



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Caracterización de clonas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a bacteriófagos con potencial terapéutico

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

QFB. Juan Carlos García Cruz

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Rodolfo García Contreras
Facultad de Medicina

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Corina-Diana Ceapă
Instituto de Química UNAM

Dr. Víctor Humberto Bustamante Santillán
Instituto de Biotecnología, UNAM

Ciudad de México. Diciembre, 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

GARCÍA CRUZ JUAN CARLOS
Estudiante de Maestría en Ciencias Bioquímicas
Presente

Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del **12 de septiembre de 2023**, conocieron su solicitud de asignación de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **Maestro en Ciencias**, con la réplica de la tesis "**Caracterización de clones de Pseudomonas aeruginosa resistentes a bacteriófagos con potencial terapéutico**", dirigida por el/la Dr(a). **GARCÍA CONTRERAS RODOLFO**.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado integrado por los doctores:

SOBERÓN CHÁVEZ GLORIA	PMDCBQ	PRESIDENTE
ALVAREZ ADRIAN FERNANDO	PMDCBQ	SECRETARIO
COCOTL YAÑEZ MIGUEL	PMDCBQ	VOCAL
MORALES ESPINOSA MARIA DEL ROSARIO	PMDCBQ	VOCAL
ISRAEL CASTILLO JUÁREZ	NO ACREDITADO	VOCAL

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 12 de septiembre de 2023



Coordinadora
Dra. Claudia Lydia Treviño Santa Cruz

Agradecimientos

A mi mamá, a mi papá y a mi hermano por todo el amor, paciencia, consejos y apoyo brindado siempre. Este logro es de todos.

A mi abuelita Carmen, a mi tía Graciela y a mis primas, Patricia y Diana, por todo el cariño incondicional.

A mis amigos Emir, Nadia, Erika, Daniel y Marco por su amistad y todo el apoyo brindado. Un agradecimiento especial para mi amiga Paty por su gran amistad y por su enorme ayuda durante el ensayo de mis tutorales.

A la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México por la oportunidad de realizar la maestría en Ciencias Bioquímicas dentro de sus instalaciones.

Al Dr. Rodolfo García Contreras por permitirme ser parte de su equipo de trabajo, por su tutoría, conocimientos y todas las oportunidades que me brindó.

A todos mis compañeros y grandes amigos, Eli, Katya, Mariel, Giselle, Miguel, Oswaldo y Yahir, del laboratorio de Bacteriología de la Facultad de Medicina. Especialmente a Xareni y Daniel por nuestra incursión en el mundo de los fagos. También a los alumnos de servicio social Santi, Cristian y Aldo por su ayuda en la realización de algunos experimentos.

A los miembros de mi comité tutorial, el Dr. Víctor Humberto Bustamante Santillán y la Dra. Corina-Diana Ceapă, por sus consejos, críticas y aportes al proyecto.

A la Dra. María del Mar Tomás Carmona por permitirme realizar una estancia en su laboratorio y por el recibimiento tan cálido y toda la ayuda brindada por todos los integrantes de su equipo. A la señora Carmen Lago Insúa por hacerme sentir como en casa durante dicha estancia, y a mi amigo Caio por su invaluable amistad.

A la Dra. María del Rosario Morales Espinosa por la donación de las cepas multidrogo-resistentes de *Pseudomonas aeruginosa*, al Dr. Luis Esaú López Jácome por su ayuda en la realización de los antibiogramas, a la Dra. Clara Estela Díaz y al Dr. Toshinari Maeda por su apoyo en la secuenciación de bacteriófagos y bacterias.

Al Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP) por el apoyo brindado para realizar la estancia corta de Investigación "Estudio de bacteriófagos líticos como tratamiento alternativo frente a *Pseudomonas aeruginosa*" en el Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña, España. Además, por el apoyo para la presentación del cartel "Pursuit and characterization of bacteriophages capable of resensitizing multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains" en el XXXIII Congreso Nacional de Bioquímica celebrado en Mérida, Yucatán.

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (Conahcyt) por la beca recibida durante mis estudios de posgrado.

ÍNDICE

ÍNDICE.....	4
ABREVIATURAS.....	7
ÍNDICE DE FIGURAS.....	8
ÍNDICE DE TABLAS.....	12
1. RESUMEN.....	13
2. INTRODUCCIÓN.....	14
2.1. Situación actual de la terapia antibiótica	14
2.2. Bacterias ESKAPE.....	14
2.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15
2.3.1. Factores de virulencia.....	15
2.3.1.1. Exoenzimas.....	15
2.3.1.2. Toxinas.....	15
2.3.1.3. Pigmentos.....	16
2.3.1.4. Adhesinas.....	16
2.3.2. Epidemiología.....	16
2.3.3. Resistencia a antibióticos.....	17
2.4. Bacteriófagos.....	17
2.4.1. Ciclos de vida.....	18
2.5. Fagoterapia.....	19
2.5.1. Comparación con los antibióticos.....	19
2.5.2. Casos clínicos exitosos.....	20
2.5.3. Resistencia a Bacteriófagos	21
2.5.3.1. Mutación o pérdida de las estructuras que contienen al receptor.....	21
3. JUSTIFICACIÓN.....	23
4. HIPÓTESIS.....	23
5. OBJETIVOS.....	23
5.1. Objetivo General.....	23
5.1. Objetivos específicos.....	23
6. METODOLOGÍA.....	24
6.1. Cepas utilizadas.....	24

6.2. Fagos utilizados.....	24
6.3. Medios de cultivo.....	25
6.4. Elaboración de precultivos.....	26
6.5. Determinación del rango de hospedero (Spot Test)	26
6.6. Amplificación de fagos.....	27
6.7. Estimación del título de fagos	27
6.8. Aislamiento de Unidades Formadoras de Placa (UFP).....	27
6.9. Purificación de fagos por estriado.....	27
6.10. Aislamiento de bacteriófagos.....	28
6.11. Aislamiento de clonas resistentes a la infección por el fago	28
6.12. Curvas de crecimiento.....	29
6.13. Extracción y secuenciación de DNA de bacteriófagos y bacterias	29
6.14. Análisis Bioinformático de la secuenciación.....	30
6.15. Ensayo de Restricción.....	30
6.16. Curvas de adsorción.....	30
6.17. Curva de crecimiento “One Step”.....	30
6.18. Microscopía electrónica.....	31
6.19. Evaluación de la producción de piocianina.....	31
6.20. Evaluación de la actividad caseinolítica.....	31
6.21. Evaluación de la formación de biopelícula.....	32
6.22. Ensayo de movilidad tipo <i>swarming</i>	32
6.23. Antibiogramas.....	33
6.24. Ensayo de virulencia <i>in vivo</i> con <i>Galleria mellonella</i>	33
7. RESULTADOS.....	34
7.1. Determinación preliminar del rango de huéspedes de las muestras de fago donadas.....	34
7.2. Purificación de las muestras de fago donadas.....	35
7.3. Aislamiento de fagos de fuentes naturales.....	36
7.4. Amplificación y estimación del título de los stocks de fago purificados.....	38
7.5. Determinación del rango de huéspedes de la colección de fagos.....	41
7.6. Extracción de DNA de bacteriófagos	43
7.7. Secuenciación y anotación de los genomas de bacteriófagos.....	44

7.8. Aislamiento de clonas de <i>P. aeruginosa</i> PA14 resistentes a los fagos ϕ DCL-PA6 y ϕ DCL-PA6 α	48
7.9. Mutaciones adquiridas por las clonas de <i>P. aeruginosa</i> PA14 resistentes a los fagos ϕ DCL-PA6 y ϕ DCL-PA6 α	52
7.10. Caracterización de los fagos ϕ DCL-PA6 y ϕ DCL-PA6 α	53
7.11. Evaluación de los factores de virulencia de las clonas de PA14 resistentes a los fagos ϕ DCL-PA6 y ϕ DCL-PA6 α	55
7.11.1. Producción de pirocianina.....	55
7.11.2. Actividad caseinolítica.....	56
7.11.3. Formación de biopelículas.....	56
7.11.4. Movilidad tipo <i>swarming</i>	57
7.12. Evaluación de factores de virulencia de las clonas resistentes de RME 58 y 75 a los fagos ϕ DCL-PA6 y 14R- ϕ DCL-PA6 α	58
7.12.1. Formación de biopelículas.....	59
7.12.2. Evaluación de cambios en el perfil de sensibilidad a antibióticos.....	60
7.13. Evaluación de la virulencia <i>in vivo</i>	62
8. DISCUSIÓN.....	63
9. CONCLUSIONES	68
10. PERSPECTIVAS.....	68
11. REFERENCIAS.....	69

ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
AMK	Amikacina
ATM	Aztreonam
CAZ	Ceftazidima
CIP	Ciprofloxacino
CLSI	Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
CPA	Antígeno común del polisacárido
CRISPR	Repeticiones palindrómicas cortas, agrupadas y regularmente interespaciadas
CRO	Ceftriaxona
CST	Colistina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
D.O.	Densidad óptica
dsDNA	Ácido desoxirribonucleico de cadena doble
FEP	Cefepima
GEN	Gentamicina
I	Sensibilidad intermedia
IPM	Imipenem
LB	Caldo Luria
LPS	Lipopolisacárido
MDR	Multidrogo-resistentes
MEM	Meropenem
MOI	Multiplicidad de infección
OMS	Organización Mundial de la Salud
ON	Overnight
OSA	Antígeno O-específico
PDR	Pandrogo-resistentes
R	Resistente
RNA	Ácido ribonucleico
r.p.m.	Revoluciones por minuto
S	Sensible
ssDNA	Ácido desoxirribonucleico de cadena sencilla
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
TOB	Tobramicina
TZP	Tazobactam/Piperacilina
UFP	Unidad formadora de placa
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
WT	Cepa nativa
XDR	Extensamente drogo-resistentes

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Taxonomía de fagos basada en morfología y composición del genoma. Tomada y modificada de Ofir, G., 2018.....	18
Figura 2. Ciclos de vida de los bacteriófagos. Tomada y modificada de Ofir, G., 2018.....	19
Figura 3. Posibles escenarios de la resistencia a bacteriófagos. Tomada y modificada de Mangalea, M. R., 2020.....	22
Figura 4. Técnica de estriado en la purificación de bacteriófagos.....	28
Figura 5. Procedimiento para el aislamiento de clonas resistentes a la infección por fagos.....	29
Figura 6. Placa de 48 pozos para la evaluación de la formación de biopelículas.....	32
Figura 7. Spot test para la cepa PA14. Sensible a las muestras 1, 2, 3, 6, 7, 8, 9, 10. Ligeramente sensible al fago 5.....	34
Figura 8. Spot test para la cepa PAO1. Sensible a fagos 1 y 8. Ligeramente sensible a los fagos 4 y 5.....	34
Figura 9. Morfologías de las muestras de fago 7 (A) y 9 (B) antes (izquierda) y después (derecha) de la purificación por estriado. Se observa que después de la purificación solo hay un solo tipo de morfología de placa lítica.....	35
Figura 10. Estriado de la muestra de fago 7 en PA14. Se observan UFP aisladas de las cuales posteriormente se amplificará el stock de fagos purificados.....	35
Figura 11. Aislamiento de UFP de la muestra de agua del Río Hondo (Naucalpan, Edo. De México). En el huésped de amplificación (PAO1) se observaron tres morfologías diferentes. Las placas A y B son líticas, sin embargo, la morfología C es característica de fagos temperados por lo que no se seleccionó para análisis posteriores.....	36
Figura 12. Aislamiento de UFP de la muestra de agua de los canales de Xochimilco (Xochimilco, CDMX). En el huésped de amplificación (RME101) se observa una morfología lítica.....	36
Figura 13. Aislamiento de UFP de la muestra de agua de del cerro de La Estrella (Iztapalapa, CDMX). En el huésped de amplificación (RME125) se observa una morfología lítica.....	37
Figura 14. Aislamiento de UFP de la muestra de agua del Parque Nacional Fuentes Brotantes (Tlalpan, CDMX). En el huésped de amplificación (PA14) se observa una morfología lítica.....	37
Figura 15. Aislamiento de UFP de la muestra de agua de la playa Revolcadero (Acapulco, Guerrero). En el huésped de amplificación (PAO1) se observa una morfología lítica.....	37
Figura 16. Aislamiento de UFP de la muestra de agua de la playa Caleta (Acapulco, Guerrero). En el huésped de amplificación (PAO1) se observa una morfología lítica.....	37
Figura 17. Aislamiento de UFP de la muestra de agua de la playa de Médano (Los Cabos, Baja California Sur). En el huésped de amplificación (PAO1) se observa una morfología lítica.....	37
Figura 18. Screening de diluciones para la amplificación del fago RN2 en PAO1. Se obtuvieron diez UFP en 10^{-7}	38
Figura 19. Screening de diluciones para la amplificación de los fagos 7 (parte superior) y fago 9 (parte inferior) en PA14. Se obtuvieron 23 UFP del fago 7 en 10^{-6} y 30 UFP del fago 9 en 10^{-4}	38

Figura 20. Morfologías de los diferentes stocks de fagos. A) Fago 1 B) Fago 2 C) Fago 3 D) Fago 4 E) Fago 5 F) Fago 6 G) Fago 7 H) Fago 8 I) Fago 9 J) Fago 10 K) Fago FRN1 L) Fago FRN2 M) Fago X N) Fago CE Ñ) Fago Rev O) Fago Fuentes P) Fago Acap Q) Fago Med.....	40
Figura 21. Spot test para la cepa PA14. Resistente a fagos 1, 4, FRN1, Med y Rev. Ligeramente sensible al F8 y Acap. Sensible a los demás.....	41
Figura 22. Spot test para la cepa PAO1. Resistente a fago CE. Ligeramente sensible a fago Acap. Sensible a los demás.....	41
Figura 23. Spot test para la cepa RME 22. Ligeramente sensible a los fagos 5, 9. Resistente a los fagos 1, 2, 3, 6, FRN1, FRN2, X, CE, Acap, Rev. Sensible a los demás.....	41
Figura 24. Spot test para la cepa RME 58. Resistente a fagos 1, CE, Rv. Ligeramente sensible al fago FRN1 y Acap. Sensible a los demás.....	41
Figura 25. Spot test para la cepa RME 60. Ligeramente sensible los fagos 3, 5, 9, 10 Fuentes y Médano. Resistente a los fagos 1, 2, 6, FRN1, FRN2, CE, X, Rev, Acap. Sensible a los demás....	41
Figura 26. Spot test para la cepa RME 66. Resistente a fagos 1, 8, FRN1, CE, Med, Rev y Acap. Ligeramente sensible al fago 4. Sensible a los demás.....	41
Figura 27. Spot test para la cepa RME 75. Resistente a los fagos CE, Rev y FRN1. Ligeramente sensible a fagos 1 y Acap. Sensible a los demás.....	42
Figura 28. Spot test para la cepa RME 101. Resistente a fago CE y Rev. Ligeramente sensible a fago Acap. Sensible a los demás.....	42
Figura 29. Spot test para la cepa RME 118. Ligeramente sensible a los fagos 5, 9, 10, X. Resistente a los fagos 1, 2, 3, 6, Acap. Sensible a los demás.....	42
Figura 30. Spot test para la cepa RME 124. Resistente a los fagos 2, 4, 8, CE. Sensible a los demás.....	42
Figura 31. Spot test para la cepa RME 125. Sensible al fago CE. Ligeramente sensible al fago 7. Resistente a los demás.....	42
Figura 32. Se observan los geles de integridad (agarosa 0.8 %) de 9 DNAs extraídos. En todos los casos se observa un DNA integro mayor a 10 kb. En el recuadro inferior se presentan los parámetros de pureza y concentración.....	44
Figura 33. A) Representación gráfica del genoma del fago ϕ DCL-PA6 elaborado con la herramienta SnapGene v6.2.2. Las flechas negras representan las mutaciones puntuales de la variante del fago (ϕ DCL-PA6 α) localizada en tres genes estructurales que corresponden a la proteína de la fibra de la cola, la proteína estructural de la base y la proteína del cuello del fago. B) Mutaciones identificadas en la variante ϕ DCL-PA6 α . Se presentaron cuatro mutaciones puntuales que llevaron a cambios en dos aminoácidos localizados en la proteína de la fibra de la cola y la proteína estructural de la base. Cada cuadro amarillo representa un nucleótido mientras que cada cuadro azul representa un aminoácido, ambos con su respectiva posición en la parte superior. Los cambios en la secuencia original son representados por cuadros rojos. Los rectángulos verdes representan al codón de paro.....	46
Figura 34. Representación gráfica de la anotación de los genomas del fago 3, CE y el fago 8 elaborados con la herramienta SnapGene v6.2.2. Para los fagos 3 y CE se obtuvo un solo contig y para el fago 8 cuatro contigs.....	47

Figura 35. Curvas de crecimiento de las clonas de PA14 resistentes a los fagos ϕ DCL-PA6 y ϕ DCL-PA6 α . La MOI empleada fue de 10.....49

Figura 36. Experimentos de resistencia cruzada. A) Rango de huéspedes de la cepa PA14 WT. Rango de huéspedes de las clonas de PA14 resistentes al fago ϕ DCL-PA6, 14R1- ϕ DCL-PA6(B) y 14R2- ϕ DCL-PA6 (C), respectivamente. Rango de huéspedes de las clonas de PA14 resistentes al fago ϕ DCL-PA6 α , 14R1- ϕ DCL-PA6 α (D) y 14R2- ϕ DCL-PA6 α (E), respectivamente. Las observaciones encontradas se presentan de manera resumida en la Tabla 11. Nótese la producción de piomelanina de algunas clonas resistentes de 14R2- ϕ DCL-PA6 α a los fagos 3, CE y JBD30....50

Figura 37. A) Ensayo de restricción de los genomas que se mandaron a secuenciar: el fago 3, el fago 5 (ϕ DCL-PA6) y el fago 6 (ϕ DCL-PA6 α), con la enzima EcoRI. Los fagos 5 y 6 presentan el mismo patrón de restricción, el cual difiere al del fago 3. B) Ensayo de restricción entre el fago 6 que se mandó a secuenciar (ϕ DCL-PA6 α) y el fago 6 recuperado de la zona de lisis de los ensayos de resistencia cruzada (ϕ DCL-PA6 α (2)) (Figura 35.B). En ambos casos se observa el mismo patrón de restricción.....52

Figura 38. Mutaciones identificadas en las clonas de PA14 resistentes al fago ϕ DCL-PA6 (A) y al fago ϕ DCL-PA6 α (B). Las mutaciones de las clonas resistentes al fago ϕ DCL-PA6 están localizadas en el gen *wzzB* que participa en la síntesis del antígeno O, mientras que las mutaciones de las clonas resistentes al fago ϕ DCL-PA6 α están localizadas en el gen *wapH* que interviene en la síntesis del núcleo del LPS. Cada recuadro amarillo representa un nucleótido con su respectiva posición en la parte superior. Los espacios en blanco representan deleciones. Los cuadros verdes representan el codón de paro. *Del* significa deleción. *Ins* significa inserción.....53

Figura 39. Caracterización de los fagos ϕ DCL-PA6 y ϕ DCL-PA6 α . Imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de los fagos ϕ DCL-PA6 α (A) y ϕ DCL-PA6 (B). La escala representa 100 nm. C) Curvas de adsorción del fago ϕ DCL-PA6 y su variante ϕ DCL-PA6 α en *P. aeruginosa* PA14 y *E. coli* NA22. Curvas de crecimiento *One-Step* para el fago ϕ DCL-PA6 (D) y su variante ϕ DCL-PA6 α (E). El periodo de latencia y el *burst size* para el fago ϕ DCL-PA6 son 10 minutos y 80 UFP/célula, respectivamente. Para el fago ϕ DCL-PA6 α el periodo de latencia y el *burst size* fueron 20 minutos y 180 UFP/célula, respectivamente. Para las curvas C, D y E los puntos representan la media de tres experimentos y las barras la desviación estándar.....54

Figura 40. Producción overnight de piocianina en medio LB de las clonas de *P. aeruginosa* PA14 resistentes a los fagos ϕ DCL-PA6 (14R- ϕ DCL-PA6) y ϕ DCL-PA6 α (14R- ϕ DCL-PA6 α). Las barras representan la media de tres experimentos. Se empleó Kruskal-Wallis y Dunn para grupos independientes, valores de $p < 0.05$ fueron considerados como significativos comparados con el grupo control de PA14 WT.....55

Figura 41. Evaluación de la actividad caseinolítica en medio LB de las clonas de *P. aeruginosa* PA14 resistentes a los fagos ϕ DCL-PA6 (14R- ϕ DCL-PA6) y ϕ DCL-PA6 α (14R- ϕ DCL-PA6 α). Las barras representan la media de tres experimentos. Se empleó Kruskal-Wallis y Dunn para grupos independientes, valores de $p < 0.05$ fueron considerados como significativos comparados con el grupo control de PA14 WT.....56

Figura 42. Formación de biopelícula de las clonas de *P. aeruginosa* PA14 resistentes a los fagos ϕ DCL-PA6 (14R- ϕ DCL-PA6) y ϕ DCL-PA6 α (14R- ϕ DCL-PA6 α). Los puntos representan el promedio de tres experimentos. Se empleó Kruskal-Wallis y Dunn para grupos independientes, valores de $p < 0.05$ fueron considerados como significativos comparados con el grupo control de PA14 WT.....57

- Figura 43.** Evaluación de la movilidad tipo *swarming* de clonas de *P. aeruginosa* PA14 resistentes a los fagos ϕ DCL-PA6 (14R- ϕ DCL-PA6) y ϕ DCL-PA6 α (14R- ϕ DCL-PA6 α). Las barras representan la media de tres experimentos. Se empleó Kruskal-Wallis y Dunn para grupos independientes, valores de $p < 0.05$ fueron considerados como significativos comparados con el grupo control de PA14 WT.....57
- Figura 44.** Movilidad tipo *swarming* de clonas de *P. aeruginosa* PA14 resistentes a los fagos ϕ DCL-PA6 y ϕ DCL-PA6 α . Se observa la morfología dendrítica típica de *P. aeruginosa* PA14, como control negativo se empleó a la cepa PA14 Δ *lasR rhIR*. Las clonas resistentes al fago ϕ DCL-PA6 presentan fenotipos similares a la cepa nativa, de manera contraria las clonas resistentes al fago ϕ DCL-PA6 α presentan una disminución de dicha movilidad.....58
- Figura 45.** (A-B) Curvas de crecimiento de las clonas de RME 58 resistentes al fago ϕ DCL-PA6 (A) y ϕ DCL-PA6 α (B). Curvas de crecimiento de las clonas de RME 75 resistentes al fago ϕ DCL-PA6 (C) y ϕ DCL-PA6 α (D). Los fagos se encuentran a una MOI de 10.....59
- Figura 46.** Formación de biopelícula de las clonas *P. aeruginosa* RME 58 (A) y RME 75 (B) resistentes a los fagos ϕ DCL-PA6 y ϕ DCL-PA6 α . Los puntos representan el promedio de tres experimentos. Se empleó Kruskal-Wallis y Dunn para grupos independientes, valores de $p < 0.05$ fueron considerados como significativos comparados con el grupo control, RME 58 o RME 75 respectivamente.....60
- Figura 47.** Cambios en el perfil de sensibilidad a antibióticos de las clonas de *P. aeruginosa* RME 58 (A) y RME 75 (B) resistentes a los fagos ϕ DCL-PA6 y ϕ DCL-PA6 α . Se presenta el mapa de calor de cambios logarítmicos en base 2 (\log_2) en los valores de la CMI de un panel de 14 antibióticos respecto a las cepas nativas de RME 58 y RME 75, respectivamente. S, sensible; I, sensibilidad intermedia; R, resistente. CAZ: Ceftazidima, CRO: Ceftriaxona, FEP: Cefepima, IPM: Imipenem, MEM: Meropenem, AMK: Amikacina, GEN: Gentamicina, CIP: Ciprofloxacino, TOB: Tobramicina, ATM: Aztreonam, CST: Colistina, TZP: Tazobactam/Piperacilina.....61
- Figura 48.** Curvas de supervivencia Kaplan–Meier de *G. mellonella* infectada con clonas de *P. aeruginosa* PA14 (A), RME 58 (B) y RME 75 (c) resistentes a los fagos ϕ DCL-PA6 y ϕ DCL-PA6 α , respectivamente. El grupo control fue inoculado con solución salina. Al menos 20 larvas fueron empleadas por grupo. Los datos fueron analizados usando la prueba Log Rank Mantel–Cox test en GraphPad Prism 8. Los resultados fueron considerados significativos a una $p < 0.05$62

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cepas empleadas.....	24
Tabla 2. Colección de fagos utilizada en este estudio.....	25
Tabla 3. Composición del medio LB en g/L.....	25
Tabla 4. Soluciones stock para la elaboración de medio mínimo M8.....	26
Tabla 5. Composición del medio M8 a partir de las soluciones stock.....	26
Tabla 6. Rango de huéspedes preliminar de la colección de fagos donada.....	34
Tabla 7. Bacteriófagos aislados de fuentes naturales.....	36
Tabla 8. Estimación del título de los stocks amplificados.....	39
Tabla 9. Rango de infección de la colección de fagos.....	43
Tabla 10. Resultados de la secuenciación. Se muestran los contigs ensamblados por fago, el tamaño del contig principal y su respectiva cobertura (Cob.). En color verde se presentan los genomas con secuencia única, en amarillo los genomas repetidos y en rojo el genoma repetido que presento 4 mutaciones en la secuencia de DNA.....	45
Tabla 11. Experimentos de resistencia cruzada usando clonas de PA14 resistentes a los fagos ϕ DCL-PA6 y su variante ϕ DCL-PA6 α	51

1. RESUMEN

La resistencia bacteriana a los antibióticos es un problema mundial de salud pública, el cual se estima que para 2050 causará 10 millones de muertes. Una de las bacterias multirresistentes a antibióticos (MDR) con mayor morbilidad y mortalidad es *Pseudomonas aeruginosa*, para la cual la Organización Mundial de Salud (OMS) ha urgido la búsqueda de nuevos tratamientos.

Una estrategia terapéutica prometedora y con resultados alentadores es la fagoterapia, en la cual se administran virus llamados bacteriófagos, los cuales infectan y lisan bacterias de manera específica. Sin embargo, al igual que en el caso de los antibióticos, las bacterias pueden desarrollar resistencia a dichos virus, no obstante, se ha demostrado que las clonas resistentes a fagos pueden presentar una disminución en su virulencia o re-sensibilización a los antibióticos debido a que el principal mecanismo de resistencia implica la mutación o pérdida de los receptores de unión al fago que comúnmente se encuentran en estructuras superficiales de la bacteria tales como la cápsula, pili, porinas, lipopolisacárido (LPS) y flagelo.

Por lo antes mencionado, el presente trabajo tuvo por objetivo aislar, caracterizar e identificar fagos de *P. aeruginosa* con potencial terapéutico, así como la evaluación de la virulencia *in vitro* e *in vivo* de clonas resistentes de *P. aeruginosa* (PA14 y cepas MDR) a algunos de esos virus. Los fagos evaluados provienen de una colección del Centro de Ciencias Genómicas (CCG) y otros fueron aislados de diferentes muestras de agua del país.

De los virus evaluados se seleccionaron a los fagos ϕ DCL-PA6 y, a su variante, el fago ϕ DCL-PA6 α , para el aislamiento de clonas resistentes debido a que, además de tener un rango de huéspedes amplio y carecer de genes de lisogenia, de virulencia y de resistencia a antibióticos, reconocen diferentes receptores en sus huéspedes bacterianos.

Los fagos ϕ DCL-PA6 y ϕ DCL-PA6 α difieren por cuatro pares de bases que producen cambios en la secuencia de la proteína estructural de la base y de la proteína de la fibra de la cola del fago. De acuerdo con la evidencia genómica y los experimentos de resistencia cruzada de las clonas resistentes de *P. aeruginosa* PA14, dichas mutaciones permiten al fago pasar de usar el antígeno O a usar el núcleo del LPS como receptor. Además, dichas mutaciones están involucradas en disminuir la adsorción del fago a la bacteria, incrementar el periodo de latencia y aumentar el *burst size*.

Las clonas resistentes de PA14 a los fagos ϕ DCL-PA6 y ϕ DCL-PA6 α presentaron, de manera general, una disminución en la formación de biopelícula y en la movilidad tipo *swarming* asociadas a mutaciones en genes biosintéticos del LPS. De manera similar, algunas de las cepas MDR presentaron una disminución en la formación de biopelículas y, además, una ligera re-sensibilización a algunos antibióticos, siendo la más relevante a amikacina. También se presentó una disminución significativa de la letalidad *in vivo* de algunas de las clonas resistentes usando a la larva *Galleria mellonella* como modelo biológico.

Este estudio logró identificar mutaciones puntuales en el fago ϕ DCL-PA6 que pueden ocasionar que el receptor reconocido por el virus pase de ser el antígeno O al núcleo del LPS de *P. aeruginosa* PA14. Además, demostró que clonas resistentes a dicho fago, y a su variante, presentan una disminución de la virulencia *in vivo* e *in vitro*, y aumentan su sensibilidad a antibióticos debido a alteraciones en el LPS. En conjunto, los resultados permiten posicionar al fago ϕ DCL-PA6 como un potencial candidato a emplearse en la terapia.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Situación actual de la terapia antibiótica

La terapia antibiótica tuvo su origen tras el descubrimiento de moléculas biológicamente activas con propiedades antibacterianas producidas por microorganismos (4), la cual ha permitido avances importantes en el campo de la medicina y ha salvado millones de vidas. Una pérdida en su efectividad llevaría a un escenario catastrófico al cual algunos autores han denominado como era postantibiótica (5).

El descubrimiento de la penicilina por Alexander Fleming en 1928, y su posterior aislamiento y producción en la década de los 40 marcó el inicio del apogeo de la terapia antibiótica (6), el cual continuó por aproximadamente cuatro décadas con más de 40 compuestos descubiertos e introducidos al uso clínico (1). En esa época la resistencia bacteriana a los antibióticos era un fenómeno que no generó preocupación (7), sin embargo, su uso intensivo e inadecuado provocaron un aumento en la tasa de generación de resistencia. Para la década de los 90, las consecuencias de la resistencia se volvieron más notorias, ya que el número de nuevos compuestos introducidos a la clínica comenzó a disminuir significativamente (6).

La resistencia de las bacterias a los antimicrobianos es un proceso natural cuya aparición no depende de la influencia humana, de hecho, se han identificado genes de resistencia para antibióticos de uso actual en poblaciones microbianas localizadas en lugares remotos como en el Ártico (8). Sin embargo, la actividad humana, particularmente el sobreuso y mal uso de los antibióticos agrava significativamente el problema de la resistencia (7).

Los antibióticos han sido usados de manera indiscriminada para tratar infecciones no necesariamente de origen bacteriano; además se emplean en grandes cantidades en la agricultura, ganadería y acuicultura. Aunado a esto, la falta de un tratamiento apropiado de aguas residuales y la reducida distancia entre granjas y ciudades producen un incremento en los niveles de dichos compuestos liberados al ambiente, lo que provoca que las comunidades microbianas presentes en los diferentes ecosistemas estén continuamente expuestas a concentraciones cada vez mayores de antibióticos. Esto ha llevado a una evolución acelerada y a una expansión del repertorio de genes de resistencia en bacterias presentes en diversos reservorios naturales (7).

2.2. Bacterias ESKAPE

El resultado de la adquisición constante de genes de resistencia a antibióticos es la generación de patógenos multidrogo-resistentes (MDR), extensamente drogo-resistentes (XDR), e incluso pandrogo-resistentes (PDR) (9).

Existe un grupo de especies bacterianas causantes de las infecciones multirresistentes más comunes y severas, el cual incluye a los patógenos *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, y *Enterobacter spp.* Dicho grupo es conocido por el acrónimo ESKAPE, haciendo referencia a la capacidad de sus integrantes de escapar del efecto de los antibióticos a través de múltiples mecanismos de resistencia (10).

Es importante destacar que los últimos tres de estos patógenos, específicamente las cepas resistentes a carbapenémicos fueron recientemente enlistadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como prioridad crítica para la búsqueda y desarrollo de nuevos antibióticos (11).

2.3. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria Gram negativa con forma bacilar, monoflagelada, anaerobia facultativa, no formadora de esporas y con temperatura óptima de crecimiento que va de los 37 a los 42 °C. (12) Las cepas de esta bacteria presentan genomas de gran tamaño (~5–7 Mpb), lo que les confiere una alta capacidad metabólica para producir diversos metabolitos secundarios, y emplear diferentes fuentes de carbono y aceptores de electrones. Esto hace de esta *P. aeruginosa* un microorganismo capaz de crecer en un gran número condiciones (13).

P. aeruginosa, además de ser un patógeno de plantas y animales, es un microorganismo oportunista en los seres humanos capaz de causar un amplio repertorio de infecciones agudas y crónicas, particularmente en pacientes con un sistema inmune comprometido y quemaduras severas (12). Tiene una importancia particular ya que es el principal causante de morbilidad y mortalidad en pacientes con fibrosis quística, y uno de los principales patógenos nosocomiales que afectan a pacientes hospitalizados debido a infecciones multirresistentes (12).

2.3.1. Factores de virulencia

P. aeruginosa codifica numerosos factores de virulencia que van desde exotoxinas, exoenzimas, pigmentos y adhesinas que le permiten colonizar diferentes huéspedes y juegan un papel importante en el proceso patogénico de la bacteria (14). Cabe destacar que gran parte de la expresión de los genes de virulencia está controlada por el mecanismo de comunicación celular denominado *quorum sensing*, el cual permite el control fenotípico de la población bacteriana (13).

2.3.1.1. Exoenzimas

P. aeruginosa cuenta con sistemas de secreción que le permiten liberar al medio enzimas que facilitan la colonización de sus huéspedes. Esta bacteria puede producir la proteasa alcalina (AprA) la cual permite contrarrestar la respuesta inmune al degradar proteínas del complemento, al TNF- α y al IFN- γ . Otro grupo de proteasas corresponden a las elastasas A y B (LasA y LasB) que degradan elastina, la cual es un componente importante en la estructura del tejido pulmonar y de los vasos sanguíneos (14).

La proteasa IV interfiere con la inmunidad del huésped al degradar moléculas del complemento, citocinas e inmunoglobulinas, además también es capaz de degradar fibrinógeno, lactoferrina, transferrina, y elastina (15).

La lipasa A es otra enzima extracelular producida por esta bacteria, la cual es capaz de degradar fosfolípidos como la dipalmitoilfosfatidilcolina la cual es el principal surfactante presente en los pulmones (14).

