 (Figuras 9-10).

VAC35 se parece a IME260

NC_041899
vB_Kpn-IME260
123490 pb

vB_KpnS-VAC35
112862 pb

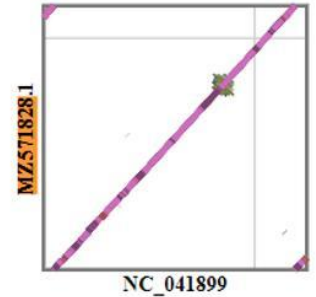
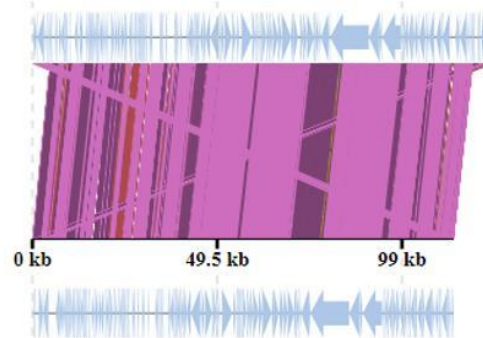
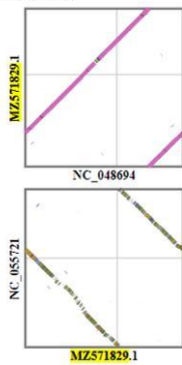


Figura 9. Fago que presenta mayor similitud con el VAC35

VAC36 se parece a F48



NC_048694
vB_Kpn-F48
170764 pb

vB_KpnM-VAC36
169970 pb

NC_055721
E. coli phage EcS1
175437 pb

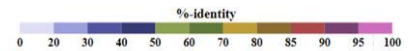
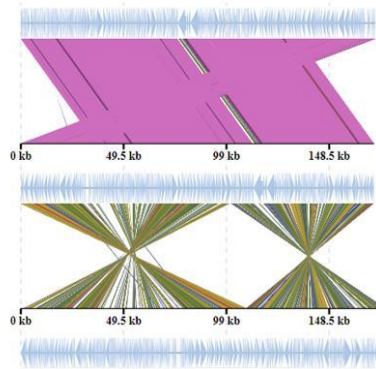


Figura 10. Fago que presenta mayor similitud con el VAC36

5.1.2. Morfología en placa.

Una vez realizadas la infección de las cepas huésped con sus fagos respectivos se observaron las placas de lisis formadas por los virus, cada una de ellas considerada una unidad formadora de placa. Tanto para el fago VAC35 como para el VAC36 se aprecia como las placas formadas presentan una morfología muy pequeña y redondeada (Figuras 11-12).

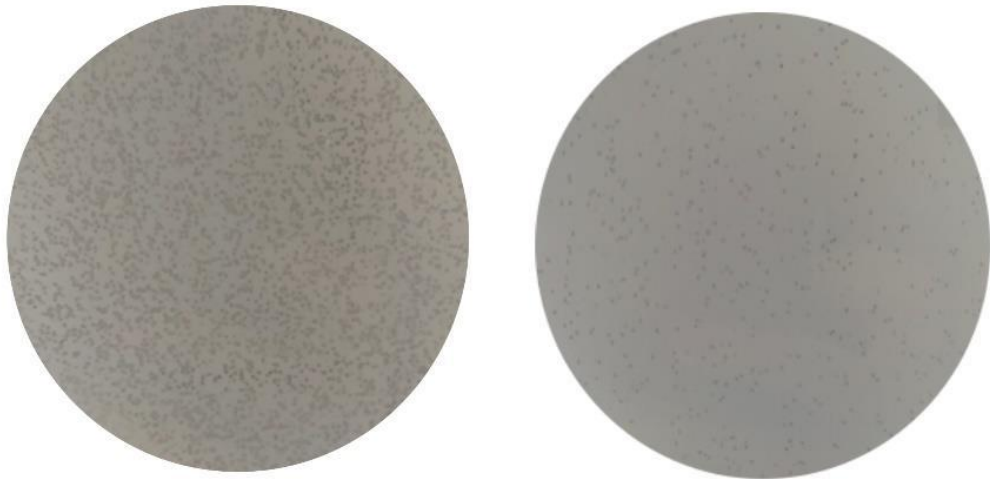


Figura 11. Morfología en placa del fago VAC35 en su cepa huésped K3574: a la izquierda en condiciones más concentradas y a la derecha en condiciones más diluidas.

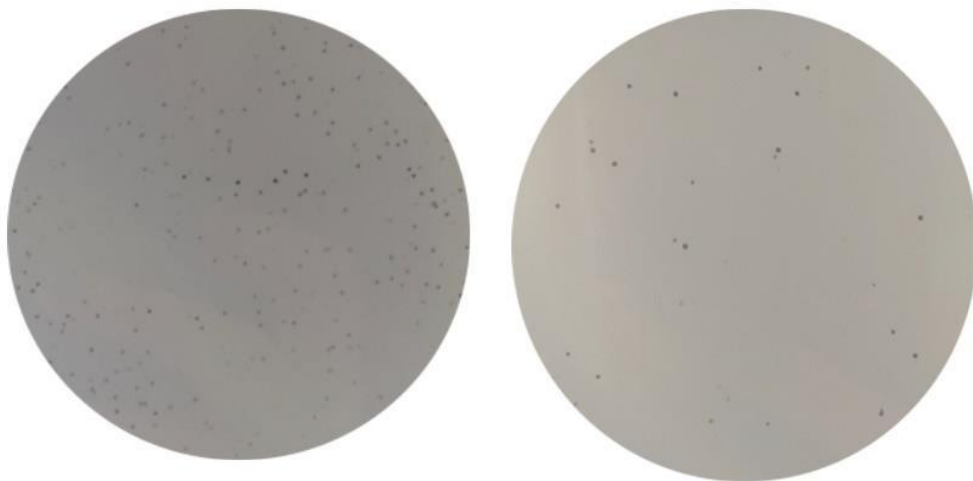


Figura 12. Morfología en placa del fago VAC36 en su cepa huésped K3573: a la izquierda en condiciones más concentradas y a la derecha en condiciones más diluidas

También hay que destacar la presencia de un halo alrededor de las placas, lo que indica la actividad de las depolimerasas previamente identificadas en el genoma. Las depolimerasas son enzimas capaces de degradar polisacáridos capsulares (CPS), exopolisacáridos (EPS) o lipopolisacáridos (LPS) presentes en bacterias gran-negativas, incrementando la sensibilidad al fago puesto que dejan las bacterias expuestas a su ataque (Saralegui et al., 2022).

