



Trabajo Fin de Grado

Aplicación potencial de los estafilofagos Twort 17422 y K 26857 en el control de cepas de *Staphylococcus spp.* resistentes a antibióticos: estudio preliminar

Autor: Esteban Martínez González

Tutora: Francisca Suárez Estrella

Cotutora: Macarena del Mar Jurado Rodríguez

Titulación: Grado en Biotecnología

Curso académico: 2020/2021

Departamento de Biología y Geología

Área de Microbiología

Agradecimientos

Si alguien me preguntara cual ha sido la parte más difícil de este trabajo, seguramente pensaría que serían los experimentos, la redacción o la defensa. Imagino que grande sería su sorpresa al enterarse de que ha sido justamente esta. Escribir los agradecimientos es como pulsar un botón de pausa, por un instante se detiene el frenesí de la redacción, dejan de importar los ajetreos administrativos, y simplemente te detienes a reflexionar sobre la gran cantidad de personas que te han ayudado a lo largo de estos años de carrera, que por si cabía alguna duda, son muchísimas.

En primer lugar, me gustaría dedicar este trabajo en memoria del profesor Joaquín Moreno Casco. Durante el transcurso de la carrera Joaquín cumplió un papel de “padre científico” para todos, por un lado, por la calidad de sus clases, y por otro, por una preocupación genuina por cada alumno. Cuando la sabiduría se junta con la honestidad forman un coctel explosivo que hacía imposible no contagiarse de su entusiasmo por aprender y te inspiraban para poner un punto de esfuerzo extra. Si me decanté por realizar el Trabajo Fin de Grado en el Área de Microbiología, en primera instancia fue sin duda por él. Asimismo, también querría agradecer a María José López por su labor y acogida en el laboratorio.

También me gustaría destacar a mi directora, Paqui Suárez Estrella, por toda su dedicación a lo largo de un año que se terció particularmente complicado. Siempre me he sentido apoyado por su parte, y junto a ella reside gran parte del mérito de este trabajo. Además, quería mencionar a mi cotutora Macarena Jurado la cuál si bien ha estado de baja estos meses, ha sido una profesora magnífica todos estos años. Finalmente, también quería agradecerle a Rosario Lerma, quien ha estado conmigo al pie del cañón durante todo el trabajo, enseñándome cómo funciona el laboratorio y animándome cuando no salían las cosas. Eres una persona genial y no me cabe duda de que conseguirás ese doctorado y lo que se te ponga por delante. Además, este espíritu de genialidad se extiende hacia el resto de personal del laboratorio, desde a mi profesor Juan Antonio López, como a otros integrantes como Jesus Salinas y María José Estrella.

Más allá del estudio, la carrera me ha permitido conocer a personas maravillosas como Carla y Lucía, grandes amigas que me llevo conmigo, y Javi Mena, gran amigo, compañero de laboratorio nº1, y responsable de tardes de cafés con conversaciones que no tienen nada que envidiar a las de Tolkien y Lewis. También me gustaría destacar a Josema y Anahis, y agradecerles por ser geniales y hacerme la vida más fácil. Por otra parte, me gustaría mencionar a los amigos que me han acompañado desde Bachillerato, como David Pérez, Javi Ib, Manolo y Andrea, muchas gracias por esta ahí cuando lo he necesitado. Finalmente, a Miguel, a quien conozco desde mi época colegial en el CEIP Indalo, por ser un amigo increíble con todas las letras, además de un ejemplo de determinación y constancia.

Quiero agradecer a mis padres, por su ejemplo, su cariño, su esfuerzo para que nunca nos faltara nada, y por animarme siempre a estudiar y dar lo mejor de mí. A mis tías, por siempre cuidarme y preocuparse por mí. A mi hermano y mis primos, David, Mariel, Andrés, Denise, Tomi, y Ezequiel por todas esas risas que hemos compartido juntos. Si bien hace tiempo que no os veo a muchos de vosotros (cortesía del covid) siempre os tengo presentes. Finalmente me gustaría acabar recordando a mis abuelos, grandes referentes para mí a los cuales tengo un cariño inmenso, sus historias, así como su templanza y su fe, me han ayudado a tener los pies en la tierra, a poder valorar las cosas en vez de darlas por sentadas y a tener las agallas de no tirar la toalla. Junto a vosotros, en esos primeros años de mi infancia en Montevideo y Colonia el mundo se veía como un lugar increíble y lleno de cosas por descubrir, todo tipo de plantas, animales, y lugares increíbles parecían estar esperándome ahí fuera. Ese mismo sentimiento sería el que años más tarde, y tras descartar ideas previas como las de ser astronauta o arqueólogo, me llevaría a interesarme por la biotecnología.

Índice

Resumen	5
Abstract	6
1. Introducción	7
1.1. <i>Staphylococcus aureus</i>: características generales y colonización	7
1.2 Factores de virulencia	8
1.2.1 Factores de virulencia relacionados con la adherencia a la célula hospedadora	8
1.2.2 Factores de virulencia relacionados la evasión de las defensas del huésped.....	8
1.2.3 Factores de virulencia relacionados con la penetración de los tejidos.....	9
1.3 Problemática de las resistencias a antibióticos	10
1.3.1 ¿Por qué surgen las resistencias?.....	10
1.3.2 Clasificación de los MRSA.....	11
1.3.3 Tratamientos nuevos y en desarrollo.....	12
1.4 Fagoterapia	13
1.4.1 Antecedentes históricos.....	13
1.4.2 Fagoterapia vs Antibióticos	14
1.4.3 Terapia con polífagos	16
1.4.3 Diseño de preparaciones de fagos con fines terapéuticos.....	17
2. Objetivos	19
3. Materiales y Métodos	19
3.1 Colección de bacterias	19
3.2 Bacteriófagos utilizados en el ensayo	20
3.3 Diseño experimental	20
3.4 Medios de cultivo	21
3.5 Producción y purificación de los bacteriófagos	23
3.6 Titulación del bacteriófago.....	23
3.7 Prueba de la gota de Adams.....	24
3.8 Cinética de adsorción	25
3.9 Curva de multiplicación	27
3.10 Análisis estadístico	27
4. Resultados y discusión.....	28
4.1 Determinación del espectro de hospedadores: Prueba de la gota de Adams	28

4.2 Cinética de adsorción	30
4.3 Curva de multiplicación (<i>one step growth</i>).....	34
5. Conclusiones	41
6. Bibliografía.....	42

Resumen

El aumento de las resistencias a antimicrobianos por parte de bacterias patógenas es un problema de salud pública mundial urgente, siendo en la actualidad responsable de 700.000 muertes anuales a escala global. Esta situación ha provocado que organismos internacionales hayan desarrollado planes de acción que promueven programas I + D para el desarrollo de nuevos medicamentos, así como el rescate de la fagoterapia, una práctica que cayó en el olvido en occidente, tras la comercialización de los antibióticos. Desde el descubrimiento de los bacteriófagos por Twort y d'Herelle a principios del siglo XX, se ha remarcado el potencial de los fagos como agentes antimicrobianos, y hoy día, las estrategias para su empleo en clínica se van abriendo paso de forma paralela a los avances biotecnológicos.

En este trabajo se ha evaluado el potencial antimicrobiano de *Staphylococcus phage K* y *Staphylococcus phage Twort*, dos bacteriófagos pertenecientes a la familia *Herelleviridae*, los cuales son específicos de *S. aureus*. Para ello, en primer lugar, se estudió cualitativamente su rango de acción sobre una colección de 61 cepas procedentes de muestras de epidermis y fosas nasales humanas. Posteriormente, se seleccionaron las cepas que mostraron mayor susceptibilidad y se realizó una caracterización *in vitro* del fago K, que consistió en determinar su cinética de adhesión, así como la capacidad para replicarse intracelularmente y provocar lisis celular.

Los resultados mostraron que el fago K presentó un mayor espectro de acción frente a las cepas de la colección, por lo cual se escogió dicho fago para las siguientes etapas del trabajo. Los ensayos cuantitativos para la determinación de su capacidad de adsorción reflejaron diferencias en función de la cepa. Pese a ello, en todos los casos se observó una gran capacidad de adhesión viral. Finalmente, respecto a la curva de multiplicación, los resultados fueron dispares, aunque destacó el efecto del fago K en las cepas 13-MSP-1 y 26-MSP-1, ya que provocó un tamaño de explosión tres veces superior al obtenido en una cepa control. Los resultados obtenidos son muy prometedores y refuerzan la idea del uso de la fagoterapia como alternativa al uso de antibióticos frente a las enfermedades causadas por *S. aureus* multirresistentes.

Palabras clave: Antimicrobianos, Resistencias, Fagoterapia, *Staphylococcus*,

Abstract

The rise of antimicrobial resistance by pathogenic bacteria is an urgent global public health problem and currently causes 700.000 deaths a year globally. This situation has caused international organizations to develop action plans that promote R + D programs for the development of new drugs, and the rescue of phage therapy, a practice that fell into oblivion for Western medicine after the commercialization of antibiotics. Since the discovery of bacteriophages by Twort and d'Herelle at the beginning of XX century, the potential of phages as antimicrobial agents has been accentuated and nowadays biotechnological advances have increased the range of strategies for their therapeutic use.

In this work, the antimicrobial potential of *Staphylococcus phage K* and *Staphylococcus phage Twort*, two bacteriophages belonging to the *Herelleviridae* family, which are specific to *S. aureus*, has been evaluated. First, its range of action was qualitatively studied on a collection of 61 strains from human epidermis and nostrils samples. Subsequently, to carry out this work, the strains that showed the greatest susceptibility were selected and an *in vitro* characterization of phage K was carried out, which consisted in determining its adhesion kinetics and multiplication curve.

The results showed that phage K presented a greater spectrum of action against the strains of the collection, for which said phage was chosen for the following phases of the work. The quantitative assays to determine its adsorption capacity showed differences depending on the strain, but despite this, a great adhesion capacity was observed in all cases. Finally, in terms of the multiplication curve, the results were mixed, but the size of the viral burst in the case of the 13-MSP-1 and 26-MSP-1 strains was remarkable, as it was three times larger than that obtained in the control strain. The results obtained are very promising and reinforce the idea of using phage therapy as an alternative to the use of antibiotics against diseases caused by multidrug-resistant *S. aureus*.

Keywords: Antimicrobials, Resistances, Phage therapy, *Staphylococcus*

1. Introducción

1.1. *Staphylococcus aureus*: características generales y colonización

Las bacterias del género *Staphylococcus* forman parte del filo *Firmicutes*. Las especies de este género suelen presentarse como comensales o parásitos de humanos y animales. En humanos, las dos especies patógenas más importantes son *Staphylococcus aureus* y *S. epidermidis* (Madigan *et al.*, 2004).

La clasificación taxonómica completa de *Staphylococcus* según el *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* es la siguiente: **Filo:** *Firmicutes* > **Clase:** *Bacilli* > **Orden:** *Bacillales* > **Familia:** *Staphylococcaceae* > **Género:** *Staphylococcus*.

El prefijo “staphylo” hace referencia a su tendencia a disponerse en grupos con forma de racimo, aunque también se pueden disponer en pares o tétradas. Las especies pertenecientes al género *Staphylococcus* se caracterizan por ser cocos gram positivos de 0,5 a 1,5 μm de diámetro (Becker *et al.*, 2015), no esporulados, presentar un metabolismo aerobio facultativo, y ser coagulasa y catalasa positivos. Esto último permite diferenciarlos de otros cocos gram positivos como *Streptococcus* y *Lactobacillus*. Además, los estafilococos tienen una relativa resistencia a la desecación y toleran concentraciones elevadas de NaCl, lo cual puede utilizarse como estrategia para aislarlos utilizando un medio selectivo (Cervantes *et al.*, 2014).

En humanos el vestíbulo nasal anterior es una zona especialmente preferente para la colonización de *S. aureus* y, en concreto, *S. aureus* resistente a la meticilina (MRSA). Esta cavidad está revestida por una capa de epitelio escamoso estratificado en la que se encuentra el 60% del reservorio (Cole *et al.*, 2001) de *S. aureus*, mientras que el resto se localiza en las fosas nasales internas, donde se unen a las células nasales ciliadas (Plouin-Gaudon *et al.*, 2006). En el proceso de colonización el factor de aglomeración B (*ClfB*) y el determinante de superficie regulado por hierro (*IsdA*) juegan un papel importante para la adhesión a la citoqueratina y a la loricrina (Burian *et al.*, 2010). Se estima que entre el 20 – 30% de los humanos adultos son portadores nasales de *S. aureus* (van Belkum *et al.*, 2009), pero además también hay otras regiones como las axilas y el tracto gastrointestinal que pueden estar colonizadas. En estas regiones el estafilococo puede permanecer de manera comensal sin desencadenar ningún signo de infección, sin embargo, la colonización aumenta el riesgo de infección, ya que actúa como un reservorio desde el cual pueden pasar al medio interno. Los datos indican que la mayoría de las infecciones por *S. aureus* están provocadas por las propias cepas endógenas (Mertz *et al.*, 2009).

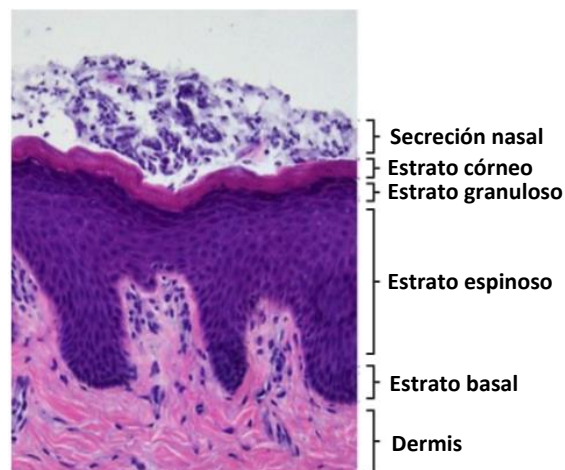


Figura 1. Corte histológico de la epidermis de un portador nasal de *S. aureus*. (Adaptado de Hanssen *et al.*, 2017)

Durante el desarrollo de la infección *S. aureus* cuenta con una gran variedad de mecanismos para evadir la respuesta inmune y producir la enfermedad gracias a que es capaz de expresar una gran variedad de factores de virulencia. Estos factores pueden ser compuestos estructurales o compuestos secretados por la bacteria.

1.2 Factores de virulencia

1.2.1 Factores de virulencia relacionados con la adherencia a la célula hospedadora

S. aureus cuenta con una gran cantidad de proteínas de superficie llamadas “componentes de superficie microbianos que reconocen moléculas de matriz adhesiva” (MSCRAMM), las cuales permiten la adhesión a los tejidos dañados del hospedador y a la superficie de las células huésped (Foster y Höök, 1998). Los MSCRAMMs pueden variar en función de la cepa y, por tanto, pueden favorecer al desarrollo de ciertos tipos de infecciones sobre otras, pero de manera general se unen a moléculas de colágeno, fibronectina, y fibrinógeno, además de otros compuestos relacionados con las heridas (Donlan y Costerton, 2002). Un ejemplo de esto es la proteína Cna, la cual muestra una gran afinidad por el colágeno y es fundamental para el desarrollo de la infección (Herman-Bausier *et al.*, 2016). La expresión de estas moléculas está regulada por un mecanismo de quorum-sensing que juega un papel clave en la virulencia, y ocurre especialmente en las primeras etapas para facilitar la colonización del hospedador (Yarwood y Schlievert, 2003).

1.2.2 Factores de virulencia relacionados la evasión de las defensas del huésped

La superficie celular de *S. aureus* cuenta con muchas moléculas reconocibles por anticuerpos, tales como los ácidos teicoicos, el peptidoglicano y numerosas proteínas de superficie. Por ello, para el desarrollo de la infección es fundamental la expresión de mecanismos que dificulten la fagocitosis.

- **Proteína A.** Se trata de una proteína presente en la pared celular de *S. aureus* que tiene la capacidad de reconocer moléculas de la matriz extracelular. Durante la infección, esta proteína interacciona con las moléculas de IgG presentes en la sangre provocando que se unan a la superficie del estafilococo con una orientación particular que impide que puedan ser reconocidas por el receptor de Fc de los neutrófilos (Deisenhofer, 1981). Esto se ha comprobado experimentalmente, con mutantes deficientes en proteína A, los cuales eran fagocitados con más facilidad por los neutrófilos y presentaban una menor virulencia en modelos animales (Palmqvist *et al.*, 2002).
- **Cápsula.** Se ha comprobado en ensayos *in vitro* de fagocitosis, que la presencia de esta cápsula dificulta que los neutrófilos pudieran captar a las bacterias. Además, aquellas cepas que expresan cápsulas del tipo 5 y 8, las cuales están presentes especialmente en entornos clínicos (Roghmann *et al.*, 2005), muestran una mayor virulencia en modelos animales (Luong y Lee, 2002).

- **TSST-1.** Se trata de una exotoxina que se libera durante el crecimiento celular la cual actúa como un superantígeno. Los superantígenos tienen la capacidad de unirse a la superficie del complejo MHC II presente en la superficie de las células presentadoras de antígenos sin necesidad de un procesamiento previo y provocar que interactúen con los receptores de los linfocitos T-helper (Llewellyn y Cohen, 2002; Bohach, 2014). A la afección causada por esta toxina se la conoce como síndrome del choque tóxico y se caracteriza por provocar fiebre elevada, erupciones cutáneas, vómitos y una respuesta inflamatoria muy elevada. En el 70% de los casos provoca la muerte (Madigan *et al.*, 2004).

1.2.3 Factores de virulencia relacionados con la penetración de los tejidos

- **Hemolisina α .** Durante el desarrollo de la infección *S. aureus* puede tener lugar la generación de toxinas citolíticas, las cuales se tratan de compuestos secretados por *S. aureus* que dañan las membranas. La toxina α se secreta en forma monómerica, pero posteriormente se ensambla formando un poro de barril beta en la membrana de los neutrófilos causando su lisis (Montoya y Gouaux, 2003). Esta es codificada por el gen *hla* y su efecto citotóxico se da sobre todo en células del sistema inmune (Menestrina *et al.*, 2001).
- **Hemolisina β .** Esta toxina es una esfingomielinasa, y actúa hidrolizando la esfingomielina presente en las membranas plasmáticas celulares en ceramida y fosfatidilcolina (Huseby *et al.*, 2007; Ira y Johnston, 2008). No se conoce con exactitud su mecanismo de actuación, pero experimentos llevados a cabo con esta actividad enzimática sobre bicapas lipídicas sintéticas, mostraron que provocaba la formación de dominios de colesterol, desestabilizando la estructura de la bicapa lipídica (Ira y Johnston, 2008).
- **Hemolisina γ .** Se trata de una leucotoxina bicomponente que actúa sobre leucocitos y eritrocitos. Estas toxinas están formadas por dos subunidades conocidas como proteínas S y F (Foster, 2005) y en función de cómo se combinen van a dar lugar a una variedad de toxinas con distintas propiedades necróticas que les dará o no la capacidad de actuar contra leucocitos y/o eritrocitos (Menestrina *et al.*, 2003).
 - **PVL (Panton-Valentine leukocidin).** Al igual que la hemolisina gamma es una leucotoxina bicomponente, pero mientras que la primera está presente en más del 90% de las cepas de *S. aureus* (codificada en los genes *hlq*), la PVL se encuentra en el 1-2% de las cepas (Peacock *et al.*, 2002; Prevost *et al.*, 1995). La combinación de los distintos monómeros de PVL forman una estructura de barril β octamérico en la membrana de los leucocitos, causando la lisis celular (Miles *et al.*, 2002).