2.3.1.2 Toxinas

Las exotoxinas ExoS, ExoT y ExoU son inyectadas al huésped celular mediante el sistema de secreción tipo III (16).

ExoS y ExoT son toxinas bifuncionales que tienen actividad de GTPasa y de transferasa de ribosil-difosfatoadenosina. Estas toxinas participan en la disrupción del citoesqueleto de actina del huésped y de esa manera interfieren con la adhesión celular, e inducen apoptosis en las células del huésped. ExoU, en cambio, es una potente fosfolipasa que causa muerte celular necrótica rápidamente (17).

En contraparte, la exotoxina A es liberada al medio por el sistema de secreción tipo II; dicha enzima es capaz de inhibir la síntesis de proteínas del hospedero al catalizar la ADP-ribosilación del factor de elongación (EF-2) e inducir de esta manera la muerte celular programada (18).

2.3.1.3. Pigmentos

La pioverdina es un pigmento fluorescente que se libera al medio y que actúa como sideróforo, es decir, que participa en la captura del hierro (Fe^{3+} principalmente) de la transferrina y la lactoferrina para promover el crecimiento bacteriano (19).

La piocianina es un metabolito secundario azulado de la familia de las fenazinas que posee actividad rédox, la cual induce estrés oxidativo en las células del huésped, lo que contribuye a la citotoxicidad ejercida por *P. aeruginosa* (20).

2.3.1.4. Adhesinas

Las adhesinas le confieren la capacidad a la bacteria de adherirse a superficies bióticas o abióticas, y con esto, facilitar la colonización, replicación y obtención de nutrientes. Existen al menos tres diferentes factores de adherencia, el pili tipo IV, el flagelo y el lipopolisacárido (LPS) (12).

El pili tipo IV es fundamental para la adhesión a las células epiteliales del huésped, además participa en la movilidad sobre superficies, en la formación de biopelículas y en la transferencia horizontal del material genético. El flagelo se requiere para la adhesión a mucina, la motilidad y la formación de biopelículas (12).

El LPS está constituido por una fracción lipídica que incluye al lípido A (anclado a la membrana externa) y una fracción de oligosacárido que abarca al núcleo del LPS y al antígeno O. *P. aeruginosa* tiene la capacidad de sintetizar de manera simultánea dos tipos de antígeno O: el antígeno común del polisacárido (CPA), compuesto por un homopolímero de ramnosa, y el antígeno O-específico (OSA), que presenta una estructura más variable entre las diferentes cepas. Además de su función de barrera protectora, favorece la formación de biopelículas mediante la unión a superficies celulares específicas (12,73).

Una disrupción de cualquiera de estas estructuras resulta en una disminución de la virulencia (4,12).

2.3.2. Epidemiología

En 2019, de acuerdo con estimaciones realizadas por una publicación en la revista Lancet (21), 1.29 millones de personas murieron debido a la resistencia a los antibióticos. De acuerdo con la OMS, se estima que para 2050 la cifra podría llegar a 10 millones de muertes cada año, además de causar un daño severo a la economía mundial, similar a la crisis global del 2008, afectando primordialmente a los países en vías de desarrollo (22).

Si bien no existen cifras oficiales sobre la incidencia y las tasas de resistencia de *P. aeruginosa* en aislados clínicos en México, existen algunos trabajos que permiten vislumbrar esta situación. De acuerdo con un estudio elaborado por Garza-González en donde se recuperaron aislados clínicos de muestras de aspirado traqueal, lavado alveolar, orina, sangre, líquido cefalorraquídeo y heces de 20 estados en México durante un periodo de seis meses. Se encontró que *P. aeruginosa* fue el tercer bacilo Gram negativo con mayor número de cepas aisladas de las

22493 reportadas, sólo por debajo de *E. coli* y *Klebsiella sp.* Cabe mencionar que del total de cepas donde se detectó resistencia a carbapenémicos, el 40 % correspondió a *P. aeruginosa* (23).

En 2017 *P. aeruginosa* causó un estimado de 32,600 infecciones entre pacientes hospitalizados y 2700 muertes estimadas en Estados Unidos (24).

2.3.3. Resistencia a antibióticos

P. aeruginosa tiene diversos mecanismos mediante los cuales puede resistir la acción de los antibióticos. Los tipos de resistencia se dividen en intrínseca, adquirida y adaptativa (25).

La resistencia intrínseca se refiere a la habilidad innata que tiene la bacteria para disminuir la eficacia de un antibiótico específico a través de su propia estructura o características funcionales. En el caso de *P. aeruginosa* este tipo de resistencia está dado por la baja permeabilidad de la membrana externa, la presencia de bombas de eflujo que transportan a algunos antibióticos fuera de la célula, y la producción de enzimas que inactivan o degradan al antibiótico (25, 26).

La resistencia adquirida es aquella que se obtiene a través de mutaciones o por transferencia horizontal de genes. Esta resistencia puede causar una disminución en la incorporación de antibióticos al interior de la bacteria, la modificación de los blancos moleculares del antibiótico, la sobreexpresión de bombas de eflujo, o la adquisición de enzimas inactivadoras del antibiótico (25,26).

La resistencia adaptativa incrementa la supervivencia de la bacteria ante los antibióticos debido a cambios en la expresión de proteínas en respuesta a un estímulo ambiental, y es reversible cuando el estímulo es removido. En *P. aeruginosa* el mecanismo que describe este tipo de resistencia es la formación de biopelícula, la cual consiste en un agregado de microorganismos que se adhieren unos a otros sobre superficies bióticas o abióticas, y se encuentran embebidos dentro de una matriz extracelular polimérica que incluye exopolisacáridos, proteínas, metabolitos e inclusive DNA extracelular. Las bacterias que crecen en biopelícula son menos sensibles a los agentes antimicrobianos y a la respuesta inmune del huésped comparado con las células que crecen en suspensión (25).

2.4. Bacteriófagos

Los bacteriófagos o fagos son virus que infectan bacterias, y como cualquier virus, son parásitos intracelulares que requieren la maquinaria del huésped para reproducirse (2). Los fagos en su forma extracelular se denominan viriones y son partículas microscópicas que contienen ácido nucleico rodeado por una cubierta de proteínas denominada cápside, y en algunos casos, otras macromoléculas (2).

Los genomas virales generalmente son pequeños y codifican principalmente para funciones que los virus no pueden adaptar a sus huéspedes. La mayoría de los fagos descubiertos (> 95 %) tienen genomas lineales de DNA doble cadena (dsDNA) empaquetados dentro de una cápside proteínica que contiene una cola. Otros grupos de fagos pueden tener cápsides sin cola con genomas de dsDNA o cápsides sin cola con DNA de una sola hebra (ssDNA) o genomas de RNA (Figura 1) (27).

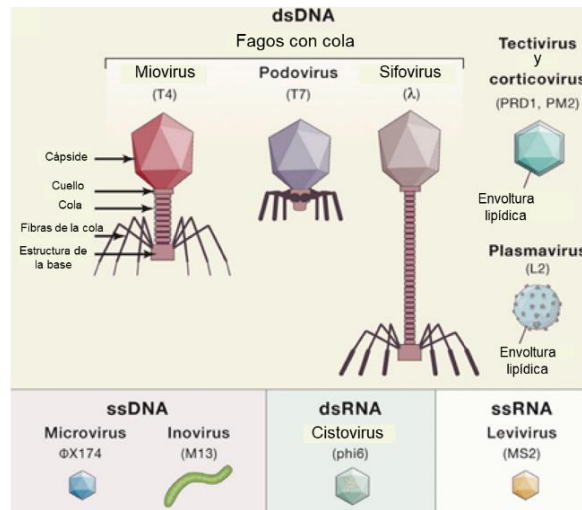


Figura 1. Taxonomía de fagos basada en morfología y composición del genoma. Tomada y modificada de Ofir, G., 2018.

Los fagos son las entidades biológicas más abundantes que existen, y se estima que exceden por diez veces la cantidad de bacterias, además pueden encontrarse en prácticamente cualquier ecosistema, donde desempeñan importantes roles ecológicos. Por ejemplo, además de directamente moldear a las comunidades microbianas a través de matar a las bacterias, participan en la transferencia horizontal de genes entre bacterias (28).

2.4.1. Ciclos de vida

El bacteriófago comienza el proceso de infección con el reconocimiento específico de un receptor localizado sobre la superficie bacteriana, seguido de la inyección de su material genético. Posterior a este paso los fagos pueden tener dos ciclos de vida diferentes dentro de su huésped: el ciclo lítico y el ciclo lisogénico (Figura 2) (28). Los fagos que únicamente pueden establecer un ciclo lítico se denominan virulentos, y aquellos que adicionalmente pueden entrar al ciclo lisogénico se denominan temperados (2).

El ciclo lítico es un ciclo productivo en donde el genoma del fago es inmediatamente replicado y las proteínas de la cápside, de la cola, y las necesarias para la replicación y síntesis proteica son sintetizadas usando la maquinaria celular de la bacteria; después el genoma viral es empaquetado y los viriones ensamblados son liberados tras inducir la lisis bacteriana (28).

El ciclo lisogénico ocurre cuando el genoma del fago es integrado al cromosoma bacteriano para convertirse en un profago y persistir de esta manera en un estado de latencia que no promueve la muerte celular o la producción de viriones. La lisogenia se mantiene por la represión de los genes líticos, y transita a un ciclo lítico cuando determinadas condiciones de estrés celular (como daño a DNA) inducen la escisión del profago del genoma bacteriano, posteriormente se expresan los genes líticos que promueven la replicación del DNA, el ensamblaje de los viriones, el empaquetamiento del DNA y la lisis bacteriana (2, 28).

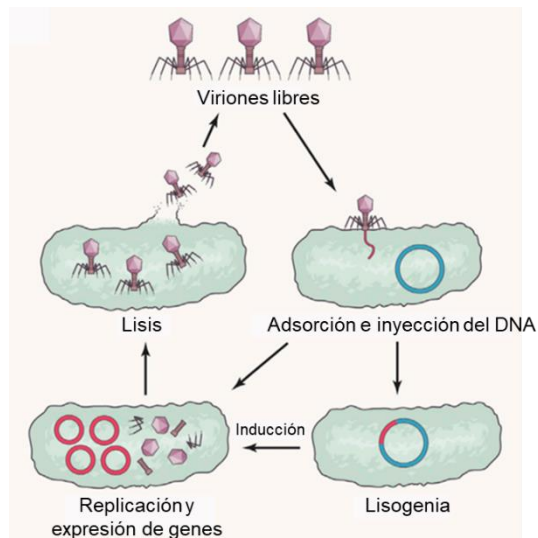


Figura 2. Ciclos de vida de los bacteriófagos. Tomada y modificada de Ofir, G., 2018.

2.5. Fagoterapia

Los bacteriófagos fueron descubiertos de manera independiente por los científicos Frederick Twort y Felix D'Herelle en 1915 y 1917, respectivamente. Sin embargo, D'Herelle se adentró a un estudio más profundo de la biología de estos virus, acuñó el término bacteriófago, y además propuso su posible uso en el tratamiento en infecciones (1).

La fagoterapia se define como la administración de fagos virulentos directamente a un paciente con el propósito de lisar al patógeno bacteriano que está causando una infección clínicamente relevante (1). Los primeros reportes de su efectividad arrojaron resultados prometedores, sin embargo, con el descubrimiento de los antibióticos se perdió el interés por el uso terapéutico de los fagos excepto en algunos lugares del mundo como Georgia (parte de la ex Unión Soviética) y Polonia, donde la fagoterapia continuó desarrollándose. Actualmente, en Georgia se encuentra el Instituto Eliava fundado en 1923, el cual es un referente internacional en el uso de fagos con fines terapéuticos (29).

Es importante recalcar que para la fagoterapia se requieren exclusivamente fagos virulentos debido a que los fagos temperados, al integrarse en el genoma del huésped, no destruyen eficazmente a la bacteria (1) y, además, pueden conceder genes que brinden una ventaja al huésped, como es el caso de toxinas, genes metabólicos o inclusive genes de resistencia a antibióticos (28). Otro punto desfavorable de estos fagos para la terapia es que pueden impedir que otro fago del mismo tipo invada a la misma célula ya que la naturaleza de los represores de los genes líticos es similar (68).

2.5.1. Comparación con los antibióticos

Algunas de las ventajas de la fagoterapia respecto a la terapia antibiótica es la especificidad (1). Los fagos, salvo algunas excepciones (30), presentan un rango muy reducido de huéspedes comparado con los antibióticos, los cuales no distinguen entre los diferentes tipos microbianos.

En este sentido, la fagoterapia requiere de antemano saber cuál es el microorganismo causante de la infección y conocer su susceptibilidad a una colección de fagos. Por dicha razón, la

mayoría de las veces se emplea un coctel de fagos, que consiste en una combinación de fagos virulentos seleccionados de tal manera que la probabilidad de que alguno infecte al patógeno sea elevada (1).

A pesar del bajo número de ensayos clínicos realizados, hasta el momento no se han encontrado efectos adversos graves relacionados con el uso de los fagos, en contraste con los reportes de alergia de algunos individuos a diferentes familias de antibióticos (29).

Se sabe que la administración de fagos estimula la actividad del sistema inmune tanto celular como humoral sin representar una reacción inflamatoria importante (31), sin embargo, es posible que dicha estimulación sea de relevancia en términos de la biodisponibilidad de los fagos administrados (1).

La producción exacerbada de endotoxina debido a la acción de los fagos se ha demostrado en *E. coli* que es menor a la producida por antibióticos beta-lactámicos. (32). En un modelo murino de neumonía se observó, de manera similar, que los efectos inflamatorios asociados a la fagoterapia fueron menores que al emplear antibióticos (33). Sin embargo, en algunos casos clínicos se han presentado sintomatologías asociadas a respuestas inflamatorias de leves a moderadas, las cuales no representaron situaciones críticas y en muchos casos culminaron con el éxito de la terapia (34).

Otra gran ventaja de la fagoterapia es el hecho de que los fagos se encuentran en prácticamente cualquier lugar en el cual pueda haber una bacteria (27), esto hace que las posibilidades de encontrar a un fago capaz de infectar a un patógeno determinado sean muy altas. Además, la capacidad de los fagos de reproducirse de manera exponencial permitiría que una menor dosis pueda ser administrada en comparación con un antibiótico (1).

Una posible desventaja de la terapia de fagos es el hecho de que las bacterias pueden generar resistencia a estos mediante múltiples mecanismos, pero a diferencia de los antibióticos, los fagos pueden evolucionar y volver a re-sensibilizar a las bacterias, aunque la relevancia clínica de esto último aún queda por ser comprobado (35).

A diferencia de la terapia antibiótica, actualmente se cuenta con una pequeña cantidad de ensayos clínicos correctamente diseñados que prueben la efectividad de la fagoterapia. Esta escasez de información, aunado a la dificultad de estandarizar los criterios de dosis, vía de administración y otros factores clínicos importantes a tomar en cuenta, hace que la regulación y los asuntos legales respecto a la propiedad intelectual aún no estén definidos (1).

2.5.2. Casos clínicos exitosos

Si bien existen cócteles de fagos comercializados en Georgia para el tratamiento de algunas infecciones (29), a la fecha los estudios Fase III doble ciego con resultados positivos que hayan probado de manera concluyente la eficacia y seguridad de esta terapia son escasos (36). La falta de resultados positivos radica, en mayor parte, en la metodología experimental establecida por las entidades regulatorias la cual no contempla la alta especificidad de los bacteriófagos, y con ello, a las terapias personalizadas.

En contraste con la idea anterior, el uso de terapias personalizadas de fagos cada vez presenta una mayor cantidad de reportes de éxito en la literatura, tales como los realizados por un consorcio belga de instituciones de salud (37), o la Unidad de fagoterapia en Breslavia, Polonia (38).

Uno de los casos clínicos exitosos con mayor alcance mediático fue el del psicólogo Tom Patterson, el cual al estar de viaje por Egipto con su esposa (Steffanie Strathdee) contrajo una

infección pancreática necrotizante causada por *Acinetobacter baumannii* multirresistente, a la cual los antibióticos suministrados fueron ineficaces para evitar la sepsis (39). Su estado decayó rápidamente, y en un intento desesperado Steffanie S. contactó a grupos que trabajaban con fagos en el Centro de Investigación Médica Naval y la Universidad A y M de Texas en Estados Unidos, los cuales diseñaron un coctel personalizado a partir de la cepa de su esposo. El uso de dicho coctel fue aprobado por la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA), y le fue administrado al paciente por vía intravenosa junto con antibióticos de amplio espectro. Después de 48 horas de tratamiento las señales de mejora fueron evidentes y después de 59 días de tratamiento pudo abandonar el hospital.

Además de la terapia contra *A. baumannii*, se han desarrollado cocteles de fagos exitosos para el tratamiento de *Klebsiella pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis*, *Achromabacter xylosoxidans*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus*, *Salmonella*, *Shigella*, etc (102,103).

A pesar de que en la literatura se presentan cada vez un número creciente de casos clínicos exitosos, también se han reportado fallas en esta terapia principalmente asociadas a una vía de administración errónea, disminución de la biodisponibilidad o purificación inadecuada del coctel de fagos administrado (34).

2.5.3. Resistencia a bacteriófagos

Como ya se ha mencionado anteriormente, las bacterias pueden desarrollar resistencia a la infección por los fagos (35). Existen múltiples mecanismos de resistencia, los cuales se pueden clasificar de manera general como los de inmunidad innata, inmunidad adaptativa y los de dormancia o inducción de la muerte celular programada.

Los de inmunidad innata comprenden mecanismos que no discriminan entre el material genético de los invasores, dentro de este grupo se encuentran los sistemas de restricción - modificación (RM) que usan generalmente a la metilación para distinguir entre el genoma bacteriano y el del invasor (40). La inmunidad adaptativa permite memorizar encuentros previos con agentes infecciosos al incorporar pequeños fragmentos de DNA del invasor en el genoma del huésped, y poder en infecciones posteriores, degradar el material genético del invasor, tal es el caso del sistema CRISPR-Cas (27).

Por último, entre los mecanismos de muerte celular programada o dormancia se encuentran los sistemas de infección abortiva, los cuales son muy variados y se activan por diferentes estímulos (40). Además, pueden inducir un estado de latencia en la bacteria, o bien, la muerte celular, y de esa manera evitan la propagación del fago en la población (40). Aunado a estos, existen otros mecanismos que dependen de la adquisición de mutaciones en los genes que codifican para los receptores del fago en la bacteria, entre otros que aún quedan por ser elucidados (40).

2.5.3.1. Mutación o pérdida de las estructuras que contienen al receptor

De manera teórica cualquier estructura ubicada en la superficie de la bacteria puede ser utilizada como receptor por el fago para reconocer al huésped; se ha reportado la presencia de receptores en el lipopolisacárido, en la cápsula, en el flagelo, en el pili e inclusive en porinas (41).

El principal mecanismo de resistencia que tienen las bacterias ante la infección por un fago es la mutación o pérdida de la estructura que contiene al receptor localizado en la superficie celular (42), (Figura 3). Dichos procesos generalmente se asocian a un costo: la pérdida de adecuación o

fitness bacteriano. (43). Esta pérdida de adecuación bacteriana puede consistir en una disminución de la virulencia, incapacidad de usar determinados nutrientes y/o la re-sensibilización a determinados antibióticos (1).

En clones resistentes a fagos que usan el pili o el LPS como receptores bacterianos se ha reportado una disminución en la capacidad de formación de biopelículas y de la movilidad (1), así también en clones resistentes a fagos flagelotrópicos se ha descrito la pérdida de la movilidad (44). También, se ha reportado que las clones resistentes a fagos cuyo receptor son porinas pueden tener defectos de crecimiento al no ser capaces de asimilar algunos nutrientes o inclusive evitar la captación de micronutrientes como hierro (45).

Otro ejemplo de esta pérdida de *fitness* consiste en la resistencia de *P. aeruginosa* al fago OMKO1 donde las clones resistentes restauran la sensibilidad a antibióticos debido a que éstas dejan de expresar las bombas de eflujo de antibióticos MexAB y MexXY que actúan como receptor del virus (2)(46).

Gordillo, *et.al.* reportó un caso similar (3), donde cepas de *A. baumannii* resistentes a dos fagos cuyos receptores se encontraban en la cápsula, presentaron pérdida de esta estructura, lo que llevó a una disminución de la virulencia *in vitro* e *in vivo*, susceptibilidad al sistema inmune y a la re-sensibilización a algunos antibióticos a los que originalmente eran resistentes.

En resumen, la evolución natural del fago y la bacteria es un fenómeno del cual se puede tomar ventaja durante la terapia, al generar clones con una virulencia atenuada o sensibles a antibióticos. Respecto al último punto se ha propuesto el uso de una terapia combinada de fagos con antibióticos (1).

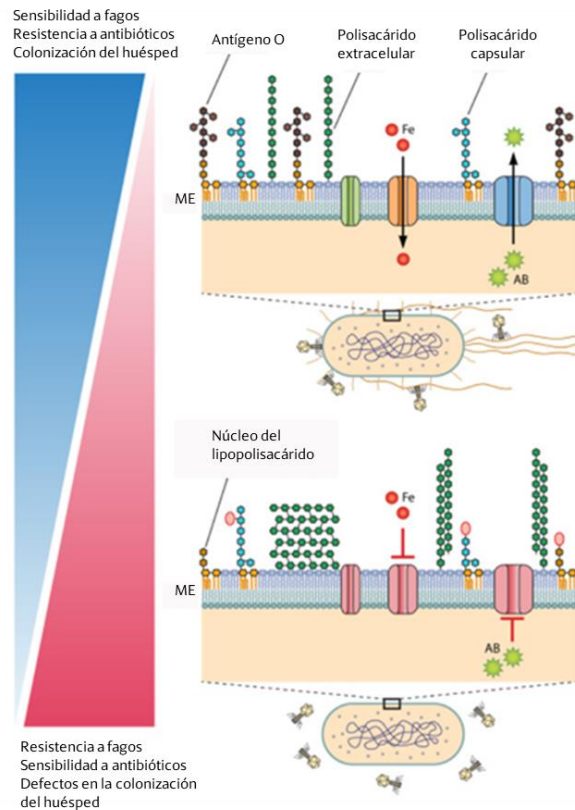


Figura 3. Posibles escenarios de la resistencia a bacteriófagos. ME significa membrana externa y AB antibióticos. Tomada y modificada de Mangalea, M. R., 2020.

3. JUSTIFICACIÓN

Hoy, a menos de un siglo del descubrimiento de los antibióticos, el sistema de salud se enfrenta a la amenaza global de la resistencia microbiana a estas sustancias. Esta situación urge a un desarrollo, estandarización e implementación de nuevas estrategias terapéuticas en contra de agentes infecciosos relevantes en la clínica como *Pseudomonas aeruginosa*, la cual ha sido enlistada por la OMS como una prioridad para llevar a cabo estas tareas.

Una de estas estrategias terapéuticas alternativas es la fagoterapia, la cual consiste en la aplicación de fagos virulentos directamente a un paciente con el propósito de lisar al patógeno bacteriano que está causando una infección clínicamente relevante.

Las bacterias son capaces de generar resistencia en contra de los fagos por múltiples mecanismos, uno de los principales es la mutación o pérdida de la estructura que contiene al receptor del fago localizado en la superficie celular. Una pérdida de estructuras como el pili, flagelo, LPS u otras proteínas de membrana externa se ha documentado puede causar una disminución en la virulencia, y en algunos casos, re-sensibilización a los antibióticos.

Por dicha razón, el presente proyecto además de enfocarse en el aislamiento y caracterización de fagos con potencial terapéutico contra *P. aeruginosa*, también pretende evaluar la virulencia *in vitro* e *in vivo*, y la posible re-sensibilización a los antibióticos de clonas de *P. aeruginosa* resistentes a la infección por los fagos.

4. HIPÓTESIS

Debido a que generalmente la resistencia a los bacteriófagos se asocia a pérdidas del *fitness* bacteriano, se propone que las clonas de *P. aeruginosa* resistentes a los fagos de nuestra colección presentarán una disminución de su virulencia *in vitro* e *in vivo* y se sensibilizarán a los antibióticos.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo General

Determinar si clonas resistentes de *P. aeruginosa* a bacteriófagos con potencial terapéutico presentarán una disminución en su virulencia *in vitro* e *in vivo*.

5.2. Objetivos específicos

- Caracterizar, amplificar y extraer el DNA genómico de una colección de fagos del Centro de Ciencias Genómicas.
- Aislar bacteriófagos de fuentes naturales, caracterizarlos y extraer el DNA genómico.
- Identificar mediante secuenciación fagos líticos con potencial uso terapéutico.
- Obtener y caracterizar clonas de *P. aeruginosa* (PA14 y cepas MDR) resistentes a la infección por fagos.
- Evaluar la producción de pirocianina, actividad caseinolítica, movilidad, formación de biopelículas y sensibilidad a los antibióticos de las clonas resistentes de *P. aeruginosa*.
- Evaluar la virulencia *in vivo* de algunas clonas resistentes empleando a *Galleria mellonella*.

6. METODOLOGÍA

6.1. Cepas utilizadas

Se emplearon las cepas de la Tabla 1. Las cepas PAO1 y PA14 pertenecen a la colección del Dr. Thomas K. Wood de la Universidad Estatal de Pennsylvania, mientras que las cepas clínicas provienen de la colección de la Dra. Rosario Morales Espinosa de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Tabla 1. Cepas empleadas

Cepa	Descripción	Referencia
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	Cepa de referencia	(47)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA14	Cepa de referencia	(48)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> RME 22	Aislados clínicos MDR de pacientes con neumonía de la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) del Hospital de Especialidades Centro Médico Nacional Siglo XXI.	Este trabajo.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> RME 58 (Número de acceso JAVCYI000000000)		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> RME 60		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> RME 66		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> RME 75 (Número de acceso JAVCYJ000000000)		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> RME 101		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> RME 118		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> RME 124		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> RME 125		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA14 $\Delta lasR \Delta rhIR$		
<i>Escherichia coli</i> O157:H7		Unpublished "Bacteriophage AR1 insensitive E. coli O157:H7 mutants"

6.2. Fagos utilizados

El Dr. Daniel Cázares del Centro de Ciencias Genómicas realizó la donación de los fagos líticos PaMx12 y PaMx74, además de ocho muestras que contenían posibles fagos líticos, de las cuales se lograron aislar los fagos con nomenclatura DCL presentes en la Tabla 2. Los demás fagos de la tabla fueron aislados en el presente trabajo. El fago JBD30 fue usado como control en los ensayos de resistencia cruzada, pues es un fago temperado cuyo receptor es el pili tipo IV (50).

Tabla 2. Colección de fagos utilizada en este estudio

Fago	Código	Lugar de aislamiento
PaMx12 (NCBI JQ067088.1)	1	Aguas residuales en Guanajuato, México (51)
PaMx74 (NCBI NC_028809.1)	2	Aguas residuales en Jalisco, México (51)
φDCL-PA9	3	Río contaminado en Ticomán, Ciudad de México
φDCL-PA8	4	Río contaminado en Ticomán, Ciudad de México
φDCL-PA6 (OR436899)	(5/9/10)	Río contaminado en Morelos (Temixco), México
φDCL-PA6α	6	Río contaminado en Morelos (Temixco), México
φDCL-PA4	7	Aguas residuales en Morelos (Cuernavaca), México
φDCL-PA7	8	Río contaminado en Morelos (Temixco), México
FRN1		Río contaminado en Naucalpan, Estado de México
FRN2		Río contaminado en Naucalpan, Estado de México
X		Río contaminado en Xochimilco, Ciudad de México
CE		Muestra de lodo en cerro de La Estrella, Ciudad de México
Acap		Agua de mar en Guerrero (Acapulco), México
Fuentes		Agua del Parque Nacional Fuentes Brotantes, Ciudad de México
Rev		Agua de mar en Guerrero (Acapulco), México
Med		Agua de mar en Baja California Sur (Los Cabos), México.
JBD30 (NCBI JX434032.1)		Profago de cepas ambientales de <i>P. aeruginosa</i> .

6.3. Medios de cultivo

Para el crecimiento de *P. aeruginosa* se preparó medio de cultivo LB en diferentes presentaciones disuelto en agua destilada, cuya composición se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 3. Composición del medio LB en g/L

Medio	Caldo LB	Agar LB	Agar suave (top agar)
Extracto de Levadura (DIBICO 3003-E)	5	5	5
Triptona (OXOID CM0087B)	10	10	10
NaCl (Meyer 6855)	10	10	10
Agar (Bioxon 215000)	-	12	5

Los medios se esterilizaron por autoclave durante 20 minutos a 15 libras de presión a 121°C.

Para la prueba de *swarming* (Véase *Ensayo de Movilidad tipo swarming*) se empleó el medio mínimo M8, el cual se preparó a partir de diferentes soluciones stock mostradas en la Tabla 4 usando agua destilada. En la Tabla 5 se indica la composición del medio M8.

Tabla 4. Soluciones stock para la elaboración de medio mínimo M8

Componente	Reactivo g/L
Sales M8 5X	30 g Na ₂ HPO ₄ (Meyer 2405)
	15 g KH ₂ PO ₄ (Meyer 6575)
	2.5 g NaCl (Meyer 6855)
Casaminoácidos 20%	100 g casaminoácidos (Bacto™ 223050)
MgSO ₄ 1M	120.4 g MgSO ₄ (Meyer 1605)
Glucosa 20 %	100 g glucosa (Sigma G8270)
Solución de Agar	5 g agar en 800 mL (Bioxon 215000)

Los diferentes componentes del medio M8 fueron esterilizados por separado durante 20 minutos a 15 libras de presión a 121°C a excepción de la solución de glucosa la cual se esterilizó por filtración empleando filtros de 0.22 µm (Millex SLGV033RB).

Tabla 5. Composición del medio M8 a partir de las soluciones stock

Componente	Composición para 1 L
Solución de Agar	800 mL
Sales M8 5X	200 mL
MgSO ₄ 1M	1 mL
Glucosa 20 %	10 mL
Casaminoácidos 20%	25 mL

Una vez esterilizados, los componentes fueron añadidos secuencialmente y en agitación sobre la solución de agar y al alcanzar una temperatura de aproximadamente 55°C el medio fue vertido sobre placas con pozos de 3 mL (Corning™ 3506) y se dejó secar a temperatura ambiente por 40 minutos.

6.4. Elaboración de precultivos

Las cepas almacenadas en glicerol al 15% y en ultracongelación se estriaron por agotamiento en agar LB y se incubaron a 37 °C en incubadora estática (Shaker Luzeren®) por 24 horas. Se prepararon cultivos de una noche, por lo que se inoculó una colonia aislada en 3 mL de medio LB y se incubó de 12 a 20 horas a 37 °C en agitación a 200 r.p.m. Después, se midió la D.O. (600 nm) del cultivo, y con base en el resultado, se calculó el volumen necesario para preparar 5 mL de un cultivo en caldo LB a una D.O. (600 nm) inicial de 0.05. Finalmente, se incubó de 3 a 4 horas a 37 °C y 200 r.p.m. hasta llegar a un valor de D.O. entre 0.5 y 0.7.

6.5. Determinación del rango de hospedero (Spot test)

Se mezclaron 100 µl del precultivo de la cepa a probar con 4 mL de agar LB suave (0.5 %) previamente derretido y a una temperatura aproximada de 45 °C. Se homogenizó con ayuda de un vórtex y el contenido fue vertido sobre una caja de agar LB.

Una vez solidificado, se gotearon 5 µL de cada suspensión de fagos sobre la capa de doble agar, se dejó absorber, y se incubó de 12 a 20 horas a 37 °C en incubadora estática. Se inspeccionaron las cajas en busca de zonas claras de lisis y se registró el resultado con fotografía.

Se determinó que un huésped es sensible a un fago cuando se observe una zona clara de lisis; ligeramente sensible cuando se aprecia una disminución en la densidad del cultivo sin observar una zona clara de lisis; y resistente cuando no se observe señal de lisis.

Para la determinación preliminar del rango de huéspedes se emplearon 5 μ L del stock (título no conocido). Sin embargo, para la determinación final del rango de huéspedes se gotearon 5 μ L de una solución con al menos 10^8 UFP/mL (3).

6.6. Amplificación de fagos

A 10 mL de un precultivo del huésped bacteriano a una D.O. (600 nm) de 0.5 con 1mM de $MgSO_4$ (Meyer 1605) y $CaCl_2$ (Meyer 5800) se adicionó el stock de fagos a amplificar ($\sim 10^8$ UFP/mL) a una MOI (multiplicidad de infección) de 0.1-1 (la MOI es la relación entre la cantidad de fagos respecto a la de bacterias). En caso de no contar con dicho título se podrá añadir la cantidad disponible, o bien, con ayuda de una punta de pipeta estéril se puede tocar una UFP aislada del fago que se desee amplificar y agitar ligeramente dentro del precultivo.

En caso de que la MOI se encuentre entre 0.1 y 1 se dejó en incubación a 37 °C con agitación (200 r.p.m.) por 6 horas, en caso de que sea menor, se dejó incubar durante 24 horas en esas mismas condiciones. Después, el cultivo fue centrifugado a 11 800 r.p.m. por 5 minutos para eliminar los remanentes de bacterias y restos celulares, dicho procedimiento fue repetido hasta no observar sedimento. Por último, el sobrenadante se filtró con filtros de 0.22 μ m (Millex SLGV033RB), y se depositó en un tubo de vidrio estéril con tapa.

6.7. Estimación del título de fagos

Se realizaron diluciones decimales seriadas a partir de un stock de fagos usando solución salina estéril (0.9 %) y se gotearon 5 μ L de cada una de ellas en una caja con doble agar de LB que contenga al huésped indicado (de acuerdo con la metodología 6.5).

Una vez absorbidas las gotas, la placa se incubó 24 horas a 37 °C en incubadora estática. Se inspeccionaron las cajas en busca de la dilución donde se observarán unidades formadoras de placa (UFP) contables para estimar el título del stock de fagos.

6.8. Aislamiento de Unidades Formadoras de Placa (UFP)

Una vez estimada la dilución del bacteriófago donde se observan UFP contables, se mezclaron 100 μ L de un precultivo a una D.O. (600 nm) de 0.5 a 0.7, 4 mL de agar LB suave (0.5 %) previamente derretido (45 °C aproximadamente) y 5 μ L de la dilución de fago antes mencionada. Se homogenizó con vórtex y el contenido fue vertido en una caja con agar LB. La placa se incubó 24 horas a 37 °C en incubadora estática. Al inspeccionar la caja es posible observar la morfología de las placas líticas.