5.1.3. Microscopía electrónica de barrido (TEM)

A través de la microscopía se analizó la morfología de los fagos VAC35 y VAC36, las imágenes obtenidas revelaron que ambos fagos pertenecían al orden *Caudovirales* puesto que presentaban cola contráctil con forma de tubo. así como una cabeza icosaédrica (producto del empaquetamiento del ADN). Las proteínas de la parte externa de la cápside ayudan a expandir y a estabilizar la estructura (Koonin et al., 2015).

Por un lado, podemos decir que el fago VAC35 pertenece a la familia *Siphoviridae* al presentar una cola larga y flexible. Analizando más en profundidad, la cápside mostró un tamaño de 88nm y la cola una longitud de 260 nm (Figura 13).

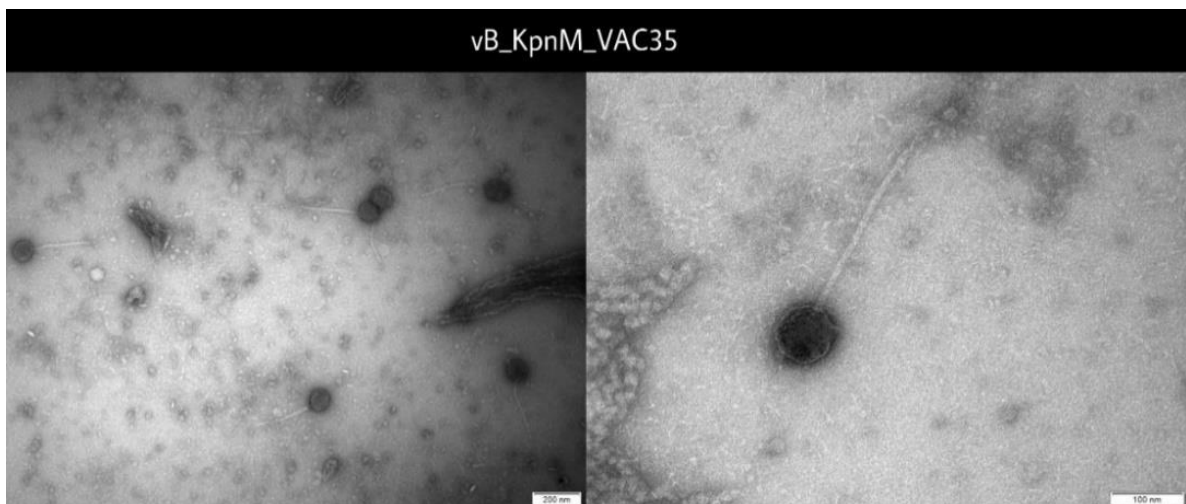


Figura 13. Morfología fago VAC35 al microscopio electrónico de barrido

Por otro lado, el VAC36 se trata de un fago perteneciente a la familia *Myoviridae* caracterizada por presentar una cola contráctil y más corta (en este caso 160 nm) que los *Siphoviridae* (Figura 14). El tamaño de la cabeza es similar al del VAC35.

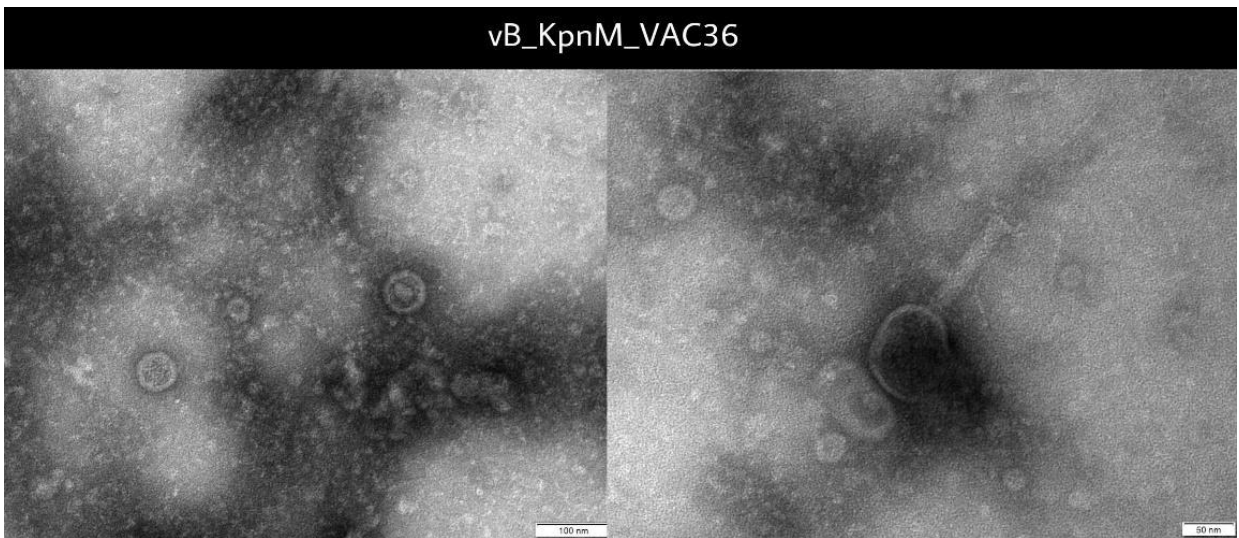


Figura 14 Morfología fago VAC36 al microscopio electrónico de barrido

5.2. Curva infección a distintas DO.

Nos permiten observar la relación que existe entre la bacteria huésped y el fago basándose en una interacción depredador-presa. De este modo, través de esta prueba, se ha conseguido monitorear la actividad de los fagos cada hora después de haberse producido la infección. Las curvas nos informan de la dinámica de la infección fágica en este caso sobre sus cepas huésped.

Con el objetivo de comprobar si la infección por los fagos se veía afectada por la composición de la pared celular y de la cápsula se infectó el cultivo en fase logarítmica temprana y media ($DO_{600nm} = 0,4$ y $0,6$), sin que se observasen diferencias que puedan suponer una mejora de la capacidad infectiva de los fagos, por ello y para los sucesivos ensayos la infección se realizó a una $DO_{600nm} = 0,4$ (Figura 13).