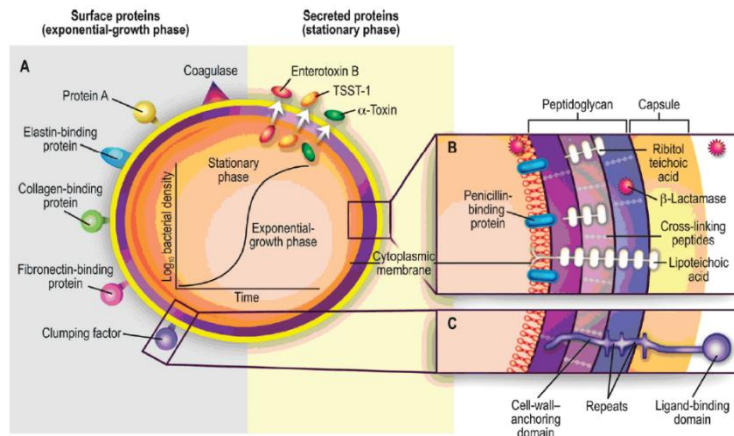


Figura 2. Factores de virulencia de *Staphylococcus aureus*. (Extraído de Gordon y Lowy, 2008)

1.3 Problemática de las resistencias a antibióticos

1.3.1 ¿Por qué surgen las resistencias?

La aparición de cepas que muestran resistencia a los antimicrobianos es un fenómeno natural relacionado con la evolución de las bacterias. Al igual que el resto de seres vivos, las bacterias sufren mutaciones espontáneas que eventualmente pueden provocar la aparición de nuevos rasgos que favorezcan su supervivencia. Estas mutaciones se transmiten a la descendencia durante la reproducción y/o mediante transferencia génica horizontal si se localizan en elementos genéticos móviles. Por otra parte, ante una gran presión selectiva, como puede ser el contacto con un antibiótico, el linaje de bacterias resistentes reemplazaría por selección natural a aquellas bacterias que carecieran de dicho rasgo. Un ejemplo de esto es la ampicilina, un antibiótico que se comercializó en 1961, pero en la actualidad es tolerada por muchas cepas de microorganismos. Casi el 100% de las infecciones nosocomiales de *Klebsiella* ocurren por cepas resistentes a la ampicilina (Laxminarayan *et al.*, 2013).

S. aureus es uno de los patógenos bacterianos más problemáticos en la actualidad ya que puede causar infecciones de piel, osteomielitis y neumonías, las cuales finalmente pueden desembocar en bacteremia y septicemia (Gillaspay y Iandolo, 2014).

A lo largo de seis décadas de utilización de antibióticos, las cepas de *S. aureus* han ido adquiriendo gradualmente determinantes de resistencia. Un ejemplo de este fenómeno ha ocurrido con la meticilina. Un antibiótico que se introdujo por primera vez entre 1959 y 1960 y, al cabo de un año, ya se detectaron cepas aisladas resistentes a la meticilina (Wu *et al.*, 1996). Los genes relacionados con la resistencia a la meticilina forman parte de un elemento genético móvil conocido como "cromosoma de casete estafilocócico mec" (SSCmec), que está situado en el cromosoma de *S. aureus*, y lo flanquean dianas de recombinasas que permiten su transmisión genética horizontal. Esta resistencia se basa principalmente en el gen *mecA*, el cual codifica para una proteína de unión a la penicilina que presenta una baja afinidad por los antibióticos β -lactámicos (Hartman y Tomasz, 1984).

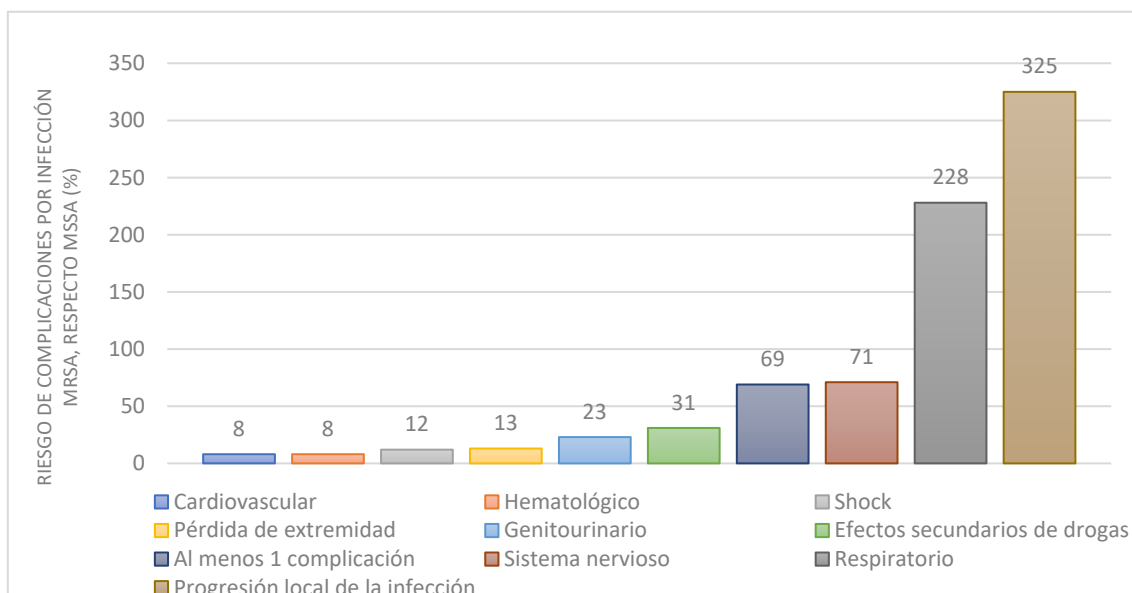


Figura 3. Riesgo adicional de desarrollar complicaciones por infecciones causadas por MRSA en comparación con una infección por MSSA (*S. aureus* susceptible a la meticilina). (Adaptado de Filicie *et al.*, 2010)

1.3.2 Clasificación de los MRSA

Las cepas de MRSA que causan infecciones en humanos se pueden clasificar según su origen en tres grandes grupos:

- **MRSA asociado a la atención médica (HA-MRSA).**

Se trata de cepas endémicas en los hospitales de todo el mundo las cuales son la principal causa de enfermedades nosocomiales. Las cepas HA-MRSA se han diseminado por todo el mundo a partir de 5 clones principales (ibérico, brasileño, húngaro, EEUU/Japón y pediátrico) que se caracterizan por una mayor virulencia gracias a su gran transmisibilidad y capacidad de colonización (Oliveira *et al.*, 2002).

Un ejemplo de esto es el clon brasileño, el cual pasó de representar el 38% de aislamientos de *S. aureus* en el Hospital Joao Barraos Barreto en 1995, al 79% en 1998 (Oliveira *et al.*, 2002). Se han realizado experimentos comparativos *in vitro* del clon brasileño (BECC) con otras cepas MSSA y MRSA y se ha observado que la capacidad para producir biopelículas es significativamente mayor. Estos estudios sugieren que la presencia de dominios de unión a fibronectina es un factor diferencial que le aporta a esta cepa una mayor capacidad de unión y persistencia (Amaral *et al.*, 2005).

- **MRSA asociado a la comunidad (CA-MRSA)**

Estas cepas están asociadas significativamente con infecciones cutáneas como la furunculosis, y la neumonía necrotizante adquirida en la comunidad (Vandenesch *et al.*, 2003). Por otra parte, se caracterizan por la presencia del factor de virulencia PVL (Vandenesch *et al.*, 2003) y en comparación con HA-MRSA son más susceptibles a antibióticos β -lactámicos (Zetola *et al.*, 2005), aunque algunas cepas como la USA300 se está volviendo cada vez más resistente (Diep *et al.*, 2006). Por otra parte, la colonización de estas cepas no es nasal, y la mayoría de los casos están relacionados con colonización genital o a partir de otros reservorios (Cook *et al.*, 2007).

No se conoce con certeza el origen de estas cepas, aunque se ha sugerido que es el resultado de la transferencia genética horizontal entre *Staphylococcus epidermidis* resistente y *Staphylococcus aureus* altamente virulenta (Said-Salim *et al.*, 2003). En la actualidad el número de infecciones por CA-MRSA está aumentando, estando algunas de sus cepas cada vez más presentes en el entorno hospitalario (Gonzalez *et al.*, 2006).

- **MRSA asociado al ganado (LA-MRSA)**

Abarca a aquellas cepas presentes en animales de granja y en los alimentos que derivan de ellos, como es el caso de cerdos, ganado vacuno y aves de corral. Tradicionalmente se ha considerado que la capacidad de las cepas de LA-MRSA de colonizar a humanos es mínima; sin embargo, informes recientes sugieren que estas cepas tienen una gran capacidad para evolucionar y adaptarse a distintos huéspedes y condiciones ambientales, ya que se han detectado cepas provenientes de aves de corral que sí pueden realizar el salto a humanos (Larsen *et al.*, 2016).

1.3.3 Tratamientos nuevos y en desarrollo

Ante el gran problema que supone el aumento de la resistencia a antimicrobianos en bacterias patógenas, la OMS y otros organismos internacionales como la FDA y EMA han diseñado un plan de acción que incluye el desarrollo de nuevos medicamentos y terapias:

1. **Nuevos antibióticos.**

- **Tetraciclinas.** Son compuestos producidos por múltiples especies de *Streptomyces*. Su estructura básica consta de un anillo de naftaceno el cual puede sufrir múltiples sustituciones (ya sea de forma natural o no) para dar lugar a una gran diversidad de análogos. Su mecanismo de acción consiste en inhibir la síntesis de proteínas interfiriendo/dificultando la función de la subunidad 30S del ribosoma bacteriano (Madigan *et al.*, 2004). Entre las nuevas tetraciclinas desarrolladas contra MRSA están la omadaciclina para infecciones de piel, y la eravaciclina para infecciones urinarias (Álvarez *et al.*, 2019).
- **Cefalosporinas.** Estos compuestos conservan el anillo β -lactámico y presentan un anillo de dihidrotiazina de seis carbonos, en lugar del anillo de tiazolidina de 5 carbonos característico de las penicilinas. Además, suelen ser más resistentes a las β -lactamasas que las penicilinas, por lo que tienen un espectro de actividad más amplio. Comparten el mismo mecanismo de acción con las penicilinas, de forma que se unen irreversiblemente a las PBP (transpeptidasas) impidiendo así la formación del peptidoglicano (Madigan *et al.*, 2004). Se han desarrollado nuevas cefalosporinas contra MRSA, como es el caso de la ceftarolina para infecciones de piel o la neumonía asociada a la comunidad, y el ceftobiprol, el cual también es efectivo contra la neumonía asociada a entornos clínicos (Álvarez *et al.*, 2019).

2. Compuestos para el tratamiento de infecciones persistentes

- **Compuestos contra SCV (Variantes de Colonias Pequeñas).** *S. aureus* tiene la capacidad de diferenciarse en SCV, las cuales tienen una gran capacidad de evadir las defensas del huésped, y posteriormente pueden recuperar su fenotipo salvaje más virulento, derivando en una infección recurrente (Gordon y Lowy, 2008). Se han identificado nuevos fármacos efectivos contra las SCV, como la daunorrubicina, ketoconazol, la rifapentina y sitafloxacina (Trombetta *et al.*, 2018).
- **Retinoides sintéticos.** Los retinoides CD437 y CD1530 se han desarrollado para el tratamiento de infecciones crónicas. Actúan degradando la bicapa lipídica bacteriana, provocando la muerte celular incluso de las cepas en estado persistente (Kim *et al.*, 2018).

3. Péptidos antimicrobianos.

Se han descubierto péptidos con potencial para el tratamiento de infecciones cutáneas causadas por MRSA. Un ejemplo de ello son los péptidos derivados de aureína (Kumar *et al.*, 2019).

4. Inmunización pasiva.

Mediante esta técnica se busca bloquear los determinantes de virulencia de *S. aureus* utilizando anticuerpos monoclonales específicos. Las estrategias actuales están dirigidas al bloque de la enterotoxina K y la toxina α (Diep *et al.*, 2017).

1.4 Fagoterapia

1.4.1 Antecedentes históricos

En la actualidad existe un interés creciente en el empleo de virus bacterianos para hacer frente a los patógenos multirresistentes, sin embargo, esto no es una novedad si no que la fagoterapia lleva existiendo desde hace un siglo.

Las primeras observaciones documentadas de la capacidad lítica de los fagos se remontan a 1896, a partir de las observaciones de Ernest Hankin en relación a las propiedades antimicrobianas del agua del río Ganges y Jumna. Hankin elaboró un informe sobre la capacidad de muestras no hervidas de dichas aguas para inhibir el crecimiento de *Vibrio cholerae* (Abedon *et al.*, 2011).

Sin embargo, el descubrimiento de los bacteriófagos se atribuye conjuntamente a dos microbiólogos, Twort y d'Herelle. En 1915 Frederick Twort descubrió por primera vez las calvas de lisis asociadas a la infección por fagos, pero fue d'Herelle en 1917 quien identificó la causa de dicho fenómeno y lo denominó "bacteriófago", que significa comedor de bacterias (Chanishvili, 2012). Además, d'Herelle fue el primero en proponer y llevar a cabo la idea del empleo de fagos con fines terapéuticos, y en 1919 se utilizaron exitosamente en el hospital Necker-Enfants-Malades, para tratar casos pediátricos de disentería bacteriana (Dublanquet y Fruciano, 2008).

Sin embargo, pese a estos primeros resultados tan prometedores, los siguientes años estuvieron llenos de controversia, tanto por la discusión de la auténtica naturaleza del bacteriófago (Bordet y Ciuca, 1920), como por la atribución de su autoría (Gratia, 1921).

En los años previos a la Segunda Guerra Mundial, la fagoterapia se extendió por el mundo. La publicación de un gran número de artículos y resultados relacionados con fagoterapia despertó el interés de grandes compañías farmacéuticas como Eli Lilly, Abbot (en EEUU) (Ruffat, 1996), y así comenzó la comercialización de preparados de fagos para tratar diversas enfermedades infecciosas bacterianas dérmicas, respiratorias o digestivas causadas por *Staphylococcus*, *Streptococcus*, y *Escherichia coli* (Sulakvelidze *et al.*, 2001).

Sin embargo, pese al optimismo inicial, el éxito de las terapias fue desigual, lo que incrementó la desconfianza por esta línea de tratamiento. Los principales errores cometidos fueron (Dublanche y Fruciano, 2008):

- Falta de comprensión de la naturaleza de los fagos. Ante la inconsistencia de los resultados, se incrementaron los debates, y algunos autores se inclinaron a favor de la teoría química, defendiendo que la naturaleza viral no estaba probada.
- Protocolos de producción, purificación y conservación rudimentarios. A causa de esto en muchos casos disminuía significativamente el número real de fagos activos.
- Elección inadecuada de los fagos específicos contra ciertos patógenos.
- Limitaciones de la época para la administración de fagos en el sitio de infección.

Debido a la falta de fiabilidad en los resultados y a la comercialización de antibióticos por parte de las farmacéuticas en la década de 1940, la fagoterapia cayó en el olvido en la medicina occidental. Sin embargo, la antigua Unión Soviética y otros países de Europa del Este, continuaron utilizando los fagos para el tratamiento de algunas infecciones (Carlton, 1999).

1.4.2 Fagoterapia vs Antibióticos

Tanto los antibióticos como los fagos funcionan como antibacterianos provocando la lisis o la inhibición del crecimiento de las bacterias. Sin embargo, muestran diferencias importantes que los convierten en más o menos apropiados según la situación.

1. Capacidad bactericida

Una bacteria infectada por un fago que desarrolle un ciclo lítico estricto será incapaz de recuperar su viabilidad, mientras que por otra parte aquellos antibióticos con actividad bacteriostática, únicamente detienen/frenan el crecimiento bacteriano (Stratton, 2003).

Por su parte, los antibióticos suelen clasificarse en bactericidas o bacteriostáticos en función de si provocan la muerte bacteriana, o únicamente inhiben su crecimiento de manera transitoria. Sin embargo, en la actualidad se ha comprobado que un mismo antibiótico puede actuar como bactericida o bacteriostático en función de su concentración en el medio y otros factores como la afinidad por su estructura diana (Martínez-Martínez, 2008).

2. Seguridad

Debido al uso generalizado de los antibióticos, existe mucha documentación sobre posibles reacciones adversas. Principalmente, se trata de reacciones alérgicas, problemas gastrointestinales o hematológicos, debidas al empleo de clases específicas de antibióticos, o a la administración de concentraciones elevadas de los mismos (Rouveix, 2003; Shehab *et al.*, 2008).

En el caso de los fagos, sin embargo, no se dispone de tanta información sobre su seguridad. Por una parte, existen autores que consideran que su empleo es seguro:

- En términos generales, se considera que su aplicación vía oral es segura (Bruttin y Brüssow, 2005; Merabishvili *et al.*, 2009).
- Los fagos tienen la capacidad de amplificarse *in situ* al infectar a sus bacterias diana. Esto permite que, en el caso de que la aplicación de una dosis alta de fagos no sea segura, se puedan diseñar preparaciones con dosis más bajas que se amplifiquen de manera local en la zona infectada (Kutter *et al.*, 2010).

Sin embargo, también hay estudios que sugieren que pueden causar problemas adicionales:

- Experimentos en ratones modelo sugieren la posibilidad de que el empleo de un cóctel de fagos comercial podría causar una situación de disfunción de la barrera intestinal, debido a la detección de complejos inmunes en sangre asociados a ciertas patologías. Estas alteraciones podrían afectar negativamente, causando trastornos relacionados con la barrera intestinal, como la enfermedad de Crohn y la diabetes tipo I (Tetz y Tetz, 2016).

3. Especificidad

Los antibióticos de amplio espectro pueden ocasionar daños sobre la microbiota intestinal habitual, los cuales pueden derivar en infecciones por parte de patógenos oportunistas como *Clostridium difficile* (Rea *et al.*, 2016), y/o aumentar el riesgo de padecer enfermedades como la obesidad (Cox y Blaser, 2015).

En el caso de los fagos, su gran diversidad los hace variables en lo que respecta al rango de hospedadores sobre el que actúan, el cual puede restringirse a nivel de especies, e incluso cepas, o pueden tener un rango más amplio, y así infectar a varios géneros bacterianos (Hyman y Abedon, 2010).

En la actualidad, aún no se conoce con certeza el daño que podría ocasionar la fagoterapia, sin embargo, sí se disponen de datos experimentales que reflejan una menor perturbación del microbioma intestinal. Un ejemplo de esto fue el ensayo realizado por Galtier *et al.* (2016) en el cual se evaluó el efecto de distintos fagos virulentos para lograr la disminución de la transmisión de *Escherichia coli* uropatógena en el intestino de un murino. Los resultados mostraron una disminución de los niveles de *E. coli* intestinales, y además el daño en la microbiota fue significativamente menor que el habitual al emplear antibióticos. Esto abre la posibilidad al empleo de bacteriófagos para tratar distintas afecciones relacionadas con la microbiota intestinal.

4. Comportamiento en situaciones de biofilm y crecimiento planctónico

Las terapias con antibióticos son muy eficientes contra bacterias de crecimiento planctónico, pero son más limitadas en aquellas infecciones cuyos mecanismos de patogénesis dependen de la formación de polímeros extracelulares, tales como biofilms. Para compensar esto, se requiere el empleo de dosis más concentradas de antibióticos que, por otra parte, pueden resultar tóxicas.

Por otra parte, múltiples grupos de fagos producen enzimas capaces de degradar los polímeros extracelulares que conforman el biofilm. Estas enzimas se denominan depolimerasas (DPS), y pueden encontrarse formando parte de la estructura de la cápsida o pueden ser liberadas al exterior durante la etapa de lisis celular. Las bacterias que se encuentran protegidas en el interior del biofilm suelen ser responsables de infecciones crónicas, pero la acción de las DPS permite a los fagos llegar a dicha región e infectarlas (Abedon, 2015).