6.9. Purificación de fagos por estriado

A partir de una UFP aislada se realizó un estriado por agotamiento sobre una caja de agar LB usando puntas para micropipeta, cambiando de punta en cada trazo del estriado (Figura 4). Por otra parte, se mezclaron 100 μ L del precultivo de la respectiva cepa huésped a una D.O. (600 nm) de 0.5 a 0.7 con 4 mL de agar LB suave (0.5 %) previamente derretido y a una temperatura de 45 °C aproximadamente. Se homogenizó con ayuda de un vórtex, el contenido fue vertido lentamente sobre

la caja del estriado con ayuda de una pipeta y se dejó solidificar. Al inspeccionar la caja es posible observar UFP aisladas, las cuales pueden someterse al mismo procedimiento, o bien, amplificarse.



Figura 4. Técnica de estriado en la purificación de bacteriófagos.

6.10. Aislamiento de bacteriófagos

Se centrifugó 1 mL de una muestra de agua a 11 800 r.p.m. por 5 minutos (Corning LSE), los sobrenadantes se filtraron con filtros de 0.22 μm (Millex SLGV033RB) y se añadieron a un precultivo del huésped de interés que contenía 1mM de MgSO_4 y 1mM CaCl_2 y cuya D.O. (600 nm) fuera de 0.5. El precultivo se incubó 24 horas a 37 °C y a 200 r.p.m.

Una vez transcurrido el lapso, el cultivo fue centrifugado a 11 800 r.p.m. por 5 minutos para eliminar los remanentes de bacterias y restos celulares, dicho procedimiento fue repetido hasta no observar sedimento. Por último, el sobrenadante se filtró con filtros de 0.22 μm , y el filtrado fue depositado en un tubo de vidrio estéril con tapa.

De haber fagos en la muestra de agua, el filtrado contendrá una mezcla de los fagos que infectan al huésped de amplificación, por lo que debe purificarse.

6.11. Aislamiento de clonas resistentes a la infección por el fago

Se realizó un tapiz bacteriano, para el cual se mezclaron 100 μl del precultivo de interés a una D.O. (600 nm) de 0.5 con 4 mL de agar LB suave (0.5 %) previamente derretido y a una temperatura de 45 °C. Se homogenizó con vórtex, el contenido fue vertido sobre una caja de agar LB y se dejó solidificar.

Una vez solidificado, se gotearon 25 μL del stock del fago purificado (Título > 10^8 UFP /mL), se dejó evaporar y se incubó a 37 °C por una noche (3). Se seleccionaron las UFC aisladas que hayan crecido dentro de la zona de lisis y se estriaron en una caja de agar LB, se incubó a 37 °C durante la noche y al siguiente día se repitió el estriado.

A partir de una UFC aislada del último estriado se realizaron precultivos en caldo LB, de los cuales 800 μl se mezclaron con 400 μl de glicerol estéril al 50 % en un tubo de taparroca estéril. Los tubos se almacenaron a -70 °C. La resistencia de las clonas aisladas fue verificada mediante curvas de crecimiento y ensayos de resistencia cruzada. La representación gráfica de la metodología anterior se encuentra en la Figura 5.

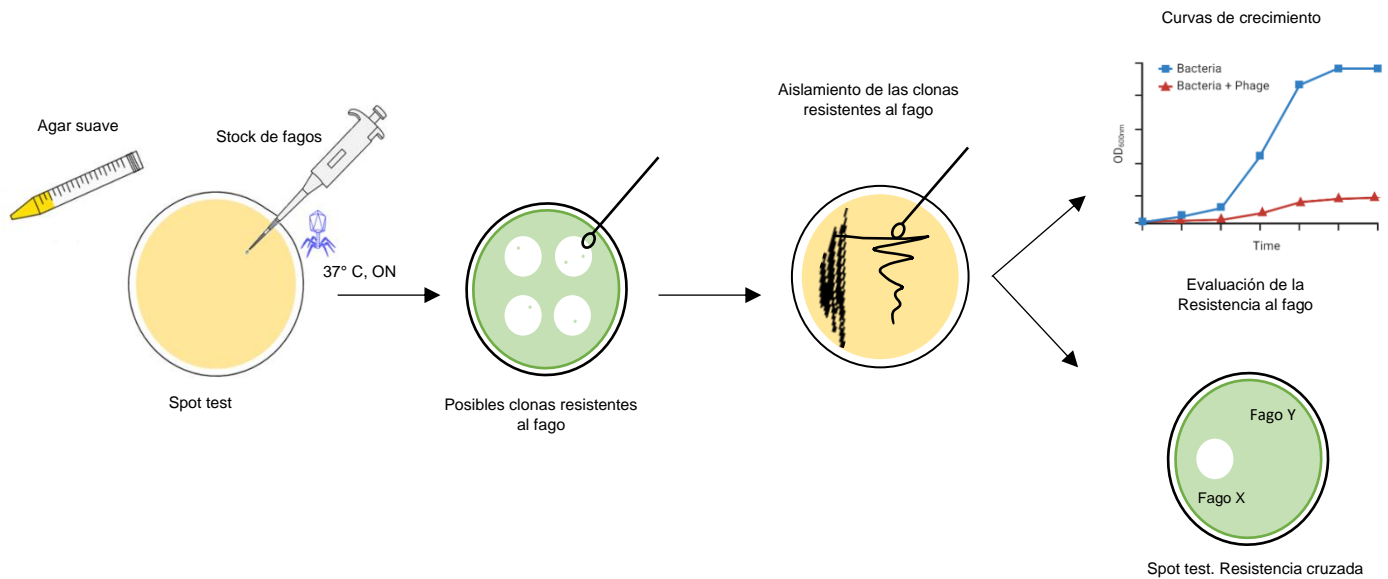


Figura 5. Procedimiento para el aislamiento de clones resistentes a la infección por fagos.

6.12. Curvas de crecimiento

En placas de 48 pozos (Corning™ 3548) se colocaron 500 µL de un precultivo de *P. aeruginosa* crecido en LB a una D.O. (600 nm) de 0.2. Posteriormente, en caso de requerirse, se agregó una determinada cantidad de bacteriófago a la proporción requerida por el experimento. La placa se colocó en el lector VÍCTOR® Nivo™ con agitación orbital a 600 r.p.m. y a 37 °C tomando lecturas cada 30 minutos por 10 horas.

6.13. Extracción y secuenciación de DNA de bacteriófagos y bacterias

Para la extracción del DNA viral se colocó 1 mL de un stock de fagos purificado con un título de al menos 10^{10} UFP/mL (52) en un tubo eppendorf con 111 µL de buffer DNasa I 10 x (100 mM Tris HCl pH 7.5, 25 mM MgCl₂, y 5 mM CaCl₂), 1.5 µL de RNAsa I (Thermo Scientific™ EN0601) (30 µg/mL) y 3 µL de DNAsa I (Thermo Scientific™ EN0521) (30 µg/mL) para degradar los ácidos nucleicos contaminantes, y se incubó por una noche a 37 °C. Después, se incubó a 65 °C por 15 minutos para inactivar a las enzimas.

Se transfirieron 330 µL del lisado a un tubo nuevo y se añadió 1.0 mL de acetona (Meyer 0025) fría. Se homogenizó con el vórtex por 2 minutos para precipitar las proteínas del medio y se centrifugó a 10 400 r.p.m. por 2 min. Se decantó el sobrenadante y sobre el botón de proteínas precipitadas se repitió el proceso hasta terminar el mililitro de stock de fagos empleado. Finalmente se dejó evaporar la acetona residual a temperatura ambiente. El pellet se resuspendió en el buffer de elución del Kit de extracción de DNA Miniprep plus kit, de BiAYS BioAdvanced Systems® y se siguieron las indicaciones del fabricante para la extracción del DNA. El material genético se eluyó usando 50 µL de agua libre de nucleasas a 70 °C. El DNA se almacenó a -20 °C.

En cambio, el DNA genómico bacteriano se obtuvo a partir de cultivos de una noche crecidos en medio LB usando el kit de extracción de DNeasy UltraClean Microbial Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Este último procedimiento se llevó en el laboratorio del Dr. Toshinari Maeda del Instituto de Tecnología Kyushu, Japón. La pureza y concentración del DNA fue determinada mediante el uso del NanoDrop (ND-1000 Spectrophotometer), y la integridad se verificó tras correr un gel de agarosa al 0.8 % a 100 V y teñirlo con bromuro de etidio.

En colaboración con la Dra. Clara Estela Díaz de la FES-Iztacala y el Dr. Toshinari Maeda se realizaron las librerías de secuenciación de las muestras de DNA usando el kit Nextera XT DNA Sample Prep con adaptadores TruSeq HT (Illumina, San Diego CA, USA) para su identificación, y también se realizó la secuenciación de las librerías usando la tecnología MiSeq de Illumina. Los datos se procesaron usando el programa Trimmomatic v.0.39 program (53).

6.14. Análisis Bioinformático de la secuenciación

Una vez obtenidos los archivos FastQC de los genomas virales y bacterianos se realizó el control de calidad de las secuencias. Para esto, se removieron las bases con un nivel de calidad Phred menor a 20, y se recortaron los primeros y los últimos 15 nucleótidos de cada lectura obtenida.

En el caso de los genomas de fagos, el ensamblaje se realizó con el programa SPAdes v3.13.0 (54) usando el tamaño de k-mero propuesto por el software KmerGenie (55) para cada secuencia. Después, el genoma se anotó usando el software DNA Master (56), complementado por la anotación manual usando herramientas de apoyo como Blastp (57) y HHpred (58) para detectar dominios de proteínas. Finalmente, con la herramienta “SnapGene software (www.snapgene.com)” se realizaron los mapas genómicos correspondientes.

Para el caso de los genomas bacterianos, estos fueron ensamblados y anotados usando la plataforma BV-BRC (59). Posteriormente se realizó un análisis de variantes en la misma plataforma, donde se compararon los genomas de las clonas resistentes a los fagos contra el genoma de la cepa PA14 WT en búsqueda de mutaciones.

6.15. Ensayo de Restricción

En un tubo de PCR se colocaron 15 μ L de agua libre de nucleasas, 2 μ L de Buffer Cutsmart, 3 μ L de DNA y 1 μ L de la enzima EcoRI (New England Biolabs R0101S). Se incubó 10 horas a 37 °C y el producto se corrió en un gel de agarosa al 1 %.

6.16. Curvas de adsorción

Se realizó una dilución 1:100 de un cultivo de una noche de la cepa huésped del fago a evaluar en 20 mL de LB con 1 mM de CaCl₂, el cual se dejó crecer en agitación y a 37 °C hasta llegar a una D.O. (600 nm) de 0.2. Posteriormente, a temperatura ambiente y sin agitación se infectó el cultivo con el fago a evaluar a una MOI de 0.01 y se homogenizó brevemente. Después, 1 mL del cultivo se colocó en un tubo eppendorf (previamente preparado con 10 μ L de cloroformo y en hielo), se homogeneizó en vórtex y se colocó nuevamente en hielo. El proceso de muestreo se repitió cada 2 minutos por 20 minutos. El matraz siempre debe permanecer inmóvil sobre la mesa.

Después, las alícuotas fueron centrifugadas a 12 000 r.p.m. por 5 minutos. Finalmente, se realizaron diluciones seriadas de las alícuotas para cuantificar el número de partículas virales.

6.17. Curva de crecimiento “One Step”

Se realizó una dilución 1:100 de un cultivo de una noche de la cepa huésped del fago a evaluar en 10 mL de LB con 1mM de CaCl₂, el cual se dejó crecer en agitación y a 37 °C hasta llegar a una D.O. (600nm) de 0.2. Posteriormente se tomaron dos alícuotas de 1 mL del cultivo bacteriano a las cuales se añadió el fago a evaluar a una MOI de 0.01 y se incubó (sobre la mesa de trabajo y a temperatura ambiente) por el tiempo de adsorción que fue determinado en el experimento anterior.

El tiempo de adsorción determinado experimentalmente para los fagos ϕ DCL-PA6 y ϕ DCL-PA6 α fue de 10 minutos en ambos casos.

Transcurrido el tiempo de incubación, los tubos se centrifugaron a 8 100 r.p.m. por 10 minutos, se removió el sobrenadante y se resuspendió el contenido en 1 mL de medio LB. Este paso se repitió de nuevo para eliminar los fagos que no se hayan adsorbido a las bacterias.

Después se transfirieron 20 μ L de la suspensión de bacterias con fagos adsorbidos a un matraz con 20 mL, se mezcló perfectamente, y se incubó a 37 °C en agitación por 70 minutos. A partir de este punto y cada 10 minutos se tomaron alícuotas de 1 mL y se depositaron en tubos eppendorf en hielo. Finalmente, se realizaron diluciones seriadas de las alícuotas para cuantificar el número de partículas virales.

El *burst size* fue determinado como el cociente del número de fagos libres en la meseta final de la curva entre el número de fagos de la meseta inicial (60).

6.18. Microscopía electrónica

El stock de fagos líticos fue precipitado a 3500 r.p.m. por 40 minutos a 4 °C y resuspendidos en buffer SM (0.1 M NaCl, 1 mM MgSO₄, 0.2 M Tris-HCl, pH 7.5) (61). Finalmente, las soluciones de fagos fueron teñidas negativamente con acetato de uranilo (1 %) antes de ser analizados por microscopía electrónica de transmisión con un JEOL JEM-1011. Esto se realizó en colaboración con la Dra. María del Mar Tomás Carmona del Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña.

6.19. Evaluación de la producción de piocianina

Se centrifugó 1 mL de un cultivo de una noche de la bacteria a evaluar a 13 100 r.p.m. por un minuto, se adicionaron 400 μ L del sobrenadante en tubos cónicos de 1.5 mL con 210 μ L de cloroformo (Meyer 1050); cada tubo se mezcló en vórtex por 1 minuto. Los tubos se centrifugaron 5 minutos a 13 100 r.p.m. y 150 μ L de la fase orgánica (parte inferior del tubo) se depositó en otro tubo con 400 μ L de HCl 0.1 N. Se mezcló en vórtex por 1 minuto y se volvieron a centrifugar los tubos a 13 100 r.p.m. por 1 minuto. Finalmente, se midió la densidad óptica de la fase acuosa (parte superior del tubo) a 492 nm en el lector de placas VÍCTOR® Nivo™. A partir de los valores de absorbancia se determinó la concentración de piocianina usando el coeficiente de extinción molar de 17.072 L mol⁻¹ cm⁻¹ (62). Los resultados se reportaron como el cociente de la concentración de piocianina entre la D.O. a 600 nm (crecimiento bacteriano). Se realizaron tres réplicas biológicas, cada una por triplicado.

6.20. Evaluación de la actividad caseinolítica

Se centrifugó a 13 000 r.p.m. por un minuto 1 mL de un cultivo de una noche de la cepa a evaluar. En un pozo de una placa de 96 pozos se adicionaron 5 μ L del sobrenadante obtenido con 100 μ L de la solución sustrato (azocaseína 1.25 % disuelta en buffer de proteasa (Tris base 20 mM, CaCl₂ 1 mM, pH 8.0 ajustado con HCl concentrado), se homogenizó levemente y se incubó a 37 °C por 40 minutos en condiciones estáticas.

Pasado el tiempo, se colocaron en tubos eppendorf de 1.5 mL 50 μ L del contenido del pozo y 200 μ L de HNO₃ al 1 %, se homogeneizaron en vórtex y se centrifugaron por 5 minutos a 13 000 r.p.m. Se mezclaron 50 μ L del sobrenadante obtenido y 150 μ L de NaOH al 0.5 % en una placa de 96 pozos y, finalmente, se midió la densidad óptica a 405 nm en el equipo VÍCTOR® Nivo™ Los

resultados se reportaron como el cociente entre la D.O. a 405 nm entre la D.O. a 600 nm (crecimiento bacteriano). Se realizaron tres réplicas biológicas, cada una por triplicado.

6.21. Evaluación de la formación de biopelícula

Se inocularon placas de 48 pozos estériles con cultivos de una noche de las cepas a evaluar en medio LB, a manera de que el volumen final fuera 500 μ L y D.O. inicial del cultivo fuera de 0.2. Los pozos de los extremos laterales que solo contenían medio LB sirvieron como control negativo (Figura 6). La placa se incubó en condiciones estáticas a 37 °C por 24 horas.

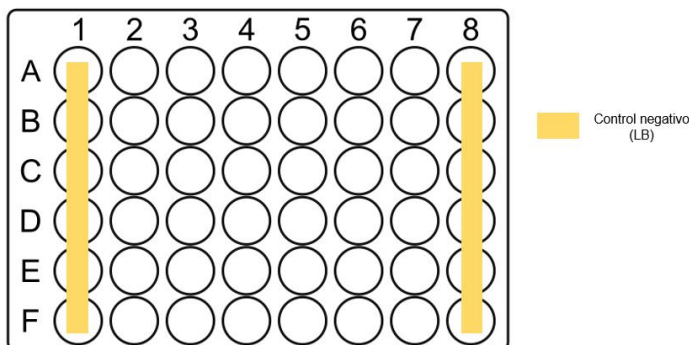


Figura 6. Placa de 48 pozos para la evaluación de la formación de biopelículas.

Después, se midió el crecimiento bacteriano de cada uno de los pozos a 600 nm. De manera cuidadosa se retiró el sobrenadante, se realizaron dos lavados con agua destilada y sobre papel absorbente se retiró el exceso de agua. Las biopelículas fueron fijadas con metanol absoluto durante 20 minutos, se retiró y se dejó evaporar. Se añadieron 600 μ L de cristal violeta al 1.0 % a cada pozo y se incubó la placa por 40 minutos a temperatura ambiente. El cristal violeta fue retirado, se realizaron dos lavados secuenciales con agua destilada para eliminar el cristal violeta excedente y se secó la placa con ayuda de papel absorbente. Se añadieron 600 μ L de etanol al 96 % para disolver el cristal violeta adherido a las biopelículas y se dejó incubar por 20 minutos. Finalmente se midió la absorbancia a 570 nm. Los resultados se reportaron como el cociente entre la D.O. de biopelícula a 570 nm sobre la D.O. a 600 nm (crecimiento bacteriano). Se realizaron tres réplicas biológicas, cada una por triplicado.

6.22. Ensayo de movilidad tipo *swarming*

Se centrifugaron a 13 100 r.p.m. por cinco minutos 500 μ L de cultivos de una noche de las cepas a evaluar. Posteriormente, el botón de células fue lavado por duplicado con agua destilada estéril y finalmente fue disuelto en 500 μ L de agua destilada. A partir de esta suspensión de células se realizó una solución con una densidad óptica inicial de 0.08.

Sobre el medio M8 depositado sobre las placas con pozos de 3 mL, se inoculó en el centro de cada pozo 2.5 μ L de la respectiva cepa a evaluar sumergiendo ligeramente la punta dentro del agar. Se dejó evaporar, se incubó a 37 °C por 24 horas en condiciones estáticas y se tomó fotografía del fenotipo observado.

Los datos se reportaron como el porcentaje de área cubierta por la bacteria respecto al área total de la placa. Para esto se empleó el software de Image J y los datos se procesaron tal como se indica en la referencia 63. Se realizaron tres réplicas biológicas, cada una por triplicado.

6.23. Antibiogramas

Las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI) fueron determinadas empleando el método de microdilución (VITEK®) usando antibióticos relevantes en el tratamiento de *P. aeruginosa* (amikacina, ceftazidima, ciprofloxacino, colistina, gentamicina, levofloxacino, meropenem, y piperacilina/tazobactam) a concentraciones que van de los 0.062 a 64 µg/mL para todos los antibióticos exceptuando a piperacilina/tazobactam (0.125/4 - 128/4 µg/mL). Los procedimientos experimentales y los valores de CMI fueron determinados de acuerdo con las recomendaciones del CLSI (64).

Los datos se reportaron como un mapa de calor del cambio logarítmico en base 2 de la concentración mínima inhibitoria de las clonas a evaluar respecto a las cepas nativas.

6.24. Ensayo de virulencia *in vivo* con *Galleria mellonella*

Se seleccionaron larvas de *Galleria mellonella* de tamaño homogéneo con un peso de al menos 26 mg, las cuales fueron infectadas con 20 µL de una suspensión bacteriana de 10³ UFC/mL (~20 UFC/larva) empleando una jeringa de 1 mL. Las larvas infectadas fueron incubadas 5 días a 37 °C, y cada 24 horas se tomó registro de su condición de viva o muerta. Cada experimento se realizó en al menos 20 larvas. El control positivo consistió en la respectiva cepa nativa de *P. aeruginosa* (PA14, RME58 o RME75), mientras que, como control negativo las larvas fueron inoculadas con solución salina.

7. RESULTADOS

7.1. Determinación preliminar del rango de huéspedes de las muestras de fago donadas

Se determinó el rango de infección preliminar de las 10 muestras de fago donadas por nuestro colaborador del Centro de Ciencias Genómicas contra las cepas de referencia PAO1 y PA14, esto con la finalidad de purificar y amplificar los fagos ahí presentes. Cabe destacar que las muestras rotuladas como 1 y 2 corresponden a los fagos líticos PaMx12 y PaMx74 (Tabla 6), mientras que el resto (3–10) corresponden a fagos no caracterizados, algunos obtenidos de diferentes regiones de un mismo sitio, por lo que es posible que algunas muestras contengan más de un fago o el mismo fago.

A continuación, se presentan las fotografías de las placas, donde cada número corresponde a una muestra diferente y (-) corresponde al control negativo que fue solución salina estéril.

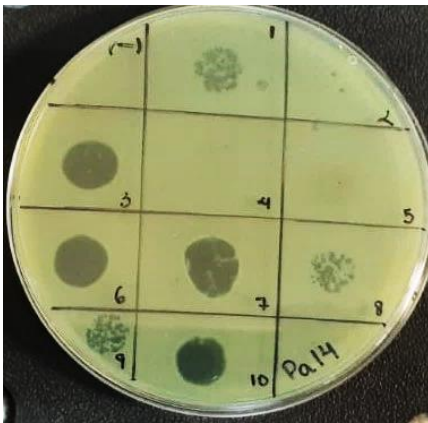


Figura 7. Spot test para la cepa PA14. Sensible a las muestras 1, 2, 3, 6, 7, 8, 9, 10. Ligeramente sensible al fago 5.

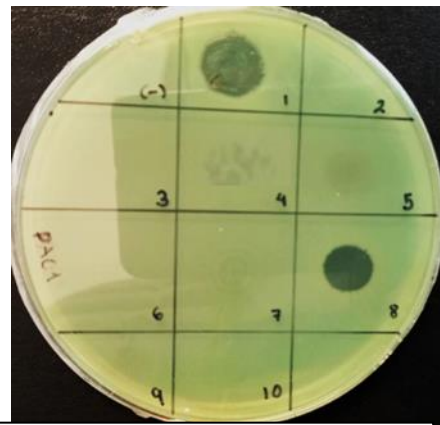


Figura 8. Spot test para la cepa PAO1. Sensible a fagos 1 y 8. Ligeramente sensible a los fagos 4 y 5.

A partir de los resultados anteriores se elaboró la Tabla 6 que resume el rango de infección preliminar de la colección de fagos.

Tabla 6. Rango de huéspedes preliminar de la colección de fagos donada.

Muestra	PAO1	PA14
1	S	S
2	R	S
3	R	S
4	LS	R
5	LS	LS
6	R	S
7	R	S
8	S	S
9	R	S
10	R	S

 Sensible	 Ligeramente sensible	 Resistente
--	--	--

De acuerdo con los resultados de la tabla 6, las muestras de fago pueden purificarse y amplificarse usando alguna de las cepas de referencia. Una vez que se obtenga un stock de fagos purificados con un título de al menos 10^8 UFP/mL se evaluará el rango de huéspedes usando una colección de cepas MDR de *P. aeruginosa*.

Debido a que la cantidad de fago era escasa, las muestras se amplificaron usando los huéspedes determinados anteriormente para el posterior aislamiento de placas y purificación.

7.2. Purificación de las muestras de fago donadas

Se realizó la purificación de la colección de fagos donados. Se aislaron unidades formadoras de placa (UFP) para cada uno de los posibles fagos, en algunas muestras como en la 7 y 9 se observó una diferencia entre las morfologías de las placas lo que indicaba una posible contaminación con otro fago (Figura 9). En estos casos, por conveniencia, se decidió únicamente continuar con la purificación de las placas de mayor tamaño.

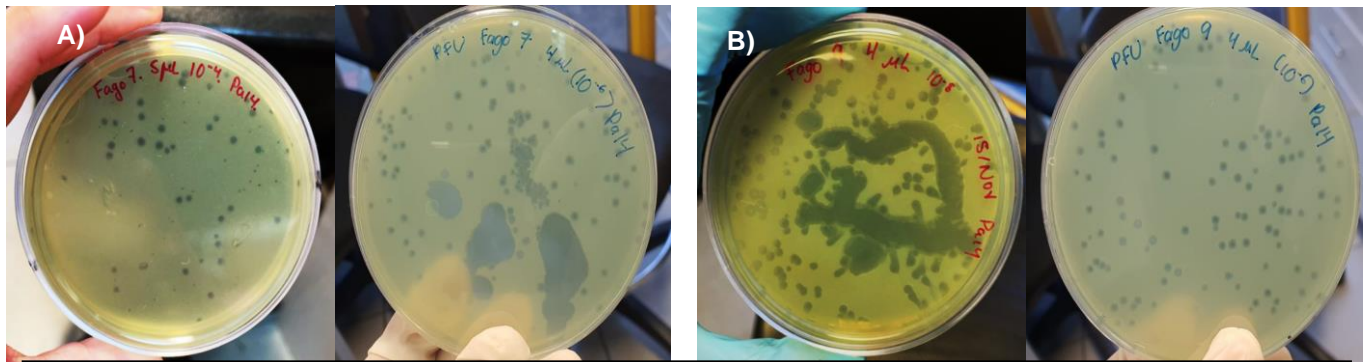


Figura 9. Morfologías de las muestras de fago 7 (A) y 9 (B) antes (izquierda) y después (derecha) de la purificación por estriado. Se observa que después de la purificación solo hay un solo tipo de morfología de placa lítica.

Se realizó la purificación del fago como se ejemplifica con la muestra 7 (Figura 10). Dicho procedimiento se llevó a cabo por triplicado, después los fagos fueron amplificados a partir de una UFP aislada. Cabe destacar que todos los fagos, independientemente de que solo se observara un solo tipo de morfología, fueron purificados y posteriormente amplificados.

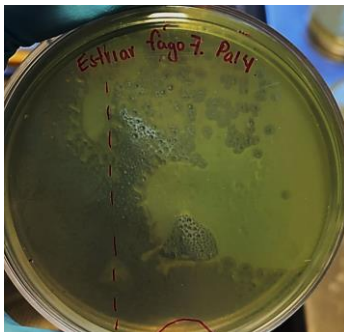


Figura 10. Estriado de la muestra de fago 7 en PA14. Se observan UFP aisladas de las cuales posteriormente se amplificará el stock de fagos purificados.

7.3. Aislamiento de fagos de fuentes naturales

Además de la colección de fagos donada, se aislaron fagos de diferentes muestras de agua provenientes de diferentes sitios de nuestro país. Para cada muestra de agua se empleó un diferente huésped de amplificación (Tabla 7) el cual se fijó de manera arbitraria (Nótese el uso de algunas cepas MDR de *P. aeruginosa*).

Tabla 7. Bacteriófagos aislados de fuentes naturales.

Muestra de agua	Fago(s) obtenidos	Huésped de Amplificación
Río Hondo en Naucalpan, Estado de México	FRN1	PAO1
	FRN2	
Canales de Xochimilco, CDMX	Fago X	RME 101
Playa Caleta en Acapulco, Gro	Fago Acap	PAO1
Parque Nacional Fuentes Brotantes, CDMX	Fago Fuentes	PA14
Cerro de La Estrella, CDMX	FCE	RME125
Playa Médano en Los Cabos, BCS	Fago Med	PAO1
Playa Revolcadero en Acapulco, Gro	Fago Rev	PAO1

Una vez que se verificó que la muestra de agua contenía fagos capaces de infectar a las cepas con las que se amplificaron, se procedió a aislar UFP con la finalidad de observar diferentes morfologías de placas, purificarlas y amplificar dichos fagos. A continuación, se muestran las morfologías de las placas halladas de cada una de las muestras de agua.

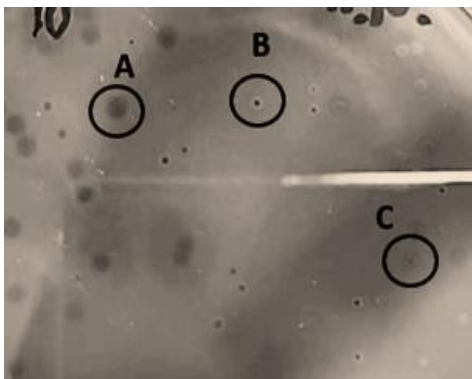


Figura 11. Aislamiento de UFP de la muestra de agua del Río Hondo (Naucalpan, Edo. De México). En el huésped de amplificación (PAO1) se observaron tres morfologías diferentes. Las placas A y B son líticas, sin embargo, la morfología C es característica de fagos temperados por lo que no se seleccionó para análisis posteriores.



Figura 12. Aislamiento de UFP de la muestra de agua de los canales de Xochimilco (Xochimilco, CDMX). En el huésped de amplificación (RME101) se observa una morfología lítica.

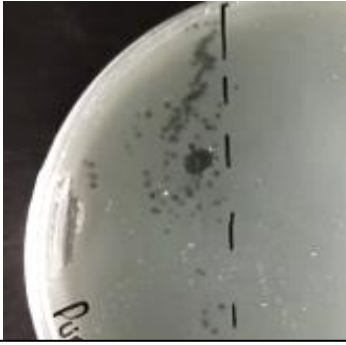


Figura 13. Aislamiento de UFP de la muestra de agua de del cerro de La Estrella (Iztapalapa, CDMX). En el huésped de amplificación (RME125) se observa una morfología lítica.

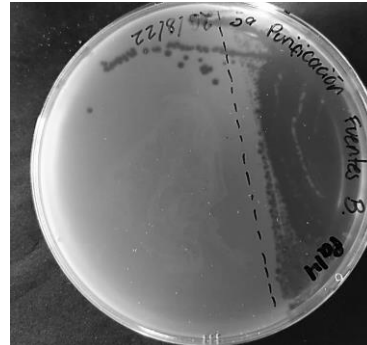


Figura 14. Aislamiento de UFP de la muestra de agua del Parque Nacional Fuentes Brotantes (Tlalpan, CDMX). En el huésped de amplificación (PA14) se observa una morfología lítica.

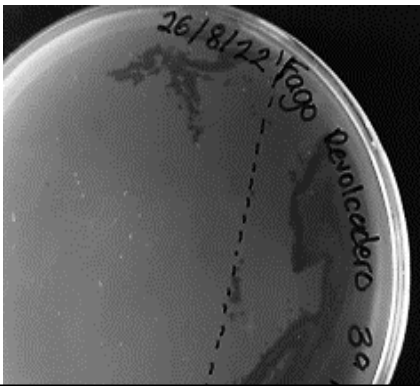


Figura 15. Aislamiento de UFP de la muestra de agua de la playa Revolcadero (Acapulco, Guerrero). En el huésped de amplificación (PAO1) se observa una morfología lítica.



Figura 16. Aislamiento de UFP de la muestra de agua de la playa Caleta (Acapulco, Guerrero). En el huésped de amplificación (PAO1) se observa una morfología lítica.

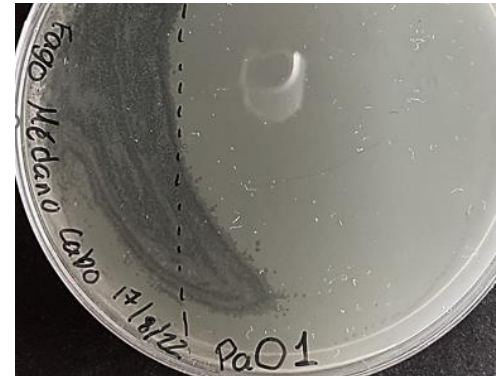


Figura 17. Aislamiento de UFP de la muestra de agua de la playa de Médano (Los Cabos, Baja California Sur). En el huésped de amplificación (PAO1) se observa una morfología lítica.

De la muestra del Río Hondo se seleccionaron dos morfologías diferentes para ser purificadas y amplificadas. La morfología B fue denominada FRN1 y la morfología A fue denominada FRN2. Para las demás muestras de agua solo se encontró una morfología en el huésped de amplificación. El fago de Xochimilco fue denominado Fago X, el de playa Caleta Fago Acap, el del Parque Nacional Fuentes Brotantes Fago Fuentes, el del cerro de la Estrella Fago CE, el de la playa Médano Fago Med y el de la playa Revolcadero Fago Rev.

En todos los casos se seleccionó una placa aislada del último triplicado del proceso de purificación para realizar la amplificación del stock de fagos.

7.4. Amplificación y estimación del título de los stocks de fago purificados

Después de purificar los fagos se procedió a la amplificación de cada uno de los stocks. Cabe destacar que la amplificación se realizó a partir de una UFP, por lo que la MOI fue menor a 0.1. Una vez amplificados y filtrados, se estimó el título de fagos de los nuevos stocks. A continuación, se muestran ejemplos de dicha estimación en algunos de los fagos (Figuras 18 y 19), y la Tabla 8 recopila el título final de cada stock amplificado. Cabe destacar que dicha tabla es dinámica y que conforme se vayan agotando los stocks se deberán amplificar nuevamente.



Figura 18. Screening de diluciones para la amplificación del fago RN2 en PAO1. Se obtuvieron diez UFP en 10^{-7} .

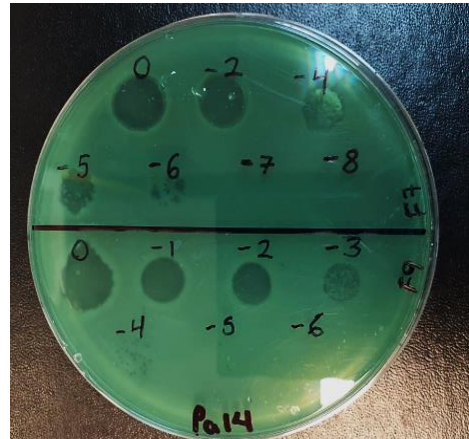


Figura 19. Screening de diluciones para la amplificación de los fagos 7 (parte superior) y fago 9 (parte inferior) en PA14. Se obtuvieron 23 UFP del fago 7 en 10^{-6} y 30 UFP del fago 9 en 10^{-4} .