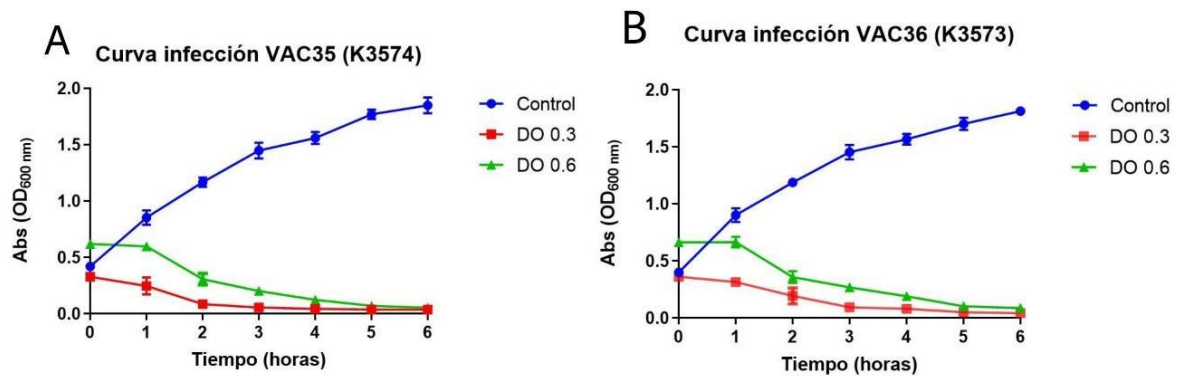


Figura 6. Curvas de infección a distintas DO. A: VAC35 B: VAC36

En esta primera aproximación se vio que los fagos VAC35 y VAC36 presentan un comportamiento muy parecido, en la figura 13 también se aprecia como a las 6h, en ambos casos, los cultivos están prácticamente lisados (cultivo carente de turbidez).

5.3. Curva adsorción

Los resultados de estas curvas nos ofrecen la información necesaria para conocer cuál es el tiempo que tarda un fago en unirse a las células bacterianas previamente al inicio de la infección.

Ambos fagos presentan tiempos de adsorción muy semejantes y rápidos, propiedad necesaria para los fagos susceptibles de ser empleados en fagoterapia. En el caso del VAC35 se produjo una rápida reducción del porcentaje de fagos libres, presentando un tiempo de adsorción de 6 minutos, mientras que el fago VAC36 muestra un tiempo de adsorción de 4 minutos (Figura 14)

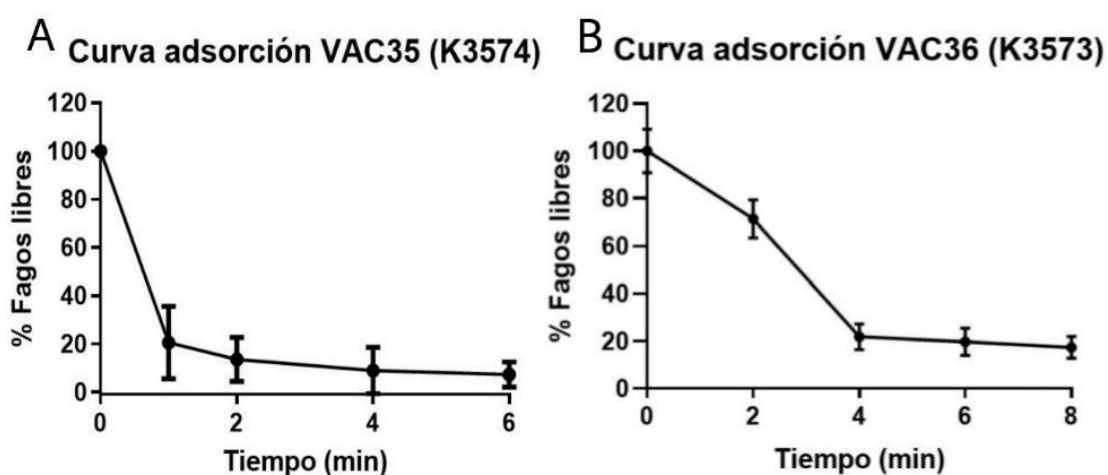


Figura 7. Curva de adsorción A: VAC35 B: VAC36

5.4. Curvas de un paso (*One step*)

Esta prueba se utiliza para determinar el período de latencia y el tamaño de explosión (*Burst size*), término que hace referencia al número de partículas virales (viriones) que se liberan en cada ciclo de infección por células bacterianas. Esta prueba también permite conocer el período de latencia que se define como el intervalo entre la adsorción de los fagos a las células bacterianas y la liberación de la progenie del fago, de este modo, podríamos conocer la interacción existente entre fago y bacteria. Gracias a esta curva podemos medir el aumento de la concentración de fagos con el tiempo, interesando fagos

con tiempos de latencia cortos y *Burst size* elevados los cuales podrían incorporarse para su uso en fagoterapia.

Ambos fagos presentaron un período de latencia (L) corto de 10 minutos. En el caso del fago VAC35 el *Burst size* fue de 34 y de 16,39 para el VAC36 (Figura 15).