1.4.3 Terapia con polífagos

Terapia con monofagos. En este caso, las preparaciones que se utilizan tienen una sola clase de fago. Un ejemplo de esto es el aditivo alimentario Listex™ P100, el cual emplea un tipo de fago capaz de actuar sobre un amplio rango de bacterias del género *Listeria* (Soni *et al.*, 2010). Este tipo de terapias, suele utilizar fagos que actúen sobre un amplio rango de hospedadores. Esto supone una serie de ventajas:

- Simplifica el proceso de producción y purificación del fago.
- Disminuye la probabilidad de que se produzcan interacciones inmunológicas negativas con los pacientes.

Aunque este tipo de terapia cuenta con resultados exitosos, éstos resultados son insuficientes (Skurnik y Strauch, 2006), y una de las estrategias para solucionarlo es el diseño de “cócteles de fagos” (Carlton, 1999).

Terapia con polífagos. Se utilizan preparados llamados “cócteles de fagos”, que contienen más de un tipo de fago. Con los polífagos se pretende, por una parte, aumentar el abanico de enfermedades que pueden tratarse, y por otro lado, prevenir la aparición de cepas bacterianas mutantes resistentes a los fagos en el paciente (Chan y Abedon, 2012).

En lo que respecta a los resultados obtenidos con este tipo de terapia existen algunos muy exitosos:

- En un experimento con murinos en una situación de bacteremia por *Klebsiella pneumoniae*, se aplicó un cóctel de fagos vía intraperitoneal, que incluía un representante de la familia *Myoviridae* y dos de *Siphoviridae*. Los animales se recuperaron completamente en las siguientes tres horas tras su aplicación (Gu *et al.*, 2012).
- Se aplicó un cóctel con 5 clases de fagos distintos de manera oral a un grupo de aves de corral que padecían una necrosis entérica causada por *Clostridium perfringens*, y los resultados reflejaron que la aplicación de los fagos redujo un 92% la mortalidad (Miller *et al.*, 2010).

También hay resultados más limitados en los que sólo se logra una leve reducción de carga bacteriana, como es el caso de Hooton *et al.* (2011), quienes aplicaron un coctel de fagos que incluía dos representantes de la familia *Myoviridae* y dos de *Podoviridae* para el tratamiento de *Salmonella enterica* en cerdos.

1.4.3 Diseño de preparaciones de fagos con fines terapéuticos

Una característica ideal para un antimicrobiano desde el punto de vista clínico y comercial, es que tenga la capacidad de eliminar a las bacterias patógenas diana sin alterar la microbiota habitual del paciente (Abedon y Thomas-Abedon, 2010).

En muchos casos el rango de acción de los fagos, a diferencia de los antibióticos, se limita a cepas específicas de una especie bacteriana. Sin embargo, es importante considerar que el empleo de fagos con un rango de actividad estrecho está subordinado a la realización de experimentos previos que permitan identificar a los patógenos diana y asegurar su susceptibilidad, lo cual supone costes adicionales (Yoshikawa, 2002).

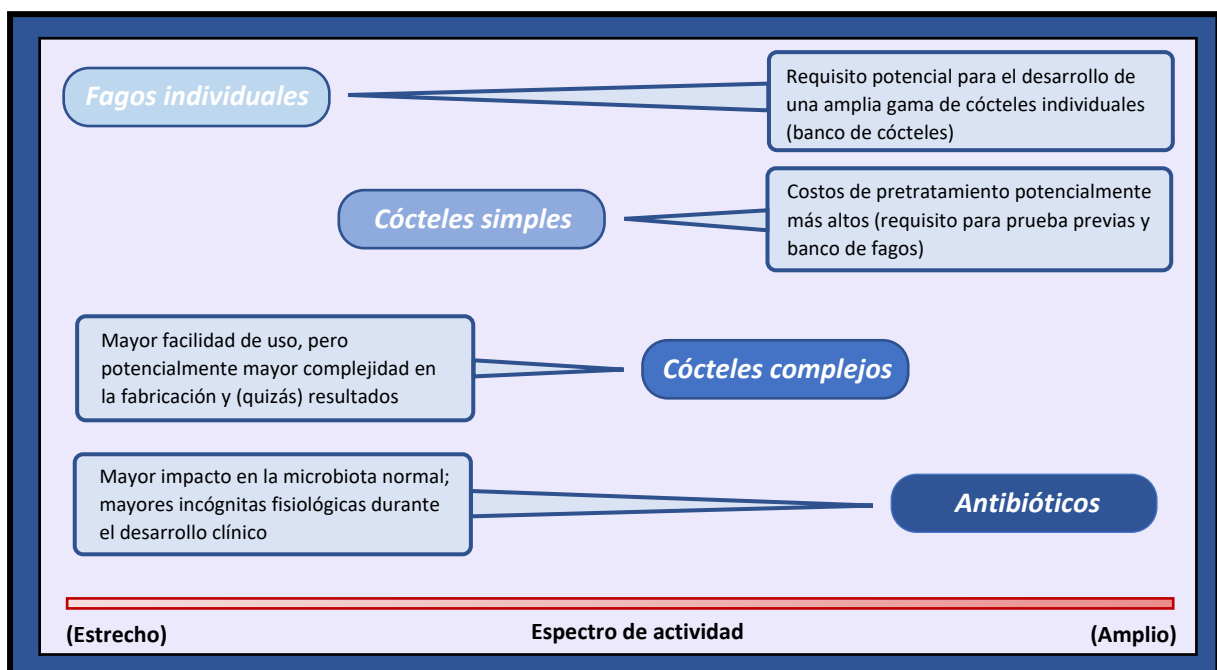


Figura 4. Esquema de ventajas y contras de la formulación de fagos (Adaptada de Chan *et al.*, 2013)

Por otra parte, una ventaja del diseño de cócteles de fagos es su mayor potencial presuntivo, es decir, permite su empleo directo sin necesidad de realizar un diagnóstico preciso de la etiología microbiana del patógeno. De esta manera cuanto mayor sea la variedad de fagos de la preparación, mayor será su aplicabilidad médica, y por tanto mayores las probabilidades de que despierte el interés comercial de manera sostenida en el tiempo (Chan *et al.*, 2013).

Sin embargo, el diseño de preparaciones con un número excesivo de fagos tiene sus inconvenientes:

- Mayor impacto en las bacterias no objetivo (aunque sigue siendo menor que el que generan los antibióticos comerciales habituales).
- Mayores costos para el desarrollo, la producción y la purificación de los fagos.

Un término medio entre una terapia con monofagos y el uso de cócteles de fagos complejos (Ejemplo: más de 50 fagos distintos) es el diseño de cocteles más simples (de 2 a 10 fagos), con un potencial intermedio (Chan *et al.*, 2013; Williams y LeJeune, 2012).

1.4.3.1 Enfoque occidental convencional

Se trata del enfoque tradicional que se aplica a la regulación de antimicrobianos y Consiste en el diseño de cócteles de fago de formulación fija. De manera ideal estas preparaciones tendrían la suficiente variedad de fagos para actuar significativamente contra posibles variaciones de las bacterias diana, y mantendría su efectividad a lo largo del tiempo. Este enfoque se ajusta mejor a los sistemas de regulación de medicamentos y a la práctica médica con antimicrobianos convencionales. El lado negativo es que no responde de forma adecuada ante la aparición de cepas resistentes (Verbeken *et al.*, 2012).

1.4.3.2 Banco de cócteles de fagos

Esta estrategia consiste en la formulación de múltiples cocteles de fagos para lidiar de forma simultánea con varias especies bacterianas o cepas resistentes emergentes. En este caso, se podrían iniciar los tratamientos con dichas preparaciones con un único coctel en función de la causa más probable de infección, y en caso de resultar ineficaz, se podría cambiar. Esta estrategia aporta una mayor flexibilidad ante la aparición de cepas resistentes y podría personalizarse para pacientes específicos, pero también supone un mayor gasto en costes de producción y distribución (Verbeken *et al.*, 2012).

1.4.3.3 Enfoque Georgiano

Esta estrategia se aleja de la complejidad que suponen la preparación de múltiples cócteles y de la medicina personalizada, y en su lugar propone la formulación de un único coctel de fagos, cuya formulación puede ser modificable en el tiempo (Pirnay *et al.*, 2011).

Un ejemplo de esto son los productos comerciales “Pyophage” para infecciones causadas por *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, y *S. aureus* (Pyofag®, s. f.), e “Intestiphage” para patógenos oportunistas intestinales como *Shigella flexneri*, *Enterococcus faecalis* y *Salmonella entérica* (Intestifag® Polyvalent Bacteriophage, s. f.). Si eventualmente la eficacia del coctel de fagos disminuye por la aparición de bacterias resistentes es posible adaptar la formulación de la preparación mediante varios mecanismos:

- Se pueden realizar producciones *in vitro* en las que la selección natural impulsará la aparición de nuevas cepas de fagos, que sí puedan infectar a las posibles cepas resistentes que se hayan desarrollado (Buckling y Rainey, 2002).
- Selección y adición de nuevos fagos procedentes de muestras ambientales, como aguas residuales, o directamente de muestras clínicas que contienen la bacteria problema.

2. Objetivos

En la actualidad existe un interés creciente por la búsqueda de alternativas a los antibióticos debido al incremento de patógenos multirresistentes a nivel mundial. Ante esta problemática organismos internacionales como la OMS han centrado sus esfuerzos en implementar un plan de acción para frenar esta tendencia, y entre las alternativas se encuentra la recuperación de la fagoterapia, una práctica que ha existido durante casi un siglo, la cual cayó en el olvido con la introducción de los antibióticos en la década de 1940.

En este contexto, el desarrollo de este trabajo se centró en la evaluación del efecto de dos cepas de bacteriófagos de la subfamilia *Twortvirinae*, los cuales son específicos de *Staphylococcus aureus*, sobre una colección de cepas de aislados nasales y dérmicos, perteneciente al cepario del grupo de investigación BIO-175, cuyos miembros habían sido identificados fenotípicamente como posibles *Staphylococcus* spp. Por tanto, el objetivo principal de este trabajo fue comprobar la capacidad infectiva de dichos fagos a nivel cualitativo y cuantitativo, a fin de evaluar su potencial en fagoterapia aplicada al control de *S. aureus* multirresistentes.

Dicho objetivo principal, se dividió en los siguientes objetivos específicos:

1. Comprobar el rango de acción de los fagos Twort y K sobre la colección de aislados de *Staphylococcus* spp.
2. Analizar la cinética de adsorción del fago K de *S. aureus* sobre la superficie celular de las cepas más susceptibles de la colección.
3. Cuantificar la capacidad infectiva del fago K de *S. aureus* mediante el estudio de la curva *one-step* de multiplicación en presencia de los aislados más susceptibles.

3. Materiales y Métodos

3.1 Colección de bacterias

La colección de cepas empleada para el desarrollo de este trabajo consistió en un grupo de aislados nasales y dérmicos, pertenecientes al cepario del grupo de investigación BIO-175. La colección constó de un total de 61 cepas, 28 de las cuales se aislaron de piel y las otras 33 de fosas nasales.

Para la recuperación de las cepas se realizó una resiembra de toda la colección en placas de Petri con el medio general APHA a partir de viales criogenizados a -80°C. Posteriormente, se realizó un aislamiento en estrías en APHA. Tras un periodo de incubación de 24 horas a 30 °C, a partir de dichos aislamientos se realizó una nueva siembra en tubos de agar APHA inclinado, los cuales se conservaron en cámara fría a 4 °C hasta el momento de su utilización.

Como hospedadores específicos de los fagos Twort y K, se utilizaron las cepas *Staphylococcus hyicus* DSMZ – 17421 y *Staphylococcus aureus* DSMZ – 104437, respectivamente. Ambas cepas procedieron de la colección alemana DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen), y fueron proporcionadas en formato liofilizado. Para su recuperación, se siguieron las recomendaciones proporcionadas por la DSMZ.

3.2 Bacteriófagos utilizados en el ensayo

La realización del trabajo se llevó a cabo utilizando dos bacteriófagos pertenecientes a la familia *Herelleviridae*, estafilofago *K* y estafilofago *Twort*, ambos específicos de *Staphylococcus aureus*.

La familia *Herelleviridae* se caracteriza por agrupar a virus de ADN bicatenario lineal, que desarrollan un ciclo lítico estricto e infectan a bacterias del filo *Firmicutes*. Además, ambos fagos pertenecen a la subfamilia *Twortvirinae*, la cual es específica de *Staphylococcus spp.* (**Tabla 1**). En lo que respecta a la estructura del virión presenta una cápsida icosaédrica isométrica de 85-100 nm de diámetro, formada por capsómeros dispuestos en pentones y hexones, y una cola larga y contráctil de 130 -185 nm.

Las muestras de los estafilofagos fueron proporcionadas por la colección alemana del instituto Leibniz DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen). El fago *K* fue suministrado como una suspensión líquida que contenía las partículas víricas, y el fago *Twort* se encontraba seco al vacío sobre un papel de filtro. Los códigos correspondientes a las cepas fágicas son:

Staphylococcus fago K – DSMZ-26857

Staphylococcus fago Twort - DSMZ-17442

CATEGORÍA TAXONÓMICA		
Reino	Duplodnaviria	Duplodnaviria
Filo	Uroviricota	Uroviricota
Orden	Caudovirales	Caudovirales
Familia	Herelleviridae	Herelleviridae
Subfamilia	Twortvirinae	Twortvirinae
Género	<i>Kayvirus</i>	<i>Twortvirus</i>
Especie	<i>Staphylococcus virus K</i>	<i>Staphylococcus virus Twort</i>

Tabla 1 - Clasificación taxonómica del fago *K* y el fago *Twort* extraída del ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses)

3.3 Diseño experimental

Para llevar a cabo los objetivos propuestos en este trabajo, se siguió el esquema de trabajo representado en la **Figura 5**.

En primera instancia se procedió a la recuperación de una colección de cepas procedentes de aislados nasales pertenecientes al grupo de investigación BIO-175. Además, a partir de las muestras de fagos procedentes de la Colección DSMZ se realizó la producción y purificación del fago, seguido de la titulación de la suspensión obtenida.

En una primera fase del trabajo, se realizó un ensayo cualitativo conocido como Prueba de la Gota de Adams, que tuvo como finalidad determinar el rango de acción de los bacteriófagos sobre la colección de partida (Objetivo Específico 1).

Los resultados cualitativos obtenidos en la Prueba de la Gota de Adams sirvieron para llevar a cabo una selección de las cepas más susceptibles que se utilizarían para la caracterización del fago y la cuantificación de su capacidad infectiva. Esto último se logró mediante el estudio de la cinética de adsorción y de la curva de multiplicación *one-step* (Objetivos específicos 2 y 3).

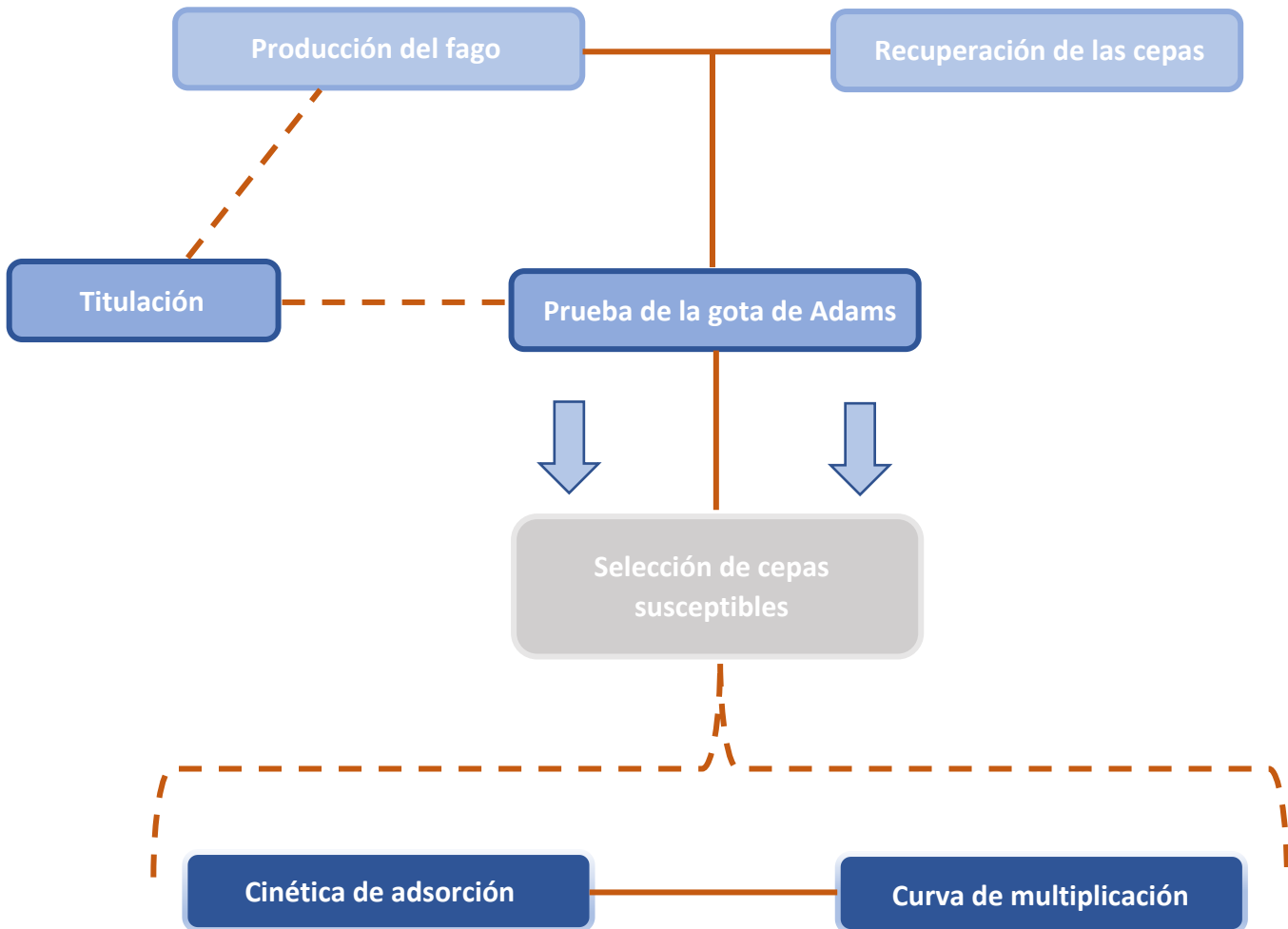


Figura 5. Esquema del diseño experimental

3.4 Medios de cultivo

A continuación, se describe el protocolo de preparación y los componentes de los medios de cultivo utilizados para el desarrollo de este trabajo.

- **APHA**

El medio de cultivo APHA se utilizó como medio general para el crecimiento de la colección de cepas bacterianas utilizadas en los ensayos. Sus componentes están indicados en la **Tabla 2**.

Componente	Concentración (g/L)
Extracto de Levadura	2,5
D(+)-Glucosa	1,0
Digerido enzimático de Caseína	5,0
Agar Bacteriológico	15,0

Tabla 2. Composición del medio general APHA

El procedimiento seguido para la preparación de este medio consistió en pesar 23,5 g del preparado comercial APHA (Panreac), y 5 g de Agar bacteriológico (Panreac) que se añadieron como refuerzo. Estos componentes se disolvieron en un matraz con 1 L de agua destilada. Finalmente, el medio fue esterilizado en autoclave a 1 atmósfera de presión durante 20 minutos y una vez se enfrió, se repartió en placas de Petri estériles.