Se muestra el ejemplo del cálculo para determinar el título del stock del fago RN2 (Figura 18) considerando que se gotearon 5 μ L de cada una de las diluciones.

$$\frac{PFU}{mL} = \frac{10 PFU}{0.005 mL dilución} * \frac{10^7 mL dilución}{1 mL stock} = 2 * 10^{10} \frac{PFU}{mL de stock}$$

Tabla 8. Estimación del título de los stocks amplificados.

Fago	Huésped de Amplificación	Título del fago en UFP/mL
1	PAO1	1.0×10^{10}
2	PA14	1.8×10^9
3	PA14	8.0×10^{10}
4	PAO1	1.0×10^{12}
5	PAO1	5.0×10^9
6	PA14	5.0×10^9
7	PA14	2.6×10^9
8	PAO1	2.0×10^{11}
9	PA14	1.0×10^{10}
10	PA14	1.0×10^{10}
FRN1	PAO1	5.6×10^{11}
FRN2	PAO1	2.0×10^{10}
X	RME101	1.0×10^8
Fuentes	PA14	8.3×10^{10}
CE	RME125	7.0×10^9
Med	PAO1	1.0×10^8
Rev	PAO1	1.0×10^8
Acap	PAO1	1.0×10^8

Una vez realizada la purificación y amplificación, se determinó la morfología de placa de la colección entera de fagos, la cual se puede observar en la Figura 20. A partir de este punto los fagos de la colección adquirieron el código de la muestra a la que pertenecían, por ejemplo, el fago presente en la muestra 3 se denominó Fago 3.

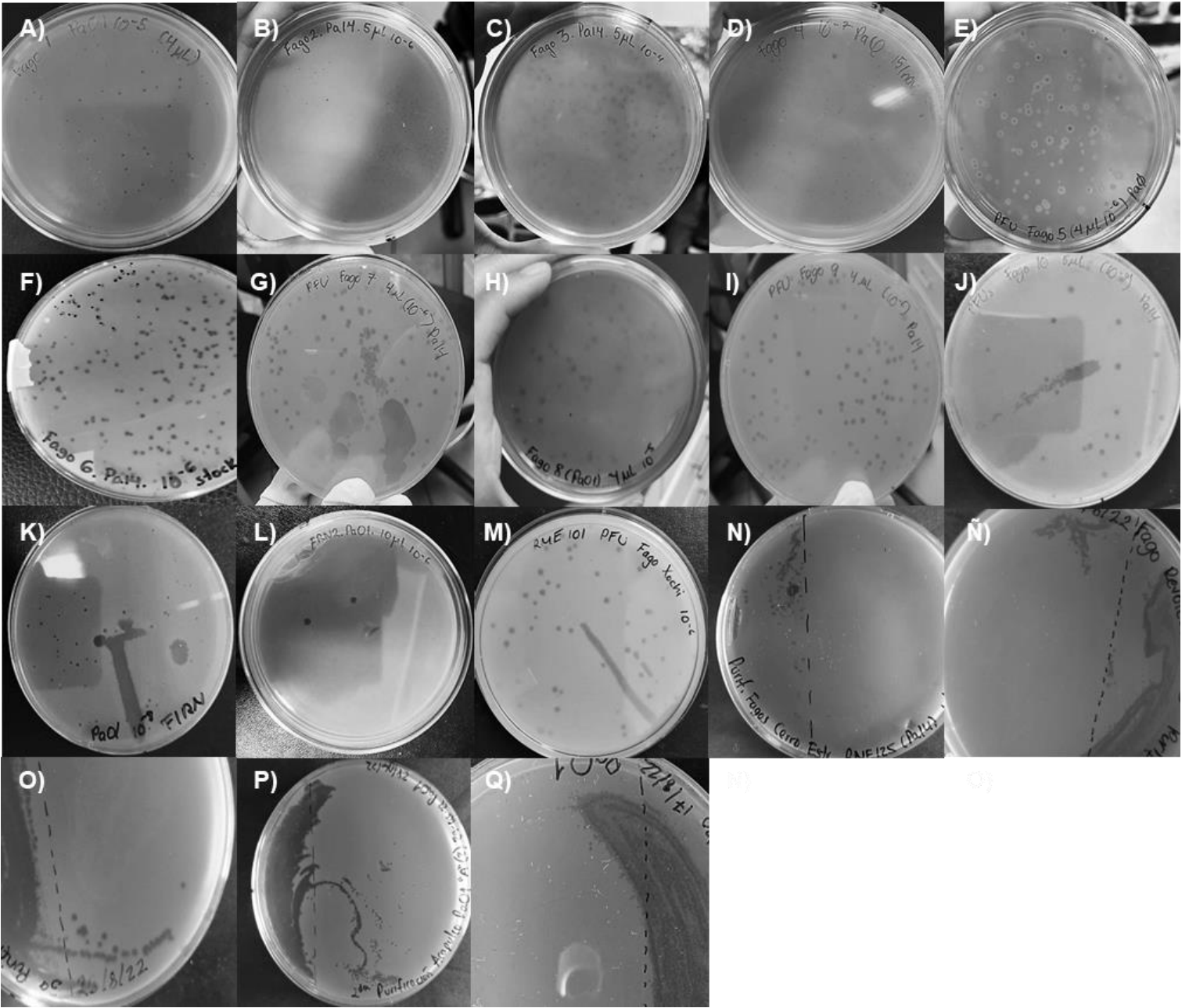


Figura 20. Morfologías de los diferentes stocks de fagos. A) Fago 1 B) Fago 2 C) Fago 3 D) Fago 4 E) Fago 5 F) Fago 6 G) Fago 7 H) Fago 8 I) Fago 9 J) Fago 10 K) Fago FRN1 L) Fago FRN2 M) Fago X N) Fago CE Ñ) Fago Rev O) Fago Fuertes P) Fago Acap Q) Fago Med.

7.5. Determinación del rango de huéspedes de la colección de fagos

Se determinó el rango de huéspedes de la colección de fagos donada y de los fagos que se aislaron usando en cada caso stocks con título de al menos 10^8 UFP/mL. Para esto, se emplearon las cepas de referencia PAO1 y PA14, y las 9 cepas RME. A continuación, se presentan las fotografías de cada una de las placas, donde se indica el código de cada fago usado (Véase 6.2. “Fagos utilizados”) y (-) corresponde a la solución salina estéril usada como control negativo. El fago JBD30 fue usado como control positivo.

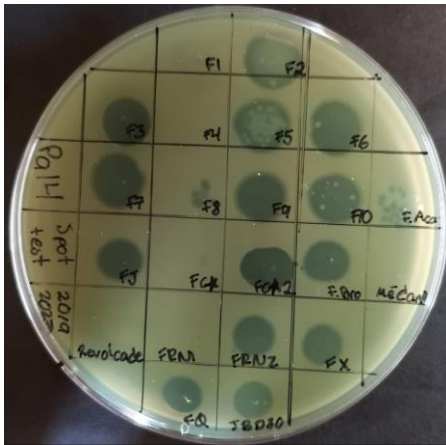


Figura 21. Spot test para la cepa PA14. Resistente a fagos 1, 4, FRN1, Med y Rev. Ligeramente sensible al F8 y Acap. Sensible a los demás.

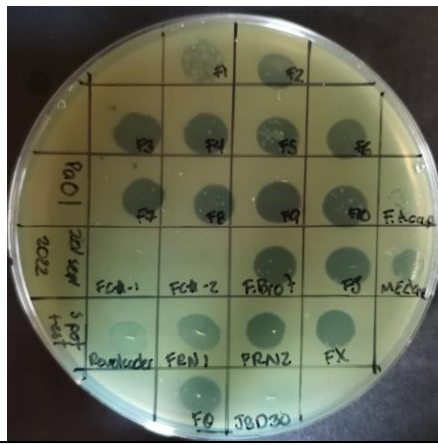
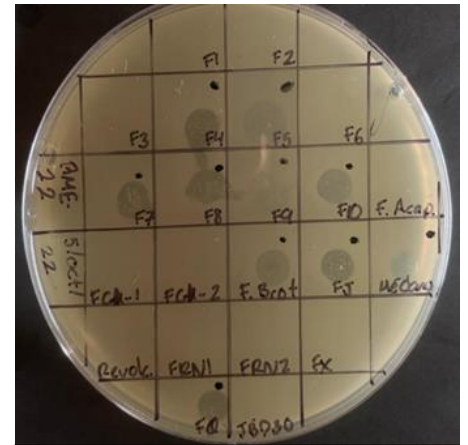


Figura 22. Spot test para la cepa PAO1. Resistente a fago CE. Ligeramente sensible a fago Acap. Sensible a los demás.



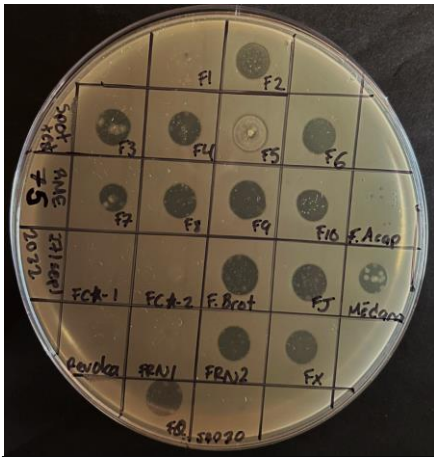


Figura 27. Spot test para la cepa RME 75. Resistente a los fagos CE, Rev y FRN1. Ligeramente sensible a fagos 1 y Acap. Sensible a los demás.



Figura 28. Spot test para la cepa RME 101. Resistente a fago CE y Rev. Ligeramente sensible a fago Acap. Sensible a los demás.

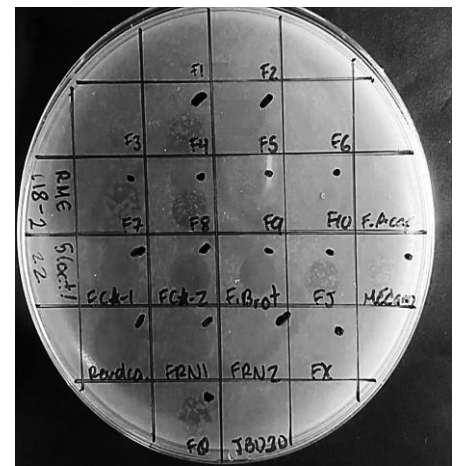


Figura 29. Spot test para la cepa RME 118. Ligeramente sensible a los fagos 5, 9, 10, X. Resistente a los fagos 1, 2, 3, 6, Acap. Sensible a los demás.

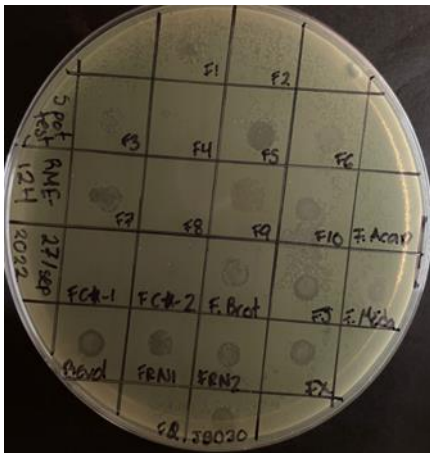


Figura 30. Spot test para la cepa RME 124. Resistente a los fagos 2, 4, 8, CE. Sensible a los demás.

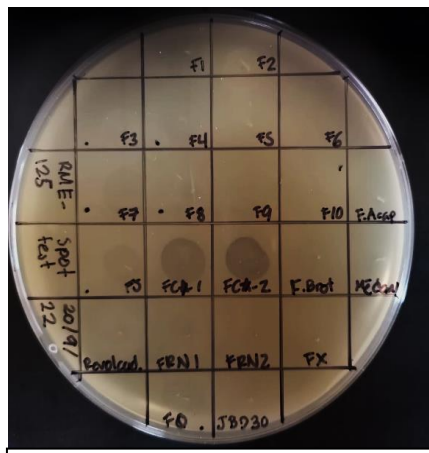


Figura 31. Spot test para la cepa RME 125. Sensible al fago CE. Ligeramente sensible al fago 7. Resistente a los demás.

A partir de los resultados anteriores se elaboró la Tabla 9 que resume el rango de infección de la colección de fagos.

Tabla 9. Rango de infección de la colección de fagos.

Fago	Pa14	Pa01	Cepas MDR de <i>P. aeruginosa</i>								
			RME 22	RME 58	RME 60	RME 66	RME 75	RME 101	RME 118	RME124	RME125
1	R	S	R	R	R	R	LS	S	R	S	R
2	S	S	R	S	R	S	S	S	R	R	R
3	S	S	R	S	LS	S	S	S	R	S	R
4	R	S	S	S	S	LS	S	S	S	R	R
5	S	S	LS	S	LS	S	S	S	LS	S	R
6	S	S	R	S	R	S	S	S	R	S	R
7	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	LS
8	LS	S	S	S	S	R	S	S	S	R	R
9	S	S	LS	S	LS	S	S	S	LS	S	R
10	S	S	S	S	LS	S	S	S	LS	S	R
FRN1	R	S	R	LS	R	R	R	S	S	S	R
FRN2	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	R
FX	S	S	R	S	R	S	S	S	LS	S	R
CE	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S
Md	R	S	S	S	LS	R	S	S	S	S	R
Rev	R	S	R	R	R	R	R	R	S	S	R
Fuentes	S	S	S	S	LS	S	S	S	S	S	R
Acap	LS	LS	R	LS	R	R	LS	LS	R	S	R
JBD30	S	R	R	R	R	R	R	LS	R	S	R

Sensible
 Ligeramente sensible
 Resistente

En comparación con la Tabla 6, se observa que al aumentar el título a 10^8 UFP y purificar los stocks de fagos, todas las cepas son sensibles a al menos un fago de la colección. De manera general las cepas clínicas son infectadas por un número menor de fagos que las cepas de referencia, y existen fagos con un rango de infección similar lo que podría sugerir una mayor relación entre ellos que con el resto de la colección. Además, se observan fagos con capacidad de infectar a una gran cantidad de cepas, lo que los hace posibles candidatos a usar en la terapia.

7.6. Extracción de DNA de bacteriófagos

Se seleccionaron, de acuerdo con los patrones de rango de huéspedes que pueden infectar, los fagos 3, 5, 6, 8, 9, 10, FRN1, y CE de la colección para extraer el DNA genómico y ser secuenciados. En la Figura 32 se muestran los geles de agarosa de los respectivos DNA, en todos los casos se aprecia una banda bien definida de tamaño mayor a 10 kb.

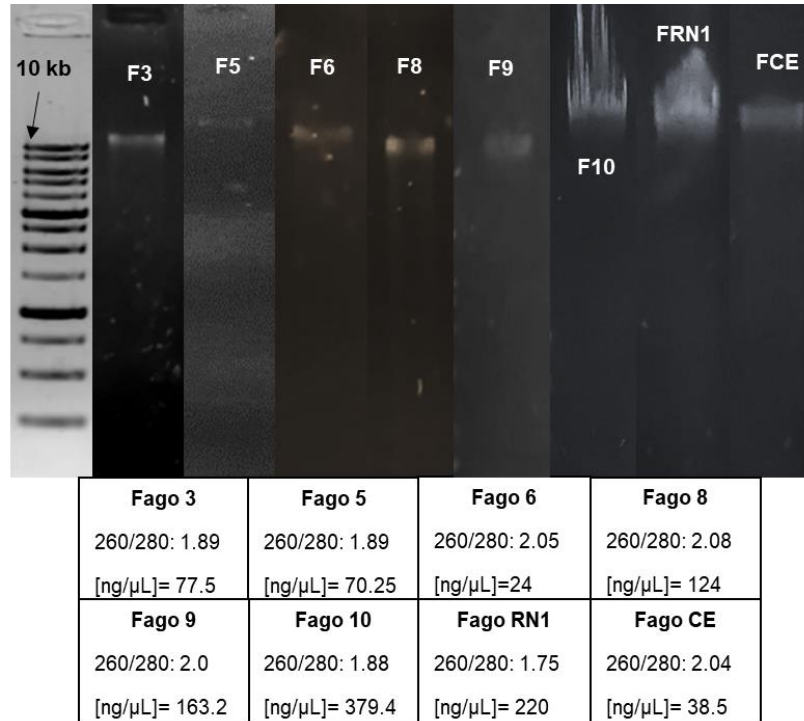


Figura 32. Se observan los geles de integridad (agarosa 0.8 %) de 9 DNAs extraídos. En todos los casos se observa un DNA integro mayor a 10 kb. En el recuadro inferior se presentan los parámetros de pureza y concentración.

Cabe mencionar que, como requisito para poder secuenciar los genomas el DNA extraído necesita al menos un cociente 260nm/280nm de 1.7, una cantidad mínima de 150 ng de DNA total y presentarse como una banda integra en un gel de agarosa. Estos requisitos se cumplen por estas muestras.

7.7. Secuenciación y anotación de los genomas de bacteriófagos

Los fagos 3, 5, 6, 8, 9, 10, FRN1, y CE fueron secuenciados con la finalidad de identificar candidatos a ser usados de manera terapéutica.

En la Tabla 10 se encuentran resumidos los datos obtenidos de la secuenciación que incluyen el número de contigs obtenidos y su cobertura. Este último término representa el número de veces que se ha cubierto una región particular del genoma con lecturas de la secuencia, y se recomienda que sea entre 25X y 100X para el ensamblaje de genomas de bacteriófagos, tal como ocurre en la mayoría de los genomas que se secuenciaron (92, 93).

Se obtuvo 1 contig para todos los fagos, exceptuando el fago 8 donde se obtuvieron 4 contigs y el fago RN1 donde se obtuvieron 521 contigs, por lo que la anotación de este último no fue posible llevarla a cabo. La fragmentación y la baja cobertura de los genomas de los fagos 8 y RN1 es posible que se haya producido por contaminación con fragmentos de genoma bacteriano, la posible contaminación con algún otro fago y/o la presencia de profagos inducidos a bajos niveles (92).

Inesperadamente, los fagos 5, 6, 9 y 10 presentaron la misma secuencia genómica, por lo que se trata del mismo virus. Los cuatro fagos provienen de diferentes muestras obtenidas del mismo lugar (Temixco, Morelos), por lo que es posible que el fago se haya encontrado en todas ellas y, al

seleccionarse únicamente las placas líticas de mayor diámetro para la purificación, solo quedó representado dicho virus. También, no puede descartarse el hecho que dentro del laboratorio el fago repetido haya sido un contaminante de las muestras, que predominó en los stocks finales después de su purificación.

A diferencia de los fagos 5, 9 y 10, el fago 6 tiene un rango de huéspedes diferente (Tabla 9) y cuatro mutaciones en su secuencia genómica, las cuales posiblemente estén relacionadas con el fenómeno anterior.

Fagos Secuenciados	Contigs	Pares de bases del contig principal
Fago 3	1	42324 (Cob. 34)
Fago 6	1	65764 (Cob. 36)
Fago 8	4	21770 (Cob. 12)
Fago CE	1	57966 (Cob. 45)
Fago 5	1	65772 (Cob. 33)
Fago 10	1	65750 (Cob. 40)
Fago 9	1	65768 (Cob. 56)
Fago RN1	521	1867 (Cob. 15)

Tabla 10. Resultados de la secuenciación. Se muestran los contigs ensamblados por fago, el tamaño del contig principal y su respectiva cobertura (Cob.). En color verde se presentan los genomas con secuencia única, en amarillo los genomas repetidos y en rojo el genoma repetido que presentó 4 mutaciones en la secuencia de DNA.

El fago presente en estas cuatro muestras fue denominado ϕ DCL-PA6 y la variante (correspondiente al Fago 6) ϕ DCL-PA6 α , respectivamente. (Véase Tabla 2: “Colección de fagos empleada”)

Una vez realizado el ensamblaje y la anotación del genoma del fago ϕ DCL-PA6 (Figura 33A), se observó que los cuatro cambios de base presentes en el DNA del fago ϕ DCL-PA6 α , constituían un cambio total de dos aminoácidos en la secuencia genómica (Figura 33B). Una de las mutaciones fue silenciosa ya que el cambio de citosina a guanina en la posición 246 del gen que codifica a la proteína del cuello del fago codificó para el mismo aminoácido, mientras que las tres mutaciones restantes fueron de cambio de sentido. Respecto a las mutaciones de cambio de sentido, una se presentó en el gen que codifica para la proteína estructural de la base donde hubo un cambio de guanina por timina en la posición 1109 del gen, y, por tanto, un cambio de glicina por valina en la posición 370 de la proteína. Los dos cambios restantes se presentaron en citosinas adyacentes en la posición 2710 y 2711 por una adenina y una guanina respectivamente, del gen de la proteína de la fibra de la cola, esto se tradujo en un cambio de una prolina por una arginina en la secuencia proteica.

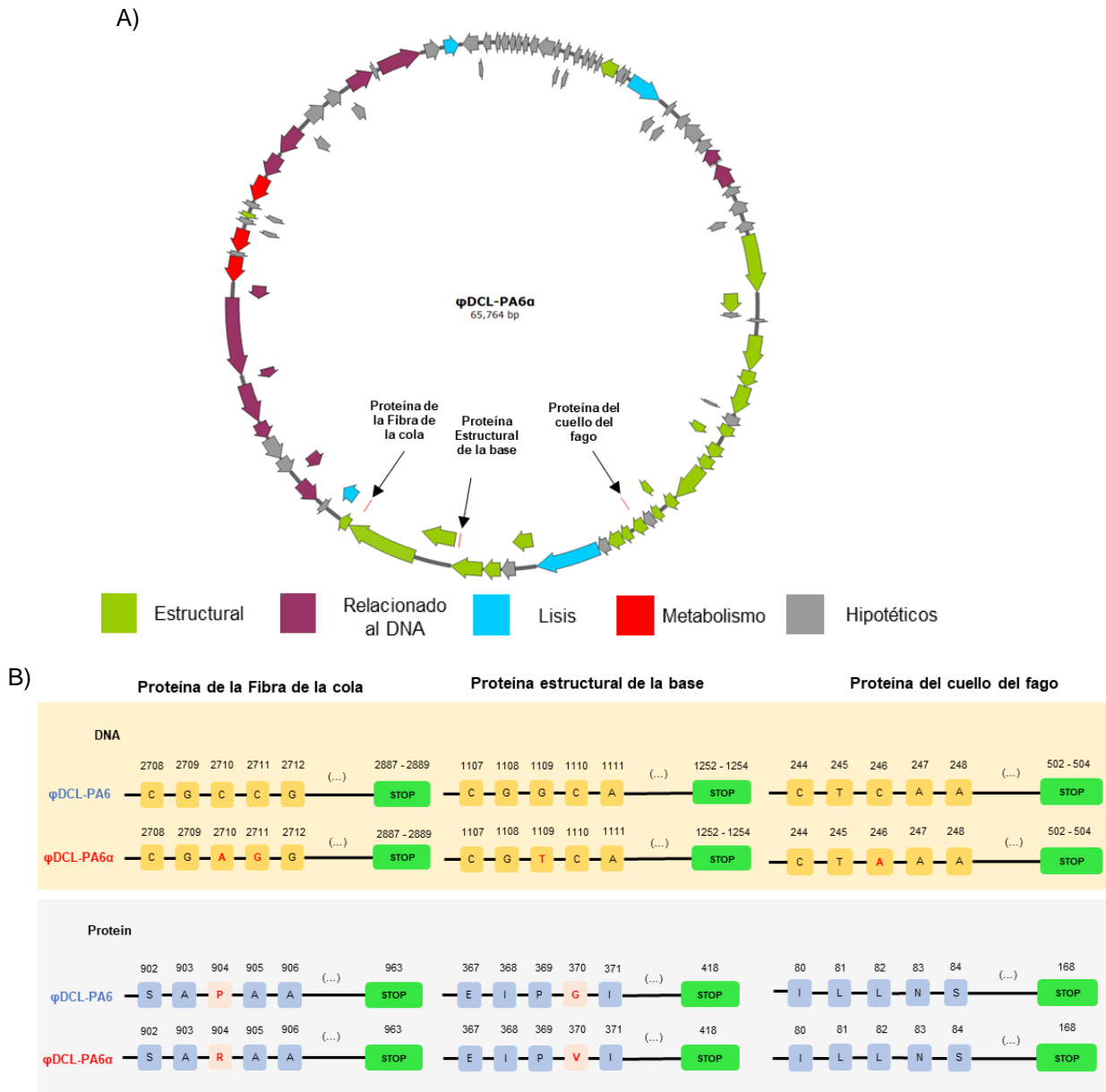


Figura 33. A) Representación gráfica del genoma del fago ϕ DCL-PA6 elaborado con la herramienta SnapGene v6.2.2. Las flechas negras representan las mutaciones puntuales de la variante del fago (ϕ DCL-PA6 α) localizada en tres genes estructurales que corresponden a la proteína de la fibra de la cola, la proteína estructural de la base y la proteína del cuello del fago.

B) Mutaciones identificadas en la variante ϕ DCL-PA6 α . Se presentaron cuatro mutaciones puntuales que llevaron a cambios en dos aminoácidos localizados en la proteína de la fibra de la cola y la proteína estructural de la base. Cada cuadro amarillo representa un nucleótido mientras que cada cuadro azul representa un aminoácido, ambos con su respectiva posición en la parte superior. Los cambios en la secuencia original son representados por cuadros rojos. Los rectángulos verdes representan al codón de paro.

Además de la anotación del fago ϕ DCL-PA6 y su variante, se realizó la de los demás fagos secuenciados (Figura 34).

Para la anotación de todos los bacteriófagos se realizó una clasificación de los genes de acuerdo con su función en genes estructurales, genes con funciones relacionadas al DNA, genes metabólicos, genes de lisis y genes hipotéticos.

Ninguno de estos fagos presentó genes indicativos de un ciclo de vida lisogénico, genes de virulencia, o genes de resistencia a antibióticos, por lo que son candidatos para su uso en la fagoterapia (1).

De los fagos secuenciados, el fago ϕ DCL-PA6 presentó una identidad del 96 % con el fago de *Pseudomonas* vB_PaeM_FBP34, el fago 3 una identidad del 32 % con el fago de *Stenotrophomonas* vB_SM_ytsc_ply2008005c, el fago CE una identidad de 95 % con el fago de *Pseudomonas* Quinobequin-P09 y el fago 8, a pesar de haber presentado 4 contigs, presentó una identidad de más del 95 % con el fago de *Pseudomonas* Steven.

Los fagos con mayor identidad a los fagos 3, 8 y CE pertenecen a la familia *Siphoviridae*, mientras que el de mayor identidad al fago ϕ DCL-PA6 pertenece a la familia *Myoviridae*. Esto último, se corrobora con las observaciones en microscopía electrónica de transmisión (TEM) del fago ϕ DCL-PA6, pues dicho fago presenta una morfología característica de la familia *Myoviridae* (Figuras 39A y 39B).

7.8. Aislamiento de clonas de *P. aeruginosa* PA14 resistentes a los fagos ϕ DCL-PA6 y ϕ DCL-PA6 α

Debido a que la variante ϕ DCL-PA6 α presenta un cambio en su rango de huéspedes (Tabla 9) respecto al fago ϕ DCL-PA6, y aunado al hecho de que estructuras involucradas en el reconocimiento del fago a la bacteria como la proteína de la fibra de la cola se encuentren mutadas, es posible que haya un cambio en la proteína del virus que se une al receptor de la bacteria (65). Cabe destacar que en el caso de *P. aeruginosa* los principales receptores descritos consisten en el lipopolisacárido y el pili tipo IV (66).

Por dicha razón se realizaron los ensayos de resistencia cruzada, estos consisten en aislar clonas bacterianas resistentes a la infección contra un determinado fago, para posteriormente ver el cambio en su perfil de sensibilidad contra una colección de fagos. Como ya se ha mencionado, el principal mecanismo de resistencia que tienen las bacterias ante la infección de bacteriófagos es la mutación o pérdida de las estructuras donde se encuentra el receptor, bajo ese mismo principio, si la clona resistente a determinado fago también adquiere resistencia contra otro fago, es altamente probable que el receptor de ambos fagos se encuentre dentro de la misma estructura bacteriana, en cambio, si dicha clona resistente es sensible contra otro fago es muy probable que sus receptores se encuentren en sitios diferentes.

Con esta finalidad se aislaron dos clonas de *P. aeruginosa* PA14 resistentes al fago ϕ DCL-PA6 (14R1- ϕ DCL-PA6 y 14R2- ϕ DCL-PA6) y dos a su variante ϕ DCL-PA6 α (14R1- ϕ DCL-PA6 α y 14R2- ϕ DCL-PA6 α), la resistencia fue corroborada mediante curvas de crecimiento (Figura 35) y ensayos de goteo (Figura 36). Además, se observó que las clonas resistentes a la variante ϕ DCL-PA6 α son aún sensibles a dicho fago, sin embargo, tienen una mayor resistencia que la cepa silvestre.

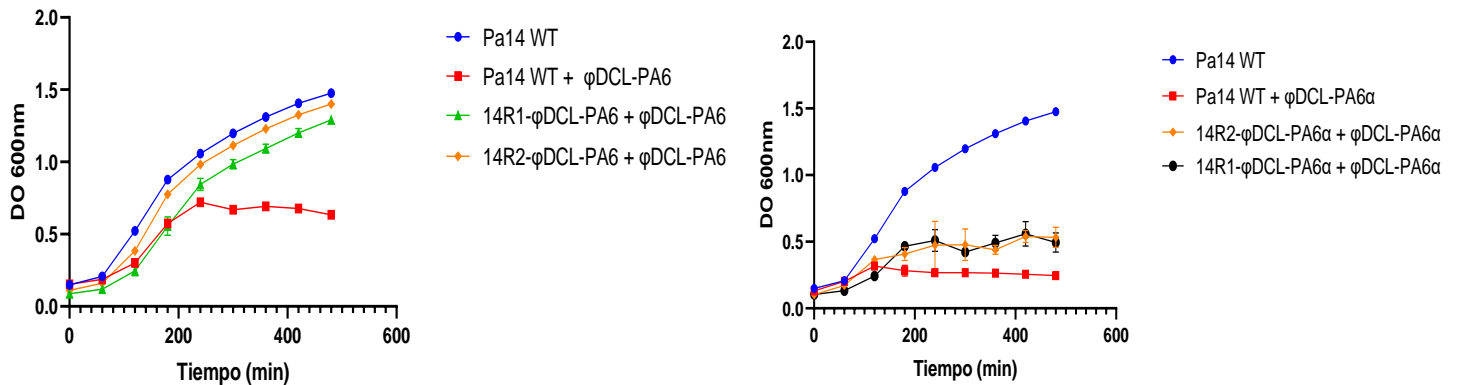


Figura 35. Curvas de crecimiento de las clonas de PA14 resistentes a los fagos ϕ DCL-PA6 y ϕ DCL-PA6 α . La MOI empleada fue de 10.

En los experimentos de resistencia cruzada (Figura 36 y Tabla 11) se observó que la resistencia de las clonas de PA14 al fago ϕ DCL-PA6 (fagos 5/9/10) también dio origen a la resistencia contra los fagos 2, 7, 8, Acap, FRN2 y X. Sin embargo, dichas clonas resistentes permanecieron sensibles a los fagos 3, Fuentes, CE, a la variante ϕ DCL-PA6 α (Fago 6) y al fago JBD30. De estas observaciones se puede deducir que los receptores de los fagos ϕ DCL-PA6 y ϕ DCL-PA6 α son diferentes. El fago JBD30 fue usado como control debido a que ya fue previamente caracterizado y se ha determinado que su receptor es el pili tipo IV. De esta manera puede suponerse que los fagos 2, 7, 8, Acap, FRN2, X y ϕ DCL-PA6 tienen un receptor diferente del pili.

De manera inesperada, los experimentos de resistencia cruzada empleando a las clonas de PA14 resistentes a la variante ϕ DCL-PA6 α permitieron observar que dichas clonas también resultaron resistentes a los fagos 2, 7, 8, Acap, FRN2 y X, sin embargo, también ganaron resistencia adicional al fago Fuentes, y permanecieron sensibles a los fagos 3, CE y JBD30. Esto sugiere que el receptor de la variante ϕ DCL-PA6 α y del fago Fuentes es diferente del pili, y debido a que los fagos 3 y CE comparten el mismo comportamiento que el fago JBD30, es posible que dichos fagos usen como receptor la misma estructura. Además, el hecho que las clonas resistentes al fago ϕ DCL-PA6 α también sean resistentes a los fagos 2, 7, 8, Acap, FRN2 y X es indicativo que la estructura donde se encuentra el receptor de esos fagos sea en la misma donde se encuentra el receptor de los fagos ϕ DCL-PA6 α y Fuentes, aunque en diferente ubicación.

Debido a que en la literatura se ha reportado que la principal estructura que alberga los receptores de fagos en *P. aeruginosa* es el LPS, se planteó la hipótesis de que el receptor de los fagos 2, 7, 8, Acap, FRN2, X, ϕ DCL-PA6, ϕ DCL-PA6 α y Fuentes se encuentran en dicha estructura, sin embargo, ya que las clonas resistentes al fago ϕ DCL-PA6 permanecen sensibles a la infección por los fagos ϕ DCL-PA6 α y Fuentes, es posible que el receptor de esos fagos se encuentren en una región más interna del LPS a diferencia del receptor de los fagos 2, 7, 8, Acap, FRN2, X y ϕ DCL-PA6.