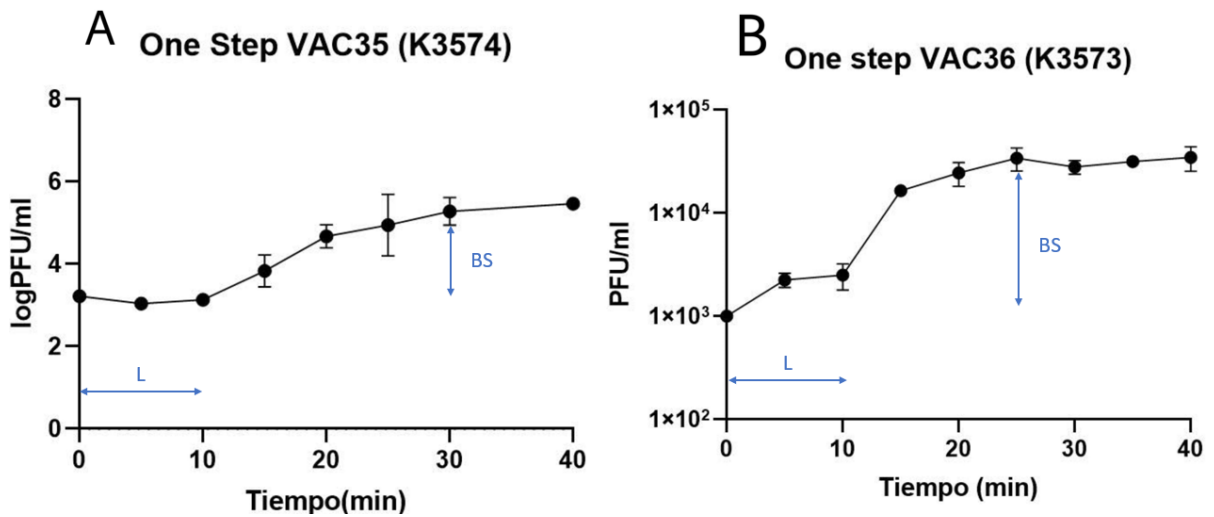


Figura 8. One step Growth Curve. A: VAC35. B: VAC36. L: Latencia BS: Burst size

5.5. Curvas infección a distintas MOI.

Los resultados de estas pruebas nos muestran cómo ha sido la actividad bacteriolítica del fago sobre la bacteria. Con el objetivo de establecer la concentración de fago con la cual se conseguía una mayor infección se testó la infección a dos MOI: 0,1 y 1 (Figura 16).

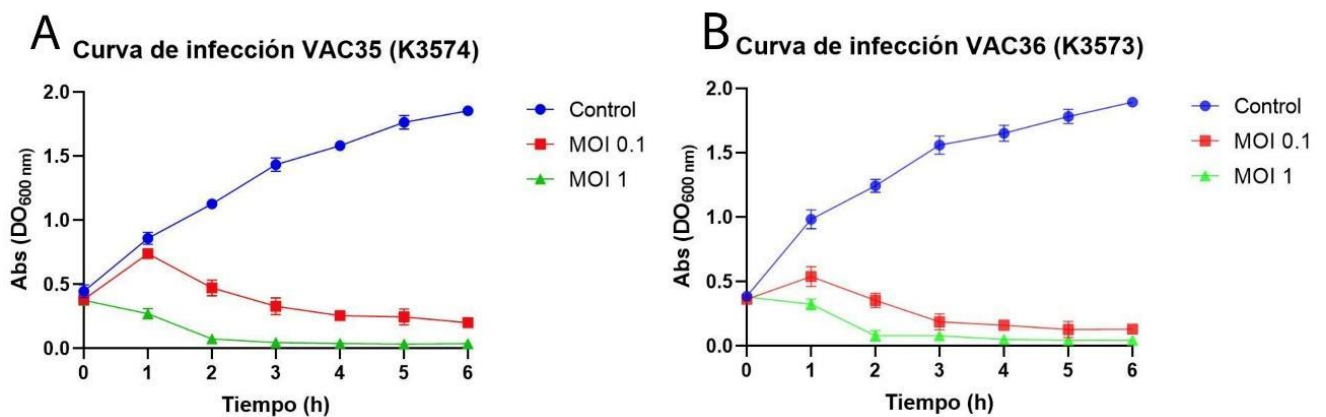


Figura 9 Curva de infección a diferentes MOI A: VAC35 B: VAC36

En primer lugar, analizando el comportamiento a distintas MOI podemos ver que en ambos casos a MOI 1 se produce un descenso inicial más brusco de la absorbancia. Esto es indicativo de que al elevarse la MOI se produce un incremento de la probabilidad de que una misma bacteria sea infectada por un mayor número de fagos. Tanto el fago VAC35 como el VAC36 presentan una buena dinámica infectiva, ya que la absorbancia a las 6h permanece en niveles muy bajos cercanos a 0. Esto indica el cultivo está completamente lisado.

En segundo lugar, comparando ambos fagos, se puede apreciar que a MOI 0,1 el fago VAC36 infecta más rápido a su cepa huésped que el VAC35, puesto que durante la primera hora prácticamente no se incrementa la absorbancia.

El fago VAC35 también se ha monitoreado en otra cepa clínica (K3525), seleccionada por ser menos susceptible al fago (Figura 17)

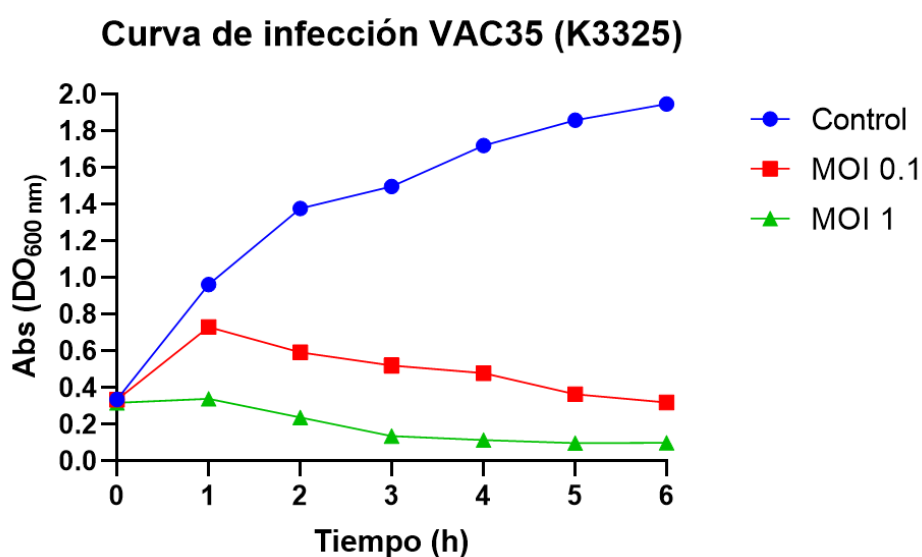


Figura 10 Curva de infección VAC 35 en la cepa K3325

En este caso, la dinámica infectiva no fue tan fuerte. Aunque se observa un retraso de aproximadamente una hora hasta que la densidad del cultivo comienza a descender, cuando el cultivo se infectó con fago a MOI 1 el cultivo estaba completamente lisado a las 3 h.

5.6. Curvas de infección combinando fago y furanona

Los resultados del efecto de la furanona y su combinación con los fagos VAC35 y VAC36 a distintas MOI sobre sus cepas huésped se ven reflejados en la figura 18.