- **Medio LB**

El medio de cultivo LB se utilizó como medio para el cultivo bacteriano tanto en placa como en medio líquido, así como para la preparación de tubos de LB Blando necesarios en los ensayos de titulación, cinética de adsorción y curva de multiplicación.

Componente	Concentración (g/L)
Triptona	10,0
Extracto de Levadura	5,0
Cloruro sódico (NaCl)	10,0
Agar bacteriológico (LB placas)	18,0
Agar Bacteriológico (LB Blando)	8,0

Tabla 3. Composición del medio

Preparación de placas

Para la preparación de este medio de cultivo se pesaron los distintos componentes mencionados en la **Tabla 3**, se incorporaron a un matraz y se diluyeron gradualmente en un 1 L de agua destilada. A continuación, el medio se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 20 minutos, y finalmente, tras el enfriamiento del medio, se repartió en placas de Petri estériles.

Preparación de LB blando

En este caso, la mezcla de los componentes y el agua se realizó en un vaso de precipitados. La mezcla se fundió en microondas para lograr la correcta solubilización del agar. Una vez fundido el medio se repartió en tubos de ensayo, a razón de 4 mL por tubo. Finalmente, estos tubos se esterilizaron vía autoclave, a 121°C durante 20 minutos.

3.5 Producción y purificación de los bacteriófagos

- **Producción**

A partir de los fagos de la colección DSMZ, se inocularon 15µL de una suspensión vírica sobre un cultivo en LB de la cepa hospedadora en fase logarítmica. A continuación, se dejó reposar durante 1 hora, y posteriormente se incubó a 37 °C en agitación durante 24 horas. Tras este periodo se deben observar signos de lisis (restos celulares al fondo del tubo).

- **Purificación**

Tras la fase de producción se repartió el contenido del tubo de ensayo en múltiples tubos eppendorf que contenían 0,3 mL de cloroformo, a razón de 1 mL por tubo. Tras la adición los eppendorf se agitaron para asegurar la lisis celular y se dejaron en reposo durante unos minutos. A continuación, se centrifugó a 5000 rpm durante 5-10 minutos, y una vez finalizada la centrifugación se extrajo el sobrenadante y se vertió en un tubo Falcon (15mL).

A continuación, se utilizó un filtro de 0,45 µm de tamaño de poro para la retención de las bacterias, de forma que el caudal de filtrado se recogiera en un nuevo tubo Falcon. Finalmente, para su conservación a largo plazo se añadieron 2-3 gotas de cloroformo y se mantuvo la suspensión en una cámara frigorífica a 4 °C.

3.6 Titulación del bacteriófago

La titulación permite determinar la concentración de viriones con capacidad infectiva de una suspensión vírica, lo cual en este caso se logró mediante la realización de un ensayo que cuantifica la producción de calvas.

De manera previa al ensayo se preparó un cultivo de la cepa hospedadora en caldo LB, y se dejó incubar a 37 °C en agitación hasta alcanzar la fase logarítmica de crecimiento. Una vez obtenido el cultivo, se prepararon tres tubos de LB blando a sobrefusión a 45°C. Los tubos inicialmente se encontraban en estado sólido y para su fusión se fundieron en autoclave. A continuación, se colocaron en un baño a 45 °C a sobrefusión y se inocularon con 0,1 mL de la suspensión bacteriana.

Por otra parte, partiendo de la suspensión vírica producida (apartado 3.5.), se realizaron diluciones centesimales desde 10^{-2} hasta 10^{-10} . En condiciones de esterilidad se transfirieron a cada tubo de LB previamente inoculado con la cepa hospedadora, 0,1 mL de las diluciones de fago 10^0 , 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} y 10^{-8} .

A continuación, la mezcla se agitó evitando la formación de espuma, y se vertió el contenido sobre una placa de Petri con medio LB. Las placas se dejaron en reposo hasta que el LB solidificó completamente, y se incubaron a 30 °C durante 24 horas.

En estas condiciones, como resultado del crecimiento de la bacteria se obtuvo un tapiz bacteriano en el que se distinguieron zonas claras llamadas calvas o placas de lisis, las cuales fueron el resultado de una infección vírica efectiva. A partir del recuento del número de calvas se pudo calcular el título o concentración vírica (expresado como unidades formadoras de calvas por mililitro).

Para obtener un título fiable, el recuento debe realizarse sobre la dilución que origine unas 100 – 300 calvas en la placa de Petri (Figura 7). Los resultados se expresaron en unidades formadoras de calvas por mililitro (C/mL) a partir de la siguiente fórmula, en la que “n” es el número de calvas de lisis de la suspensión, “v” es el volumen de suspensión inoculado en la placa, y “d” es la dilución utilizada:

$$\text{Título de la suspensión} = \frac{n}{v \cdot d} \text{ (C} \cdot \text{ml}^{-1}\text{)}$$

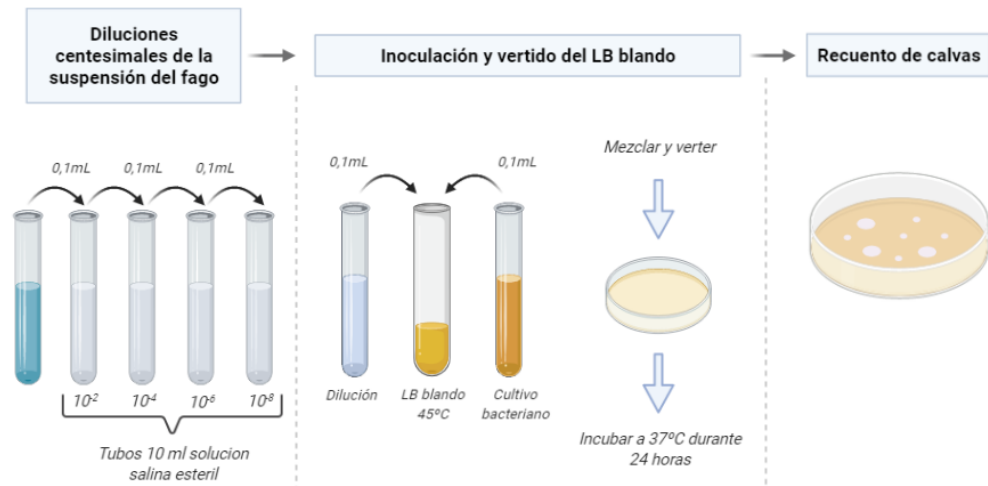


Figura 6. Protocolo de titulación de un bacteriófago

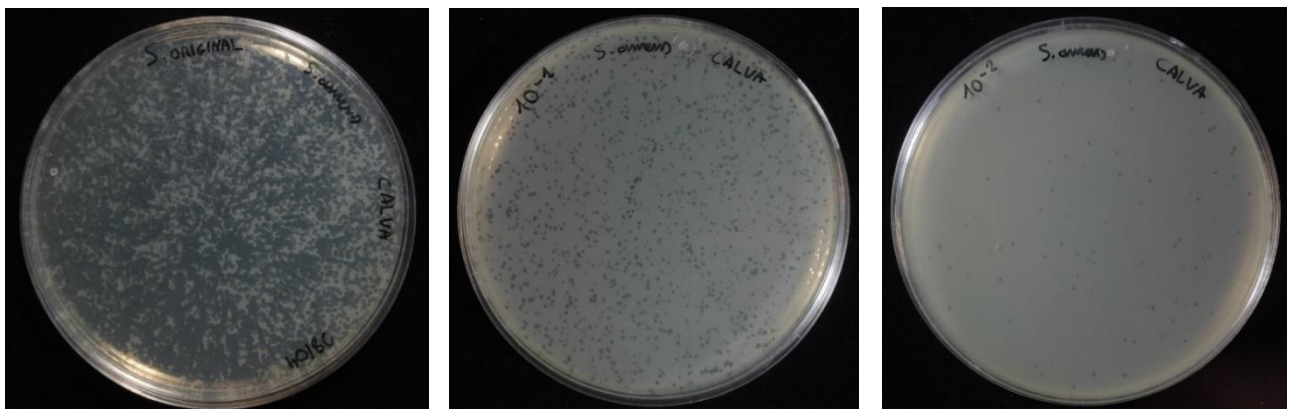


Figura 7. Titulación del fago K a partir de: (A) suspensión original, (B) Dilución 10^{-1} , (C) Dilución 10^{-2}

3.7 Prueba de la gota de Adams

Mediante la prueba de la gota de Adams se realizó un screening sobre toda las cepas de la colección para comprobar a nivel cualitativo el nivel de susceptibilidad frente a ambos fagos.

Para la realización de esta prueba, se preparó un cultivo de la cepa a testar en caldo LB, el cual se dejó incubar a 37 °C en agitación hasta alcanzar la fase logarítmica de crecimiento. Tras el periodo de incubación, se realizó una siembra por hisopo en placas LB y, a continuación, utilizando una micropipeta, se añade una gota de 15 μL de la suspensión del fago (Figura 8).

La placa se dejó reposar hasta que la gota se absorbió por completo y posteriormente se pasó a incubación a 37 °C durante 24 horas. A continuación, se realizó una primera lectura de las placas, considerando como resultados positivos aquellas placas en las que se observaron calvas individuales o un halo de aclaramiento en la zona en la que se depositó la gota. Finalmente, se añadió una nueva gota de 15 μ L de la suspensión del fago sobre el césped bacteriano de la placa y se dejó incubar nuevamente a 37°C durante 24 horas. Al día siguiente se realizó una segunda lectura para comprobar si en la zona en la que se colocó la segunda gota hubiera signos de lisis, lo cual se manifestaría por la aparición de un nuevo halo de aclaramiento.

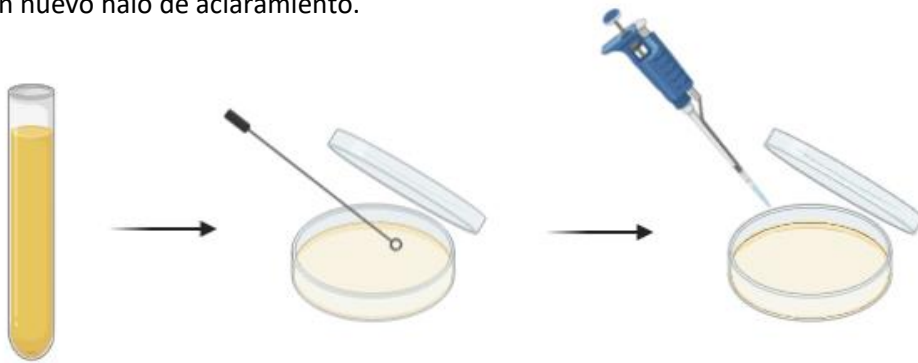


Figura 8. Procedimiento Prueba de la gota de Adams

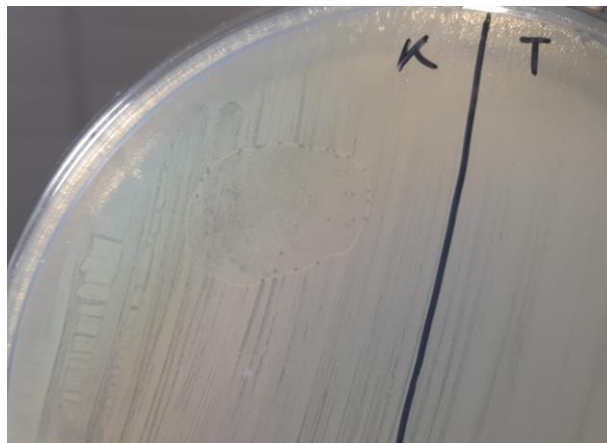


Figura 9. Aparición de calvas de lisis en la cepa 13-MSP-1

3.8 Cinética de adsorción

El ensayo para la determinación de la cinética de adsorción de un bacteriófago es una prueba que permite determinar la velocidad de adsorción de los fagos sobre las células bacterianas receptoras. La técnica se basa en la detección de la disminución del número de fagos libres, al estar en contacto en medio líquido con su bacteria receptora, en función del tiempo.

Para la realización adecuada del ensayo, previamente se realizó una siembra por estrías de la bacteria receptora en una placa de Petri con medio LB, y se dejó incubando a 37 °C durante toda la noche. Tras el periodo de incubación necesario para el crecimiento bacteriano, se preparó una suspensión de células a partir de la placa realizando una resuspensión de la biomasa en un tubo con 10 mL de solución salina estéril.

Para la determinación del número de células viables de la suspensión se realizaron diluciones centesimales de la misma y, posteriormente, se inocularon 0,1 mL de las diluciones 10^{-6} y 10^{-8} en placas con medio LB, realizando la siembra con perlas de vidrio estériles. Paralelamente, se prepararon tres tubos de LB blando a sobrefusión a 45 °C. Los tubos inicialmente se encontraban en estado sólido, por lo que se fundieron en autoclave a una sobrepresión de 1 atm, durante 15 minutos. A continuación, se colocaron en un baño de agua a 45 °C y se inocularon con 0,1 mL de la suspensión bacteriana.

El siguiente paso consistió en añadir al tubo de la suspensión bacteriana, 0,1 mL de una suspensión del fago cuya cinética se quería estudiar (El título recomendado de la suspensión de fagos debe de ser del orden de 10^7 calvas/mL). Este fue considerado el tiempo 0 ($t=0$) del experimento. Inmediatamente, tras la adición del fago, se tomaron 0,1 mL de la mezcla y se inocularon en uno de los tubos de LB blando a sobrefusión que anteriormente habían sido inoculados con 0,1 mL del hospedador bacteriano. Esta sería la medida a $t = 0$. Una vez pasados tres minutos ($t = 3$) se tomó 1 mL de la mezcla fago-bacteria y se transfirió a un tubo Eppendorf que contenía 0,2 mL de cloroformo. Para asegurar la muerte de las bacterias se agitó el tubo adecuadamente y se dejó reposar durante 1 minuto. A continuación, se realizó una etapa de centrifugación a 5000 rpm durante 5 minutos, a fin de separar los restos celulares de los fagos libres. Finalmente se tomó 0,1 mL del sobrenadante en el que teóricamente se encontrarían los fagos libres no adsorbidos y se añadió a uno de los tubos de LB blando a sobrefusión, previamente inoculados con el estafilococo receptor. El tubo se agitó vigorosamente, se vertió en una placa de Petri con medio LB y se dejó en reposo hasta su solidificación. Esta operación se repetiría también a los 10 minutos ($t = 10$).

Todas las placas se incubaron a 37 °C durante 24 horas, y tras el periodo de incubación se realizó un recuento del nº de calvas de lisis a los distintos tiempos, y un recuento del número de colonias viables. Los resultados se expresaron en nº de calvas por mililitro de muestra (C/mL) de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$P_f = P_0 e^{-k B t}$$

$P_f(t) = n^\circ$ de fagos libres

$P_0 = n^\circ$ inicial de fagos libres ($t = 0$)

$B = n^\circ$ de bacterias/mL

$t =$ tiempo (s)

$k =$ tasa de adsorción

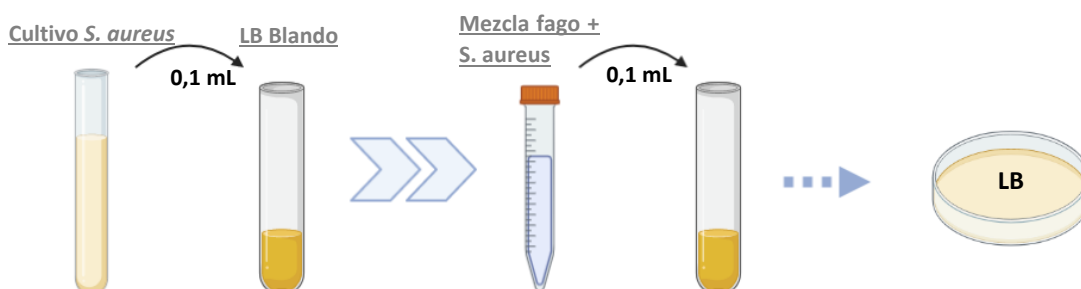


Figura 10. Esquema explicativo: Cinética de adsorción

3.9 Curva de multiplicación

Las etapas de la replicación vírica se ilustran en la curva de multiplicación conocida como “one step growth”. Este nombre es debido a que durante el transcurso de la replicación el número de viriones en el medio de cultivo no aumenta hasta que ocurre la lisis celular y la liberación de los viriones recién sintetizados. En el caso de los virus bacterianos este periodo tiene una duración de 20 – 60 minutos.

Para la realización de esta prueba, en primer lugar, se preparó un cultivo de la cepa en cuestión en caldo LB, y se dejó incubar a 37 °C en agitación, hasta alcanzar la fase logarítmica de crecimiento. Paralelamente se prepararon tres tubos de LB blando a sobrefusión a 45 °C. Los tubos inicialmente se encontraban en estado sólido y para su fusión se calentaron en autoclave tal y como se describe en apartados anteriores. A continuación, se colocaron en un baño a 45 °C y se inocularon con 0,1 mL de la suspensión bacteriana.

Para comenzar el ensayo, se transfirieron con micropipeta 0,9 mL del cultivo de la cepa en cuestión, a un tubo eppendorf estéril, y seguidamente se añadieron 0,1 mL de la suspensión del fago cuyo ciclo se quería estudiar. Se consideró el momento de la adición del fago sobre el cultivo bacteriano como el tiempo 0 del experimento. La mezcla se incubó durante 2 – 3 minutos a 37 °C para facilitar que se produjera la adsorción del fago a la célula, y posteriormente se centrifugó a 5000 rpm durante 5 minutos. Tras la centrifugación, se desechó el sobrenadante, se resuspendió el precipitado en 1 mL de caldo LB precalentado, y se incubó a 37 °C. Se realizaron mediciones periódicas a los 10, 20, 30, 40, 50 y 60 minutos desde el comienzo de la infección. Entre cada muestreo se mantuvo el tubo eppendorf en el que se inició la infección en una estufa a 37 °C. Para cuantificar la multiplicación viral en cada muestreo, se transfirieron 0,1 mL del tubo de incubación a uno de los tubos con agar LB previamente inoculado con la cepa que se pretendía estudiar, se mezcló vigorosamente, y se vertió sobre una placa de Petri con medio LB. Tras esto se dejó la placa reposar hasta que el medio se solidificó por completo, y a continuación se dejó en incubación a 37 °C durante toda la noche. Al día siguiente se realizó el recuento del número de calvas a los distintos tiempos. Los resultados se expresaron en nº de calvas por mililitro de muestra (C/mL) de acuerdo con la fórmula utilizada para el cálculo de la titulación:

$$\text{Unidades formadoras de calvas} = \frac{n}{v \cdot d} (C \cdot ml^{-1})$$

3.10 Análisis estadístico

Las medidas analíticas obtenidas en los ensayos de cinética de adsorción y curva de multiplicación se realizaron por triplicado para cada una de las cepas estudiadas. Para el tratamiento de los resultados, así como para la elaboración de las distintas gráficas se utilizó el programa Microsoft Office Excel 2010. Por otra parte, se utilizó el programa Statgraphics Centurion 18 y se realizó un Análisis Multifactorial de la Varianza (ANOVA) a un nivel de significancia $p < 0,05$, para observar la influencia de los distintos factores analizados, así como de la interacción entre los mismos, sobre los resultados de la cinética de absorción y de la curva de multiplicación. Además, se realizó un Test de Mínima Diferencia de Fisher a fin de comparar los datos y detectar la existencia de diferencias significativas entre los distintos niveles de cada factor.

4. Resultados y discusión

De acuerdo con los objetivos planteados en el presente TFG, y cumpliendo con el diseño experimental presentado en la **Figura 5**, a continuación, se realizará una exposición de los resultados obtenidos en las distintas etapas experimentales y, posteriormente, se llevará a cabo una discusión de los mismos.