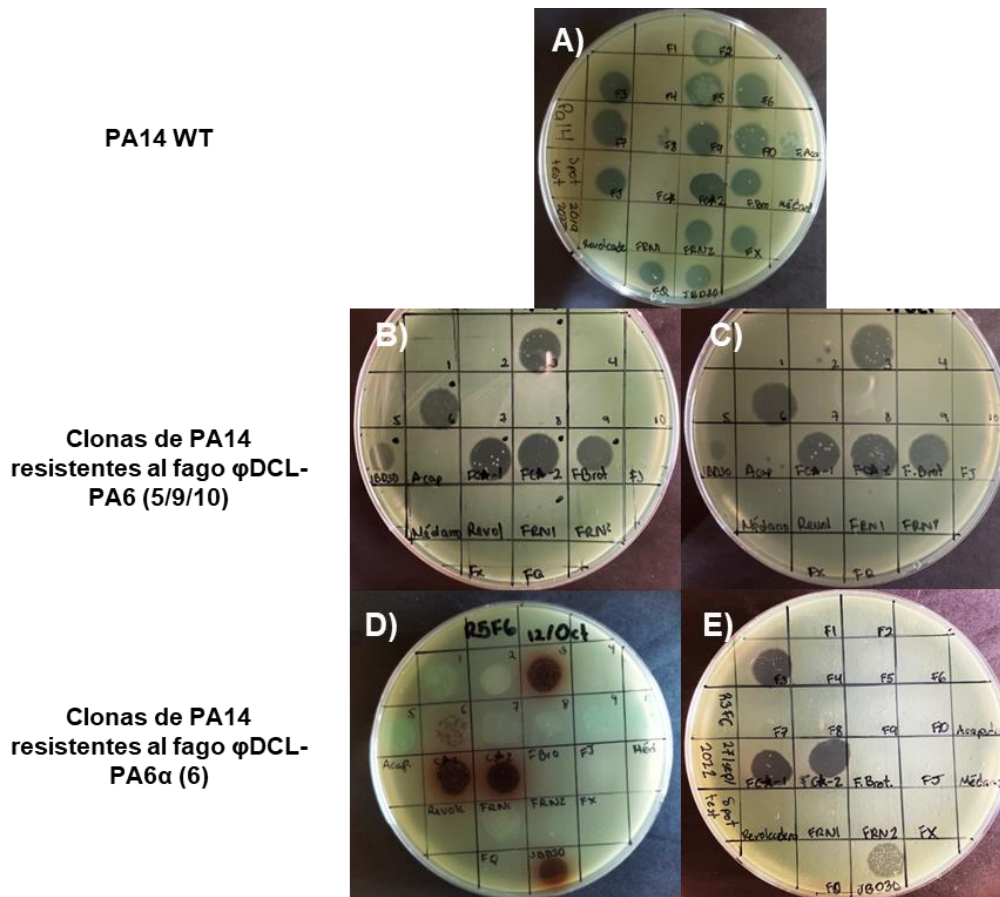


Figura 36. Experimentos de resistencia cruzada. A) Rango de huéspedes de la cepa PA14 WT. Rango de huéspedes de las clonas de PA14 resistentes al fago ϕ DCL-PA6, 14R1- ϕ DCL-PA6(B) y 14R2- ϕ DCL-PA6 (C), respectivamente. Rango de huéspedes de las clonas de PA14 resistentes al fago ϕ DCL-PA6 α , 14R1- ϕ DCL-PA6 α (D) y 14R2- ϕ DCL-PA6 α (E), respectivamente. Las observaciones encontradas se presentan de manera resumida en la Tabla 11. Nótese la producción de piomelanina de algunas clonas resistentes de 14R2- ϕ DCL-PA6 α a los fagos 3, CE y JBD30.

Tabla 11. Experimentos de resistencia cruzada usando clonas de PA14 resistentes a los fagos ϕ DCL-PA6 y su variante ϕ DCL-PA6 α .

Fago	PA14			Fago	PA14		
	WT	14R- ϕ DCL-PA6	14R- ϕ DCL-PA6 α		WT	14R- ϕ DCL-PA6	14R- ϕ DCL-PA6 α
1	Resistente	Resistente	Resistente	FRN1	Resistente	Ligeramente sensible	Resistente
2	Sensible	Ligeramente sensible	Resistente	FRN2	Sensible	Resistente	Resistente
3	Sensible	Sensible	Sensible	CE	Sensible	Sensible	Sensible
4	Resistente	Resistente	Resistente	Med	Resistente	Resistente	Resistente
ϕ DCL-PA6 WT	Sensible	Resistente	Resistente	Rev	Resistente	Resistente	Resistente
ϕ DCL-PA6 α	Sensible	Sensible	Ligeramente sensible	Fuentes	Sensible	Sensible	Resistente
7	Sensible	Resistente	Resistente	Acap	Sensible	Ligeramente sensible	Resistente
8	Ligeramente sensible	Resistente	Resistente	JBD30	Sensible	Sensible	Sensible
X	Sensible	Resistente	Resistente				

Sensible
 Ligeramente sensible
 Resistente

Debido a que hay poca información respecto al cambio de receptor en *P. aeruginosa* asociadas a mutaciones puntuales en el genoma del fago, decidimos corroborar nuestros hallazgos haciendo un ensayo de restricción. Esto con la finalidad de verificar que los genomas repetidos no hayan sido producto de un error en la secuenciación. Para corroborarlo, se extrajo el DNA de los fagos 3, 5 (ϕ DCL-PA6) y 6 (ϕ DCL-PA6 α) que secuenciaron y realizó un ensayo de restricción con la enzima EcoRI. Tal como se aprecia en la Figura 37.A se observa que los fagos 5 (ϕ DCL-PA6) y 6 (ϕ DCL-PA6 α) presentaron el mismo patrón de restricción a diferencia del fago 3, lo que corrobora lo obtenido por la secuenciación.

Además de esto, se procedió a purificar el fago 6 (ϕ DCL-PA6 α) de una placa de lisis obtenida del ensayo de resistencia cruzada (Figura 36.B) donde se observa el fenotipo diferente entre los fagos ϕ DCL-PA6 y su variante, se extrajo el DNA y nuevamente se realizó el ensayo de restricción (Figura 37.B) donde se obtuvo el mismo patrón de restricción entre el fago 6 que se mandó a secuenciar (ϕ DCL-PA6 α) y el fago 6 obtenido del ensayo de resistencia cruzada (ϕ DCL-PA6 α (2)). Estos experimentos confirman que el fago 6 (ϕ DCL-PA6 α), a pesar de tener la misma secuencia de los fagos 5, 9 y 10, presenta un fenotipo diferente debido a las mutaciones antes descritas.

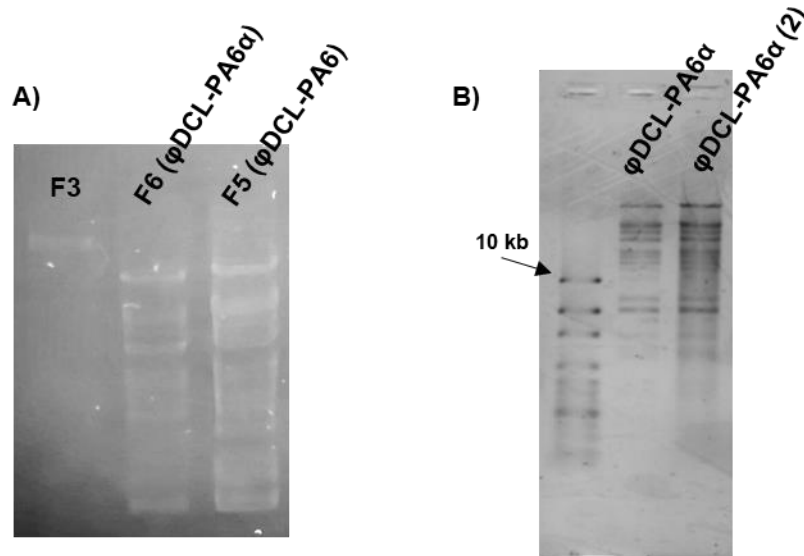


Figura 37. A) Ensayo de restricción de los genomas que se mandaron a secuenciar: el fago 3, el fago 5 (ϕ DCL-PA6) y el fago 6 (ϕ DCL-PA6 α), con la enzima EcoRI. Los fagos 5 y 6 presentan el mismo patrón de restricción, el cual difiere al del fago 3. B) Ensayo de restricción entre el fago 6 que se mandó a secuenciar (ϕ DCL-PA6 α) y el fago 6 recuperado de la zona de lisis de los ensayos de resistencia cruzada (ϕ DCL-PA6 α (2)) (Figura 36.B). En ambos casos se observa el mismo patrón de restricción.

7.9. Mutaciones adquiridas por las clonas de *P. aeruginosa* PA14 resistentes a los fagos ϕ DCL-PA6 y ϕ DCL-PA6 α

Con la finalidad de entender los mecanismos mediante los cuales las clonas aisladas adquirieron resistencia a la infección por los fagos ϕ DCL-PA6 y ϕ DCL-PA6 α , además de corroborar la hipótesis de su posible cambio de receptor, las clonas de PA14 14R1- ϕ DCL-PA6, 14R2- ϕ DCL-PA6, 14R1- ϕ DCL-PA6 α y 14R2- ϕ DCL-PA6 α fueron secuenciadas. Las secuencias de las clonas resistentes antes mencionadas se encuentran depositadas en el NCBI bajo los siguientes números de acceso: 14R1- ϕ DCL-PA6 (JAVCYL000000000), 14R2- ϕ DCL-PA6 (JAVCYM000000000), 14R1- ϕ DCL-PA6 α (JAVCYN000000000) y 14R2- ϕ DCL-PA6 α (JAVCYO000000000).

En la Figura 38 se encuentran resumidas las mutaciones identificadas en las clonas antes mencionadas. Sorprendentemente se observa que las mutaciones de las clonas resistentes al fago ϕ DCL-PA6 se encuentran en el gen *wzzB* que participa en la síntesis del antígeno O, mientras que las mutaciones de las clonas resistentes al fago ϕ DCL-PA6 α se encuentran en el gen *wapH* que interviene en la síntesis del núcleo del LPS. En todos los casos, las mutaciones producen un corrimiento del marco abierto de lectura.

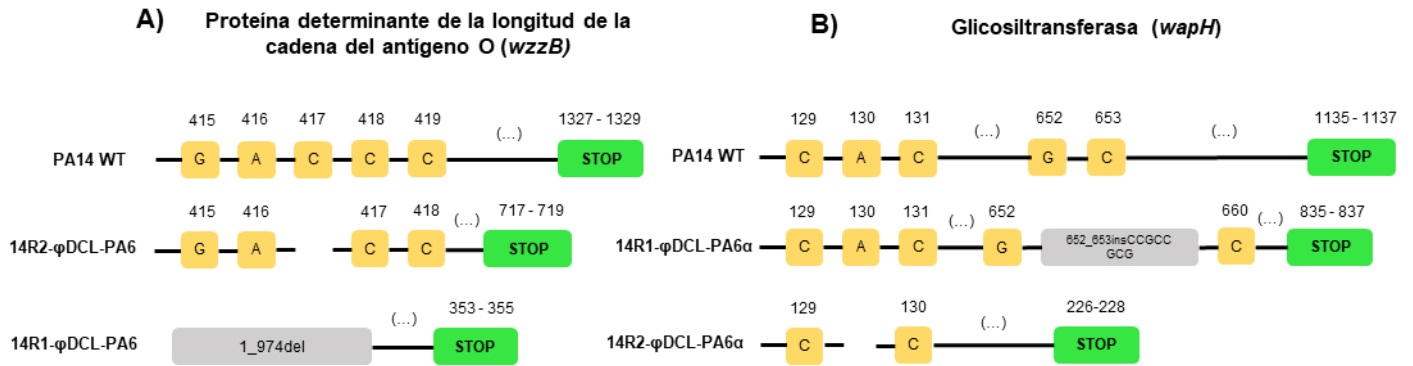


Figura 38. Mutaciones identificadas en las clonas de PA14 resistentes al fago φDCL-PA6 (A) y al fago φDCL-PA6α (B). Las mutaciones de las clonas resistentes al fago φDCL-PA6 están localizadas en el gen *wzzB* que participa en la síntesis del antígeno O, mientras que las mutaciones de las clonas resistentes al fago φDCL-PA6α están localizadas en el gen *wapH* que interviene en la síntesis del núcleo del LPS. Cada recuadro amarillo representa un nucleótido con su respectiva posición en la parte superior. Los espacios en blanco representan deleciones. Los cuadros verdes representan el codón de paro. *Del* significa deleción. *Ins* significa inserción.

Las mutaciones encontradas corroboran la hipótesis de que el receptor de los fagos φDCL-PA6 y su variante φDCL-PA6α es diferente. De acuerdo con el análisis genómico, el receptor del fago φDCL-PA6 se encuentra en el antígeno O del LPS, mientras que el receptor del fago φDCL-PA6α en el núcleo del LPS, lo que concuerda con el análisis de resistencia cruzada.

7.10. Caracterización de los fagos φDCL-PA6 y φDCL-PA6α

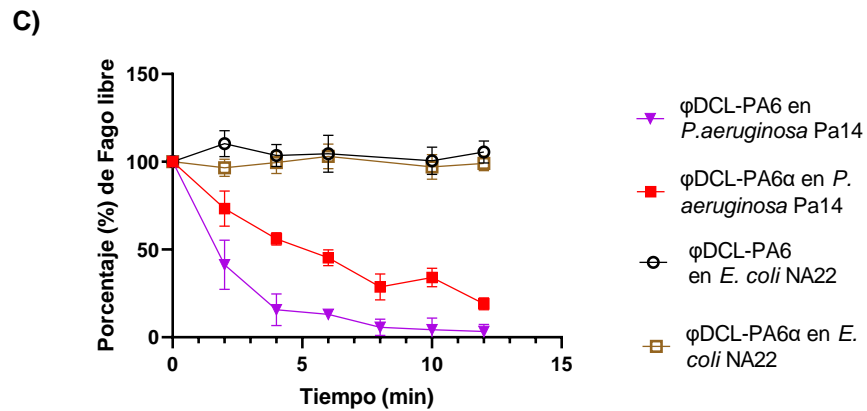
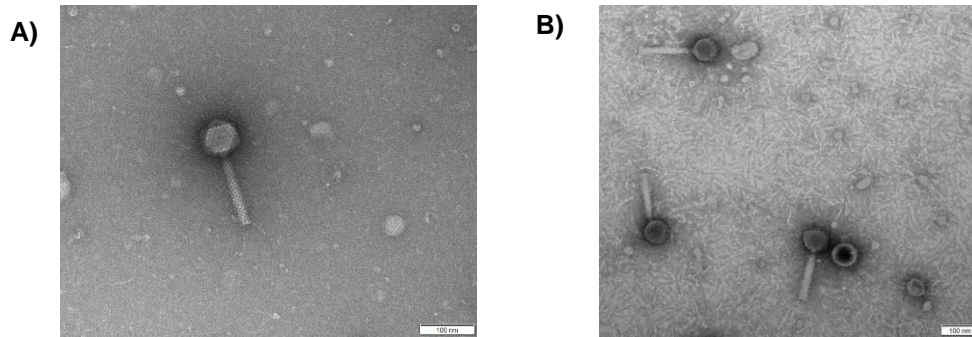
Debido al hallazgo anterior se decidió caracterizar de una manera más profunda a los fagos φDCL-PA6 y φDCL-PA6α. La caracterización involucra las imágenes por TEM, las curvas de adsorción, que indican el tiempo y la eficacia con la que un fago tarda en adherirse a la bacteria, y las curvas de crecimiento “*One-Step*”, que muestran cuánto tiempo tardan en producirse las copias virales una vez que el fago ya se ha adsorbido (tiempo de latencia) y cuántas copias de fago se producen por bacteria infectada (*Burst size*).

En las Figuras 39A y 39B se observan las imágenes por microscopía electrónica de transmisión de los bacteriófagos φDCL-PA6 y φDCL-PA6α, las cuales morfológicamente corresponden a miofagos de acuerdo con la clasificación del Orden *Caudovirales* (27). Esto coincide con que las familias de los fagos con mayor homología a los fagos secuenciados pertenecían a la familia *Myoviridae* como se mencionó anteriormente.

En la Figura 39C se muestran las curvas de adsorción de los fagos φDCL-PA6 y φDCL-PA6α. En dichas curvas se muestra que ambos fagos se adsorben en su huésped bacteriano PA14 a diferencia de la bacteria *Escherichia coli* NA22, además se observa que el fago φDCL-PA6 se adsorbe de manera más eficaz y rápida a la superficie bacteriana a diferencia del fago φDCL-PA6α.

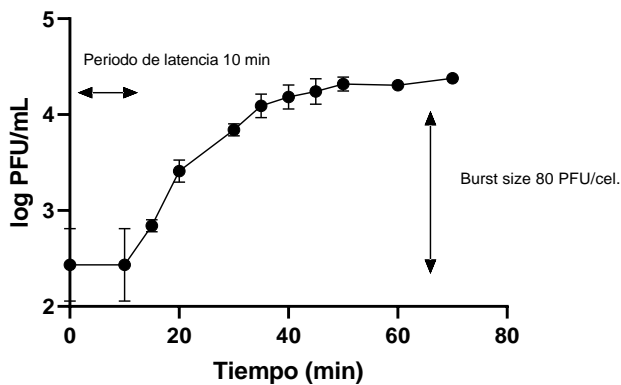
En ambos casos se observa que la máxima adsorción de fago se da a los 10 minutos aproximadamente.

En las Figuras 39D y 39E se muestran las curvas de crecimiento “One-Step” de los fagos ϕ DCL-PA6 y ϕ DCL-PA6 α . Para el fago ϕ DCL-PA6 se obtuvo un periodo de latencia de 10 minutos y un *burst size* de 80 UFP/célula, mientras que para el fago ϕ DCL-PA6 α un periodo de latencia de 20 minutos y un *burst size* de 180 UFP/célula. Estos resultados indican que el fago ϕ DCL-PA6 produce copias virales más rápido que su variante ϕ DCL-PA6 α , e interesantemente se observa que la variante produce 2.25 veces mayor cantidad de copias virales que el fago ϕ DCL-PA6.



D)

Curva de crecimiento One Step ϕ DCL-PA6



E)

Curva de crecimiento One Step ϕ DCL-PA6 α

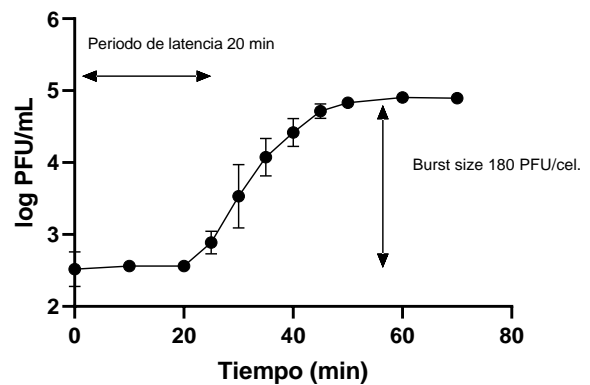


Figura 39. Caracterización de los fagos ϕ DCL-PA6 y ϕ DCL-PA6 α . Imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de los fagos ϕ DCL-PA6 α (A) y ϕ DCL-PA6 (B). La escala representa 100 nm. C) Curvas de adsorción del fago ϕ DCL-PA6 y su variante ϕ DCL-PA6 α en *P. aeruginosa* PA14 y *E. coli* NA22. Curvas de crecimiento *One-Step* para el fago ϕ DCL-PA6 (D) y su variante ϕ DCL-PA6 α (E). El periodo de latencia y el *burst size* para el fago ϕ DCL-PA6 son 10 minutos y 80 UFP/célula, respectivamente. Para el fago ϕ DCL-PA6 α el periodo de latencia y el *burst size* fueron 20 minutos y 180 UFP/célula, respectivamente. Para las curvas C, D y E los puntos representan la media de tres experimentos y las barras la desviación estándar.

7.11. Evaluación de los factores de virulencia de las clonas de PA14 resistentes a los fagos ϕ DCL-PA6 y ϕ DCL-PA6 α

Una vez caracterizados los fagos, decidimos evaluar si existió una atenuación de la virulencia de las clonas resistentes a los fagos ϕ DCL-PA6 y ϕ DCL-PA6 α . Para esto, se decidió evaluar la producción de piocianina, la actividad caseinolítica, la formación de biopelículas y la movilidad tipo *swarming* de las clonas de PA14 14R1- ϕ DCL-PA6, 14R2- ϕ DCL-PA6, 14R1- ϕ DCL-PA6 α y 14R2- ϕ DCL-PA6 α .

7.11.1 Producción de piocianina

No se observó diferencia significativa en la producción de piocianina de las clonas resistentes respecto a la cepa nativa de *P. aeruginosa* PA14.

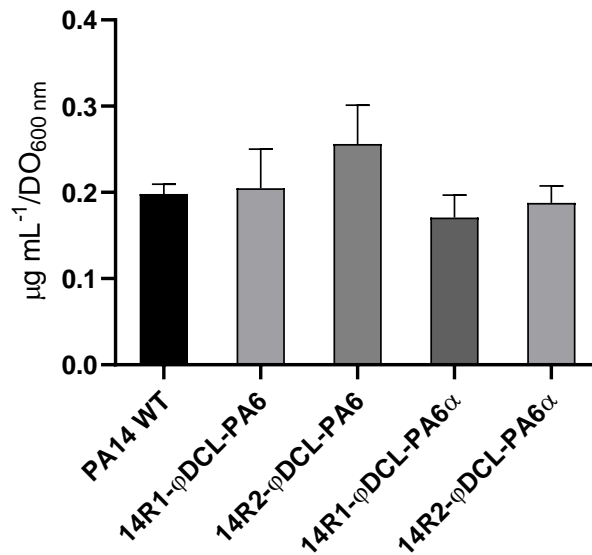


Figura 40. Producción overnight de piocianina en medio LB de las clonas de *P. aeruginosa* PA14 resistentes a los fagos ϕ DCL-PA6 (14R- ϕ DCL-PA6) y ϕ DCL-PA6 α (14R- ϕ DCL-PA6 α). Las barras representan la media de tres experimentos. Se empleó Kruskal-Wallis y Dunn para grupos independientes, valores de $p < 0.05$ fueron considerados como significativos comparados con el grupo control de PA14 WT.

7.11.2 Actividad caseinolítica

No se observó diferencia significativa en la actividad caseinolítica de las clonas resistentes respecto a la cepa nativa de *P. aeruginosa* PA14.

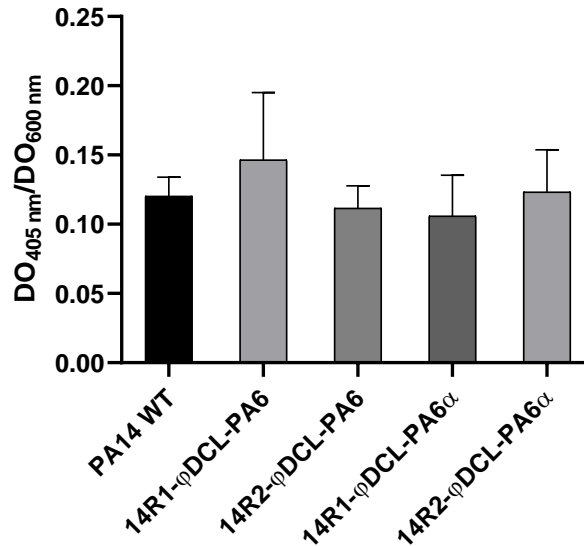


Figura 41. Evaluación de la actividad caseinolítica en medio LB de las clonas de *P. aeruginosa* PA14 resistentes a los fagos φDCL-PA6 (14R-φDCL-PA6) y φDCL-PA6α (14R-φDCL-PA6α). Las barras representan la media de tres experimentos. Se empleó Kruskal-Wallis y Dunn para grupos independientes, valores de $p < 0.05$ fueron considerados como significativos comparados con el grupo control de PA14 WT.

7.11.3. Formación de biopelículas

En todos los casos se observa una disminución en la formación de biopelícula respecto a la cepa nativa de PA14, la cual es significativa únicamente para las clonas 14R1-φDCL-PA6 y 14R1-φDCL-PA6α. Es de destacar que la clona 14R1-φDCL-PA6α perdió completamente la capacidad de generar biopelícula bajo estas condiciones experimentales.

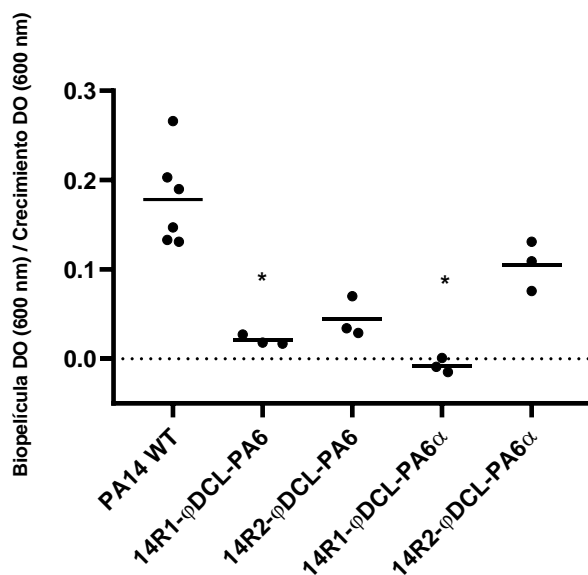


Figura 42. Formación de biopelícula de las clonas de *P. aeruginosa* PA14 resistentes a los fagos φDCL-PA6 (14R-φDCL-PA6) y φDCL-PA6α (14R-φDCL-PA6α). Los puntos representan el promedio de tres experimentos. Se empleó Kruskal-Wallis y Dunn para grupos independientes, valores de $p < 0.05$ fueron considerados como significativos comparados con el grupo control de PA14 WT.

7.11.4. Movilidad tipo *swarming*

Se observa que las clonas resistentes al fago φDCL-PA6 y la clona 14R1-φDCL-PA6α no presentan una disminución significativa de la movilidad tipo *swarming* respecto a la cepa nativa de PA14, en cambio la clona 14R2-φDCL-PA6α perdió completamente la capacidad de presentar dicha movilidad. Como control negativo del experimento se empleó a la cepa PA14 $\Delta lasR rhIR$ la cual carece de los principales reguladores del sistema de *quorum sensing* y con ello la capacidad de realizar *swarming* (67).

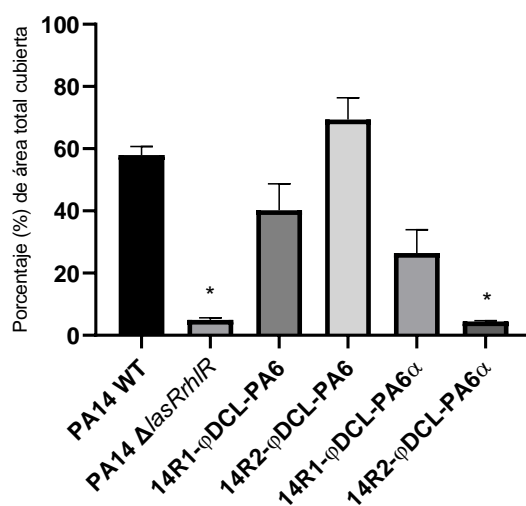


Figura 43. Evaluación de la movilidad tipo *swarming* de clonas de *P. aeruginosa* PA14 resistentes a los fagos φDCL-PA6 (14R-φDCL-PA6) y φDCL-PA6α (14R-φDCL-PA6α). Las barras representan la

media de tres experimentos. Se empleó Kruskal-Wallis y Dunn para grupos independientes, valores de $p < 0.05$ fueron considerados como significativos comparados con el grupo control de PA14 WT.

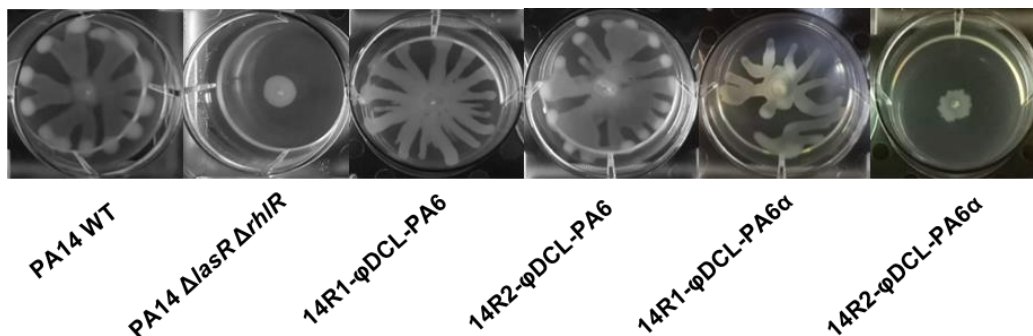


Figura 44. Movilidad tipo *swarming* de clones de *P. aeruginosa* PA14 resistentes a los fagos ϕ DCL-PA6 y ϕ DCL-PA6 α . Se observa la morfología dendrítica típica de *P. aeruginosa* PA14, como control negativo se empleó a la cepa PA14 Δ lasR rhIR. Las clonas resistentes al fago ϕ DCL-PA6 presentan fenotipos similares a la cepa nativa, de manera contraria las clonas resistentes al fago ϕ DCL-PA6 α presentan una disminución de dicha movilidad.

7.12. Evaluación de factores de virulencia de las clonas resistentes de RME 58 y 75 a los fagos ϕ DCL-PA6 y 14R- ϕ DCL-PA6 α

Con la finalidad de ampliar nuestro trabajo, se seleccionaron las cepas MDR de *P. aeruginosa* RME 58 y RME 75 para aislar, de manera similar que con la cepa PA14, tres clonas resistentes a los fagos ϕ DCL-PA6 y ϕ DCL-PA6 α , respectivamente.

Las clonas de RME 58 resistentes al fago ϕ DCL-PA6 fueron nombradas 58R1- ϕ DCL-PA6, 58R2- ϕ DCL-PA6 y 58R3- ϕ DCL-PA6 respectivamente, mientras que resistentes a la variante ϕ DCL-PA6 α fueron nombradas 58R1- ϕ DCL-PA6 α , 58R2- ϕ DCL-PA6 α y 58R3- ϕ DCL-PA6 respectivamente.

Las clonas de RME 75 resistentes al fago ϕ DCL-PA6 fueron nombradas 75R1- ϕ DCL-PA6, 75R2- ϕ DCL-PA6 y 75R3- ϕ DCL-PA6 respectivamente, mientras que las clonas resistentes a la variante ϕ DCL-PA6 α fueron nombradas 75R1- ϕ DCL-PA6 α , 75R2- ϕ DCL-PA6 α y 75R3- ϕ DCL-PA6 α respectivamente. La resistencia de las clonas aisladas fue verificada mediante curvas de crecimiento (Figura 45).

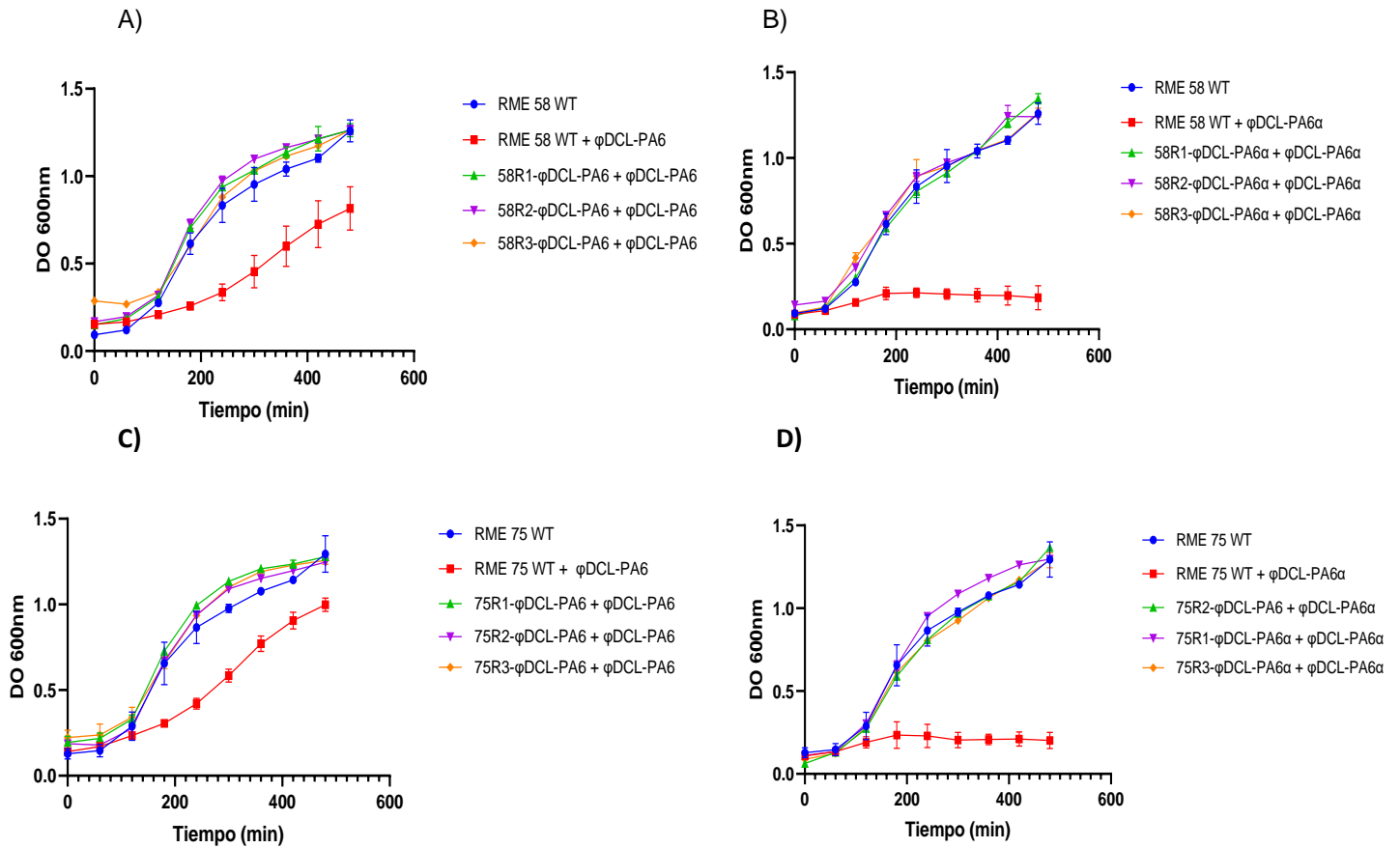


Figura 45. (A-B) Curvas de crecimiento de las clonas de RME 58 resistentes al fago ϕ DCL-PA6 (A) y ϕ DCL-PA6 α (B). Curvas de crecimiento de las clonas de RME 75 resistentes al fago ϕ DCL-PA6 (C) y ϕ DCL-PA6 α (D). Los fagos se encuentran a una MOI de 10.

Debido a que las cepas RME 58 y RME 75 no producen pirocianina, exoproteasas y no presentan movilidad tipo *swarming* (probablemente por algún defecto a nivel de *quorum sensing*) (71), el único factor de virulencia evaluado fue la formación de biopelícula. Además, debido a que se ha reportado que la resistencia a los bacteriófagos en algunos casos puede restaurar la sensibilidad a algunos antibióticos (2,3), se evaluó el perfil de sensibilidad a antibióticos de dichas clonas.