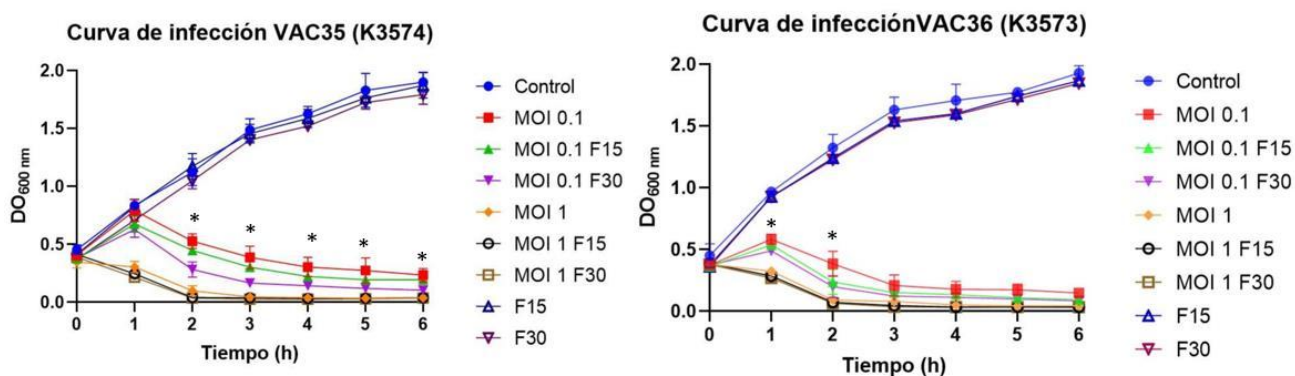


Figura 18. Curvas de infección de los fagos VAC35 y VAC 36 a distintas MOI en combinación con distintas concentraciones de furanona en sus cepas huésped (K3574 y K3573). Los asteriscos indican diferencias significativas.

Cuando las cepas K3574 y K3573 se trataron con fagos VAC35 y VAC356, respectivamente, en combinación con furanona, la DO_{600nm} se mantuvo en todos los niveles inferiores a los controles de bacteria y al fago por separado. Sin embargo, los valores de la DO_{600nm} para ambas cepas descendieron significativamente cuando se trataron con la combinación de fago con furanona en las siguientes condiciones:

- VAC35: A las 2, 3, 4 y 5 horas después de la infección para las concentraciones de furanona de 15 $\mu\text{g/mL}$ y 30 $\mu\text{g/mL}$ en combinación con el fago a MOI 0,1. Además, en el caso de la combinación de MOI 0,1 y furanona a 30 $\mu\text{g/mL}$ se ha visto que las diferencias también son significativas a las 6 horas.
- VAC36: Sólo se vieron resultados significativos a las 2 y a las 3 horas después de la infección a MOI 0,1 y a concentraciones de 15 $\mu\text{g/mL}$ y 30 $\mu\text{g/mL}$.

También se monitoreó la actividad de la furanona sobre otra cepa clínica, K3325 (Figura 19), que, en este caso al no ser la huésped, la supervivencia de la bacteria al fago es mayor sobretodo a MOI 0,1, como ya se ha visto anteriormente.

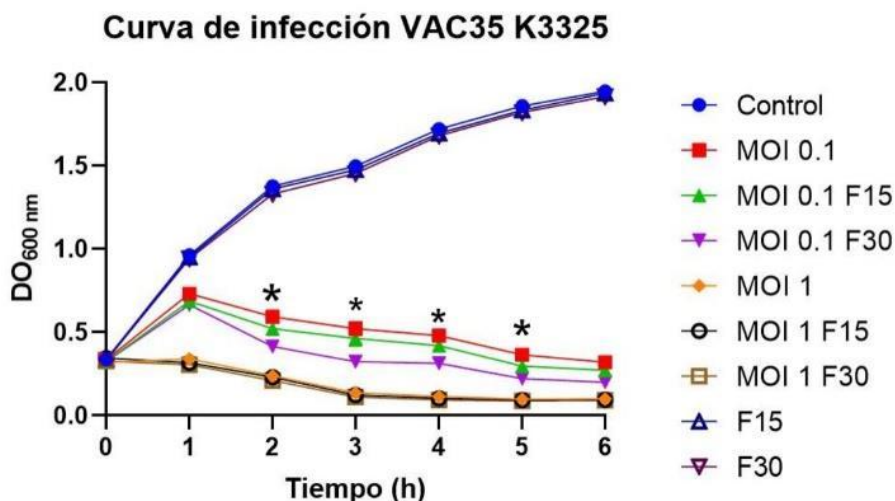


Figura 19 Curva de infección del fago VAC35 en combinación con distintas concentraciones de furanona sobre la cepa clínica K3325. Los asteriscos indican diferencias significativas.

En esta cepa se observó un descenso mayor de la DO_{600nm} cuando la cepa se trató con furanona y fago a MOI 0,1. A MOI 1 sin embargo no se observaron diferencias. De este modo a partir de las 2h hasta las 5h obtenemos resultados significativos ($p < 0,05$) para las concentraciones de furanona de 15 $\mu g/mL$ y 30 $\mu g/mL$. Además, a las 6h el resultado sigue siendo significativo para la concentración de 30 $\mu g/mL$.

6. Discusión

Las Enterobacterias representan uno de los principales grupos de microorganismos patógenos involucrados tanto en las infecciones adquiridas en la comunidad como en las relacionadas con el entorno sanitario. En este grupo destaca la especie *K. pneumoniae*, una bacteria que es considerada uno de los patógenos nosocomiales de mayor riesgo para los sistemas de salud pública y que provoca infecciones urinarias, infecciones pulmonares e infecciones de los tejidos blandos (Wang et al., 2022). El incremento en el uso de antibióticos como β -lactámicos de amplio espectro (BLEE) o carbapenémicos para su tratamiento, ha provocado la aparición de mecanismos heterogéneos de resistencia en múltiples cepas de esta bacteria. Esto ha provocado que sea un patógeno muy difícil de tratar especialmente en personas de edades avanzadas o inmunodeprimidos (Antequera et al., 2020).