4.1 Determinación del espectro de hospedadores: Prueba de la gota de Adams

Se realizó un *screening* de las cepas de la colección con objeto de seleccionar aquellas que se mostraran más susceptibles a una suspensión previamente preparada de los fagos K y Twort (Titulación: 10^3 C/mL). El ensayo, tal y como se describe en el apartado 3.7., se realizó en dos tiempos: en el momento de la siembra en masa de la bacteria (T=0 h) y sobre el césped bacteriano ya crecido (T=24 h).

Los resultados obtenidos en la prueba de la gota de Adams se muestran recopilados en la **Tabla 4** y permiten determinar el rango de acción de ambos fagos. Dichos resultados se interpretaron de manera cualitativa asignando valores numéricos, siendo: “0”, ausencia de calvas/halo de lisis; “1” presencia de calvas/halo de lisis, y “x”, ausencia de crecimiento.

Cepa	Fago K		Fago Twort		K + T	
	0h	24h	0h	24h	0h	24h
10-MSP-1	0	0	0	0	0	0
12-MSP-1	1	0	0	0	0	0
13-MSP-1	1	0	0	0	0	0
25-MSP-1	1	0	1	0	1	0
26-MSP-1	1	1	0	0	0	0
28-MSP-1	0	0	0	0	0	0
36-MSP-1	x	x	x	x	x	x
37-MSP-1	x	x	x	x	x	x
39-MSP-1	1	1	1	1	1	1
42-MSP-1	0	0	0	0	0	0
43-MSP-1	1	0	0	0	0	0
54-MSP-1	0	1	0	1	0	1
56-MSP-1	0	0	0	0	0	0
58-MSP-1	0	0	0	0	0	0
68-MSP-1	0	0	0	0	0	0
71-MSP-1	0	0	0	0	0	0
11-MSP-2	0	0	0	0	0	0
14-MSP-2	0	0	0	0	0	0
28-MSP-2	x	x	x	x	x	x
30-MSP-2	0	0	0	0	0	0
33-MSP-2	0	0	0	0	0	0
36-MSP-2	x	x	x	x	x	x
42-MSP-2	0	0	0	0	0	0

Cepa	Fago K		Fago Twort		K + T	
	0h	24h	0h	24h	0h	24h
44-MSP-2	x	x	x	x	x	x
55-MSP-2	0	0	0	0	0	0
61-MSP-2	1	0	1	0	1	0
62-MSP-2	1	1	0	1	0	1
63-MSP-2	0	0	0	0	0	0
4-MSN-1	1	0	1	0	1	0
7-MSN-1	0	0	0	0	0	0
9-MSN-1	0	0	1	0	0	0
10-MSN-1	0	0	0	0	0	0
11-MSN-1	0	0	0	0	0	0
13-MSN-1	1	1	1	0	1	0
14-MSN-1	0	0	0	0	0	0
16-MSN-1	0	0	0	0	0	0
17-MSN-1	1	0	1	0	1	0
18-MSN-1	1	0	0	0	0	0
21-MSN-1	0	0	0	0	0	0
24-MSN-1	0	0	0	0	0	0
30-MSN-1	0	1	0	1	0	1
35-MSN-1	0	0	0	0	0	0
41-MSN-1	0	0	0	0	0	0
44-MSN-1	x	x	x	x	x	x
45-MSN-1	0	0	0	0	0	0
46-MSN-1	0	1	0	1	0	1
49-MSN-1	0	0	0	0	0	0
51-MSN-1	1	0	1	1	1	0
60-MSN-1	x	x	x	x	x	x
62-MSN-1	1	0	1	0	1	0
66-MSN-1	0	0	0	0	0	0
68-MSN-1	0	0	0	0	0	0
8-MSN-2	0	0	0	0	0	0
9-MSN-2	0	0	0	0	0	0
18-MSN-2	0	0	0	0	0	0
28-MSN-2	1	1	1	1	1	1
32-MSN-2	0	0	1	0	0	0
60-MSN-2	1	0	1	0	1	0
70-MSN-2	1	0	1	0	1	0
71-MSN-2	0	0	0	0	0	0
62-MSN-3	1	0	1	0	1	0
Total	18	8	14	7	12	6

Tabla 4. Resultados obtenidos en la prueba de la gota de Adams. Expresados como "0": ausencia de calvas "1": presencia de calvas, y "x": ausencia de crecimiento.

Como se puede apreciar en la **Figura 11** los resultados del ensayo evidenciaron una mayor capacidad infectiva del fago K (30%) respecto al fago Twort (23%) sobre la colección de partida. Además, también se observan grandes discrepancias en los resultados obtenidos a tiempo 0 y 24h, lo cual es indicativo de que la eficacia del virus es mayor cuando virus y bacteria se ponen en contacto al inicio del protocolo (T=0 horas). En este punto, debido a la mayor efectividad del fago K y a las dificultades para obtener una titulación alta del fago Twort, se decidió seguir trabajando únicamente con el fago K.

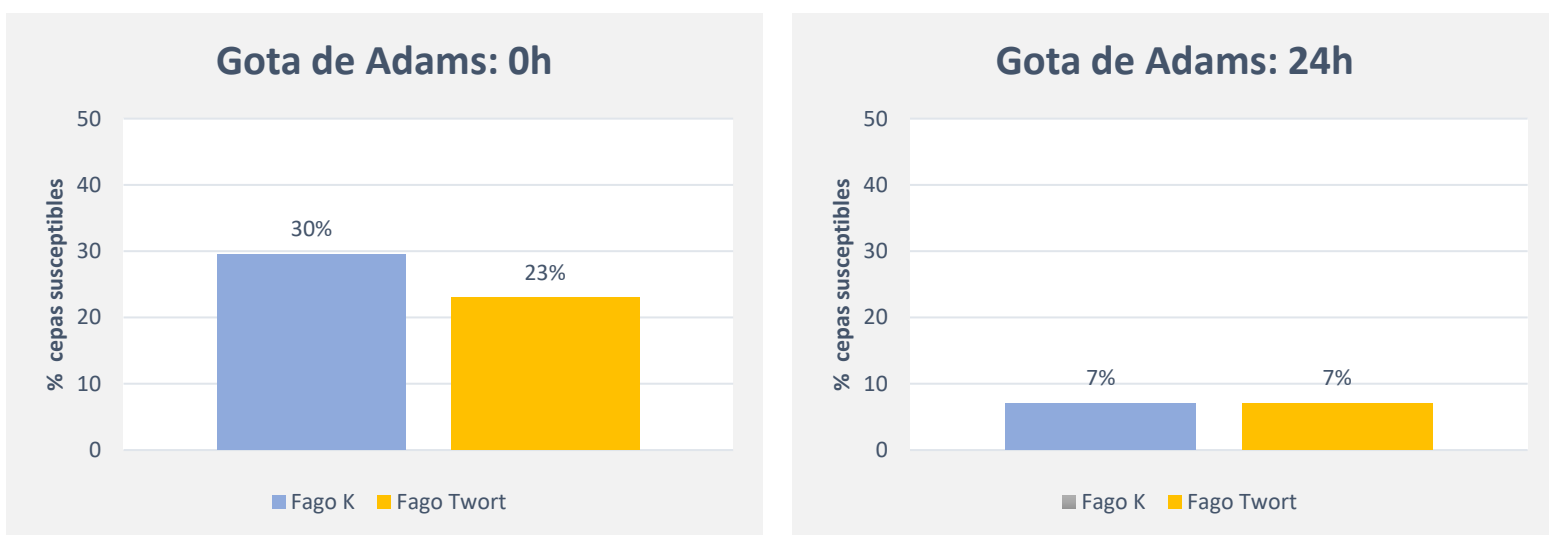


Figura 11. % de cepas susceptibles en la prueba de la gota de Adams a las **A:** 0h y **B:** 24h.

Por otra parte, a partir de los resultados positivos obtenidos en la **Tabla 4** se realizó una selección de 8 cepas para continuar con los ensayos de cinética de adsorción y curva de multiplicación, por ser estas las más susceptibles. El primer criterio aplicado fue el de mostrar susceptibilidad a ambos fagos, lo cual llevo a la selección de las cepas 13-MSN-1, 62-MSN-1, 62-MSN-3 y 62-MSP-2. Además, también se seleccionaron las cepas 12-MSN-1, 13-MSP-1 y 26-MSP-1, las cuales, pese a mostrar únicamente susceptibilidad al fago K, destacaban por la formación de calvas de mayor diámetro. Finalmente, se seleccionó también la cepa *Staphylococcus aureus* DSM-104437 como cepa control, ya que se considera el hospedador específico del fago K.

4.2 Cinética de adsorción

Los resultados obtenidos en el ensayo de cinética de adsorción del fago K, se encuentran recopilados en la **Figura 12**.

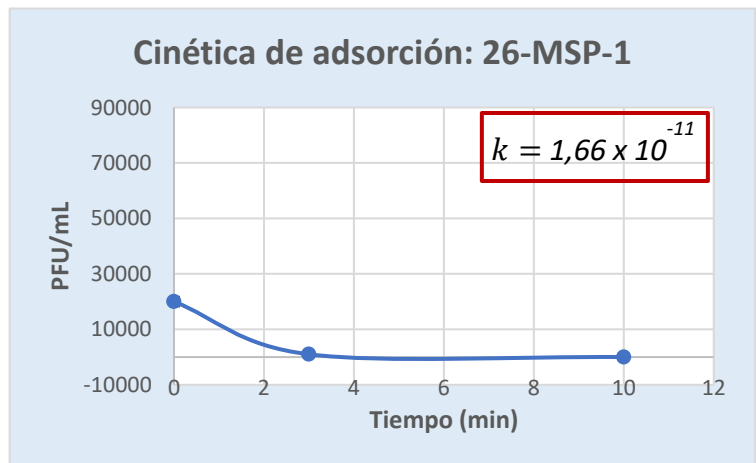
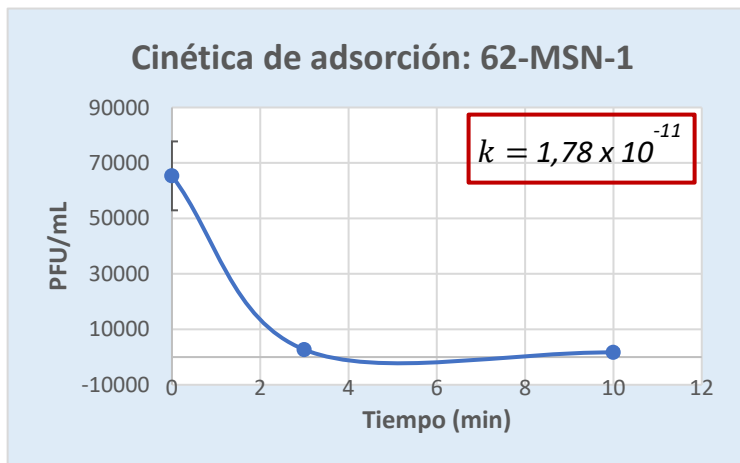
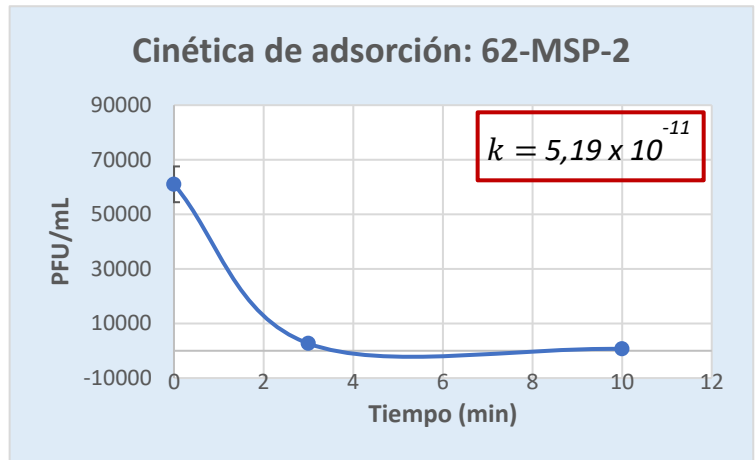
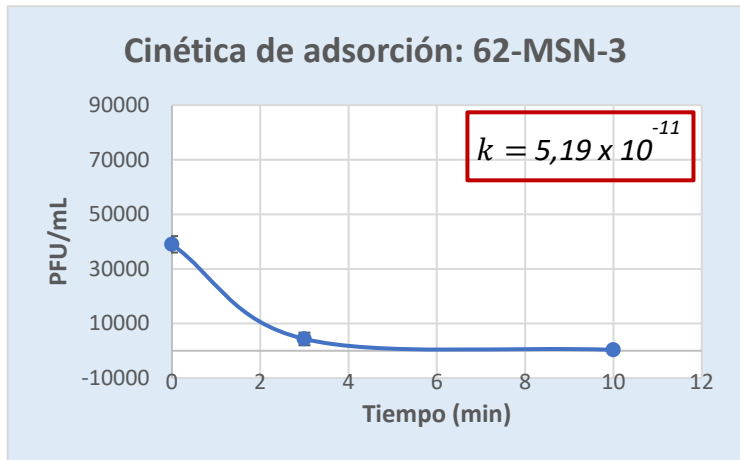
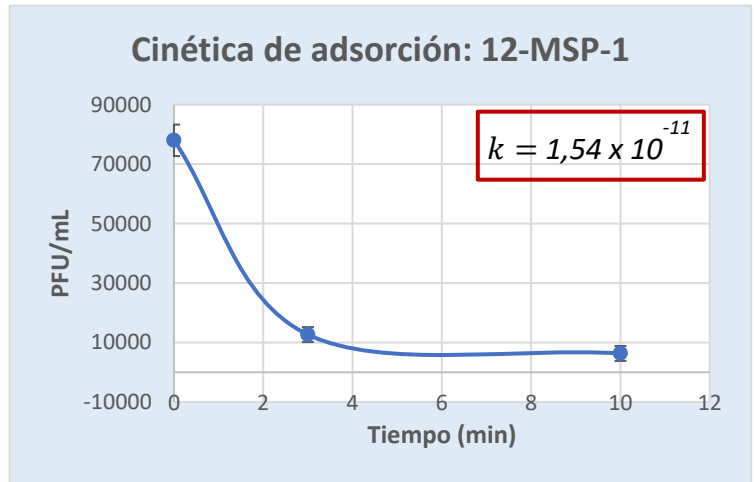
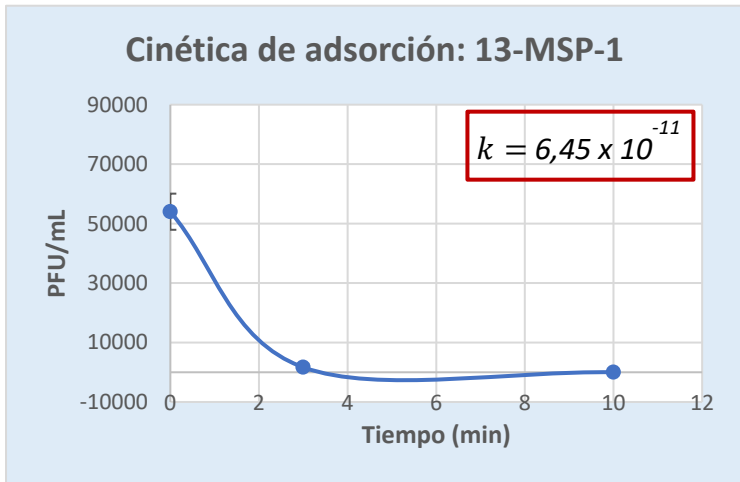
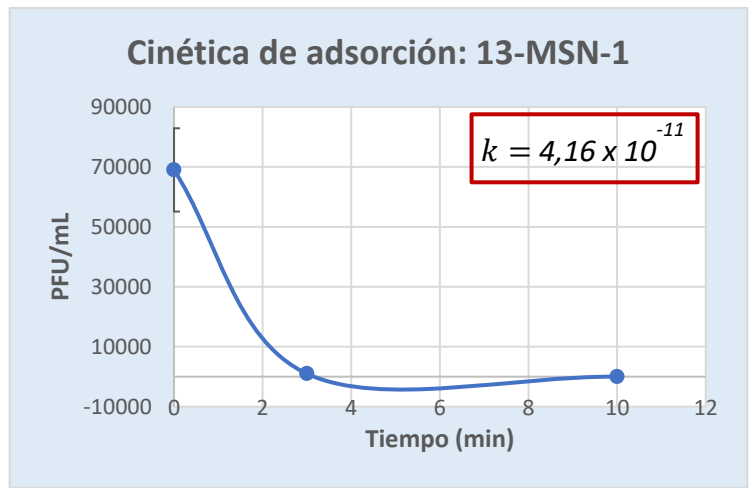
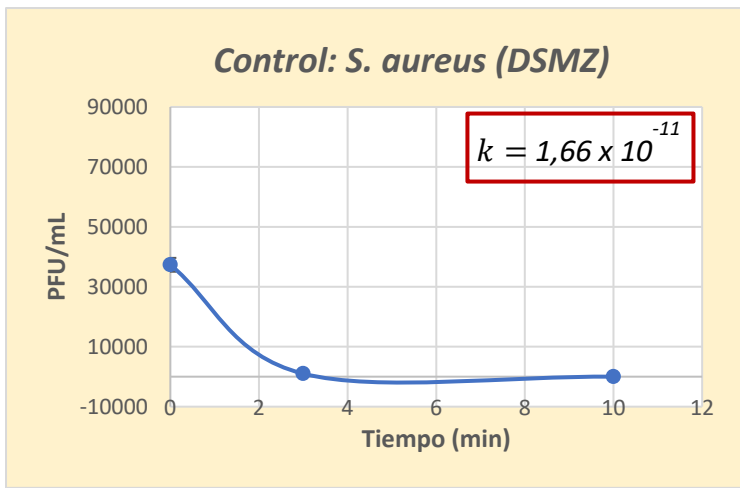


Figura 12. Cinética de adsorción del fago K. Titulación empleada: 10^5 C/mL

El proceso de unión del fago a la superficie del hospedador es complejo, y responde a múltiples factores como son la presencia de receptores específicos presentes en la membrana de la bacteria, y/o la acción de ciertas moléculas de naturaleza iónica que facilitan la adhesión. Sin embargo, para el tratamiento de estos datos se ha considerado que la adsorción del fago a la superficie bacteriana puede describirse como un proceso de índole estadístico que está representado en la ecuación indicada en la *sección 3.8*. La expresión indica que la variación del número de fagos libres (P_f) es una función exponencial del tiempo y es directamente proporcional a la concentración de bacterias receptoras del medio y a una constante de proporcionalidad denominada “k”, la cual es dependiente de las condiciones experimentales y de aspectos específicos de la interacción fago-bacteria. La constante “k” también es conocida como tasa de adsorción y es una medida cuantitativa de la capacidad de adhesión del fago a su hospedador de forma que las interacciones fago-bacteria que resulten en un mayor valor de “k”, indican un mayor ritmo de adhesión del fago lo cual es una característica de interés para posibles aplicaciones terapéuticas. El cálculo de “k” se ha realizado utilizando la ecuación indicada en la *sección 3.8*, en el intervalo 0 – 3 minutos, ya que a los 10 minutos las partículas ya se habían adherido prácticamente en su totalidad. La constante “k” se expresa en mL/ufc s.