7.12.1. Formación de biopelículas

A diferencia de la disminución en la formación de biopelícula de la mayoría de las clonas resistentes de PA14, las clonas resistentes de RME 58 y RME 75 presentaron una disminución en algunas clonas, siendo significativa solo en las clonas 75R2- ϕ DCL-PA6 y 75R1- ϕ DCL-PA6 α .

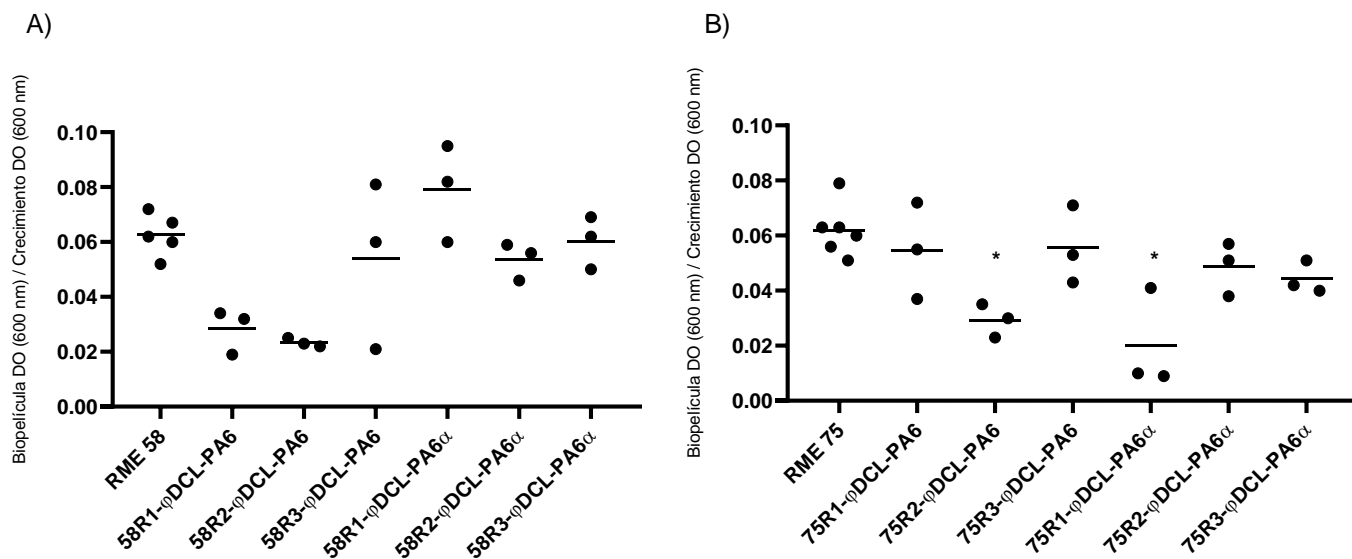


Figura 46. Formación de biopelícula de las clonas *P. aeruginosa* RME 58 (A) y RME 75 (B) resistentes a los fagos ϕ DCL-PA6 y ϕ DCL-PA6 α . Los puntos representan el promedio de tres experimentos. Se empleó Kruskal-Wallis y Dunn para grupos independientes, valores de $p < 0.05$ fueron considerados como significativos comparados con el grupo control, RME 58 o RME 75 respectivamente.

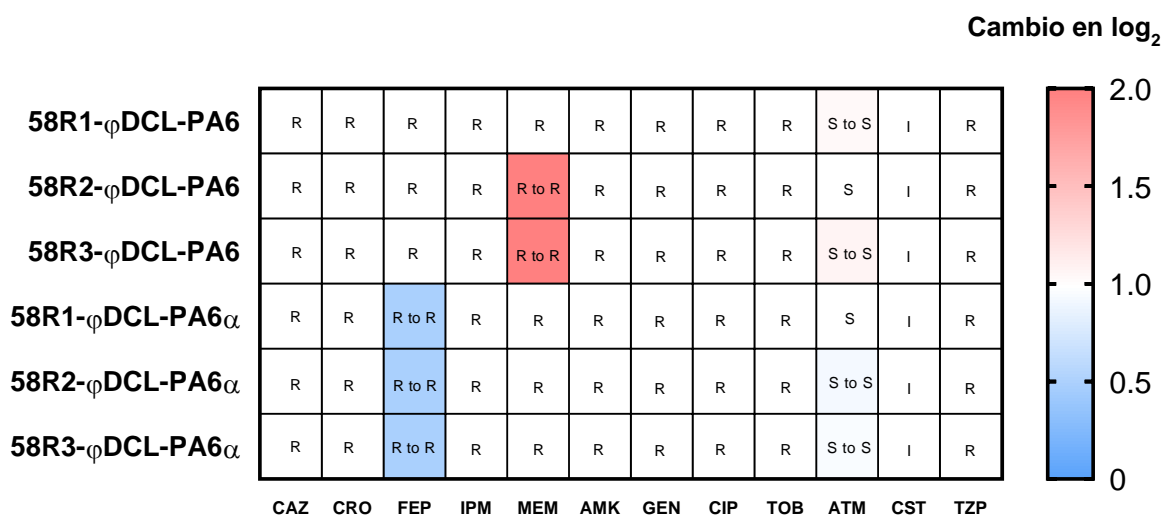
7.12.2 Evaluación de cambios en el perfil de sensibilidad a antibióticos

Las cepas RME 58 y 75 son sensibles únicamente a aztreonam que es un antibiótico β -lactámico sintético y presentan sensibilidad intermedia a colistina, además que la cepa RME 75 tiene sensibilidad intermedia a amikacina, que es un antibiótico aminoglucósido.

Las clonas de RME 58 resistentes a los fagos ϕ DCL-PA6 y ϕ DCL-PA6 α presentaron una menor cantidad de cambios en su perfil de sensibilidad respecto a las clonas resistentes de RME 75. De manera general no hubo cambios drásticos en los perfiles de sensibilidad salvo en las clonas 75R3- ϕ DCL-PA6, 75R2- ϕ DCL-PA6 α y 75R3- ϕ DCL-PA6 α que pasaron de tener sensibilidad intermedia a amikacina a ser sensibles.

La clona 75R3- ϕ DCL-PA6 fue la que presentó mayor cantidad de cambios, donde además de re-sensibilizarse a la amikacina, presentó disminuciones en las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de la cefepima, del meropenem y del ciprofloxacino, tal y como también se presentaron en otras clonas resistentes de RME 75 y RME 58.

A)



B)

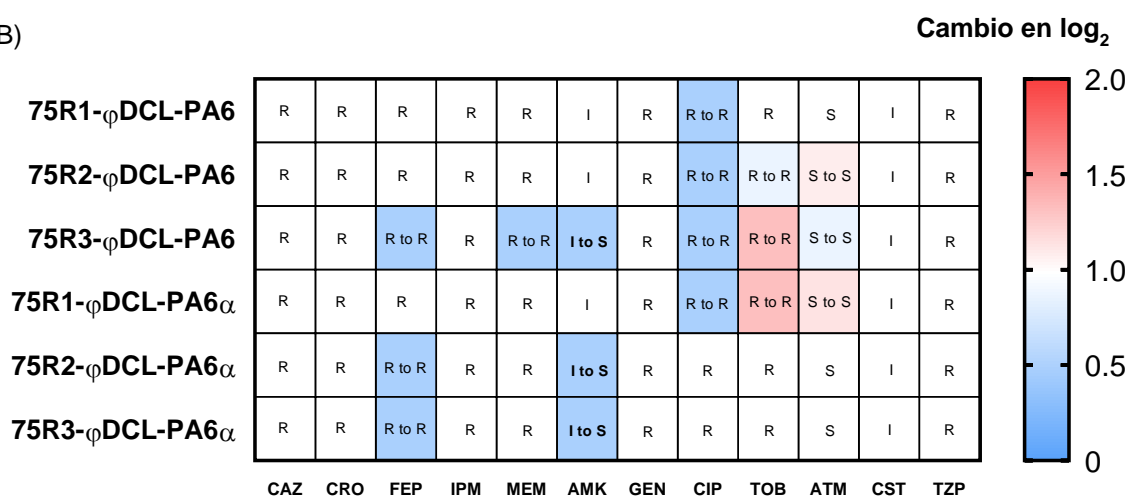


Figura 47. Cambios en el perfil de sensibilidad a antibióticos de las clonas de *P. aeruginosa* RME 58 (A) y RME 75 (B) resistentes a los fagos φDCL-PA6 y φDCL-PA6_α. Se presenta el mapa de calor de cambios logarítmicos en base 2 (log₂) en los valores de la CMI de un panel de 14 antibióticos respecto a las cepas nativas de RME 58 y RME 75, respectivamente. S, sensible; I, sensibilidad intermedia; R, resistente. CAZ: Ceftazidima, CRO: Ceftriaxona, FEP: Cefepima, IPM: Imipenem, MEM: Meropenem, AMK: Amikacina, GEN: Gentamicina, CIP: Ciprofloxacino, TOB: Tobramicina, ATM: Aztreonam, CST: Colistina, TZP: Tazobactam/Piperacilina.

7.13. Evaluación de la virulencia *in vivo*

De manera general, se observó que algunos de los factores de virulencia evaluados *in vitro* se ven afectados en las clonas resistentes a bacteriófagos tanto de la cepa PA14 como de las cepas RME 58 y RME 75, por dicha razón se evaluó la supervivencia *in vivo* de larvas de *G. mellonella* administradas con algunas de las clonas resistentes a fagos.

Para los experimentos se seleccionó la clona de cada cepa que haya presentado la mayor disminución en la formación de biopelícula: 14R1- ϕ DCL-PA6 α , 58R2- ϕ DCL-PA6 y 75R2- ϕ DCL-PA6 α .

Se puede observar en la Figura 48 como en todos los casos las clonas resistentes presentaron una disminución en su virulencia *in vivo* respecto a la correspondiente cepa nativa, e inclusive, las clonas 14R1- ϕ DCL-PA6 α y 75R2- ϕ DCL-PA6 α no presentaron diferencia significativa respecto al control negativo de solución salina.

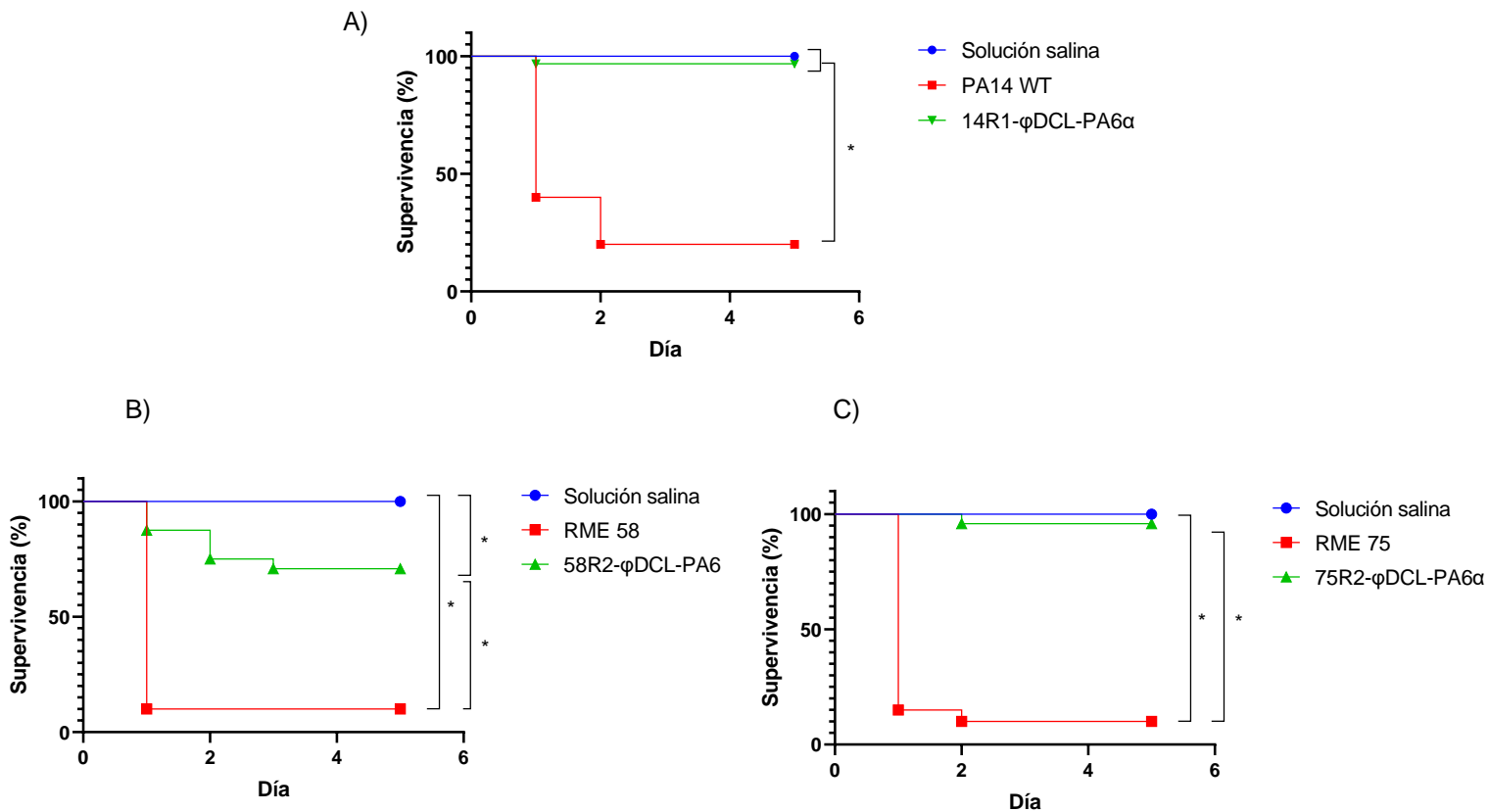


Figura 48. Curvas de supervivencia Kaplan–Meier de *G. mellonella* infectada con clonas de *P. aeruginosa* PA14 (A), RME 58 (B) y RME 75 (c) resistentes a los fagos ϕ DCL-PA6 y ϕ DCL-PA6 α , respectivamente. El grupo control fue inoculado con solución salina. Al menos 20 larvas fueron empleadas por grupo. Los datos fueron analizados usando la prueba Log Rank Mantel–Cox test en GraphPad Prism 8. Los resultados fueron considerados significativos a una $p < 0.05$.

8. DISCUSIÓN

La búsqueda e implementación de alternativas terapéuticas, tales como la fagoterapia, debido a la amenaza global de la resistencia bacteriana a los antibióticos nos llevó a explorar en este trabajo los efectos de la resistencia bacteriana a bacteriófagos en *P. aeruginosa*.

Para este proyecto, se utilizó una colección de fagos donada, así como fagos aislados de diferentes muestras de agua, de los cuales se secuenciaron y ensamblaron los genomas de los fagos 3, 5, 6, 8, 9, 10 y CE. En todos los casos los genomas carecían de genes indicadores de un ciclo de vida lisogénico, genes de virulencia o genes de resistencia a antibióticos que los harían desventajosos para su uso en la fagoterapia (3). Además, algunos de ellos poseen un amplio rango de huéspedes (Tabla 9), tales como los Fagos 5, 6, 8, 9 y 10, lo que los hace atractivos para su uso terapéutico.

Cabe mencionar que, de manera general, los bacteriófagos usados tienden a infectar en menor proporción a las cepas clínicas, esto puede explicarse porque dichas cepas generalmente presentan profagos que expresan un represor de genes líticos, el cual puede regular la expresión de los genes de un bacteriófago de naturaleza similar que invada a la misma bacteria (68). Esto se corroboró con el análisis de las secuencias de algunas cepas de *P. aeruginosa* empleadas en este trabajo. En la cepa PA14, que tiene mayor sensibilidad a fagos, se identificaron 21 proteínas virales. Por otro lado, las cepas RME 58 y RME 75 presentaron 165 y 158 proteínas, respectivamente, mientras que la cepa RME 125, apenas susceptible a algunos fagos, presentó 264. Otra posible explicación es que algunas cepas clínicas carecen de estructuras superficiales y con ello evitan la adsorción de los fagos (69). Este fenómeno se observó en la cepa RME 125 donde se encontraron mutaciones en genes biosintéticos del LPS y del pili tipo IV. Este hecho aunado a la presencia abundante de secuencias virales en el genoma de RME 125 podría explicar porque dicha cepa es altamente resistente a la infección por bacteriófagos.

Respecto a los fagos secuenciados, de manera inesperada, se encontró que los fagos 5, 6, 9 y 10 correspondían al mismo bacteriófago el cual fue denominado ϕ DCL-PA6, sin embargo, el fago 6, a diferencia de los demás, presentó cuatro mutaciones puntuales por lo que fue denominado ϕ DCL-PA6 α . Estas mutaciones produjeron dos cambios de aminoácido en proteínas relacionadas con el reconocimiento viral del receptor bacteriano (65), uno de prolina por arginina en la proteína de la fibra de la cola y otro de glicina por valina en la proteína estructural de la base. Además, la variante ϕ DCL-PA6 α perdió la capacidad de infectar a las cepas MDR RME 22, 60 y 118, sugiriendo que las mutaciones podrían haber causado una alteración en el reconocimiento del fago a su receptor bacteriano.

En este contexto, se ha reportado que mutaciones en la proteína de la fibra de la cola y en la proteína estructural de la base, como las encontradas en este proyecto, pueden modificar el rango de huéspedes (77, 78). Un estudio sobre las proteínas de la fibra de la cola de colifagos de la familia T2 identificó que los residuos de triptófano, serina, asparagina y arginina representan la mayor parte de las substituciones que causan cambios en las especificidades de los receptores (94). Además, otro estudio identificó que una substitución entre dos aminoácidos no polares en el gen de la estructura de la base del fago K8 de *P. aeruginosa* produjo un cambio en el rango de huéspedes y en la afinidad del fago por su receptor (95). Por las razones antes mencionadas no es posible concluir si el fenotipo del fago ϕ DCL-PA6 α es el producto individual de alguna de las mutaciones o un resultado en conjunto de ambas.

Con la finalidad de comprender la causa de los cambios en el rango de huéspedes, se aislaron clones resistentes de *P. aeruginosa* PA14 a los fagos ϕ DCL-PA6 y ϕ DCL-PA6 α para secuenciarlas

y llevar a cabo experimentos de resistencia cruzada. Los resultados obtenidos apuntan a que las mutaciones del fago ϕ DCL-PA6 α provocaron que el virus pase de reconocer el antígeno O al núcleo del LPS como receptor bacteriano.

Los datos genómicos de las clonas resistentes a los fagos ϕ DCL-PA6 y ϕ DCL-PA6 α indican que los genes afectados están relacionados con la biosíntesis del LPS. Interesantemente, las mutaciones presentes en las clonas resistentes al fago ϕ DCL-PA6 se presentaron en el gen *wzzb* que presenta más del 99 % de identidad con el gen *wzz2* de *P. aeruginosa* PAO1 (la cepa donde se ha estudiado con mayor detalle los genes biosintéticos del LPS), y el cual codifica para una proteína que pertenece al grupo de las copolimerasas del polisacárido que intervienen en la síntesis del antígeno O del LPS. Este grupo de proteínas determinan la longitud total del antígeno O mediante la regulación de la actividad de las polimerasas Wzy por mecanismos aún no elucidados completamente (70)(71).

Experimentalmente se ha demostrado en *P. aeruginosa* serotipo O13 que deleciones en el gen *wzz2* producen cadenas de antígeno O de longitud drásticamente reducida (71), además se ha demostrado que una mutante por transposón de *P. aeruginosa* PA14 en el gen *wzz* presentaba afectaciones en el antígeno O provocando su sensibilidad al suero de ratón (72).

En cambio, las clonas resistentes al fago ϕ DCL-PA6 α presentaron mutaciones en un gen que presenta más del 99 % de identidad respecto al gen *wapH* de *P. aeruginosa* PAO1, dicho gen codifica para una glicosiltransferasa que participa en la biosíntesis del núcleo del LPS. Dicha glicosiltransferasa aparentemente participa en la adición de un residuo de glucosa a uno de galactosamina, el cual es clave para la incorporación de residuos de ramnosa donde se ensamblan los componentes del antígeno O (73). Además, mutantes de *P. aeruginosa* PAO1 tipo knock out del gen *wapH* se ha reportado que producen un núcleo del oligosacárido incompleto (74).

Por otro lado, los experimentos de resistencia cruzada mostraron que el fago ϕ DCL-PA6 α era capaz de infectar a las clonas resistentes al fago ϕ DCL-PA6, mientras que el fago ϕ DCL-PA6 no era capaz de infectar a las clonas resistentes al fago ϕ DCL-PA6 α . Esto puede ser explicado con los hallazgos genómicos.

Las clonas resistentes al fago ϕ DCL-PA6 que carecen de antígeno O, aún contienen al núcleo del LPS debido a que su síntesis es independiente de esta estructura (75), en cambio las clonas resistentes a la variante ϕ DCL-PA6 α presentan un núcleo del LPS defectuoso y carecen de antígeno O, debido a que esta última estructura sólo se puede ensamblar si se encuentra el núcleo del LPS (75). Esto explica porque el fago cuyo receptor es el antígeno O no fue capaz de infectar a las clonas resistentes del fago ϕ DCL-PA6 α , pero el fago cuyo receptor fue el núcleo del LPS si pudo infectar a las clonas resistentes a ϕ DCL-PA6.

Mutaciones en fagos capaces de cambiar la afinidad por otro receptor bacteriano han sido reportadas en virus de algunas especies bacterianas como *P. aeruginosa* y *E. coli* (76). El fago K8 de *P. aeruginosa*, a pesar de presentar una baja similitud con el fago ϕ DCL-PA6, presentó una variante capaz de reconocer al núcleo del LPS como receptor en lugar del antígeno O al presentar mutaciones en la estructura de la base (95), lo cual concuerda con los hallazgos de este estudio.

Es importante mencionar que es probable que las mutaciones de las clonas resistentes produzcan estructuras incompletas del LPS que aún conserven algunos sitios claves en la unión del fago. Esto se apoya en las observaciones de que las clonas 14R1- ϕ DCL-PA6 α y 14R2- ϕ DCL-PA6 α son parcialmente resistentes al fago ϕ DCL-PA6 α (Figura 35). Además, en los experimentos de resistencia cruzada, se observó que algunos otros de los fagos de la colección que aparentemente

utilizan el mismo receptor que los fagos ϕ DCL-PA6 y ϕ DCL-PA6 α no pierden por completo la capacidad de infectar a las clonas resistentes. Estas observaciones también podrían explicar porque las clonas resistentes aún conservan la capacidad de realizar ciertos fenotipos evaluados en este trabajo.

Otro punto interesante es el hecho de que, durante los ensayos de resistencia cruzada de la clona 14R2- ϕ DCL-PA6 α , se generaron clonas resistentes a los fagos 3, CE y JBD30 dentro de las zonas de lisis productoras del pigmento piomelanina (Figura 36D). Se ha reportado que algunas clonas resistentes a fagos producen dicho pigmento debido a deleciones que incluyen, además de genes biosintéticos de LPS y pili, al gen *hmgA* que participa en el catabolismo de aminoácidos aromáticos, y cuya ausencia produce dicho fenotipo (96).

Los bacteriófagos están en una carrera evolutiva constante con sus huéspedes bacterianos (40), por lo que el origen del fago ϕ DCL-PA6 α es probable se haya debido a un mecanismo adaptativo del virus para hacer frente a la resistencia bacteriana. Dicha adaptación, sin embargo, produjo que la afinidad de la variante por su huésped bacteriano fuera menos efectiva (Figura 39), y el tiempo de generación de copias virales fuera mayor. Sorprendentemente, el número de copias virales producidas en la variante fue 2.5 veces mayor. Algunas posibles explicaciones son que debido a que la unión del fago ϕ DCL-PA6 a su receptor es mucho más fuerte, las copias virales que se liberan se unen inmediatamente a un nuevo receptor bacteriano y de esa manera la cantidad de fago libre que se muestrea es menor respecto a la variante del fago.

Otro hallazgo interesante fue que las clonas resistentes de PA14 y cepas MDR a los fagos ϕ DCL-PA6 y ϕ DCL-PA6 α presentaron disminución en algunos de sus factores de virulencia *in vitro* y una dramática reducción de su virulencia *in vivo*.

Debido a que algunos de los factores de virulencia en *P. aeruginosa*, como la producción de piocianina y la síntesis de exoproteasas, están regulados por el sistema de *quorum sensing* (13) dichos factores fueron evaluados, sin embargo, no se encontraron cambios significativos respecto a la cepa nativa. Esto coincide con reportes previos (79) donde en clonas resistentes de PAO1 a un solo fago se observó que la producción de piocianina y de elastasa (una de las exoproteasas producidas) (80) era muy heterogénea, sin embargo, al obtener clonas resistentes a múltiples fagos, la producción de piocianina y de elastasa presentaban una reducción (79). Se sabe que el sistema de *quorum sensing* regula positivamente algunos genes biosintéticos de pili y de LPS (97), por lo que defectos en este sistema podrían favorecer a la resistencia de la bacteria. Sin embargo, de acuerdo con nuestros resultados y lo publicado previamente, esto solo ocurriría si la bacteria es sometida a una infección por múltiples virus.

Respecto a la formación de biopelícula, a diferencia de la producción de piocianina y exoproteasas, se observa que la mayoría de las clonas presentan una disminución comparada con la cepa nativa de PA14 e inclusive una de las clonas resistentes al fago ϕ DCL-PA6 α presenta nula formación de biopelícula. Observaciones previas, de igual forma, han reportado la disminución en la producción de biopelículas en clonas resistentes a bacteriófagos en *P. aeruginosa* (79, 81, 82).

Cabe mencionar que, a pesar de que las clonas resistentes a un mismo fago presentan mutaciones en el mismo gen, los fenotipos observados presentaron distinto grado de intensidad. Además del fenómeno intrínseco de la variabilidad biológica, este hecho puede ser explicado porque las mutaciones se presentaron en diferentes regiones del gen afectado, por lo que la proteína, en algunos casos podría presentar regiones funcionales diferentes y, por tanto, un fenotipo de intensidad diferente.

Se sabe que el LPS (75), y en especial el antígeno O (83), juega un papel importante en la formación de biopelículas, esto podría explicar la reducción observada en estos experimentos. Sin embargo, existen otros factores involucrados en su formación tales como el pili y la producción de exopolisacáridos, alginato y de DNA exógeno (13), este último fue observado durante el trabajo con las cepas RME 58 y 75 probablemente debido a la gran cantidad de profagos que presentan. En caso de que las clonas de las cepas MDR presentaran afectaciones en el LPS, lo anterior puede explicar porque no presentaron una disminución generalizada en su capacidad de producir biopelículas comparado con la cepa PA14, o bien, es posible también que el tipo de mutaciones que adquirieron las clonas resistentes de las cepas MDR fueran diferentes a las de las clonas de PA14, y no hayan tenido un impacto en este fenotipo.

En el caso de la movilidad tipo *swarming* los resultados mostraron que las clonas resistentes al fago ϕ DCL-PA6 α presentaron una disminución en este tipo de movilidad a diferencia de las clonas resistentes al fago ϕ DCL-PA6. Este tipo de movilidad es un movimiento coordinado entre bacterias sobre superficies semisólidas, la cual depende de estructuras como el flagelo, la síntesis de biosurfactante o la presencia de LPS (84); por lo que la presencia de mutaciones en esta última estructura permitiría explicar el fenotipo observado.

Previamente se ha reportado que clonas de *P. aeruginosa* que presentan deleciones o mutaciones que producen una región truncada del núcleo del LPS, presentan una movilidad tipo *swarming* defectuosa, tal como se observó en nuestros resultados. Esto puede explicarse porque la falta de antígeno O se ha documentado que produce una disminución en el ensamblaje del flagelo (75), o bien, porque la ausencia de antígeno O podría incrementar la hidrofobicidad celular, favoreciendo la aglomeración de bacterias y dificultando la movilidad (75). Es posible que las clonas resistentes al fago ϕ DCL-PA6 presenten un antígeno O truncado que aún les confiera la capacidad de presentar este tipo de movilidad.

En lo referente a los cambios hallados en los perfiles de sensibilidad a antibióticos de las clonas resistentes de las cepas RME 58 y 75, el resultado más destacable fue la sensibilización de algunas clonas de RME 75 a amikacina.

Se sabe que el LPS funciona como barrera que protege a las bacterias Gram negativas de xenobióticos, sales biliares y detergentes (85) por lo que una pérdida o alteración de su estructura, como en el posible caso de las clonas de RME 58 y 75, permitiría una mayor permeabilidad de la bacteria a diferentes moléculas incluidas los antibióticos. De hecho, se ha reportado que la membrana externa de bacterias Gram negativas juega un rol fundamental en la resistencia de las bacterias a macrólidos, aminoglucósidos, rifampicinas y β -lactámicos (86, 87).

Un estudio previo mostró que el principal mecanismo de resistencia a amikacina en aislados clínicos de fibrosis quística de *P. aeruginosa* era la permeabilidad intrínseca de la bacteria (88), por lo que al generarse mutantes defectivas de LPS, dicho antibiótico lograría ser eficaz en la bacteria. De manera similar, se reportó que clonas de *Pseudomonas stutzeri* que presentaban mutaciones en genes involucrados en la síntesis de estructuras de membrana eran sensibles a gentamicina (98).

De manera contraria a lo que se ha reportado en la literatura donde afectaciones en la integridad del LPS favorecen la sensibilidad a las polimixinas (99, 100), no se presentó una disminución en la CMI de la colistina. Una posible explicación es que los genomas de las cepas RME 75 y 58 presentaron una gran cantidad de genes que codifican para bombas de eflujo o enzimas inactivadoras de antibióticos como β -lactamasas, esta sería la razón por la cual las clonas permanecen resistentes a la mayoría de los antibióticos a pesar de presentar posibles alteraciones en su LPS.

Además de la disminución de los factores de virulencia *in vitro*, algunas de las clonas evaluadas presentaron una disminución de la letalidad en *G. mellonella*, llegando las clonas 14R1- ϕ DCL-PA6 α y 75R2- ϕ DCL-PA6 α a ser comparables al control negativo; esto podría explicarse por la síntesis de moléculas de LPS truncas.

El modelo empleado en este experimento es un insecto que, además de no requerir de consentimientos éticos y de tener ciclos de vida cortos, presenta un sistema inmune innato muy similar al de organismos vertebrados (89). Se sabe que el LPS contribuye a la evasión del sistema inmune e inclusive algunas moléculas de antígeno O pueden mimetizar azúcares de las células del huésped (90), por lo que al haber un LPS defectuoso las células inmunes de la larva pueden resolver la infección fácilmente.

Se ha demostrado que el grado de afectación de la molécula de LPS está relacionado con su impacto en la virulencia (91), además, en modelos animales se ha observado que clonas que carecen o presentan un LPS trunco tienen una virulencia atenuada (71).

Estos resultados indican que algunas de las clonas resistentes a fagos que emergen presentan una disminución de su virulencia *in vivo*, sin embargo, queda por determinar qué proporción de bacterias del total de clonas resistentes presentan dicha disminución en su virulencia, puesto que aquí solo se emplearon las clonas que presentaban una mayor reducción en su producción de biopelícula.

Cabe mencionar que el proyecto se realizó con clonas de PA14, la cual a diferencia de la cepa PAO1, presenta un antígeno O con una composición diferente y, además, carece de antígeno común del polisacárido (CPA) debido a una mutación puntual en la glicosiltransferasa WbpX (101). Debido a esto, es posible que la resistencia de la cepa PAO1 a los fagos ϕ DCL-PA6 y ϕ DCL-PA6 α , se dé por mecanismos diferentes y, por lo tanto, el impacto en el fenotipo de la bacteria sea distinto. De igual forma, las cepas MDR RME 58 y RME 75 pertenecen al clado de la cepa PA14, por lo que es posible que las mutaciones de las clonas puedan ser similares entre ellas y entre la cepa PA14.

Los hallazgos presentados en este trabajo muestran algunas ventajas de la resistencia a los bacteriófagos en el tratamiento de *P. aeruginosa* con estos virus, y exhorta a futuras investigaciones en la aplicación de esta terapia. Además, nuestra investigación es un ejemplo de cómo las variantes de fagos con mutaciones sencillas pueden generar un cambio de receptor, y con ello, pueden ser empleadas para el diseño de un coctel de fagos.

9. CONCLUSIONES

El fago ϕ DCL-PA6 y su variante ϕ DCL-PA6 α son posibles candidatos para usarse en la terapia debido a que no contienen genes de virulencia, de resistencia a antibióticos ni asociados a la lisogenia. Además, poseen un amplio rango de huéspedes y algunas de las clonas resistentes a estos presentan re-sensibilización a amikacina y disminución de su virulencia *in vitro* e *in vivo* debido a mutaciones en genes biosintéticos del LPS.

Adicionalmente se demostró que mutaciones puntuales en la proteína de la fibra de la cola y en la proteína estructural de la base provocaron que el fago ϕ DCL-PA6 pasara de reconocer el antígeno O al núcleo del LPS, lo que permite que la variante pueda ser incluida en un coctel con fagos dirigidos a otros receptores.

10. PERSPECTIVAS

- Determinar los mecanismos mediante los cuales las clonas resistentes a los fagos ϕ DCL-PA6 y ϕ DCL-PA6 α de las cepas RME 58 y 75 adquirieron dicha resistencia.
- Determinar si debido a la modificación estructural de la membrana externa de las clonas resistentes hay afectaciones en otros componentes como los sistemas de secreción.
- Realizar ensayos *in vivo*, para dilucidar la efectividad del fago ϕ DCL-PA6 y su variante ϕ DCL-PA6 α en el tratamiento de *P. aeruginosa*.