La presencia de genes de resistencia a antibióticos desarrollada por las llamadas bacterias multirresistentes, implica que la búsqueda de nuevos tratamientos sea un hito en las últimas décadas. En este contexto está volviendo a adquirir gran importancia la fagoterapia, debido a sus buenos resultados en el control de las infecciones bacterianas, cuando se usa sola o en combinación con antibióticos. Además, una característica atractiva de este tratamiento es el espectro de actividad selectivo de los fagos, limitado al huésped particular, el cual se basa en la elevada especificidad de reconocimiento del receptor bacteriano. De este modo, se está consiguiendo una interesante reducción de las tasas de mortalidad y morbilidad de las personas afectadas por este tipo de bacterias (Smug et al., 2022).

Para desarrollar esta terapia en primer lugar se debe llevar a cabo una selección adecuada de fagos líticos y, en segundo lugar, tener un conocimiento profundo sobre las cepas que van a ser utilizadas con el objetivo de intentar evitar la aparición de clones resistentes a fagos, un mecanismo habitual de coevolución bacteria-virus. Por esta razón, en los últimos años se está incrementando la caracterización y aislamiento de fagos, así como el estudio de los genomas. Así, actualmente, en la base de datos de GenBank se muestran más de 120 genomas de fagos de *Klebsiella* (Jiang et al., 2022).

En el presente trabajo, se ha llevado a cabo la caracterización de dos fagos; VAC35 y VAC36, frente a sus cepas huésped; K3574 y K3573, para poder estudiar in vitro las interacciones fago-bacteria y de este modo analizar su potencial utilidad en fagoterapia.

El estudio genómico de ambos fagos mostró que ambos pertenecían a dos familias distintas y no presentaban muchas proteínas comunes. No obstante, cada fago mostró proteínas de los siguientes tipos:

- Proteínas estructurales: Dentro de este grupo se incluyen genes que codifican componentes estructurales como la cabeza, procabeza y cápside, la placa base, la proteína portal, las proteínas del cuello y las de las fibras de la cola.
- Proteínas de lisis: En este caso se recogen una serie de proteínas que están implicadas en el proceso de lisis, dentro de ellas se encuentran: endolisinas, holinas, spaninas...
- Proteínas de DNA y empaquetamiento: En este grupo destacan genes que codifican proteínas implicadas en la replicación del ADN, provocando la

independencia del huésped: genes que codifican la RNasa H, numerosas helicasas, genes que codifican la ADN-ligasa...

- Proteínas relacionadas con mecanismos de defensa: Se trata de proteínas que, junto con otros mecanismos, juegan un papel muy importante en la defensa de los fagos contra sus huéspedes (Castillo et al., 2020). En el genoma de ambos fagos nos hemos encontrado con: ADP-ribosiltransferasas, metiltransferasas...
- tRNA: Se trata de distintos tipos de tRNA que están implicados en la síntesis protéica.
- Proteínas hipotéticas: Dentro de este grupo se encuentran proteínas para las cuales todavía no se ha podido determinar la función.

Se pudo apreciar que el número de proteínas estructurales es muy superior en el caso del VAC35, habiendo una gran cantidad de proteínas de cola debido a que pertenece a la subfamilia *Siphoviridae*. En el caso del VAC36, siguiendo con las proteínas estructurales, se ha detectado la presencia de la proteína de la vaina de la cola (característica propia de la subfamilia *Myoviridae* que los diferencia de los *Siphoviridae*), que forma parte de la cola rígida, que se contrae al infectar al huésped, iniciando la infección viral en la célula bacteriana (Lopes et al., 2014). Estos resultados van de la mano con las imágenes obtenidas a través de la microscopía electrónica de barrido que mostraban que VAC35 presentaba una cola larga y flexible mientras que VAC36 tenía una cola rígida y contráctil.

Por otro lado, se confirmó la presencia de proteínas que juegan un papel muy importante en el proceso infeccioso. Se trataría de proteínas líticas tales como; holina, endolisinas y despolimerasas. Las holinas son pequeñas proteínas transmembrana involucradas en la etapa final del ciclo lítico de los fagos de ADN de doble cadena (dsDNA). Estas proteínas cooperan con las endolisinas para lograr la lisis bacteriana, liberando así la progenie del fago al entorno extracelular, además también son agentes permeabilizadores de la membrana. Los componentes de la maquinaria lítica citados también podrían ser utilizados por sí solos, una vez purificados, como agente terapéutico (LePrince et al., 2022).

Inicialmente, con el análisis morfológico y genómico se vio que cumplían el principal requisito para su uso en fagoterapia: eran fagos líticos, lo cual es una característica necesaria debido a su mecanismo de acción y no presentaban genes conocidos de

virulencia o resistencia. Además, previamente se había determinado que ambos fagos presentaban un amplio rango de huésped.

Los datos obtenidos de las curvas de adsorción y crecimiento en un paso mostraron que ambos fagos presentaban tiempos de adsorción y latencia óptimos para la infección, además de *burst size* elevados lo que hace de ellos buenos candidatos para la fagoterapia.

La monitorización de las infecciones fago-bacteria revelaron que tanto el VAC35 como el VAC36 presentan una fuerte actividad bacteriolítica frente a sus cepas huésped: K3574 y K3573. Con estas curvas se observaron que hasta las 6h los cultivos permanecían lisados sin crecimiento, en otros trabajos (Pacios et al., 2021) se pudo observar como a pesar de esta lisis a las 24h aparecía resistencia y los cultivos se volvían turbios.

Los fagos líticos también pueden ser combinados con otros compuestos, siendo los antibióticos los más habituales. Varios estudios señalan que esta combinación provocaría una mejora de las propiedades *antibiofilm* y bactericidas que los antibióticos y fagos por sí solos. Esto se debe a que los fagos harían a las bacterias más susceptibles al posterior tratamiento con el antibiótico y además se disminuiría la aparición de clones de bacterias resistentes a los fagos (Smug et al., 2022).