En la **Figura 12** se puede observar que todas las cinéticas se adaptan a lo esperado según el modelo matemático planteado para describir el proceso de adhesión, de forma que tiene lugar una disminución exponencial del número de fagos libres en función del tiempo. Para todos los ensayos se partió de una suspensión de fagos con una titulación en torno a 10^5 C/mL. Sin embargo, en la **Figura 12** se ponen de manifiesto diferencias en el recuento a tiempo 0, en los ensayos con las distintas cepas seleccionadas. Una vez que se produce la adición del fago a la suspensión bacteriana (momento que determina el tiempo 0), existe un lapso de 10-15 segundos (intrínseco a la propia metodología) que transcurre antes de la toma de la muestra. Durante este breve periodo, pueden comenzar a producirse las primeras uniones fago-hospedador; las diferencias observadas pueden estar relacionadas con las diferentes afinidades del fago en relación a las cepas seleccionadas. Esta hipótesis se ve reforzada al observar la evolución de la curva a lo largo del tiempo, ya que a los 3 minutos prácticamente la totalidad de viriones se habían adsorbido a la superficie bacteriana, lo cual refleja que incluso un margen de unos pocos segundos puede ser significativo.

De las 8 cepas analizadas las 13-MSP-1, 62-MSP-2 y 62-MSN-3, mostraron los valores de “k” más elevados los cuales fueron 2-3 veces superiores a los obtenidos para la cepa control. Estos resultados fueron especialmente interesantes, ya que la capacidad de adsorción celular es una de las características que se tienen en cuenta para la selección de bacteriófagos con potencial aplicación en fagoterapia. Por el contrario, la cepa 12-MSP-1 presentó los menores valores de “k”, junto con la cepa control y la 26-MSP-1.

Posteriormente, gracias al tratamiento estadístico de los datos mediante un análisis ANOVA multifactorial, un nivel de confianza del 95% ($p < 0,05$), se pudo comprobar la influencia de los factores de variabilidad procedencia, cepa, tiempo y repetición, sobre el recuento de calvas por mililitro (C/mL). Los resultados mostraron la existencia de diferencias significativas respecto a los factores tiempo y

cepa, mientras los factores procedencia y repetición no influyeron significativamente sobre la variable analizada.

La influencia significativa observada respecto a la variable tiempo es coherente con lo esperado según el marco teórico de la técnica, ya que se observó una disminución del número de fagos libres de manera exponencial respecto al tiempo. Por otra parte, las diferencias respecto al factor cepa indican la existencia de variabilidad significativa respecto a la capacidad de adhesión del fago K dentro del conjunto de cepas analizadas, lo cual es de interés para determinar cuáles de ellas son más susceptibles a la entrada del fago.

A continuación, se analizó con mayor detalle la influencia de los factores cepa y tiempo mediante una prueba de múltiples rangos utilizando el test de mínima diferencia de Fischer (LSD) con un intervalo de confianza del 95% ($p < 0,05$) a fin de comparar las medias de los niveles de cada factor y detectar las diferencias significativas existentes. Los resultados de este análisis se pueden observar gráficamente en la **Figura 13**.

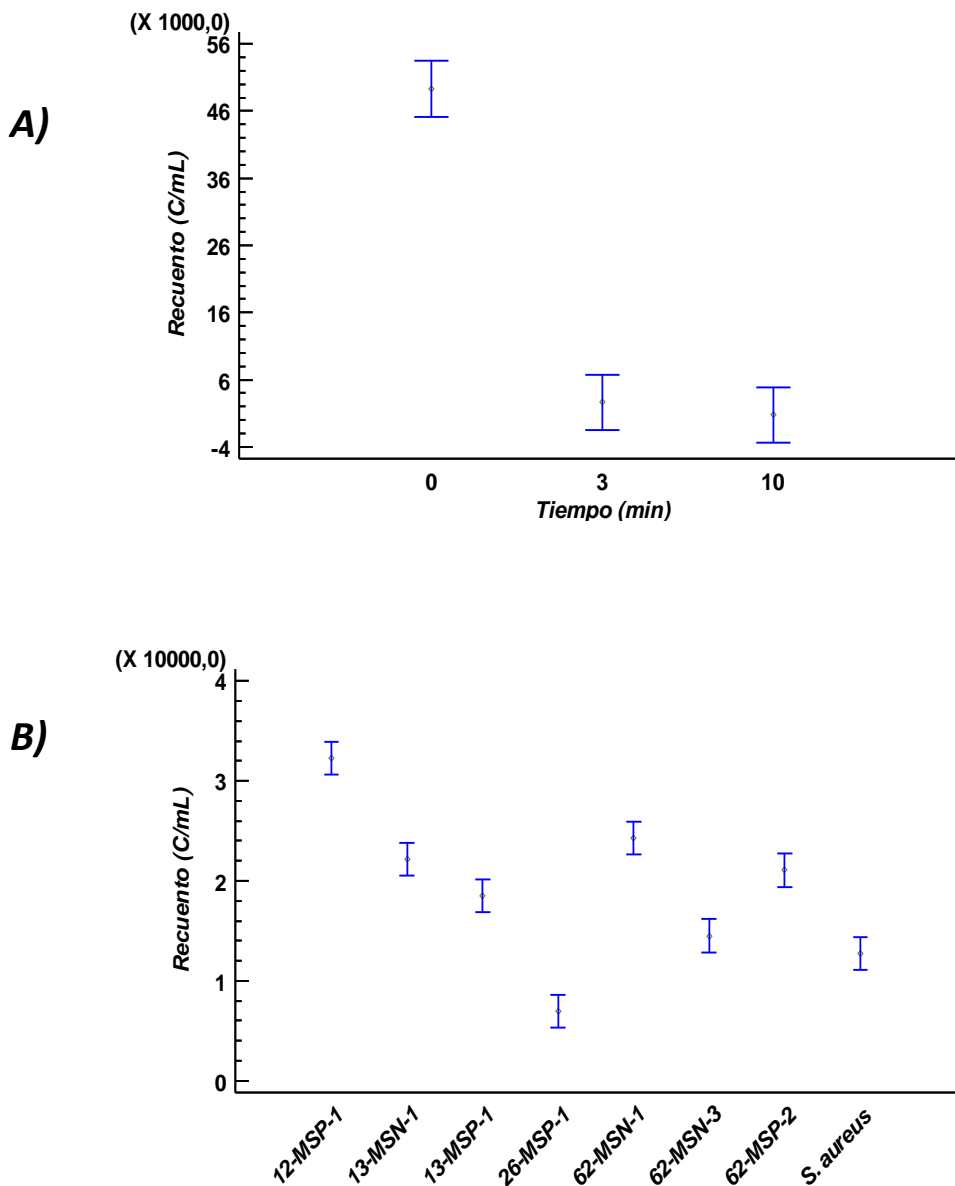


Figura 13. Test LSD de Fisher ($P < 0,05$). para las variables **A:** tiempo, y **B:** cepa

Los resultados del Recuento en función del Tiempo (**Figura 13 - A**) reflejan la existencia de dos grupos homogéneos. Uno correspondiente a tiempo 0, y otro correspondiente a los tiempos 3 y 10, los cuales no mostraron diferencias significativas entre sí. Estos resultados son indicativos de una gran capacidad general de adherencia del fago K sobre las cepas de la colección, ya que la mayoría de fagos libres se adhieren de manera previa antes de los 3 minutos, mientras que a partir de tiempo 3 se detectó un número muy bajo de partículas víricas libres.

Por otra parte, al realizar esta misma prueba con respecto al factor Cepa (**Figura 13 – B**) se observó la presencia de 5 grupos homogéneos que corresponde a (1): 26-MSP-1, (2): *S. aureus* y 62-MSN-3, (3): 13-MSP-1 y 62-MSP-2, (4): 13-MSN-1 y 62-MSN-1 y (5): 12-MSP-1. Las cepas pertenecientes al grupo (1) son las que mostraron un mayor ritmo de unión, sin embargo, esto no necesariamente implica que su capacidad de adhesión sea mayor, ya que para un análisis comparativo más completo que tenga en cuenta el número de células hospedadoras viables presentes en el medio al realizar el ensayo, se debería realizar la comparación a partir de la tasa de adsorción “k”.

Finalmente, se analizó la influencia de la interacción entre los factores tiempo y cepa (**Figura 14**). En esta gráfica se pone de manifiesto las diferencias a nivel de la cinética de adsorción en función de cada cepa, siendo el proceso más lento de adhesión aquel protagonizado por la combinación fago K-cepa 12-MSP-1.

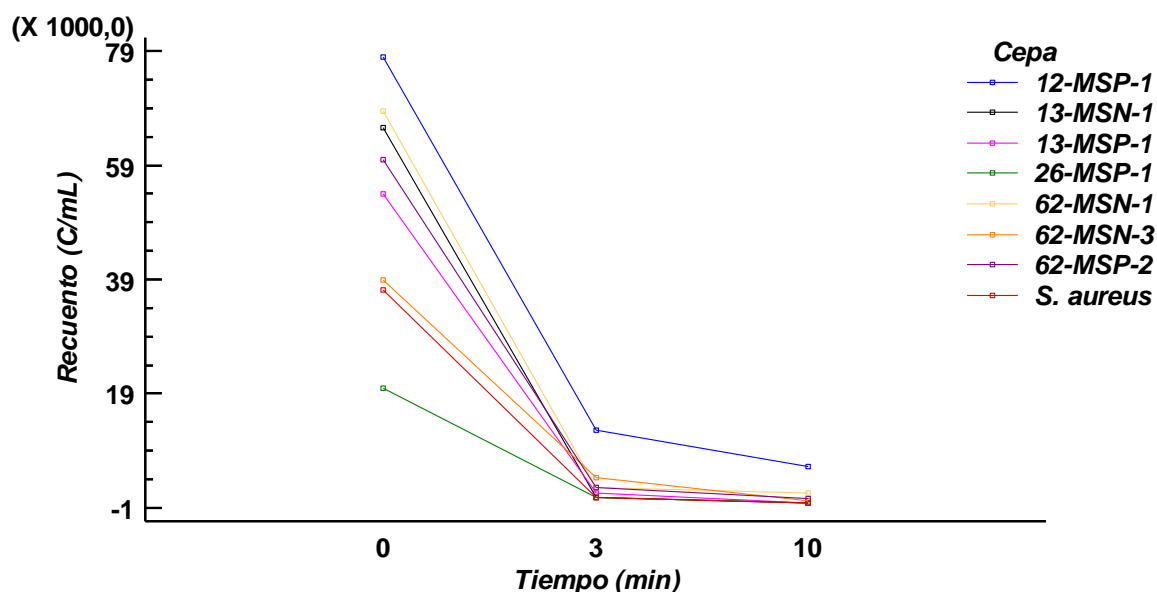


Figura 14. Gráfico de Interacciones para las variables Tiempo/Cepa en el estudio de la cinética de adsorción

4.3 Curva de multiplicación (*one step growth*)

Los resultados obtenidos en el ensayo de la curva *one-step* de multiplicación del fago K, están recopilados en la **Figura 15**.

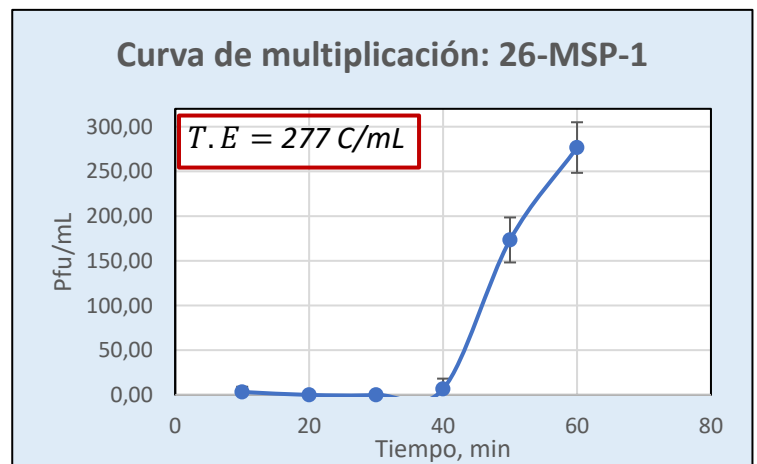
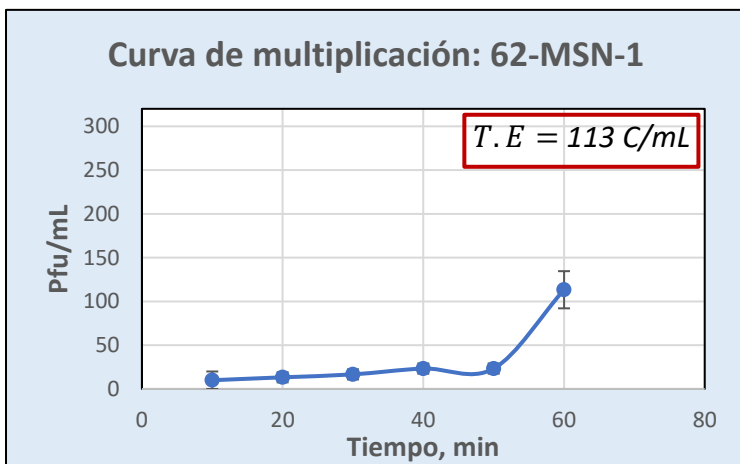
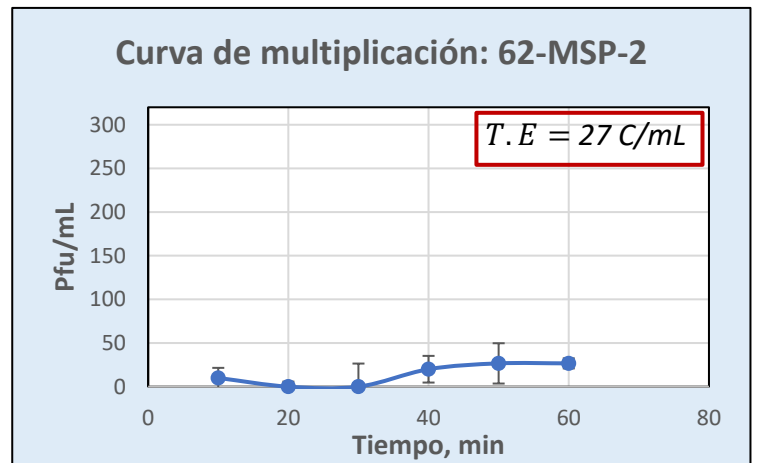
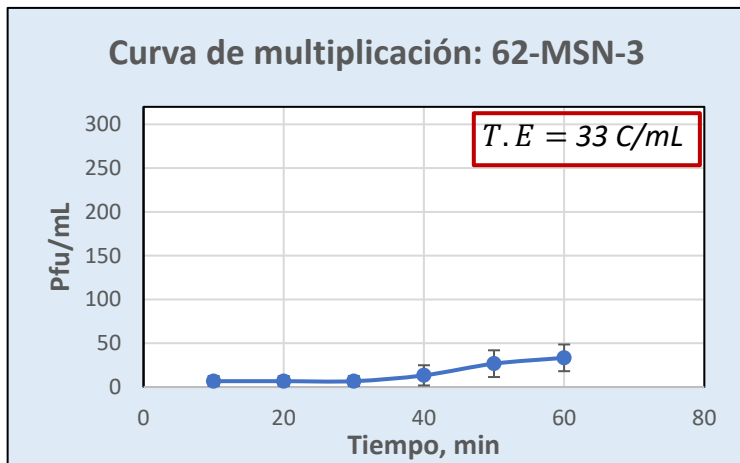
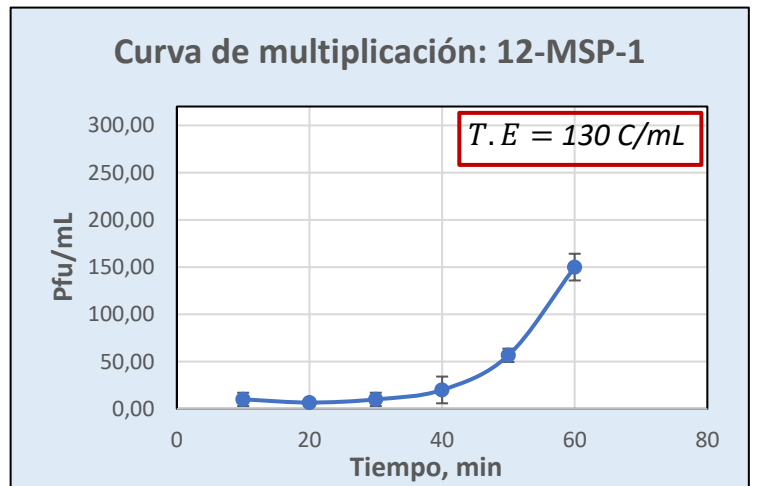
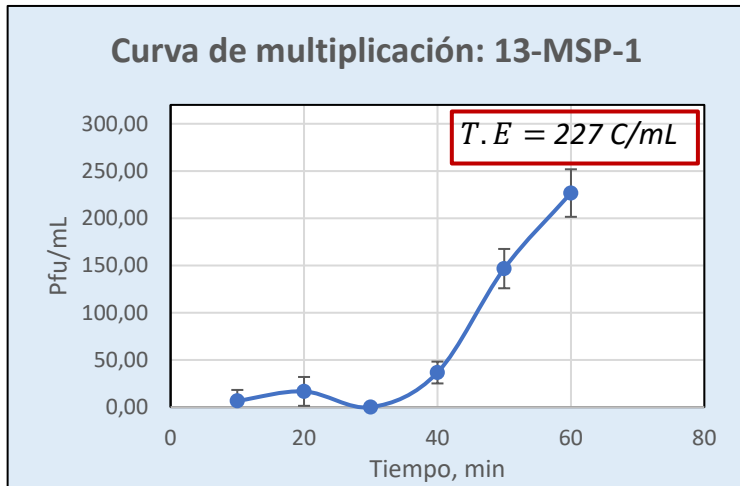
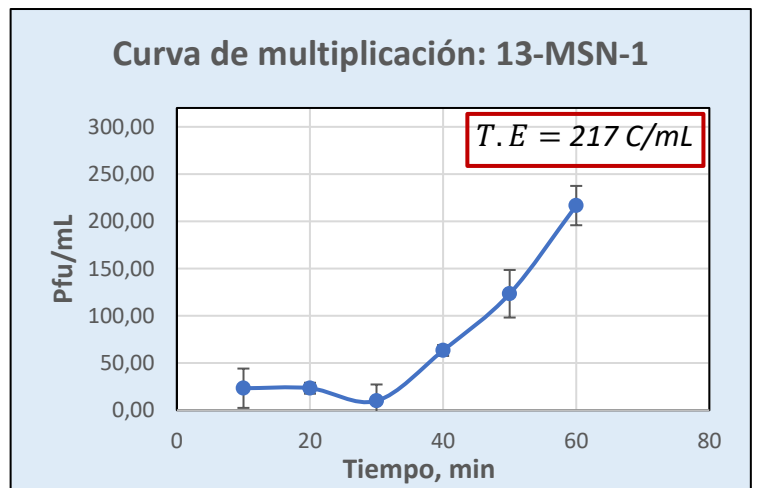
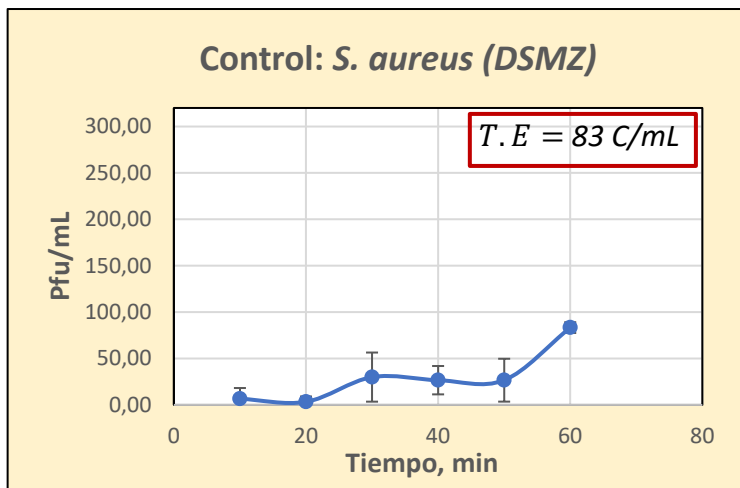


Figura 15. Curva de multiplicación del fago K, T.E: Tamaño de explosión

El desarrollo del ciclo de vida de un fago virulento como el empleado en este ensayo, se puede diferenciar en una serie de pasos secuenciales: (1) adsorción del virión a la célula hospedadora, (2) penetración del genoma vírico, (3) síntesis de ácidos nucleicos y proteínas víricas, (4) ensamblaje y empaquetamiento de las partículas víricas, y (5) lisis bacteriana y liberación de los viriones maduros (Madigan et al., 2014). A nivel experimental, esta curva permite obtener información relevante sobre la capacidad lítica del fago mediante la determinación del periodo de latencia, que corresponde al tiempo previo a la detección experimental del aumento de fagos libres con capacidad infectiva, y el tamaño de explosión, que cuantifica el nº de fagos liberados al final del ciclo lítico. En este contexto, un bacteriófago ideal para aplicación terapéutica tendrá un periodo de latencia bajo y un gran tamaño de explosión. En la **Figura 15** se puede observar que las gráficas obtenidas reproducen lo esperado según la bibliografía existente, de forma que se puede observar un periodo de latencia en el intervalo 10 – 30 min, mientras que a partir de los 30 – 40 minutos, comienza la lisis bacteriana y se observa un aumento del número de fagos libres. Debido a que las mediciones del experimento se han realizado en periodos de 10 minutos, no podemos determinar la duración del periodo de latencia de manera precisa, sin embargo, sí podemos apreciar que su valor se sitúa en el intervalo 30 – 40 min, según la cepa (Figura 18).