11. REFERENCIAS

- 1) Gordillo Altamirano, F. L., & Barr, J. J. (2019). *Phage Therapy in the Postantibiotic Era*. *Clinical Microbiology Reviews*, 32(2). doi:10.1128/cmr.00066-18
- 2) Chan, B., Siström, M., Wertz, J., et al. (2016). *Phage selection restores antibiotic sensitivity in MDR Pseudomonas aeruginosa*. *Sci Rep* 6, 26717. <https://doi.org/10.1038/srep26717>
- 3) Gordillo Altamirano, F., Forsyth, J.H., Patwa, R., et al. (2021). *Bacteriophage-resistant Acinetobacter baumannii are resensitized to antimicrobials*. *Nat Microbiol* 6, 157–161. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-00830-7>
- 4) Madigan, M., Martinko, J., Dunlap, P., Clark, D. Brock. (2009). *Biología de los microorganismos*. Duodécima edición. Editorial Pearson Educación, S.A.
- 5) Alanis, A. J. (2005). *Resistance to Antibiotics: Are We in the Post-Antibiotic Era?* *Archives of Medical Research*, 36(6), 697–705. doi: 10.1016/j.arcmed.2005.06.009
- 6) Aminov, R. I. (2010). *A Brief History of the Antibiotic Era: Lessons Learned and Challenges for the Future*. *Frontiers in Microbiology*, 1. doi:10.3389/fmicb.2010.00134
- 7) Davies, J., Davies, D. (2010). *Origins and evolution of antibiotic resistance*. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, 74(3), 417–433. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00016-10>
- 8) Perron, G. G., Whyte, L., Turnbaugh, P., et al. (2015). *Functional characterization of bacteria isolated from ancient arctic soil exposes diverse resistance mechanisms to modern antibiotics*. *PLoS one*, 10(3), e0069533. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069533>
- 9) Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., et al. (2012). *Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance*. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 18(3), 268–281. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>
- 10) Santajit, S., Indrawattana, N. (2016). *Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens*. *BioMed research international*, 2475067. <https://doi.org/10.1155/2016/2475067>
- 11) WHO. (February 27, 2017). *WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed, 2021* recuperado de <https://www.who.int/es/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
- 12) Wu, W., Jin, Y., Bai, F., Jin, S. (2015). *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Medical Microbiology*, 753–767. doi:10.1016/b978-0-12-397169-2.00041-x
- 13) Moradali, M. F., Ghods, S., Rehm, B. H. A. (2017). *Pseudomonas aeruginosa Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7. doi:10.3389/fcimb.2017.00039
- 14) Liao, C., Huang, X., Wang, Q., Yao, D., Lu, W. (2022). *Virulence Factors of Pseudomonas Aeruginosa and Antivirulence Strategies to Combat Its Drug Resistance*. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 12, 926758. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.926758>
- 15) Bradshaw, J. L., Caballero, A. R., et al. (2018). *Pseudomonas aeruginosa Protease IV Exacerbates Pneumococcal Pneumonia and Systemic Disease*. *mSphere*, 3(3), e00212-18. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00212-18>
- 16) Hauser A. R. (2009). *The type III secretion system of Pseudomonas aeruginosa: infection by injection*. *Nature reviews. Microbiology*, 7(9), 654–665. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2199>

- 17) Barbieri, J. T., & Sun, J. (2004). *Pseudomonas aeruginosa ExoS and ExoT*. Reviews of physiology, biochemistry, and pharmacology, 152, 79–92. <https://doi.org/10.1007/s10254-004-0031-7>
- 18) Pollack, M. (1983). *The role of exotoxin A in pseudomonas disease and immunity*. Reviews of infectious diseases, 5 Suppl 5, S979–S984. https://doi.org/10.1093/clinids/5.supplement_5.s979
- 19) Kang, D., Kirienko, D. R., Webster, P., Fisher, A. L., Kirienko, N. V. (2018). *Pyoverdine, a siderophore from Pseudomonas aeruginosa, translocates into C. elegans, removes iron, and activates a distinct host response*. Virulence, 9(1), 804–817. <https://doi.org/10.1080/21505594.2018.1449508>
- 20) Hall, S., McDermott, C., et al. (2016). *Cellular Effects of Pyocyanin, a Secreted Virulence Factor of Pseudomonas aeruginosa*. Toxins, 8(8), 236. <https://doi.org/10.3390/toxins8080236>
- 21) Antimicrobial Resistance Collaborators (2022). *Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis*. Lancet (London, England), 399(10325), 629–655. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)
- 22) WHO. (April 29, 2019). *New report calls for urgent action to avert antimicrobial resistance crisis, 2021* from <https://www.who.int/news/item/29-04-2019-new-report-calls-for-urgent-action-to-avert-antimicrobial-resistance-crisis>
- 23) Garza-González, E., et al. (2019). *A snapshot of antimicrobial resistance in Mexico. Results from 47 centers from 20 states during a six-month period*. PloS one, 14(3), e0209865. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209865>
- 24) CDC. (November 13, 2017). *Pseudomonas aeruginosa in Healthcare Settings, 2021* from <https://www.cdc.gov/hai/organisms/pseudomonas.html>
- 25) Pang, Z., Raudonis, R., Glick, B. R., Lin, T.-J., Cheng, Z. (2018). *Antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa: mechanisms and alternative therapeutic strategies*. Biotechnology Advances. doi: 10.1016/j.biotechadv.2018.11.
- 26) Yelin, I., Kishony, R. (2018). *Antibiotic resistance*. Cell 172:1136 –1136. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.02.018>.
- 27) Ofir, G., Sorek, R. (2018). *Contemporary Phage Biology: From Classic Models to New Insights*. Cell, 172(6), 1260–1270. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.10.045>
- 28) Feiner, R., Argov, T., Rabinovich, L., Sigal, N., Borovok, I., Herskovits, A. (2015). *A new perspective on lysogeny: prophages as active regulatory switches of bacteria*. Nature reviews. Microbiology, 13(10), 641–650. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3527>
- 29) Chanishvili, N. (2012). *Phage Therapy—History from Twort and d’Herelle Through Soviet Experience to Current Approaches*. Bacteriophages, Part B, 3–40. doi:10.1016/b978-0-12-394438-2.00001-3
- 30) Cazares, D., Cazares, A., Figueroa, W., Guarneros, G., Edwards, R. A., & Vinuesa, P. (2021). *A Novel Group of Promiscuous Podophages Infecting Diverse Gammaproteobacteria from River Communities Exhibits Dynamic Intergenous Host Adaptation*. mSystems, 6(1), e00773-20. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00773-20>
- 31) Bruttin, A., Brussow, H. (2005). *Human Volunteers Receiving Escherichia coli Phage T4 Orally: a Safety Test of Phage Therapy*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 49(7), 2874–2878. doi:10.1128/aac.49.7.2874-2878.2005
- 32) Dufour, N., Delattre, R., Ricard, J. D., Debarbieux, L. (2017). *The Lysis of Pathogenic Escherichia coli by Bacteriophages Releases Less Endotoxin Than by β -Lactams*. Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America, 64(11), 1582–1588. <https://doi.org/10.1093/cid/cix184>

- 33) Dufour, N., Delattre, R., Chevallereau, A., Ricard, J.-D., & Debarbieux, L. (2019). *Phage therapy of pneumonia is not associated with an over stimulation of the inflammatory response compared to antibiotic treatment in mice*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. doi:10.1128/aac.00379-19
- 34) Liu, D., Van Belleghem, J. D., de Vries, C. R., et al. (2021). *The Safety and Toxicity of Phage Therapy: A Review of Animal and Clinical Studies*. *Viruses*, 13(7), 1268. <https://doi.org/10.3390/v13071268>
- 35) Oechslin, F. (2018). *Resistance Development to Bacteriophages Occurring during Bacteriophage Therapy*. *Viruses*, 10(7), 351. <https://doi.org/10.3390/v10070351>
- 36) Chan, B. K., Abedon, S. T., & Loc-Carrillo, C. (2013). *Phage cocktails and the future of phage therapy*. *Future microbiology*, 8(6), 769–783. <https://doi.org/10.2217/fmb.13.47>
- 37) Pirnay, J.-P., Djebara, S., Steurs, G., et al. (2023). *Retrospective, Observational Analysis of the First One Hundred Consecutive Cases of Personalized Bacteriophage Therapy of Difficult-to-Treat Infections Facilitated by a Belgian Consortium*. medRxiv. <https://doi.org/10.1101/2023.08.28.23294728>
- 38) Międzybrodzki, R., Borysowski, J., Weber-Dąbrowska, B., et al. (2012). *Clinical Aspects of Phage Therapy*. *Bacteriophages, Part B*, 73–121. doi:10.1016/b978-0-12-394438-2.00003-7
- 39) Hesse, S., & Adhya, S. (2019). *Phage Therapy in the Twenty-First Century: Facing the Decline of The Antibiotic Era; Is it Finally Time for The Age of the Phage?* *Annual Review of Microbiology*, 73(1). doi:10.1146/annurev-micro-090817-062535
- 40) Stern, A., & Sorek, R. (2011). *The phage-host arms race: shaping the evolution of microbes*. *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 33(1), 43–51. <https://doi.org/10.1002/bies.201000071>
- 41) Bertozzi Silva, J., Storms, Z., & Sauvageau, D. (2016). *Host receptors for bacteriophage adsorption*. *FEMS microbiology letters*, 363(4), fnw002. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw002>
- 42) De Sousa, J.A.M., Buffet, A., Haudiquet, M., et al. (2020) *Modular prophage interactions driven by capsule serotype select for capsule loss under phage predation*. *ISME J* 14, 2980–2996. <https://doi.org/10.1038/s41396-020-0726-z>
- 43) Sant, D.G., Woods, L.C., Barr, J.J., et al. (2021). *Host diversity slows bacteriophage adaptation by selecting generalists over specialists*. *Nat Ecol Evol* 5, 350–359. <https://doi.org/10.1038/s41559-020-01364-1>
- 44) Davarzani, F., Saidi, N., Besharati, S., Sadari, H., Rasooli, I., Owlia, P. (2021). *Evaluation of Antibiotic Resistance Pattern, Alginate and Biofilm Production in Clinical Isolates of Pseudomonas aeruginosa*. *Iranian journal of public health*, 50(2), 341–349. <https://doi.org/10.18502/ijph.v50i2.5349>
- 45) Mangalea, M. R., Duerkop, B. A. (2020). *Fitness Trade-Offs Resulting from Bacteriophage Resistance Potentiate Synergistic Antibacterial Strategies*. *Infection and immunity*, 88(7), e00926-19. <https://doi.org/10.1128/IAI.00926-19>
- 46) Chan, B. K., Turner, P. E., Kim, S., Mojibian, H. R., Eleftheriades, J. A., & Narayan, D. (2018). *Phage treatment of an aortic graft infected with Pseudomonas aeruginosa*. *Evolution, Medicine, and Public Health*, 2018(1), 60–66. doi:10.1093/emph/eoy005
- 47) Holloway, B. W. (1955). *Genetic recombination in Pseudomonas aeruginosa*. *J. Gen. Microbiol.* 13:572-581.
- 48) Schroth, M., Cho, J., Green, S., Kominos, S. (1977). *Epidemiology of Pseudomonas aeruginosa in agricultural areas*. *Pseudomonas aeruginosa: Ecological Aspects and Patient Colonization* New York: Raven Press; pp. 1–29

- 49) Park, S. Y., Heo, Y. J., Choi, Y. S., Déziel, E., Cho, Y. H. (2005). *Conserved virulence factors of Pseudomonas aeruginosa are required for killing Bacillus subtilis*. Journal of microbiology (Seoul, Korea), 43(5), 443–450.
- 50) Valentová, L., Tibor, F., Pavel, P. (2021). *Structure of Pseudomonas aeruginosa infecting bacteriophage JBD30 solved by cryo-electron microscopy*. In 1st Student Conference in Structural Biology.
- 51) Sepúlveda-Robles, O., Kameyama, L., & Guarneros, G. (2012). *High diversity and novel species of Pseudomonas aeruginosa bacteriophages*. Applied and environmental microbiology, 78(12), 4510–4515. <https://doi.org/10.1128/AEM.00065-12>
- 52) Soleimani-Delfan, A., Bouzari, M., Wang, R. (2021). *A rapid competitive method for bacteriophage genomic DNA extraction*. Journal of virological methods, 293, 114148. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2021.114148>
- 53) Bolger, A. M., Lohse, M., Usadel, B. (2014). *Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data*. Bioinformatics (Oxford, England), 30(15), 2114–2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
- 54) Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A. A., et al. (2012). *SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing*. Journal of computational biology: a journal of computational molecular cell biology, 19(5), 455–477. <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>
- 55) Chikhi, R., Medvedev, P. (2013). *Informed and Automated k-Mer Size Selection for Genome Assembly*. Bioinformatics, Volume 30, Issue 1, January 2014, Pages 31–37, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt310>
- 56) Pope, W., Jacobs-Sera, D. (2018). *Annotation of Bacteriophage Genome Sequences Using DNA Master: An Overview*. Bacteriophages. Methods in Molecular Biology, vol 1681. Humana Press, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7343-9_16
- 57) Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. (1990) “*Basic local alignment search tool*.” J. Mol. Biol. 215:403-410
- 58) Gabler, F., Nam, S. (2020). *Protein Sequence Analysis Using the MPI Bioinformatics Toolkit*. Curr. Protoc Bioinformatics. Dec;72(1):e108. doi: 10.1002/cpbi.108
- 59) Olson, R. D., Assaf, R., Brettin, T., et al. (2023). *Introducing the Bacterial and Viral Bioinformatics Resource Center (BV-BRC): a resource combining PATRIC, IRD and ViPR*. Nucleic acids research, 51(D1), D678–D689. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1003>
- 60) Middelboe, M., Chan, A., & Bertelsen, S. K. (2010). *Isolation and life cycle characterization of lytic viruses infecting heterotrophic bacteria and cyanobacteria*. In S. W. Wilhelm, M. G. Weinbauer, & C. A. Suttle (Eds.), Manual of aquatic viral ecology (pp. 118-33). American Society of Limnology and Oceanography, Inc. <https://doi.org/10.4319/mave.2010.978-0-9845591-0-7.118>
- 61) Zabarovskii, E. R., & Turina, O. V. (1988). *Rapid isolation of phage lambda DNA*. Molekuliarnaia biologii, 22(6), 1451–1455.
- 62) Montelongo-Martínez, L. F., Hernández-Méndez, C., et al. (2023). *Unraveling the regulation of pyocyanin synthesis by RsmA through MvaU and RpoS in Pseudomonas aeruginosa ID4365*. Journal of basic microbiology, 63(1), 51–63. <https://doi.org/10.1002/jobm.202200432>
- 63) Morales-Soto, N., Anyan, M. E., et al. (2015). *Preparation, imaging, and quantification of bacterial surface motility assays*. Journal of visualized experiments: JoVE, (98), 52338. <https://doi.org/10.3791/52338>
- 64) CLSI. (2020). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. 30th ed. Wayne, PA: CLSI. M100 ED30:2020. CLSI M100 ED302020.

- 65) Taslem Mourosoi, J., Awe, A., Guo, W., Batra, H., Ganesh, H., Wu, X., Zhu, J. (2022). *Understanding Bacteriophage Tail Fiber Interaction with Host Surface Receptor: The Key "Blueprint" for Reprogramming Phage Host Range*. International journal of molecular sciences, 23(20), 12146. <https://doi.org/10.3390/ijms232012146>
- 66) Bertozzi Silva, J., Storms, Z., Sauvageau, D. (2016). *Host receptors for bacteriophage adsorption*. FEMS microbiology letters, 363(4), fnw002. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw002>
- 67) Shrout, J. D., Chopp, D. L., Just, C. L., Hentzer, M., Givskov, M., & Parsek, M. R. (2006). *The impact of quorum sensing and swarming motility on Pseudomonas aeruginosa biofilm formation is nutritionally conditional*. Molecular Microbiology, 62(5), 1264–1277. doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05421.x
- 68) Bondy-Denomy, J., Qian, J., Westra, E. R., Buckling, A., Guttman, D. S., Davidson, A. R., & Maxwell, K. L. (2016). *Prophages mediate defense against phage infection through diverse mechanisms*. The ISME journal, 10(12), 2854–2866. <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.79>
- 69) Pourcel, C., Midoux, C., Vergnaud, G., Latino, L. (2020). *The Basis for Natural Multiresistance to Phage in Pseudomonas aeruginosa*. Antibiotics (Basel, Switzerland), 9(6), 339. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9060339>
- 70) Islam, S. T., Huszczyński, S. M., Nugent, T., Gold, A. C., & Lam, J. S. (2013). *Conserved-residue mutations in Wzy affect O-antigen polymerization and Wzz-mediated chain-length regulation in Pseudomonas aeruginosa PAO1*. Scientific reports, 3, 3441. <https://doi.org/10.1038/srep03441>
- 71) Huszczyński, S. M., Coumoundouros, C., Pham, P., Lam, J. S., Khursigara, C. M. (2019). *Unique Regions of the Polysaccharide Co-Polymerase Wzz2 from Pseudomonas aeruginosa are Essential for O-Specific Antigen Chain Length Control*. Journal of Bacteriology. doi:10.1128/jb.00165-19
- 72) Dzvova, N., Colmer-Hamood, J. A., Griswold, J. A., Hamood, A. N. (2017). *Heparinase Is Essential for Pseudomonas aeruginosa Virulence during Thermal Injury and Infection*. Infection and immunity, 86(1), e00755-17. <https://doi.org/10.1128/IAI.00755-17>
- 73) King, J. D., Kocíncová, D., Westman, E. L., Lam, J. S. (2009). *Review: Lipopolysaccharide biosynthesis in Pseudomonas aeruginosa*. Innate Immunity, 15(5), 261–312. doi:10.1177/1753425909106436
- 74) Matewish MJ. (2004). *The functional role of lipopolysaccharide in the cell envelope and surface proteins of Pseudomonas aeruginosa*. PhD thesis. University of Guelph, Ontario, Canada.
- 75) Huszczyński, Lam, Khursigara. (2019). *The Role of Pseudomonas aeruginosa Lipopolysaccharide in Bacterial Pathogenesis and Physiology*. Pathogens, 9(1), 6. doi:10.3390/pathogens9010006
- 76) Drexler, K., Dannull, J., Hindennach, I., Mutschler, B., & Henning, U. (1991). *Single mutations in a gene for a tail fiber component of an Escherichia coli phage can cause an extension from a protein to a carbohydrate as a receptor*. Journal of molecular biology, 219(4), 655–663. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(91\)90662-p](https://doi.org/10.1016/0022-2836(91)90662-p)
- 77) Borges A. L. (2021). *How to train your bacteriophage*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 118(28), e2109434118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2109434118>
- 78) Yehl, K., Lemire, S., Yang, A. C., et al. (2019). *Engineering Phage Host-Range and Suppressing Bacterial Resistance through Phage Tail Fiber Mutagenesis*. Cell, 179(2), 459–469.e9. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.09.015>
- 79) Markwitz, P., Olszak, T., Gula, G., Kowalska, M., Arabski, M., Drulis-Kawa, Z. (2021). *Emerging Phage Resistance in Pseudomonas aeruginosa PAO1 Is Accompanied by an Enhanced Heterogeneity and Reduced Virulence*. Viruses, 13(7), 1332. <https://doi.org/10.3390/v13071332>

- 80) Caballero, A. R., J. M. Moreau, *et al.* (2001). *Pseudomonas aeruginosa* protease IV enzyme assays and comparison to other *Pseudomonas* proteases. *Anal. Biochem.* 290:330-337.
- 81) Wannasrichan, W., Htoo, H. H., Suwansaeng, R., Pogliano, J., Nonejuie, P., Chaikerasitak, V. (2022). *Phage-resistant Pseudomonas aeruginosa* against a novel lytic phage JJ01 exhibits hypersensitivity to colistin and reduces biofilm production. *Frontiers in microbiology*, 13, 1004733. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1004733>
- 82) Castledine, M., Padfield, D., *et al.* (2022). *Parallel evolution of Pseudomonas aeruginosa phage resistance and virulence loss in response to phage treatment in vivo and in vitro.* *eLife*, 11, e73679. <https://doi.org/10.7554/eLife.73679>
- 83) Ruhál, R., Antti, H., Rzhepishevskaya, O., *et al.* (2015). *A multivariate approach to correlate bacterial surface properties to biofilm formation by lipopolysaccharide mutants of Pseudomonas aeruginosa.* *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 127, 182–191. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.01.030>
- 84) Kearns D. B. (2010). *A field guide to bacterial swarming motility.* *Nature reviews. Microbiology*, 8(9), 634–644. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2405>
- 85) Romano, K. P., Hung, D. T. (2023). *Targeting LPS biosynthesis and transport in gram-negative bacteria in the era of multi-drug resistance.* *Biochimica et biophysica acta. Molecular cell research*, 1870(3), 119407. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2022.119407>
- 86) Delcour, A. H. (2009) *Outer membrane permeability and antibiotic resistance.* *Biochim Biophys Acta* 1794, 808-816, doi:10.1016/j.bbapap.2008.11.005
- 87) Lakaye, B., Dubus, A., Joris, B., Frère, J. M. (2002). *Method for estimation of low outer membrane permeability to beta-lactam antibiotics.* *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 46(9), 2901–2907. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.9.2901-2907.2002>
- 88) Hurley, J. C., Miller, G. H., Smith, A. L. (1995). *Mechanism of amikacin resistance in Pseudomonas aeruginosa isolates from patients with cystic fibrosis.* *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 22(4), 331–336. [https://doi.org/10.1016/0732-8893\(95\)00138-6](https://doi.org/10.1016/0732-8893(95)00138-6)
- 89) Tsai, C. J., Loh, J. M., Proft, T. (2016). *Galleria mellonella infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing.* *Virulence*, 7(3), 214–229. <https://doi.org/10.1080/21505594.2015.1135289>
- 90) Matsuura, M. (2013). *Structural Modifications of Bacterial Lipopolysaccharide that Facilitate Gram-Negative Bacteria Evasion of Host Innate Immunity.* *Frontiers in Immunology*, 4. doi:10.3389/fimmu.2013.00109
- 91) Filippov, A. A., Sergueev, K. V., *et al.* (2011). *Bacteriophage-resistant mutants in Yersinia pestis: identification of phage receptors and attenuation for mice.* *PloS one*, 6(9), e25486. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025486>
- 92) Turner, D., Adriaenssens, E. M., Tolstoy, I., Kropinski, A. M. (2021). *Phage Annotation Guide: Guidelines for Assembly and High-Quality Annotation.* *PHAGE (New Rochelle, N.Y.)*, 2(4), 170–182. <https://doi.org/10.1089/phage.2021.0013>
- 93) Shen, A., Millard, A. (2021). *Phage Genome Annotation: Where to Begin and End.* *PHAGE (New Rochelle, N.Y.)*, 2(4), 183–193. <https://doi.org/10.1089/phage.2021.0015>
- 94) Hashemolhosseini, S., Holmes, Z., Mutschler, B., Henning, U. (1994). *Alterations of receptor specificities of coliphages of the T2 family.* *J Mol Biol* 240: 105-110. doi:<https://doi.org/10.1006/jmbi.1994.1424>
- 95) Sun, L., You, J., Li, D. *et al.* (2023). *Variants of a putative baseplate wedge protein extend the host range of Pseudomonas phage K8.* *Microbiome* 11, 18. <https://doi.org/10.1186/s40168-022-01459-w>

- 96) Menon, N. D., Penziner, S., Montañó, E. *et al.* (2022). *Increased Innate Immune Susceptibility in Hyperpigmented Bacteriophage-Resistant Mutants of Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 66(8), e0023922. <https://doi.org/10.1128/aac.00239-22>
- 97) Xuan, G., Lin, H., Tan, L., Zhao, G., Wang, J. (2022). *Quorum Sensing Promotes Phage Infection in Pseudomonas aeruginosa PAO1*. *mBio*, 13(1), e0317421. <https://doi.org/10.1128/mbio.03174-21>
- 98) Tattawasart, U., Maillard J., Furr J., Russell A. (2000). *Outer membrane changes in Pseudomonas stutzeri resistant to chlorhexidine diacetate and cetylpyridinium chloride*. *Int J Antimicrob Agents* 16:233–238. doi: 10.1016/s0924-8579(00)00206-5
- 99) Xuan, G., Lin, H., Kong, J., Wang, J. (2022). *Phage Resistance Evolution Induces the Sensitivity of Specific Antibiotics in Pseudomonas aeruginosa PAO1*. *Microbiology spectrum*, 10(5), e0135622. <https://doi.org/10.1128/spectrum.01356-22>
- 100) Hernández, L., Alvarez-Ortega, C., Wiegand, I., *et al.* (2013). Characterization of the polymyxin B resistome of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 57(1), 110–119. <https://doi.org/10.1128/AAC.01583-12>
- 101) Hao, Y., Murphy, K., Lo, R. Y., Khursigara, C. M., Lam, J. S. (2015). *Single-Nucleotide Polymorphisms Found in the migA and wbpX Glycosyltransferase Genes Account for the Intrinsic Lipopolysaccharide Defects Exhibited by Pseudomonas aeruginosa PA14*. *Journal of bacteriology*, 197(17), 2780–2791. <https://doi.org/10.1128/JB.00337-15>
- 102) Stephen, T., Abedon, Sarah J., Kuhl, Bob G., *et al.* (2011) *Phage treatment of human infections*, *Bacteriophage*, 1:2, 66-85, DOI: 10.4161/bact.1.2.15845
- 103) McCallin, Sacher, Zheng, Chan. (2019). *Current State of Compassionate Phage Therapy*. *Viruses*, 11(4), 343. doi:10.3390/v11040343

Myriad applications of bacteriophages beyond phage therapy

Juan Carlos García-Cruz^{1,*}, Daniel Huelgas-Méndez^{1,*},
 Jorge Santiago Jiménez-Zúñiga¹, Xareni Rebollar-Juárez¹,
 Mariel Hernández-Garnica¹, Ana María Fernández-Presas¹,
 Fohad Mabood Husain², Rawaf Alenazy³, Mohammed Alqasmi³,
 Thamer Albalawi⁴, Pravej Alam⁴ and Rodolfo García-Contreras¹

¹ Faculty of Medicine Department of Microbiology and Parasitology, Universidad Nacional de México, Mexico City, Mexico

² Department of Food Science and Nutrition, King Saud University, Riyadh, Saudi Arabia

³ Department of Medical Laboratory, College of Applied Medical Sciences-Shaqra, Shaqra University, Shaqra, Saudi Arabia

⁴ Department of Biology, Prince Sattam bin Abdulaziz University, Alkharj, Saudi Arabia

* These authors contributed equally to this work.

ABSTRACT

Bacteriophages are the most abundant biological entity on the planet, having pivotal roles in bacterial ecology, animal and plant health, and in the biogeochemical cycles. Although, in principle, phages are simple entities that replicate at the expense of their bacterial hosts, due the importance of bacteria in all aspects of nature, they have the potential to influence and modify diverse processes, either in subtle or profound ways. Traditionally, the main application of bacteriophages is phage therapy, which is their utilization to combat and help to clear bacterial infections, from enteric diseases, to skin infections, chronic infections, sepsis, *etc.* Nevertheless, phages can also be potentially used for several other tasks, including food preservation, disinfection of surfaces, treatment of several dysbioses, and modulation of microbiomes. Phages may also be used as tools for the treatment of non-bacterial infections and pest control in agriculture; moreover, they can be used to decrease bacterial virulence and antibiotic resistance and even to combat global warming. In this review manuscript we discuss these possible applications and promote their implementation.

Submitted 9 February 2023

Accepted 30 March 2023

Published 21 April 2023

Corresponding author
 Rodolfo García-Contreras,
 rgarc@bq.unam.mx

Academic editor
 Konstantinos Kormas

Additional Information and
 Declarations can be found on
 page 10

DOI [10.7717/peerj.15272](https://doi.org/10.7717/peerj.15272)

© Copyright
 2023 García-Cruz et al.

Distributed under
 Creative Commons CC-BY 4.0

OPEN ACCESS

Subjects Biotechnology, Ecology, Microbiology, Virology, Environmental Contamination and Remediation

Keywords Bacteriophage, Disinfectants, Virulence, Resistance, Dysbiosis, Pest, Global warming

INTRODUCTION

Bacteriophages are the most abundant biological entity on the planet, likely surpassing bacteria by a factor of 10 (*Mushegian, 2020*). They play important roles in global ecology, biogeochemical cycles, and animal and plant health (*Batinovic et al., 2019*). Bacteriophages were discovered independently by Frederick Twort and Felix d'Herelle, and d'Herelle hypothesized that they were viruses as well as coined the term bacteriophage. d'Herelle also pioneered phage therapy, which is the utilization of phages to treat infections. From its beginning, phage therapy was very promising and useful for the treatment of dysentery, cholerae and other diseases, and its study and implementation continued to be carried out

in some countries in Eastern Europe like Georgia and Poland. However, due the discovery of antibiotics, the use of phage therapy in the western world was scarce (Summers, 2012). Nevertheless, due the increasing prevalence in bacterial resistance towards antibiotics, recently the use of bacteriophages in occidental medicine has been revived, especially as the last resource to treat recalcitrant infections caused by multi- and pan-drug-resistant bacteria. Hence, the number of successful cases in which phage therapy was able to rescue untreatable patients is increasing (Schooley et al., 2017; LaVergne et al., 2018; Law et al., 2019; Johri et al., 2021). Recently, Strathdee and coworkers published a comprehensive review on phage therapy explaining phage biology, the ideal characteristics of phages that make them suitable for their utilization in phage therapy, phage engineering and current phage mainstream applications (Strathdee et al., 2023). Remarkably, bacteriophages have a great versatility and potential as useful tools in several fields beyond classic phage therapy, including cattle raising, agriculture, pest control, microbiome modulation, and disinfection. In this review, we discuss several possible bacteriophage potential and robust applications beyond classical phage therapy and hope it will stimulate research for these applications and lead to additional uses. This review is intended for microbiologists, biotechnologists and to a general audience interested in biotechnological applications of bacteriophages.

SURVEY METHODOLOGY

Suitable literature was compiled using the main online scientific databases, including PubMed, Science Direct (<http://sciencedirect.com>), Web of Science, Scopus, and Google Scholar. Several keywords, such as bacteriophage, applications, antibiotic resistance, virulence, quorum sensing, biofilm, disinfectants, food preservatives, probiotics, microbiome, dysbiosis, CRISPR-Cas, methane, global warming, etc., were used, together with Boolean operators such as “AND” and “OR”.

Bacteriophages as preservatives, disinfectants, and biofilm inhibitors

Bagged products, such as salads, greens and mushrooms, represent environments suitable for bacterial growth, and contamination has resulted in several outbreaks, like 2022's *Listeria monocytogenes* outbreaks in the U.S. *Bacillus cereus*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.* and *Staphylococcus aureus* are some of the most common pathogens that contaminate and spoil food, nevertheless pathogens like *Borrelia spp.* and *Yersinia enterocolitica* are also of concern. Phage utilization after the harvest of vegetables or before food packaging should be further evaluated, and there are several commercial products like Intralytix, Micros Food Safety, FINK TEC GmbH, Passport Food Safety Solutions and Phagelux, which have gained approval of the Food and Drug Administration (FDA) (Arienzo et al., 2020; Endersen & Coffey, 2020). Also, phage utilization in the food industry may be useful for preventing contamination by *Cronobacter sakazakii*, in baby formula and *Clostridium botulinum* in honey. Both pathogens affect children and present misleading clinical presentations.

Furthermore, phage preparations may also be useful as self-replicating disinfectants for decontaminating or cleaning surfaces, such as in hospitals. They are particularly effective

at killing bacteria within biofilms since biofilms are often resistant to chemical disinfectants. To date, it has been shown that for some bacteria, such as *Pseudomonas aeruginosa*, chemical disinfectants like sodium hypochlorite and benzalkonium chloride have synergistic effects with some phages, enhancing biofilm elimination on contaminated surfaces. Similarly, phages that can eliminate biofilms of other important bacterial pathogens such as *S. aureus*, *E. coli*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, etc., have been reported ([Song et al., 2021](#); [Liu et al., 2022](#)).

Bacteriophages as tools for decreasing antibiotic resistance and bacterial virulence

The ability of bacteria to readily develop resistance against phages is a double-edged sword for bacterial pathogens, since one of the most common bacterial mechanisms of developing phage resistance is to mutate the phages receptors, frequently diminishing or avoiding its expression; however, some of the phages preferred receptors are structures related to virulence, such as flagella, type IV pili, and capsular polysaccharide and some others such as efflux pumps and lipopolysaccharide (LPS) are involved in bacterial antibiotic resistance. Hence, bacteria that become resistant to phage sometimes also decrease their virulence and/or their antimicrobial resistance. Several authors had already demonstrated this property for important bacterial pathogens such as *P. aeruginosa* and *A. baumannii* ([León & Bastías, 2015](#); [Chan et al., 2016](#); [Gordillo Altamirano et al., 2021](#)). Moreover, important processes leading to the exchange of genetic material in bacteria such as conjugation, which promotes the spread of bacterial resistance, can also be inhibited by some filamentous phages for example by the occlusion of conjugative pilus by phage particles ([Lin et al., 2011](#)). Hence, perhaps this property could be used to decrease bacterial virulence bacteria or to re-sensitize pathogenic bacteria against antibiotics in hospitals, farms, aquaculture, and wastewater treatment plants and even in the environment. Their implementation may be first done in small experimental settings to evaluate its performance and gradually could be scaled. Furthermore, phages may also be used to inhibit quorum sensing (QS), which is a mechanism of cell signaling that allows the regulation of gene expression in response to changes in cell-population density. Many virulence genes are upregulated through this mechanism, therefore the inhibition or interruption of the QS signaling pathway is a desired mechanism of action of antivirulence compounds ([Asfour, 2018](#)). For example, (Aqs1) located in the genome of the *Pseudomonas aeruginosa* phage DMS3 contains two domains: one that inhibits the protein LasR, the master regulator of QS in this bacterium, and another that inhibits the activity of the type IV pilus assembly ATPase protein (PilB). Remarkably, this protein requires 69 residues to decrease virulence ([Shah et al., 2021](#)). Hence, phages with these kinds of negative regulators of QS, may be also useful for reducing bacterial virulence.