Como ya se ha visto en otros trabajos (Guo et al., 2013) (Høyland-Krogsho et al., 2013), el QS juega un papel muy importante en la defensa frente a fagos mediante la producción de moléculas autoinducidas como por ejemplo las acilhomoserinalactonas (AHL). En este caso, se ha detectado que *K.pneumoniae* no las produce, pero si es capaz de detectar sus señales procedentes de otras bacterias. De este modo, dichas señales provocan una desensibilización de las bacterias al ataque de los fagos, generándose de esta manera una resistencia a ellos. Por esta razón, en el presente TFM se ha empleado la molécula furanona 4-Metoxi-2(5H) para mejorar la infección al inhibir diversos mecanismos de defensa basados en el QS, como es la producción de *biofilm* o la producción de la cápsula, que impiden el acceso de los fagos a los receptores (Ashe et al., 2021). La furanona se ha empleado en combinación con los fagos VAC35 y VAC36 en sus cepas huésped, K3574 y K3573, pero también con el fago VAC35 sobre la cepa K3325, para comprobar su efecto sobre una cepa que se infecta peor. Hemos podido ver como redujo más rápido la densidad celular del cultivo, logrando resultados significativos en las tres cepas cuando se empleaba una MOI de 0,1 y concentraciones de furanona de 15 $\mu\text{g/mL}$ y 30 $\mu\text{g/mL}$. Cuando las MOI eran elevadas la lisis producida por el fago fue tan rápida que no permitió

observar el efecto de la furanona. Estos resultados muestran que el efecto de los fagos a bajas concentraciones puede mejorarse con el uso de la furanona lo que podría favorecer el uso de los fagos en terapia, reduciendo la respuesta inmune que se pueda producir cuando estos se aplican en altas concentraciones (Dąbrowska et al., 2014).

Con este trabajo se ha podido establecer que los fagos VAC35 y VAC36 presentan unas características óptimas para su uso en fagoterapia, y que su capacidad bacteriolítica se puede ver incrementada cuando se inhiben el QS bacteriano.

7. Conclusiones

- ✓ En los fagos vB_KpnS_VAC35 y vB_KpnM_VAC3 se ha descartado la presencia de genes relacionados con la lisogenia y genes relacionados con la virulencia y la resistencia, características indispensables para la selección de los fagos empleados en fagoterapia.
- ✓ Los fagos vB_KpnS_VAC35 y vB_KpnM_VAC36, presentan tiempos de adsorción y de latencia bajos, que, en combinación con un *Burst size* elevados los hacen buenos candidatos para su uso en fagoterapia.
- ✓ Los fagos vB_KpnS_VAC35 y vB_KpnM_VAC36 muestran una gran capacidad bacteriolítica sobre sus cepas huésped: K3574 y K3573, respectivamente.
- ✓ La combinación de los fagos vB_KpnS_VAC35 y vB_KpnM_VAC36 con el inhibidor de QS furanona 4-Metoxi-2(5H) a concentraciones de 15 µg/mL y 30 µg/mL produjo una disminución significativa de la densidad óptica en todos los cultivos testados, principalmente cuando se empleó una baja concentración de fago. Es por ello que esta combinación podría emplearse en fagoterapia, aunque son necesarios más estudios que permitan confirmar nuestros resultados.

8. Bibliografía

1. 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>

2. Ahmed, M., Hedier Jawad, N., Al-shimmery, S., Basi, R. (2018). Comparative study of Efficacy of curcumin oil and Levofloxacin against wound contamination by Klebsiella Pneumonia. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. 9.
3. Antequera M, A., Sáez B, C., Ciudad S, M., García B, M. J., Moyano V, B., Rodríguez C, P., Roy V, E., Aguilera G, M., Alonso N, E., Cárdenas I, M. J., Castro G, S., Domingo G, D., & Barrios B, A. (2020). Epidemiología, tratamiento y mortalidad en pacientes infectados por enterobacterias productoras de carbapenemasas: estudio retrospectivo [Epidemiology, treatment and mortality in infection by carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: retrospective study]. *Revista chilena de infectología : órgano oficial de la Sociedad Chilena de Infectología*, 37(3), 295–303. <https://doi.org/10.4067/s0716-10182020000300295>
4. Ashe, E. C., Comeau, A. M., Zejdlik, K., & O'Connell, S. P. (2021). Characterization of Bacterial Community Dynamics of the Human Mouth Throughout Decomposition *via* Metagenomic, Metatranscriptomic, and Culturing Techniques. *Frontiers in microbiology*, 12, 689493.
5. Bragg, R. R., Meyburgh, C. M., Lee, J. Y., & Coetzee, M. (2018). Potential Treatment Options in a Post-antibiotic Era. *Advances in experimental medicine and biology*, 1052, 51–61. https://doi.org/10.1007/978-981-10-7572-8_5
6. Brister, J. R., Le Mercier, P., & Hu, J. C. (2012). Microbial virus genome annotation-mustering the troops to fight the sequence onslaught. *Virology*, 434(2), 175–180. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2012.09.027>
7. Castillo, J. A., Secaira-Morocho, H., Maldonado, S., & Sarmiento, K. N. (2020). Diversity and Evolutionary Dynamics of Antiphage Defense Systems in *Ralstonia solanacearum* Species Complex. *Frontiers in microbiology*, 11, 961. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00961>
8. Dąbrowska, K., Miernikiewicz, P., Piotrowicz, A., Hodyra, K., Owczarek, B., Lecion, D., Kaźmierczak, Z., Letarov, A., & Górski, A. (2014). Immunogenicity studies of proteins forming the T4 phage head surface. *Journal of virology*, 88(21), 12551–12557. <https://doi.org/10.1128/JVI.02043-14>

9. 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
10. 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>
11. Gorrie, C. L., Mirceta, M., Wick, R. R., Judd, L. M., Wyres, K. L., Thomson, N. R., Strugnell, R. A., Pratt, N. F., Garlick, J. S., Watson, K. M., Hunter, P. C., McGloughlin, S. A., Spelman, D. W., Jenney, A., & Holt, K. E. (2018). Antimicrobial-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Carriage and Infection in Specialized Geriatric Care Wards Linked to Acquisition in the Referring Hospital. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 67(2), 161–170. <https://doi.org/10.1093/cid/ciy027>
12. Guo, M., Gamby, S., Zheng, Y., & Sintim, H. O. (2013). Small molecule inhibitors of AI-2 signaling in bacteria: state-of-the-art and future perspectives for anti-quorum sensing agents. *International journal of molecular sciences*, 14(9), 17694–17728. <https://doi.org/10.3390/ijms140917694>
13. Høyland-Kroghsbo, N. M., Maerkedahl, R. B., & Svenningsen, S. L. (2013). A quorum-sensing-induced bacteriophage defense mechanism. *mBio*, 4(1), e00362-12. <https://doi.org/10.1128/mBio.00362-12>
14. Jiang, L., Jiang, Y., Liu, W., Zheng, R., & Li, C. (2022). Characterization of the Lytic Phage Flora With a Broad Host Range Against Multidrug-Resistant *Escherichia coli* and Evaluation of Its Efficacy Against *E. coli* Biofilm Formation. *Frontiers in veterinary science*, 9, 906973. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.906973>
15. Jorquera, D., Galarce, N., & Borie, C. (2015). El desafío de controlar las enfermedades transmitidas por alimentos: bacteriófagos como una nueva herramienta biotecnológica [The challenge of controlling foodborne diseases: bacteriophages as a new biotechnological tool]. *Revista chilena de infectología : organo oficial de la Sociedad Chilena de Infectología*, 32(6), 678–688. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182015000700010>
16. Leprince, A., Nuytten, M., July, E., Tesseur, C., & Mahillon, J. (2022). Getting Outside the Cell: Versatile Holin Strategies Used by Distinct Phages to Leave