Por otra parte, a partir de los resultados obtenidos, se ha podido comprobar que la infección sobre las cepas 26-MSP-1, 13-MSP-1, 13-MSN-1 proporcionaron los mayores tamaños de explosión, los cuales tuvieron un valor de 277, 227 y 217 C/mL, respectivamente, lo que supone un valor 3 veces más altos que el observado en la cepa control. Por el contrario, las cepas 62-MSN-3 y 62-MSP-2 mostraron valores muy bajos de tamaño de explosión. Una posible causa podría ser el hecho de que el desarrollo del ciclo de multiplicación esté subordinado a interacciones específicas fago-hospedador, por tanto, en algunos casos el ciclo de vida puede requerir de un mayor tiempo de infección para completarse.

Otros estudios basados en el estafilofago vB_SauM-515A1 (Kornienko *et al.*, 2020), muy similar al fago K, mostraron en términos generales un mayor número de unidades formadoras de calvas por mililitro, sin embargo, estas diferencias son debidas al empleo de una suspensión de partida de mayor titulación y a la aplicación de otra metodología alternativa a la empleada en este trabajo.

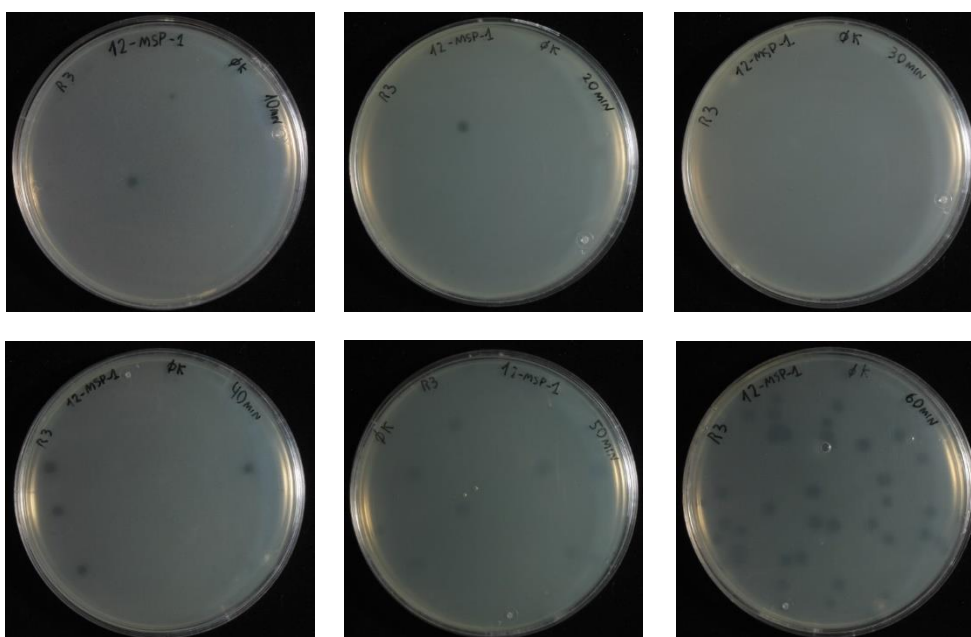


Figura 16. Recuento de C/mL en el ensayo para la determinación de la curva de multiplicación de la cepa 12-MSP-1 en medio LB

Para el tratamiento estadístico de los datos obtenidos en el ensayo de curva de multiplicación, se siguió una estructura similar a la aplicada en el ensayo de cinética de adsorción. En primer lugar, se realizó un análisis de la varianza (ANOVA multifactorial), a fin de estudiar la influencia de las variables explicativas: procedencia, cepa, tiempo y repetición, sobre la variable recuento de “unidades formadoras de calvas por mililitro” (C/mL), utilizando un nivel de confianza del 95% ($p < 0,05$). Los resultados indicaron la existencia de diferencias significativas respecto a las variables tiempo y cepa, mientras que no ocurrió así para las variables procedencia y repetición.

Las diferencias encontradas respecto a la variable tiempo son coherentes con lo esperado según el marco teórico de la técnica, ya que se observó un aumento del número de unidades formadoras de calvas en el medio a medida que transcurre la infección (Figura 16). Por otra parte, la influencia del factor cepa revela la existencia de variabilidad en los datos en función del conjunto de cepas analizadas, lo cual resulta de enorme interés para determinar qué cepas permiten una mayor amplificación del fago.

A continuación, se analizó con mayor detalle la influencia de los factores cepa y tiempo realizando un test de mínima diferencia de Fischer a un intervalo de confianza del 95% ($p < 0,05$). Dicho análisis se llevó a cabo a fin de comparar los niveles de cada factor y detectar las diferencias significativas existentes. Los resultados de este análisis se pueden observar en los gráficos de la **Figura 17**. Los resultados del recuento de calvas en función del *Tiempo* (**Figura 17 - A**) reflejan la existencia de cuatro grupos homogéneos correspondientes a (a): 10, 20 y 30 min, (b): 40 min, (c): 50 min, (d): 60 min. Estos resultados son indicativos de cómo una vez comienza la lisis bacteriana en el intervalo 30 – 40 min, ocurre un aumento significativo del número de fagos que se prolonga hasta al menos los 60 minutos. Por otra parte, al realizar esta misma prueba para evaluar el recuento en función de la Cepa (**Figura 17 - B**), se observó la presencia de 3 grupos homogéneos constituidos por (1): 26-MSP-1, 13-MSN-1 y 13-MSP-1, (2): *S. aureus* (DSMZ), 62-MSN-1 y 12-MSP-1, (3): 62-MSN-3 y 62-MSP-2. Las cepas pertenecientes al grupo (1) son las que despertaron mayor interés, ya que mostraron los mayores recuentos, así como el mayor tamaño de explosión a los 60 minutos. Por su parte, en el grupo (2), se encontraba la cepa control, mostrando valores de recuento intermedios. Finalmente, en el grupo (3), se observaron los resultados más bajos, coincidiendo con los menores tamaños de explosión.

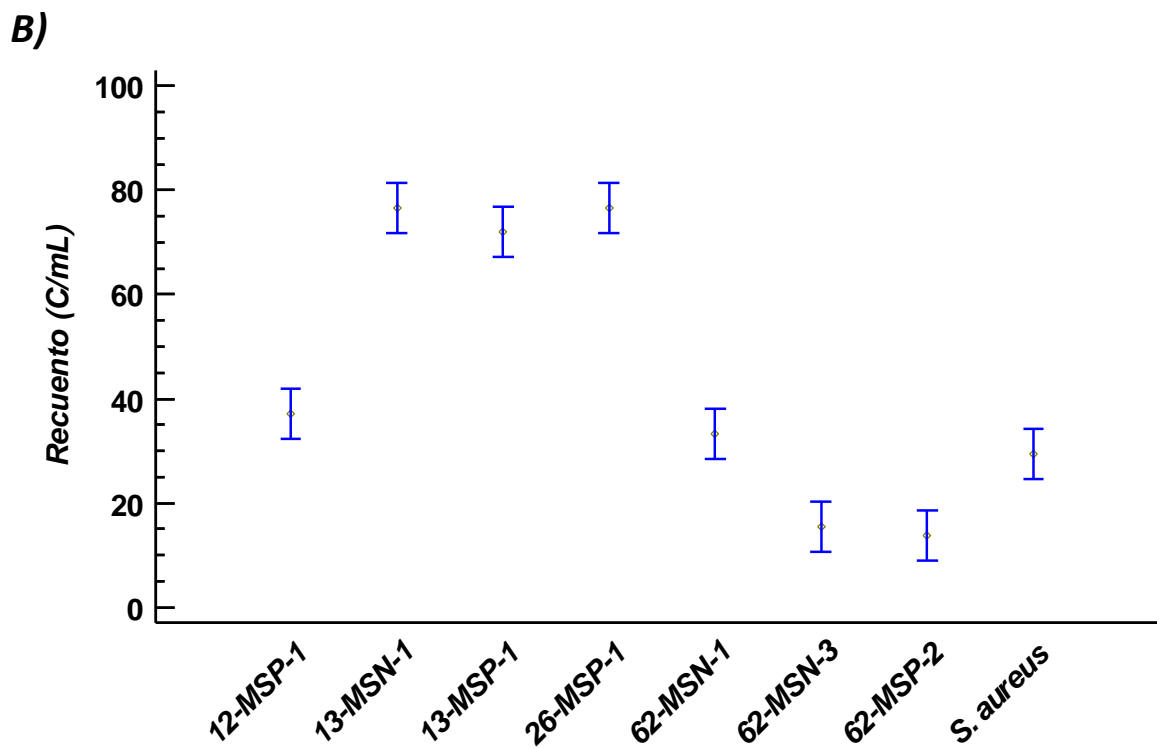
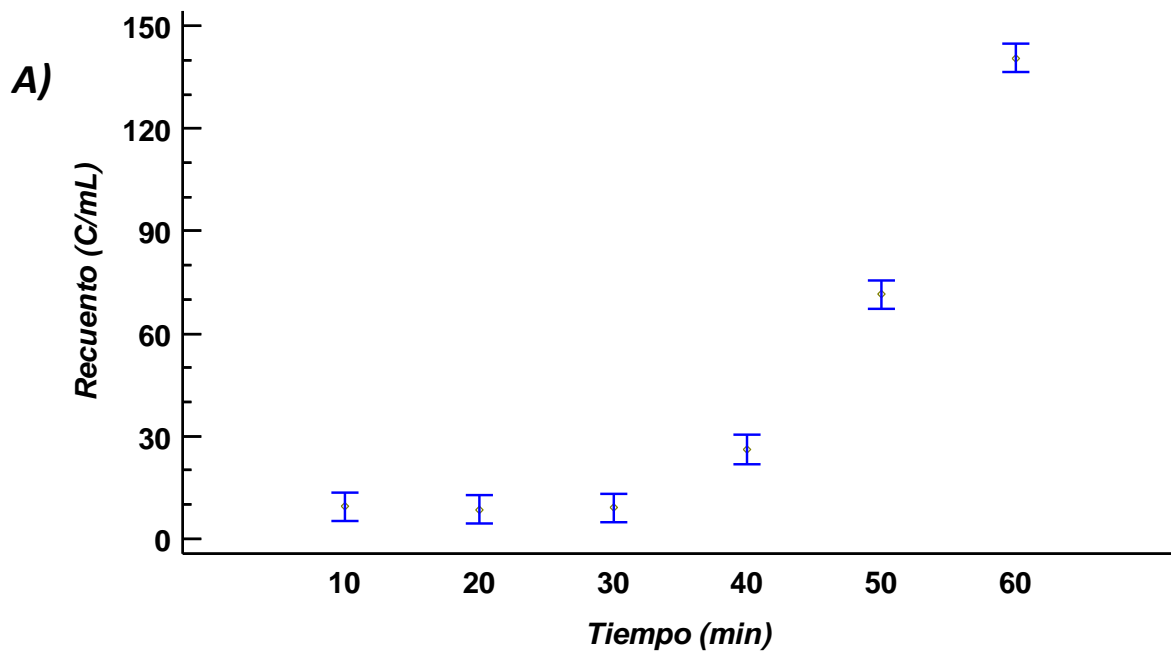


Figura 17. Test LSD de Fisher ($P < 0,05$). para las variables **A)**: tiempo, y **B)**: cepa

Finalmente, el análisis ANOVA confirmó la influencia significativa de la interacción Cepa/Tiempo (Figura 18), distinguiéndose los tres mismos grupos homogéneos indicados anteriormente.

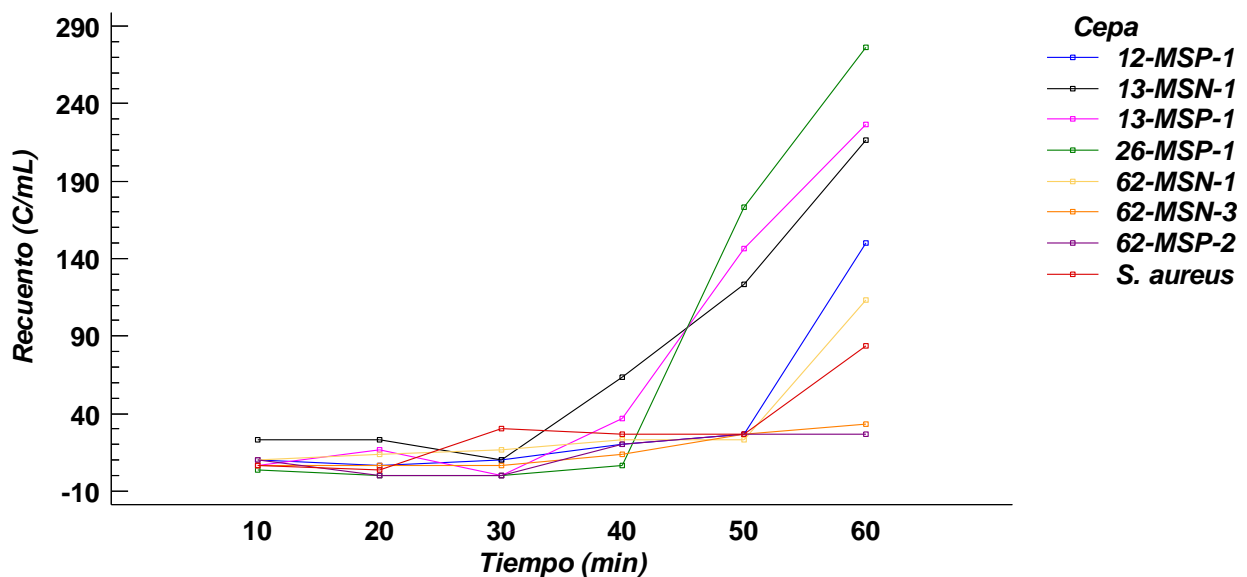


Figura 18. Gráfico de Interacciones para las variables Tiempo/Cepa en el estudio de la curva de multiplicación

Tanto la cinética de adsorción como el tamaño de explosión en la curva *one-step* son dos parámetros importantes para evaluar el potencial terapéutico de un fago. Comparando los resultados obtenidos en los ensayos de cinética de adsorción y curva de multiplicación para las distintas cepas, se comprobó que aquellas cepas con las que el virus mostró una mayor tasa de adhesión no eran necesariamente las que tenían un mayor tamaño de explosión. Por ejemplo, el estudio de cinética del fago K frente a la cepa 26-MSP-1, mostró valores bajos de “k”, aunque el tamaño de explosión registrado en la curva de *one-step* fue de 277 C/mL. Frente a esta cepa concreta, la adhesión del fago podría ser un factor limitante del proceso, mientras que una vez ingresado en la célula huésped, el resto de fases del ciclo viral transcurren de manera óptima, generando un buen tamaño de explosión, a pesar de su menor capacidad de adsorción. Una excepción a esto es el caso de la cepa 13-MSN-1, la cual destaca por presentar grandes una buena capacidad de adsorción, así como niveles de explosión viral destacables (Figuras 12 y 15).

Como se ha indicado anteriormente, entre las características ideales que debe de tener un fago para ser aplicado en fagoterapia se encuentran las siguientes: un gran tamaño de explosión, una gran capacidad de adhesión y un periodo de latencia corto. Los resultados de este trabajo han reflejado la gran capacidad lítica del fago K contra determinadas cepas de la colección como la 13-MSN-1 y la 26-MSP-1, sin embargo, no se puede afirmar que su rango de acción sea suficiente para ser aplicado por si solo en fagoterapia.

Las terapias con monofagos son útiles durante el desarrollo de modelos experimentales, o a nivel clínico si se realizan experimentos previos que aseguren su eficacia. Sin embargo, en general su potencial presuntivo es muy bajo (Skurnik y Strauch, 2006). Por tanto, a fin de desarrollar una alternativa real contra las enfermedades causadas por cepas de *S. aureus* sería necesario aumentar su rango de acción, lo cual se puede lograr mediante el diseño de formulaciones que contengan otros fagos además del fago K (Chan y Abedon, 2012). Además, en lo que respecta al origen de estos nuevos bacteriófagos es conveniente que se aislen de los mismos hábitats en los que se pretenden emplear. Por ejemplo, en el caso de fagos contra cepas MRSA, el aislamiento puede realizarse a partir de aguas residuales de granjas, o a partir de muestras de la propia persona infectada (Abedon *et al.*, 2017).

Por otra parte, la coevolución entre fagos y bacterias puede llevar a la aparición de resistencias en relativamente poco tiempo (Buckling y Rainey, 2002). En este sentido, según lo indicado por Kutter *et al.* (2010) es de vital importancia desarrollar un marco regulatorio específico que se aleje del empleado tradicionalmente para otros agentes antimicrobianos, y permita la actualización periódica de los cócteles de fagos. Este enfoque permitiría enfrentarse mejor a la generación de nuevas resistencias. Además, un marco más desregularizado despertaría el interés empresarial por la fagoterapia.

Finalmente, una vez analizados los resultados obtenidos en este trabajo, y según las recomendaciones de Abedon *et al.* (2017), se proponen las siguientes líneas de actuación:

1. **Caracterización de un mayor rango de hospedadores.** Es necesario evaluar el rango de acción del fago K sobre las cepas patógenas habituales de la región, y sobre variantes resistentes a antibióticos.
2. **Caracterización *in vitro*.** Además de analizar la cinética de adsorción del fago, y el tamaño de la explosión viral, deben evaluarse otros aspectos del fago k, como la resistencia a la acidez y temperatura, la capacidad de degradar biopelículas, y el efecto que puede ejercer sobre células eucariotas *in vitro*.
3. **Caracterización *in vivo*.** Consiste en evaluar el efecto del bacteriófago en tejidos animales. Este tipo de experimentos permiten evaluar las interacciones existentes entre las partículas víricas y el sistema inmunológico, y determinar posibles efectos citotóxicos causados por compuestos del hospedador liberados tras la lisis celular.