- Their *Bacillus thuringiensis* Host. *Journal of virology*, e0069622. Advance online publication. <https://doi.org/10.1128/jvi.00696-22>
17. Lopes, A., Tavares, P., Petit, M. A., Guérois, R., & Zinn-Justin, S. (2014). Automated classification of tailed bacteriophages according to their neck organization. *BMC genomics*, *15*(1), 1027. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-1027>
 18. 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).
 19. Martin, R. M., & Bachman, M. A. (2018). Colonization, Infection, and the Accessory Genome of *Klebsiella pneumoniae*. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, *8*, 4. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00004>
 20. Pacios, O., Fernández-García, L., Bleriot, I., Blasco, L., Ambroa, A., López, M., Ortiz-Cartagena, C., Cuenca, F. F., Oteo-Iglesias, J., Pascual, Á., Martínez-Martínez, L., Domingo-Calap, P., & Tomás, M. (2021). Phenotypic and Genomic Comparison of *Klebsiella pneumoniae* Lytic Phages: vB_KpnM-VAC66 and vB_KpnM-VAC13. *Viruses*, *14*(1), 6. <https://doi.org/10.3390/v14010006>
 21. Pacios, O., Fernández-García, L., Bleriot, I., Blasco, L., González-Bardanca, M., López, M., Fernández-Cuenca, F., Oteo, J., Pascual, Á., Martínez-Martínez, L., Domingo-Calap, P., Bou, G., Tomás, M., & Study Group on Mechanisms of Action and Resistance to Antimicrobials (GEMARA) on behalf of the Spanish Society of Infectious Diseases and Clinical Microbiology (SEIMC) (2021). Enhanced Antibacterial Activity of Repurposed Mitomycin C and Imipenem in Combination with the Lytic Phage vB_KpnM-VAC13 against Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *65*(9), e0090021. <https://doi.org/10.1128/AAC.00900-21>
 22. Podschun, R., & Ullmann, U. (1998). *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clinical microbiology reviews*, *11*(4), 589–603. <https://doi.org/10.1128/CMR.11.4.589>
 23. Saralegui, C., Herencias, C., Halperin, A. V., de Dios-Caballero, J., Pérez-Viso, B., Salgado, S., Lanza, V. F., Cantón, R., Baquero, F., Prieto, M. A., & Del Campo, R. (2022). Strain-specific predation of *Bdellovibrio bacteriovorus* on *Pseudomonas aeruginosa* with a higher range for cystic fibrosis than for

- bacteremia isolates. *Scientific reports*, 12(1), 10523. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-14378-5>.
24. Shabbir, M. A., Hao, H., Shabbir, M. Z., Wu, Q., Sattar, A., & Yuan, Z. (2016). Bacteria vs. Bacteriophages: Parallel Evolution of Immune Arsenal. *Frontiers in microbiology*, 7, 1292. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01292>
25. Smug, B. J., Majkowska-Skrobek, G., & Drulis-Kawa, Z. (2022). PhREEPred: Phage Resistance Emergence Prediction Web Tool to Foresee Encapsulated Bacterial Escape from Phage Cocktail Treatment. *Journal of molecular biology*, 434(14), 167670. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2022.167670>
26. Tacconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A., Harbarth, S., Mendelson, M., Monnet, D. L., Pulcini, C., Kahlmeter, G., Kluytmans, J., Carmeli, Y., Ouellette, M., Outtersson, K., Patel, J., Cavalieri, M., Cox, E. M., Houchens, C. R., Grayson, M. L., Hansen, P., Singh, N., Theuretzbacher, U., WHO Pathogens Priority List Working Group (2018). Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *The Lancet. Infectious diseases*, 18(3), 318–327. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30753-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30753-3)
27. Vuotto, C., Longo, F., Balice, M. P., Donelli, G., & Varaldo, P. E. (2014). Antibiotic Resistance Related to Biofilm Formation in *Klebsiella pneumoniae*. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 3(3), 743–758. <https://doi.org/10.3390/pathogens3030743>
28. Wang, X., Xu, X., Zhang, S., Chen, N., Sun, Y., Ma, K., Hong, D., Li, L., Du, Y., Lu, X., & Jiang, S. (2022). TPGS-based and S-thanatin functionalized nanorods for overcoming drug resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *Nature communications*, 13(1), 3731. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-31500-3>
29. Weber-Dąbrowska, B., Letkiewicz, S., Fortuna, W., Szufnarowski, K., Pawełczyk, Z., Rogóż, P., Kłosowska, D. (2012). Phage as a modulator of immune responses: practical implications for phage therapy. *Advances in virus research*, 83, 41–71. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394438-2.00002-5>
30. Zhang, Y., Lin, Y., Zhang, X., Chen, L., Xu, C., Liu, S., Cao, J., Zheng, X., Jia, H., Chen, L., & Zhou, T. (2021). Combining Colistin with Furanone C-30 Rescues Colistin Resistance of Gram-Negative Bacteria *in Vitro* and *in Vivo*. *Microbiology spectrum*, 9(3), e0123121. <https://doi.org/10.1128/Spectrum.01231-21>.

31. Zhou, W., Feng, Y., & Zong, Z. (2018). Two New Lytic Bacteriophages of the *Myoviridae* Family Against Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii*. *Frontiers in microbiology*, 9, 850. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00850>.