5. Conclusiones

Finalmente, a partir de los resultados obtenidos, se obtuvieron las siguientes conclusiones:

1. La fagoterapia se posiciona actualmente como una alternativa viable para el tratamiento de cepas multirresistentes de *Staphylococcus aureus*.
2. Los estafilofagos K y Twort han mostrado resultados muy prometedores frente al crecimiento *in vitro* de algunas de las cepas ensayadas en este trabajo. De hecho, en torno a un 12% de las mismas se pudieron considerar susceptibles a la acción de ambos.
3. Una tasa de adsorción óptima, así como un tamaño de explosión viral elevado a nivel intracelular, son aspectos clave a la hora de decidir la idoneidad de un fago para ser utilizado en terapia viral aplicada al control de multirresistencias.
4. La especificidad de las interacciones fago-hospedador es la principal responsable de las diferencias observadas respecto a la capacidad de acción del fago k en los ensayos de caracterización realizados. Este hecho justifica la necesidad de estudiar preparaciones con polífagos, que aseguren un rango de acción más amplio.

6. Bibliografía

- Abedon, S. T., (2015). Ecology of anti-biofilm agents I: Antibiotics versus bacteriophages. *Pharmaceutical (Basel, Switzerland)*, 8(3), 525–558.
- Abedon, S. T., García, P., Mullany, P., & Aminov, R. (2017). Editorial: Phage therapy: Past, present and future. *Frontiers in Microbiology*, 8, 981.
- Abedon, S. T., & Thomas-Abedon, C. (2010). Phage therapy pharmacology. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 11(1), 28–47.
- Abedon, S. T., Thomas-Abedon, C., Thomas, A., & Mazure, H. (2011). Bacteriophage prehistory: Is or is not Hankin, 1896, a phage reference?: Is or is not Hankin, 1896, a phage reference? *Bacteriophage*, 1(3), 174–178.
- Álvarez, A., Fernández, L., Gutiérrez, D., Iglesias, B., Rodríguez, A., & García, P. (2019). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in hospitals: Latest trends and treatments based on bacteriophages. *Journal of Clinical Microbiology*, 57(12). doi:10.1128/JCM.01006-19
- Amaral, M. M., Coelho, L. R., Flores, R. P., Souza, R. R., Silva-Carvalho, M. C., Teixeira, L. A., ... Figueiredo, A. M. S. (2005). The predominant variant of the Brazilian epidemic clonal complex of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* has an enhanced ability to produce biofilm and to adhere to and invade airway epithelial cells. *The Journal of Infectious Diseases*, 192(5), 801–810.
- Becker, K., von Eiff, C., & Skov, R. L. (2015). *Staphylococcus*, *Micrococcus*, and other catalase-positive cocci. En *Manual of Clinical Microbiology*, 11th Edition (pp. 354–382). American Society of Microbiology.
- Bohach, G. A. (2014). *Staphylococcus aureus* Exotoxins. In *Gram-Positive Pathogens* (pp. 464–477). ASM Press.
- Bordet, J., & Ciuca, M. (1920). Exsudats leucocytaires ey autolyse microbienne transmissible. *Comptes Rendus des séances de la Société de Biologie et de ses filiales* 83, 161-163.
- Bruttin, A., & Brüssow, H. (2005). Human volunteers receiving *Escherichia coli* phage T4 orally: a safety test of phage therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(7), 2874–2878.
- Buckling, A., & Rainey, P. B. (2002). Antagonistic coevolution between a bacterium and a bacteriophage. *Proceedings. Biological Sciences*, 269(1494), 931–936.
- Burian, M., Wolz, C., & Goerke, C. (2010). Regulatory adaptation of *Staphylococcus aureus* during nasal colonization of humans. *PloS One*, 5(4), e10040.
- Carlton, R. M. (1999). Phage therapy: past history and future prospects. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 47(5), 267–274.
- Cervantes, E., García, R., y Salazar, P. (2014). Características generales del *Staphylococcus aureus*. *Revista Latinoamericana: Patología Clínica y Medicina de laboratorio*, 61(1), 28-40.
- Chan, B. K., & Abedon, S. T. (2012). Phage therapy pharmacology phage cocktails. *Advances in Applied Microbiology*, 78, 1–23.

- Chan, B. K., Abedon, S. T., & Loc-Carrillo, C. (2013). Phage cocktails and the future of phage therapy. *Future Microbiology*, 8(6), 769–783.
- Chanishvili, N. (2012). Phage therapy--history from Twort and d'Herelle through Soviet experience to current approaches. *Advances in Virus Research*, 83, 3–40.
- Cole, A. M., Tahk, S., Oren, A., Yoshioka, D., Kim, Y.-H., Park, A., & Ganz, T. (2001). Determinants of *Staphylococcus aureus* Nasal Carriage. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 8(6), 1064–1069.
- Cook, H. A., Furuya, E. Y., Larson, E., Vasquez, G., & Lowy, F. D. (2007). Heterosexual transmission of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 44(3), 410–413.
- Cox, L. M., & Blaser, M. J. (2015). Antibiotics in early life and obesity. *Nature Reviews. Endocrinology*, 11(3), 182-190.
- Deisenhofer, J. (1981). Crystallographic refinement and atomic models of a human Fc fragment and its complex with fragment B of protein A from *Staphylococcus aureus* at 2.9- and 2.8-Å resolution. *Biochemistry*, 20(9), 2361–2370.
- Diep, B. A., Gill, S. R., Chang, R. F. et al. (2006). Complete genome sequence of USA300, an epidemic clone of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet*, 367, 731-739.
- Diep, B. A., Hilliard, J. J., Le, V. T. M., Tkaczyk, C., Le, H. N., Tran, V. G., ... Sellman, B. R. (2017). Targeting alpha toxin to mitigate its lethal toxicity in ferret and rabbit models of *Staphylococcus aureus* necrotizing pneumonia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(4). doi:10.1128/AAC.02456-16
- Donlan, R. M., & Costerton, J. W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(2), 167–193.
- Dublanchet, A., & Fruciano, E. (2008). Brève histoire de la phagothérapie. *Medecine et maladies infectieuses*, 38(8), 415–420.
- Filice, G. A., Nyman, J. A., Lexau, C., Lees, C. H., Bockstedt, L. A., Como-Sabetti, K., ... Lynfield, R. (2010). Excess costs and utilization associated with methicillin resistance for patients with *Staphylococcus aureus* infection. *Infection Control and Hospital Epidemiology: The Official Journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America*, 31(4), 365–373.
- Foster, T. J., & Höök, M. (1998). Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Trends in Microbiology*, 6(12), 484–488.
- Foster, Timothy J. (2005). Immune evasion by staphylococci. *Nature Reviews. Microbiology*, 3(12), 948–958.
- Galtier, M., De Sordi, L., Maura, D., Arachchi, H., Volant, S., Dillies, M.-A., & Debarbieux, L. (2016). Bacteriophages to reduce gut carriage of antibiotic resistant uropathogens with low impact on microbiota composition. *Environmental Microbiology*, 18(7), 2237–2245.
- Gillaspy, A., & Iandolo, J. (2014). *Staphylococcus* | Introduction. En batt, C., y Tortorello, M., *Encyclopedia of Food Microbiology* (Vol. 3, págs. 482-486). Elsevier.
- Gonzalez, B. E., Rueda, A. M., Shelburne, S. A., 3rd, Musher, D. M., Hamill, R. J., & Hulten, K. G. (2006). Community-associated strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as the cause of

- healthcare-associated infection. *Infection Control and Hospital Epidemiology: The Official Journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America*, 27(10), 1051–1056.
- Gordon, R. J., & Lowy, F. D. (2008). Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 46 Suppl 5(S5), S350-9.
- Gratia, A. (1921). Studies on the d'Herelle phenomenon. *The Journal of Experimental Medicine*, 34(1), 115–126.
- Gu, J., Liu, X., Li, Y., Han, W., Lei, L., Yang, Y., ... Feng, X. (2012). A method for generation phage cocktail with great therapeutic potential. *PLoS One*, 7(3), e31698.
- Hanssen, A. M., Kindlund, B., Stenklev, N.C., Furberg, A. S., Fismen, S., Olsen, R. S., ... Sollid, J. U. E. (2017). Localization of *Staphylococcus aureus* in tissue from the nasal vestibule in healthy carriers. *BMC Microbiology*, 17(1), 89.
- Hartman, B. J., & Tomasz, A. (1984). Low-affinity penicillin-binding protein associated with beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 158(2), 513–516.
- Herman-Bausier, P., Valotteau, C., Pietrocola, G., Rindi, S., Alsteens, D., Foster, T. J., ... Dufrêne, Y. F. (2016). Mechanical strength and inhibition of the *Staphylococcus aureus* collagen-binding protein Cna. *MBio*, 7(5). doi:10.1128/mBio.01529-16
- Hooton, S. P. T., Atterbury, R. J., & Connerton, I. F. (2011). Application of a bacteriophage cocktail to reduce *Salmonella typhimurium* U288 contamination on pig skin. *International Journal of Food Microbiology*, 151(2), 157–163.
- Huseby, M., Shi, K., Brown, C. K., Digre, J., Mengistu, F., Seo, K. S., ... Earhart, C. A. (2007). Structure and biological activities of beta toxin from *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 189(23), 8719–8726.
- Hyman, P., & Abedon, S. T. (2010). Bacteriophage host range and bacterial resistance. *Advances in Applied Microbiology*, 70, 217–248.
- Intestifag® polyvalent bacteriophage. (s. f.). Bacteriophages. Recuperado 2 de julio de 2021, de: <https://bacteriophages.info/en/bacteriophage/intesifag>
- Ira, & Johnston, L. J. (2008). Sphingomyelinase generation of ceramide promotes clustering of nanoscale domains in supported bilayer membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1778(1), 185–197.
- Kim, W., Zhu, W., Hendricks, G. L., Van Tyne, D., Steele, A. D., Keohane, C. E., ... Mylonakis, E. (2018). A new class of synthetic retinoid antibiotics effective against bacterial persisters. *Nature*, 556(7699), 103–107.
- Kornienko, M., Fisunov, G., Bespiatykh, D., Kuptsov, N., Gorodnichev, R., Klimina, K., ... Shitikov, E. (2020). Transcriptional Landscape of *Staphylococcus aureus* Kayvirus Bacteriophage vB_SauM-515A1. *Viruses*, 12(11), 1320.
- Kumar, P., Pletzer, D., Haney, E. F., Rahanjam, N., Cheng, J. T. J., Yue, M., ... Straus, S. K. (2019). Aurein-derived antimicrobial peptides formulated with pegylated phospholipid micelles to target methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin infections. *ACS Infectious Diseases*, 5(3), 443–453.

- Kutter, E., De Vos, D., Gvasalia, G., Alavidze, Z., Gogokhia, L., Kuhl, S., & Abedon, S. T. (2010). Phage therapy in clinical practice: treatment of human infections. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 11(1), 69–86.
- Larsen, J., Stegger, M., Andersen, P. S., Petersen, A., Larsen, A. R., Westh, H., ... Skov, R. L. (2016). Evidence for human adaptation and foodborne transmission of livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 63(10), 1349–1352.
- Laxminarayan, R., Duse, A., Wattal, C., Zaidi, A. K. M., Wertheim, H. F. L., Sumpradit, N., ... Cars, O. (2013). Antibiotic resistance—the need for global solutions. *The Lancet Infectious Diseases*, 13(12), 1057–1098.
- Llewelyn, M., & Cohen, J. (2002). Superantigens: microbial agents that corrupt immunity. *The Lancet Infectious Diseases*, 2(3), 156–162.
- Luong, T. T., & Lee, C. Y. (2002). Overproduction of type 8 capsular polysaccharide augments *Staphylococcus aureus* virulence. *Infection and Immunity*, 70(7), 3389–3395.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., & Parker, J. (2004). *Brock, biología de Los microorganismos*. Pearson Educacion.
- Martínez-Martínez, L. (2008). Muerte bacteriana y heterorresistencia a los antimicrobianos. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 26(8), 481–484.
- Menestrina, G., Dalla, S. M., Comai, M et al. (2003). Ion channels and bacterial infection: the case of β -barrel pore-forming protein toxins of *Staphylococcus aureus*. *FEBS Letters*, 552, 54-60.
- Menestrina, G., Serra, M. D., & Prévost, G. (2001). Mode of action of beta-barrel pore-forming toxins of the staphylococcal alpha-hemolysin family. *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*, 39(11), 1661–1672.
- Merabishvili, M., Pirnay, J.-P., Verbeken, G., Chanishvili, N., Tediashvili, M., Lashkhi, N., ... Vanechoutte, M. (2009). Quality-controlled small-scale production of a well-defined bacteriophage cocktail for use in human clinical trials. *PLoS One*, 4(3), e4944.
- Mertz, D., Frei, R., Periat, N., Zimmerli, M., Battegay, M., Flückiger, U., & Widmer, A. F. (2009). Exclusive *Staphylococcus aureus* throat carriage: at-risk populations: At-Risk Populations. *Archives of Internal Medicine*, 169(2), 172–178.
- Miles, G., Movileanu, L., & Bayley, H. (2002). Subunit composition of a bicomponent toxin: staphylococcal leukocidin forms an octameric transmembrane pore. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, 11(4), 894–902.
- Miller, R. W., Skinner, E. J., Sulakvelidze, A., Mathis, G. F., & Hofacre, C. L. (2010). Bacteriophage therapy for control of necrotic enteritis of broiler chickens experimentally infected with *Clostridium perfringens*. *Avian Diseases*, 54(1), 33–40.
- Montoya, M., & Goaux, E. (2003). β -Barrel membrane protein folding and structure viewed through the lens of α -hemolysin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1609, 19–27.
- Oliveira, D. C., Tomasz, A., & de Lencastre, H. (2002). Secrets of success of a human pathogen: molecular evolution of pandemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *The Lancet Infectious Diseases*, 2, 180–189.

- Palmqvist, N., Foster, T., Tarkowski, A., & Josefsson, E. (2002). Protein A is a virulence factor in *Staphylococcus aureus* arthritis and septic death. *Microbial Pathogenesis*, 33(5), 239–249.
- Peacock, S. J., Moore, C. E., Justice, A., Kantzanou, M., Story, L., Mackie, K., ... Day, N. P. J. (2002). Virulent combinations of adhesin and toxin genes in natural populations of *Staphylococcus aureus*. *Infection and Immunity*, 70(9), 4987–4996.
- Pirnay, J. P., De Vos, D., Verbeken, G., Merabishvili, M., Chanishvili, N., Vaneechoutte, M., ... Adamia, R. (2011). The phage therapy paradigm: Prêt-à-Porter or sur-mesure? *Pharmaceutical Research*, 28(4), 934–937.
- Plouin-Gaudon, I., Clement, S., Huggler, E., Chaponnier, C., François, P., Lew, D., ... Lacroix, J. S. (2006). Intracellular residency is frequently associated with recurrent *Staphylococcus aureus* rhinosinusitis. *Rhinology*, 44(4), 249–254.
- Prevost, G., Cribier, B., Couppié, P., Petiau, P., Supersac, G., Finck-Barbançon, V., Monteil, H., & Piemont, Y. (1995). Panton-Valentine leucocidin and gamma-hemolysin from *Staphylococcus aureus* ATCC 49775 are encoded by distinct genetic loci and have different biological activities. *Infection and Immunity*, 63(10), 4121–4129.
- Pyofag®. (s. f.). Bacteriophages. Recuperado 2 de julio de 2021, de: <https://bacteriophages.info/en/bacteriophage/piofag>
- Rea, K., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2016). The microbiome: A key regulator of stress and neuroinflammation. *Neurobiology of Stress*, 4, 23–33.
- Roghmann, M., Taylor, K. L., Gupte, A., Zhan, M., Johnson, J. A., Cross, A., ... Fattom, A. I. (2005). Epidemiology of capsular and surface polysaccharide in *Staphylococcus aureus* infections complicated by bacteraemia. *The Journal of Hospital Infection*, 59(1), 27–32.
- Rouveix, B. (2003). Antibiotic safety assessment. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 21(3), 215–221.
- Ruffat, M. (1996). *175 ans d'industrie pharmaceutique française: Histoire de Synthélabo*. La Découverte.
- Saïd-Salim, B., Mathema, B., & Kreiswirth, B. N. (2003). Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an emerging pathogen. *Infection Control and Hospital Epidemiology: The Official Journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America*, 24(6), 451–455.
- Shehab, N., Patel, P. R., Srinivasan, A., & Budnitz, D. S. (2008). Emergency department visits for antibiotic-associated adverse events. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 47(6), 735–743.
- Skurnik, M., & Strauch, E. (2006). Phage therapy: facts and fiction. *International Journal of Medical Microbiology: IJMM*, 296(1), 5–14.
- Soni, K. A., Nannapaneni, R., & Hagens, S. (2010). Reduction of *Listeria monocytogenes* on the surface of fresh channel catfish fillets by bacteriophage Listex P100. *Foodborne Pathogens and Disease*, 7(4), 427–434.
- Stratton, C. W. (2003). Dead bugs don't mutate: susceptibility issues in the emergence of bacterial resistance. *Emerging Infectious Diseases*, 9(1), 10–16.
- Sulakvelidze, A., Alavidze, Z., & Morris, J. G., Jr. (2001). Bacteriophage therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(3), 649–659.

- Tetz, G., & Tetz, V. (2016). Bacteriophage infections of microbiota can lead to leaky gut in an experimental rodent model. *Gut Pathogens*, 8(1), 33.
- Trombetta, R. P., Dunman, P. M., Schwarz, E. M., Kates, S. L., & Awad, H. A. (2018). A high-throughput screening approach to repurpose FDA-approved drugs for bactericidal applications against *Staphylococcus aureus* small-colony variants. *mSphere*, 3(5). doi:10.1128/mSphere.00422-18
- van Belkum, A., Verkaik, N. J., de Vogel, C. P., Boelens, H. A., Verveer, J., Nouwen, J. L., ... Wertheim, H. F. L. (2009). Reclassification of *Staphylococcus aureus* nasal carriage types. *The Journal of Infectious Diseases*, 199(12), 1820–1826.
- Vandenesch, F., Naimi, T., Enright, M. C., Lina, G., Nimmo, G. R., Heffernan, H., ... Etienne, J. (2003). Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence. *Emerging Infectious Diseases*, 9(8), 978–984.
- Verbeke, G., Pirnay, J.-P., De Vos, D., Jennes, S., Zizi, M., Lavigne, R., ... Huys, I. (2012). Optimizing the European regulatory framework for sustainable bacteriophage therapy in human medicine. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 60(3), 161–172.
- Williams, M. L., & LeJeune, J. T. (2012). Phages and bacterial epidemiology. *Bacteriophages in health and disease* (pp. 76–85). CABI.
- Wu, S., Piscitelli, C., de Lencastre, H., & Tomasz, A. (1996). Tracking the evolutionary origin of the methicillin resistance gene: cloning and sequencing of a homologue of *mecA* from a methicillin susceptible strain of *Staphylococcus sciuri*. *Microbial Drug Resistance*, 2, 435–441.
- Yarwood, J. M., & Schlievert, P. M. (2003). Quorum sensing in *Staphylococcus* infections. *The Journal of Clinical Investigation*, 112(11), 1620–1625.
- Yoshikawa, T. T. (2002). Antimicrobial resistance and aging: beginning of the end of the antibiotic era? *Journal of the American Geriatrics Society*, 50(7 Suppl), S226-9.
- Zetola, N., Francis, J.S., Nuermberger, E.L., Bishai, W.R. (2005). Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an emerging threat. *The Lancet Infectious Diseases*, 5, 275-86.