Phages to treat dysbiosis and modulate microbiomes

Animal microbiomes, including humans, are dominated by bacterial species and microbiome alterations have been linked to a plethora of diseases including obesity, type II diabetes, autoimmune diseases, cancer, autism, depression, periodontal disease ([Wang](#)

et al., 2017). Phages could be an ideal tool for the treatment of several dysbioses, helping to reach an adequate balance of the microbiome, particularly if the imbalance is caused by one or a few species that promote disease when they overgrow. For example phages could be implemented to control the populations of *Helicobacter pylori*, the main agent causing gastric and peptic ulcers, especially since current triple and quadruple therapies with antibiotics aim to eliminate it, but the evidence of a protective role of this bacterium against a variety of diseases such as asthma, allergies, and esophageal cancer is growing (Shahabi *et al.*, 2008; Zuo *et al.*, 2021). Hence, perhaps modulation of their population size, rather than complete elimination, could be a better option for enhancing human health. Unfortunately, there are only few examples of characterized *H. pylori* bacteriophages and most of them are lysogenic (Muñoz *et al.*, 2020; Khosravi *et al.*, 2021). Therefore, further research is required, which will allow the identification of lytic phages suitable for controlling *H. pylori* populations in patients. Another possible bacterial target for phages is *Clostridium difficile*, which causes recurrent diarrhea usually in elderly people after an antibiotic course due to overgrowth of this bacterium that survives the antibiotics since it produces spores that are metabolically inactive and hence insensitive to antibiotics. Currently, the most successful treatment for those patients is a fecal transplant from healthy donors (Juul *et al.*, 2018); however, phages able to kill *C. difficile* may be another possibility and these have the advantage that they may be used prophylactically in patients with probabilities of develop recurrent diarrhea before or during the antibiotic course (Hargreaves & Clokie, 2014). Furthermore, other dysbioses such as acne, the most common skin infection, is produced by an overgrowth of the bacterium *Cutibacterium acnes* that triggers inflammatory responses; to date several phages active against *C. acnes* have been isolated and studied, finding that usually they are able to infect several *C. acnes* strains which is a good quality for their possible application (Golembo *et al.*, 2022). Another dysbiosis that potentially could be treated with bacteriophages is vaginosis, which is caused by the overgrowth of *Gardnerella vaginalis*, a natural inhabitant of the female genital tract that is normally non harmful unless it overgrows. Vaginosis is usually treated with the antibiotics clindamycin or metronidazole but relapses frequently; hence, phage therapy could be another alternative to combat this common dysbiosis (Bordigoni, Bouchard & Desnues, 2021). Also, in a more generic way, phages can be added to prebiotic and probiotic formulations to enhance their health promoting effects by reducing the growth of potentially harmful bacteria (Kiani *et al.*, 2020) or by decreasing bacterial competitors of health-promoting species. More complex multifactorial dysbioses, such as those causing periodontal disease, dental bacterial plaque and caries, are also susceptible to be treated using bacteriophages. For instance, several bacterial pathogens such as *Streptococcus mutans*, which is likely the main causative of dental caries, and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* which is the bacteria most frequently related to rapidly progressive periodontitis, are strong candidates for the application of phages as they are important periodontal pathogens and since lytic phages able to destroy these bacteria either in a free living state or in biofilms have been described (Castillo-Ruiz *et al.*, 2011; Dalmaso *et al.*, 2015). Moreover, health-damaging conditions such as obesity may be also

combated by administrating phages targeting bacteria associated with a promotion of weight gain, fat accumulation, *etc.*

Bacteriophages to combat nonbacterial diseases

Some degenerative diseases like Parkinson or Alzheimer are characterized by the accumulation of misfolded protein aggregates which possess a canonical amyloid fold. The current therapies for these diseases are based on targeting specific protein aggregation pathways. In an interesting work, the bacteriophage M13 capsid protein was shown to have a motif that interacts with the canonical amyloid fold; therefore, it has been used to reverse the formation of plaques derived from amyloid-like structures in the brain. This protein represents a novel approach to combat neurodegenerative diseases ([Krishnan et al., 2014](#)). There is a famous Arab quote that says: “*The enemy of my enemy is my friend*”. In phage-based technologies, this phrase is not only appropriate for the context of combating bacterial infections using classical phage therapy but also for viral infections in animals and plants. Most of these properties of phages against viral infections are of immunomodulatory nature but they also can be used as vehicles for gene delivery, for diagnosis of diseases and for discovery and development of new antivirals, as well as vaccine development. Some antiviral responses that are triggered by the interaction between eukaryotic cells and bacteriophages indicate that phages have the potential to be utilized as adjunct therapy of viral infections like those caused by SARS-COV-2 and Epstein-Barr virus (EBV). Moreover, a secondary benefit of this application of phages would be that it could aim to prevent or combat secondary bacterial infections that often appear and kill coronavirus disease of 2019 (COVID) patients ([Gorski et al., 2020](#); [Shahin et al., 2022](#)). Tumor necrosis factor (TNF) levels of COVID-19 patients are high so anti-TNF therapies are recommended because the elevated production of this anti-inflammatory cytokine can increase the risk of viral replication and bacterial infection ([Feldmann et al., 2020](#)). Since some phages that infect *A. baumannii* such as ϕ km18P and B ϕ -R2096 downregulate TNF- α concentration in lungs and serum of mice with acute pneumonia, they may be used in human patients for decreasing TNF- α level upon viral infections. Also, it has been hypothesized that the integrin KGD motifs (Lys-Gly-Asp) located on the capsids of some phages such as T4 could compete with SARS-CoV-2 and other coronaviruses for binding their receptors, since the exposed loop of the protein S of SARS-CoV-2 has the same motif ([Gorski et al., 2020](#)). Furthermore, this motif is also relevant for the infection of the EBV to B and epithelial cells, so phage T4 can also potentially interfere in the adsorption and internalization of EBV ([Górski et al., 2018](#)). As it was mentioned above, bacteriophages can be used as vehicles for gene delivery. In 2019, Przystal and coworkers used a hybrid vector composed of the phage M13 with a single stranded adeno-associated transgene cassette inserted in an intergenomic region of the single stranded phage genome to treat glioblastoma multiforme (GBM) in mice. The vector bears the RGD4C ligand in the pIII minor coat protein on the capsid of M13 which binds the α v β 3 integrin receptor present in the tumor cells. Then, the hybrid vector is internalized and the recombinant genome is delivered into the nucleus to generate the expression of a therapeutic gene called HSVtk which induces cell death by apoptosis.

Moreover, the expression of HSVtk was under the control of a promoter induced by the administration of TMZ. The approach was efficient and harmless ([Przystal et al., 2019](#)).

For viral therapeutics, a similar approach can be applied in which phage based vectors can be engineered to carry and deliver CRISPR-Cas systems as therapeutic genes and target an infected eukaryotic cell editing its genome, changing either host or viral genes. This approach could be optimal for those viruses that can integrate into its eukaryotic host genome like human immunodeficiency virus, papillomavirus and herpes simplex viruses ([Chen et al., 2018](#); [Chen, Yu & Guo, 2018](#)). The Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR)-associated (Cas) system includes the helicase called the Cas protein which can bind to RNA transcribed from palindromic repeats of DNA. The transcript of palindromic repeats of DNA is known as the transactivating CRISPR RNA (tracrRNA) while the spacers transcript is called CRISPR RNA (crRNA). The tracrRNA and crRNA can be linked to form a single guide RNA (sgRNA) that can direct Cas9 to induce a double stranded DNA break in the protospacer adjacent motifs (PAMs) region of the DNA target ([Chen, Yu & Guo, 2018](#)). Despite that there are two effective vaccines against human papilloma virus (HPV), it remains as the causal agent of the second most common cancer worldwide. Moreover, its double stranded DNA (dsDNA) may integrate into the host genome or remain as an episome so it could be also edited with CRISPR-Cas. There are two main target genes of HPV that can be treated with this strategy, the oncogenes E6 and E7, which can induce the degradation of tumor-suppressive protein (p53), and retinoblastoma (Rb), thereby blocking the cell cycle ([Kennedy et al., 2014](#)). [Kennedy et al. \(2014\)](#) proved that the expression of a bacterial Cas9 RNA-guided endonuclease, together with two pairs of single guide RNAs (sgRNAs) specific for E6 and E7 of HPV-18 and HPV-16, respectively, induce cleavage of the HPV genome and eventual cell cycle arrest and cell death in transformed SiHA and HeLa cervical carcinoma cell lines. Although they used a lentiviral vector, it is also possible to use engineered phage-based vectors to improve the efficiency of transduction and this procedure can be escalated to an *in vivo* infection model. Some of the advantages of using engineered phages as a vehicle of CRISPR-cas delivery into mammalian cells are their specific cell tropism, in contrast to eukaryotic virus vectors which are more prone to have interactions with more than one type of eukaryotic cell and consequently more chances to develop side effects, making phage-based vectors safer for clinical use ([Bakhshinejad & Sadeghizadeh, 2014](#)). Nonetheless, the interactions between phages and the immune system should be investigated further in order to make this strategy safer and more effective. Furthermore, the relatively simple genetics of the phages make them easier to manipulate by widespread using tools like phage display and also phages can package a large sized vector-genomes in contrast to adeno-associated virus vectors ([Zhou, Suwan & Hajitou, 2020](#); [Fage, Lemire & Moineau, 2021](#)).

The challenges for using phages as delivery methods for CRISPR-Cas involve the manufacture of the engineered phages, likely requiring utilization of strict and expensive standards for producing and purifying them.

Phages as a tool for pest control

The utilization of bacteriophages to combat bacterial diseases in agriculture and farming is a growing practice showing promising results as a safe and efficient alternative to the use of antibiotics. However, beside the straight forward utilization of phages for killing bacteria that cause disease to commercially-important cultures, we propose that they can be used to debilitate and perhaps even kill some insect pests that rely in their microbiome to perform important physiological functions such as bacteria of the genera *Buchnera* that are obligate endosymbionts of aphids and contribute to the production of tryptophan (a key factor to maintain nutritional balance) and for the development and reproduction of their hosts (Shigenobu & Wilson, 2011; Zhang et al., 2021). Similarly, bacterial symbionts are important for the physiology of other pests such as termites, flies, mosquitoes, and roaches. So far, an interesting work demonstrated that phages can be used to remove up to 90% of *P. aeruginosa* in the gut of *Musca domestica* and that the removal of this species (that provides the flies defense against fungal infections) led to broad changes in gut microbiome composition affecting the normal development of the flies (Zhang et al., 2021).

Mosquitoes are the most important vectors involved in the transmission of multiple animal and human pathogens, for that reason several strategies affecting the development of these insects have been investigated. The microbiota of adult mosquitoes is mainly derived from the larval microbiota, which in turn depends on the microbiota of their water habitat; alterations in the microbiota of mosquito larvae have a huge impact on mosquito biology for that reason this approach can potentially be exploited to alter the mosquitoes' life-history traits. Recently it was shown that the microbiota of *Anopheles* larvae could be modulated by using bacteriophages in the larvae water (Dimopoulos, 2022). In that work gnotobiotic *Anopheles* larvae with microbiota composed of *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Elizabethkingia*, and *Asaia* showed a survival and larval development reduction with the addition of phages into the larvae water targeting *Enterobacter* and *Pseudomonas* respectively, and a synergistic behavior was shown when both phages were added simultaneously (Dimopoulos, 2022).

Phages for combating global warming

Methane is the second more abundant greenhouse gas, just behind CO₂ and a significant amount of it is produced by methanogenic archaea in the microbiome of cattle raised for human consumption. Since archaea also are infected by viruses (equivalent to bacteriophages), they can be used to decrease their population in cattle microbiome and decrease methane emissions produced by livestock (Boadi et al., 2004). Alternatively, phages that target eubacteria that have synergies with methanogenic archaea may be also targeted since the decrease of their populations will also decrease that of the methanogens and hence mitigate methane production. Similarly, CO₂ emissions and trapping may be modulated using bacteriophages to control bacterial populations. Figure 1 summarizes the main phage applications discussed in this manuscript.

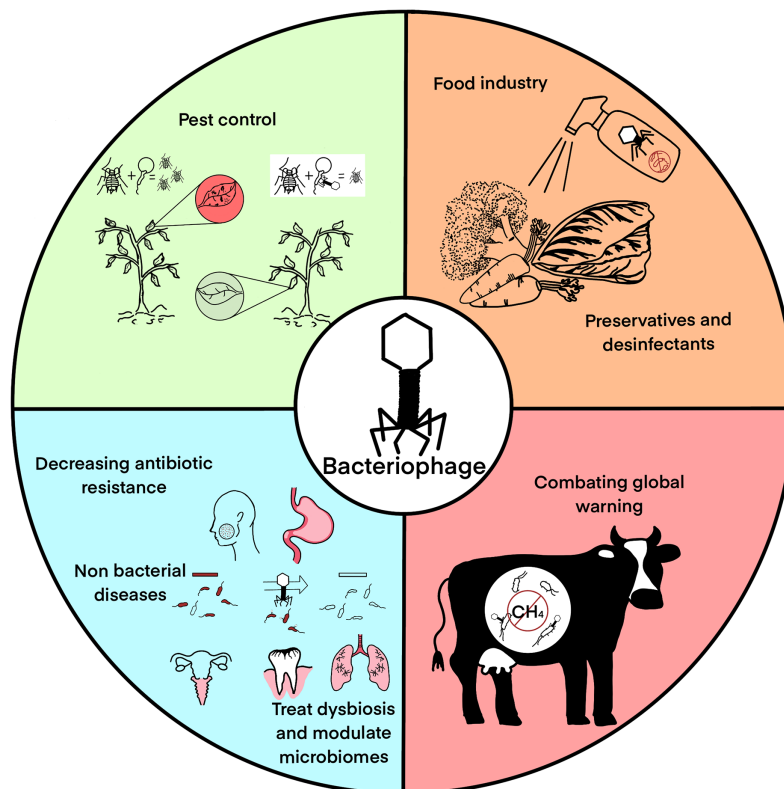


Figure 1 Main bacteriophage applications: pest control, food industry, medical applications excluding classical phage therapy, and global warming mitigation.

Full-size DOI: [10.7717/peerj.15272/fig-1](https://doi.org/10.7717/peerj.15272/fig-1)

Possible limitation and drawbacks

Currently most of the applications for phage therapy described here are still in their early stages, and much more basic research is needed. For example, research is needed to expand the repertoire of lytic phages against *H. pylori*, *C. difficile* and *G. vaginalis*, since to date only a few phages able to infect them have been described and some of them are lysogenic rather than lytic (Bordigoni, Bouchard & Desnues, 2021), making it necessary to identify more suitable phages and/or engineer the lysogenic ones to turn them in to lytic. On the other hand, some illnesses originated from dysbioses such as periodontal disease, are complex since several different bacterial species are implicated acting in a specific spatiotemporal order; hence, the design of phage treatments for the prevention and cure of these diseases needs to take these characteristics into account. Furthermore, phage mediated lysis of bacteria sometimes releases toxic bacterial compounds like LPS and other toxins that can damage the host and promote inflammation. Moreover, the high prevalence of phages in the environment is a risk of contamination in the dairy industry, potentially causing reduction or loss of the yield in several dairy products such as yogurt, kefir, and cheese. In addition, the contamination of these products with antibiotic resistance genes transferred by phages may massively disseminate antibiotic resistance (Blanco-Picazo et al., 2022); nevertheless, one way to prevent this scenario is to use a

temperate phage to lysogenize industrial strains to exclude environmental phages. Therefore, this approach would provide immunity against phages, mitigating the risk of undesirable phage infections (*da Silva Duarte et al., 2019*). Moreover, despite the myriad of applications bacteriophages have, extensive further research is needed in order to increase our understanding of phage biology and of their ecological relationship with bacteria. For instance, current applied phages are selected avoiding those that carry potential genes encoding toxins and other virulence factors, antibiotic resistance genes, *etc.*; however, around 70% of phage genes have unknown functions hence it is not possible to rule out that some of the used phages have potentially dangerous genes (*McNair et al., 2019*). Moreover, ecology is complex and perhaps the utilization of phages for treating dysbioses could have unexpected consequences. For example, for *P. aeruginosa*, some phages can preferentially eliminate mutants defective in quorum sensing (QS) that are impaired in the production of many virulence factors and potentially could increase the fraction of QS proficient bacteria selecting therefore more harmful bacteria (*Saucedo-Mora et al., 2017; Cazares, García-Contreras & Pérez-Velázquez, 2020*). Beyond that, the escalation of phage preparations, and the financial and technical challenges to make them commercially available for any application should be considered. Finally, if the utilization of phages becomes widespread, society and industry should avoid committing the same mistakes that lead us to the current antibiotic crisis (*Amábile-Cuevas, 2022*).

CONCLUSIONS

Although the mainstream bacteriophage application is their use for treating bacterial infections phage therapy, possible alternative bacteriophage applications are numerous and include ones in the industrial, medical, veterinary and health fields. Critically, their possible uses are only limited by the human imagination; hence, in the following decades phages may become fundamental contributors for solving some of the more critical global concerns for humanity, including (1) reducing the antibiotic crisis, not only curing patients infected with bacteria insensitive to antibiotics but contributing to the decrease in the prevalence of multi and pan drug resistant bacteria in hospitals (if they are used as disinfectants) and in the environment (if regular antibiotics used in livestock raising and in agriculture are replaced by phages). Additionally, even if some bacteria turn resistant against the used phages, new phages can be selected and obsolete phages may be engineered or evolved to regain the ability to infect the hosts. Furthermore, sometimes bacteria that become phage resistant suffer a decrease in their antibiotic resistance ability; therefore, this property may also contribute to decrease the overall antibiotic bacterial resistance worldwide. (2) Increasing food production, by their application for combating bacterial pathogens that attack crops and perhaps by their use to debilitate insects, nematodes, and other eukaryotic pests that depend on their bacterial microbiota to perform important metabolic traits. (3) Decreasing obesity if they are used to promote the reduction of obesity promoting bacterial species in the human gut microbiota or by enhancing the proliferation of lean promoting species and (4) reducing global warming, if they are used to reduce the populations of methanogenic archaea or methanogenic promoting bacteria in cattle.

Furthermore, we think that many novel ways to utilize bacteriophages or their components will constantly appear, increasing even more the potential benefits of the utilization of these viruses.

On the other hand, several considerations such as possible not desired effects of their applications and challenges such as massive production of phages and their thoughtful purification need to be contemplated in order to maximize the benefits mankind can obtain from these versatile and amazing organisms.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful with Professor Dr. Thomas K. Wood, from Penn State University for proofreading the manuscript.

ADDITIONAL INFORMATION AND DECLARATIONS

Funding

This study is supported *via* funding from Prince Sattam bin Abdulaziz University project number (PSAU/2023/R/1444) and by DGAPA-UNAM grant number PAPIIT-IN200121. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Grant Disclosures

The following grant information was disclosed by the authors:

Prince Sattam bin Abdulaziz University: PSAU/2023/R/1444.

DGAPA-UNAM: PAPIIT-IN200121.

Competing Interests

Rodolfo García-Contreras is an Academic Editor for PeerJ.

Author Contributions

- Juan Carlos García-Cruz conceived and designed the experiments, performed the experiments, analyzed the data, authored or reviewed drafts of the article, and approved the final draft.
- Daniel Huelgas-Méndez conceived and designed the experiments, performed the experiments, analyzed the data, authored or reviewed drafts of the article, and approved the final draft.
- Jorge Santiago Jiménez-Zúñiga conceived and designed the experiments, performed the experiments, analyzed the data, authored or reviewed drafts of the article, and approved the final draft.
- Xareni Rebollar-Juárez conceived and designed the experiments, performed the experiments, analyzed the data, authored or reviewed drafts of the article, and approved the final draft.
- Mariel Hernández-Garnica conceived and designed the experiments, performed the experiments, analyzed the data, prepared figures and/or tables, authored or reviewed drafts of the article, and approved the final draft.

- Ana María Fernández-Presas conceived and designed the experiments, performed the experiments, analyzed the data, authored or reviewed drafts of the article, and approved the final draft.
- Fohad Mabood Husain conceived and designed the experiments, performed the experiments, analyzed the data, authored or reviewed drafts of the article, and approved the final draft.
- Rawaf Alenazy conceived and designed the experiments, performed the experiments, analyzed the data, authored or reviewed drafts of the article, and approved the final draft.
- Mohammed Alqasmi conceived and designed the experiments, performed the experiments, analyzed the data, authored or reviewed drafts of the article, and approved the final draft.
- Thamer Albalawi conceived and designed the experiments, performed the experiments, analyzed the data, authored or reviewed drafts of the article, and approved the final draft.
- Pravej Alam conceived and designed the experiments, performed the experiments, analyzed the data, authored or reviewed drafts of the article, and approved the final draft.
- Rodolfo García-Contreras conceived and designed the experiments, performed the experiments, analyzed the data, prepared figures and/or tables, authored or reviewed drafts of the article, and approved the final draft.

Data Availability

The following information was supplied regarding data availability:

This is a literature review.

REFERENCES

- Amábile-Cuevas CF. 2022.** Phage therapies: lessons (not) learned from the Antibiotic Era. *PHAGE: Therapy, Applications, and Research* **3(1)**:12–14 DOI [10.1089/phage.2022.0001](https://doi.org/10.1089/phage.2022.0001).
- Arienzo A, Murgia L, Fraudentali I, Gallo V, Angelini R, Antonini G. 2020.** Microbiological quality of ready-to-eat leafy green salads during shelf-life and home-refrigeration. *Foods* **9(10)**:1421 DOI [10.3390/foods9101421](https://doi.org/10.3390/foods9101421).
- Asfour H. 2018.** Anti-quorum sensing natural compounds. *Journal of Microscopy and Ultrastructure* **6(1)**:1 DOI [10.4103/JMAU.JMAU_10_18](https://doi.org/10.4103/JMAU.JMAU_10_18).
- Bakhshinejad B, Sadeghizadeh M. 2014.** Bacteriophages as vehicles for gene delivery into mammalian cells: prospects and problems. *Expert Opinion on Drug Delivery* **11(10)**:1561–1574 DOI [10.1517/17425247.2014.927437](https://doi.org/10.1517/17425247.2014.927437).
- Batinovic S, Wassef F, Knowler SA, Rice DTF, Stanton CR, Rose J, Tucci J, Nittami T, Vinh A, Drummond GR, Sobey CG, Chan HT, Seviour RJ, Petrovski S, Franks AE. 2019.** Bacteriophages in natural and artificial environments. *Pathogens* **8(3)**:100 DOI [10.3390/pathogens8030100](https://doi.org/10.3390/pathogens8030100).
- Blanco-Picazo P, Gómez-Gómez C, Morales-Cortes S, Muniesa M, Rodríguez-Rubio L. 2022.** Antibiotic resistance in the viral fraction of dairy products and a nut-based milk. *International Journal of Food Microbiology* **367**:109590 DOI [10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109590](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109590).
- Boadi D, Benchaar C, Chiquette J, Massé D. 2004.** Mitigation strategies to reduce enteric methane emissions from dairy cows: update review. *Canadian Journal of Animal Science* **84(3)**:319–335 DOI [10.4141/A03-109](https://doi.org/10.4141/A03-109).

- Bordigoni A, Bouchard S, Desnues C. 2021.** Isolation and characterization of gardnerella phage vB_Gva_AB1, a bacteriophage infecting a clinical strain of gardnerella vaginalis. *Microbiology Resource Announcements* **10**(12):1 DOI [10.1128/MRA.00053-21](https://doi.org/10.1128/MRA.00053-21).
- Castillo-Ruiz M, Vinés ED, Montt C, Fernández J, Delgado JM, Hormazábal JC, Bittner M. 2011.** Isolation of a novel Aggregatibacter actinomycetemcomitans serotype b bacteriophage capable of lysing bacteria within a biofilm. *Applied and Environmental Microbiology* **77**(9):3157–3159 DOI [10.1128/AEM.02115-10](https://doi.org/10.1128/AEM.02115-10).
- Cazares A, García-Contreras R, Pérez-Velázquez J. 2020.** Eco-evolutionary effects of bacterial cooperation on phage therapy: an unknown risk? *Frontiers in Microbiology* **11**:3598 DOI [10.3389/fmicb.2020.590294](https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.590294).
- Chan BK, Siström M, Wertz JE, Kortright KE, Narayan D, Turner PE. 2016.** Phage selection restores antibiotic sensitivity in MDR *Pseudomonas aeruginosa*. *Scientific Reports* **6**:26717 DOI [10.1038/srep26717](https://doi.org/10.1038/srep26717).
- Chen YC, Sheng J, Trang P, Liu F. 2018.** Potential application of the CRISPR/CAS9 system against herpesvirus infections. *Viruses* **10**(6):291 DOI [10.3390/v10060291](https://doi.org/10.3390/v10060291).
- Chen S, Yu X, Guo D. 2018.** CRISPR-Cas targeting of host genes as an antiviral strategy. *Viruses* **10**(1):40 DOI [10.3390/v10010040](https://doi.org/10.3390/v10010040).
- da Silva Duarte V, Giaretta S, Campanaro S, Treu L, Armani A, Tarrah A, de Paula SO, Giacomini A, Corich V. 2019.** A cryptic non-inducible prophage confers phage-immunity on the *Streptococcus thermophilus* M17PTZA496. *Viruses* **11**(1):7 DOI [10.3390/v11010007](https://doi.org/10.3390/v11010007).
- Dalmasso M, de Haas E, Neve H, Strain R, Cousin FJ, Stockdale SR, Ross RP, Hill C. 2015.** Isolation of a novel phage with activity against *Streptococcus mutans* biofilms. *PLOS ONE* **10**(9):e0138651 DOI [10.1371/journal.pone.0138651](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138651).
- Dimopoulos CVTG. 2022.** Phage therapy for mosquito larval control: a proof-of-principle study. *mBio* **13**(6):e0301722 DOI [10.1128/mbio.03017-22](https://doi.org/10.1128/mbio.03017-22).
- Endersen L, Coffey A. 2020.** The use of bacteriophages for food safety. *Current Opinion in Food Science* **36**:1–8 DOI [10.1016/j.cofs.2020.10.006](https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.10.006).
- Fage C, Lemire N, Moineau S. 2021.** Delivery of CRISPR-Cas systems using phage-based vectors. *Current Opinion in Biotechnology* **68**:174–180 DOI [10.1016/j.copbio.2020.11.012](https://doi.org/10.1016/j.copbio.2020.11.012).
- Feldmann M, Maini RN, Woody JN, Holgate ST, Winter G, Rowland M, Richards D, Hussell T. 2020.** Trials of anti-tumour necrosis factor therapy for COVID-19 are urgently needed. *The Lancet* **395**(10234):1407–1409 DOI [10.1016/S0140-6736\(20\)30858-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30858-8).
- Golembo M, Puttagunta S, Rappo U, Weinstock E, Engelstein R, Gahali-Sass I, Moses A, Kario E, Ben-Dor Cohen E, Nicenboim J, Ben David H, Sudakov K, Cohen A, Bassan M, Zak NB. 2022.** Development of a topical bacteriophage gel targeting *Cutibacterium acnes* for acne prone skin and results of a phase 1 cosmetic randomized clinical trial. *Skin Health and Disease* **2**(2):1 DOI [10.1002/ski2.93](https://doi.org/10.1002/ski2.93).
- Gordillo Altamirano F, Forsyth JH, Patwa R, Kostoulas X, Trim M, Subedi D, Archer SK, Morris FC, Oliveira C, Kielty L, Korneev D, O'Bryan MK, Lithgow TJ, Peleg AY, Barr JJ. 2021.** Bacteriophage-resistant *Acinetobacter baumannii* are resensitized to antimicrobials. *Nature Microbiology* **6**(2):157–161 DOI [10.1038/s41564-020-00830-7](https://doi.org/10.1038/s41564-020-00830-7).
- Gorski A, Miedzybrodzki R, Żaczek M, Borysowski J. 2020.** Phages in the fight against COVID-19? *Future Microbiology* **15**:1095–1100 DOI [10.2217/fmb-2020-0082](https://doi.org/10.2217/fmb-2020-0082).
- Górski A, Międzybrodzki R, Jończyk-Matysiak E, Weber-Dabrowska B, Baginska N, Borysowski J. 2018.** Perspectives of phage-eukaryotic cell interactions to control Epstein-Barr virus infections. *Frontiers in Microbiology* **9**:3984 DOI [10.3389/fmicb.2018.00630](https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00630).

- Hargreaves KR, Clokie MRJ. 2014. *Clostridium difficile* phages: still difficult? *Frontiers in Microbiology* 5(2601):66 DOI 10.3389/fmicb.2014.00184.
- Johri AV, Johri P, Hoyle N, Pipia L, Nadareishvili L, Nizharadze D. 2021. Case report: chronic bacterial prostatitis treated with phage therapy after multiple failed antibiotic treatments. *Frontiers in Pharmacology* 12:1 DOI 10.3389/fphar.2021.692614.
- Juul FE, Garborg K, Bretthauer M, Skudal H, Øines MN, Wiig H, Rose Ø, Seip B, Lamont JT, Midtvedt T, Valeur J, Kalager M, Holme Ø, Helsingen L, Løberg M, Adami H-O. 2018. Fecal microbiota transplantation for primary *Clostridium difficile* infection. *New England Journal of Medicine* 378(26):2535–2536 DOI 10.1056/nejmc1803103.
- Kennedy EM, Kornepati AVR, Goldstein M, Bogerd HP, Poling BC, Whisnant AW, Kastan MB, Cullen BR. 2014. Inactivation of the human papillomavirus E6 or E7 gene in cervical carcinoma cells by using a bacterial CRISPR/Cas RNA-guided endonuclease. *Journal of Virology* 88(20):11965–11972 DOI 10.1128/jvi.01879-14.
- Khosravi S, Amini R, Arabestani MR, Talebi SS, Jalilian FA. 2021. Isolation of a lytic bacteriophage for *Helicobacter pylori*. *Gene Reports* 23(8):101107 DOI 10.1016/j.genrep.2021.101107.
- Kiani AK, Anpilogov K, Dautaj A, Marceddu G, Sonna WN, Percio M, Dundar M, Beccari T, Bertelli M. 2020. Bacteriophages in food supplements obtained from natural sources. *Acta Biomedica* 91:e2020025 DOI 10.23750/abm.v91i113-S.10834.
- Krishnan R, Tsubery H, Proschitsky MY, Asp E, Lulu M, Gilead S, Gartner M, Waltho JP, Davis PJ, Hounslow AM, Kirschner DA, Inouye H, Myszka DG, Wright J, Solomon B, Fisher RA. 2014. A bacteriophage capsid protein provides a general amyloid interaction motif (GAIM) that binds and remodels misfolded protein assemblies. *Journal of Molecular Biology* 426(13):2500–2519 DOI 10.1016/j.jmb.2014.04.015.
- LaVergne S, Hamilton T, Biswas B, Kumaraswamy M, Schooley RT, Wooten D. 2018. Phage therapy for a multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* craniectomy site infection. *Open Forum Infectious Diseases* 5(4):e1403 DOI 10.1093/ofid/ofy064.
- Law N, Logan C, Yung G, Furr CLL, Lehman SM, Morales S, Rosas F, Gaidamaka A, Bilinsky I, Grint P, Schooley RT, Aslam S. 2019. Successful adjunctive use of bacteriophage therapy for treatment of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection in a cystic fibrosis patient. *Infection* 47(4):665–668 DOI 10.1007/s15010-019-01319-0.
- León M, Bastías R. 2015. Virulence reduction in bacteriophage resistant bacteria. *Frontiers in Microbiology* 6:343 DOI 10.3389/fmicb.2015.00343.
- Lin A, Jimenez J, Derr J, Vera P, Manapat ML, Esvelt KM, Villanueva L, Liu DR, Chen IA. 2011. Inhibition of bacterial conjugation by phage M13 and its protein g3p: quantitative analysis and model. *PLOS ONE* 6:e19991 DOI 10.1371/journal.pone.0019991.
- Liu S, Lu H, Zhang S, Shi Y, Chen Q. 2022. Phages against pathogenic bacterial biofilms and biofilm-based infections: a review. *Pharmaceutics* 14(2):427 DOI 10.3390/pharmaceutics14020427.
- McNair K, Zhou C, Dinsdale EA, Souza B, Edwards RA. 2019. PHANOTATE: a novel approach to gene identification in phage genomes. *Bioinformatics* 35(22):4537–4542 DOI 10.1093/bioinformatics/btz265.
- Mushegian AR. 2020. Are there 1031 virus particles on earth, or more, or fewer? *Journal of Bacteriology* 202(9):e00052–20 DOI 10.1128/JB.00052-20.
- Muñoz AB, Stepanian J, Trespalacios AA, Vale FF. 2020. Bacteriophages of *Helicobacter pylori*. *Frontiers in Microbiology* 11:821 DOI 10.3389/fmicb.2020.549084.
- Przystal JM, Waramit S, Pranjol MZI, Yan W, Chu G, Chongchai A, Samarth G, Olaciregui NG, Tabatabai G, Carcaboso AM, Aboagye EO, Suwan K, Hajitou A. 2019. Efficacy of systemic

- temozolomide-activated phage-targeted gene therapy in human glioblastoma. *EMBO Molecular Medicine* **11**(4):3022 DOI [10.15252/emmm.201708492](https://doi.org/10.15252/emmm.201708492).
- Saucedo-Mora MA, Castañeda-Tamez P, Cazares A, Pérez-Velázquez J, Hense BA, Cazares D, Figueroa W, Carballo M, Guarneros G, Pérez-Eretza B, Cruz N, Nishiyama Y, Maeda T, Belmont-Díaz JA, Wood TK, García-Contreras R. 2017. Selection of functional quorum sensing systems by lysogenic bacteriophages in *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in Microbiology* **8**:811 DOI [10.3389/fmicb.2017.01669](https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01669).
- Schooley RT, Biswas B, Gill JJ, Hernandez-Morales A, Lancaster J, Lessor L, Barr JJ, Reed SL, Rohwer F, Benler S, Segall AM, Taplitz R, Smith DM, Kerr K, Kumaraswamy M, Nizet V, Lin L, McCauley MD, Strathdee SA, Benson CA, Pope RK, Leroux BM, Picel AC, Mateczun AJ, Cilwa KE, Regeimbal JM, Estrella LA, Wolfe DM, Henry MS, Quinones J, Salka S, Bishop-Lilly KA, Young R, Hamilton T. 2017. Development and use of personalized bacteriophage-based therapeutic cocktails to treat a patient with a disseminated resistant *Acinetobacter baumannii* infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **61**(10):e00954–17 DOI [10.1128/AAC.00954-17](https://doi.org/10.1128/AAC.00954-17).
- Shah M, Taylor VL, Bona D, Tsao Y, Stanley SY, Pimentel-Elardo SM, McCallum M, Bondy-Denomy J, Howell PL, Nodwell JR, Davidson AR, Moraes TF, Maxwell KL. 2021. A phage-encoded anti-activator inhibits quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Cell* **81**(3):571–583.e6 DOI [10.1016/j.molcel.2020.12.011](https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.12.011).
- Shahabi S, Rasmi Y, Jazani NH, Hassan ZM. 2008. Protective effects of *Helicobacter pylori* against gastroesophageal reflux disease may be due to a neuroimmunological anti-inflammatory mechanism. *Immunology and Cell Biology* **86**(2):175–178 DOI [10.1038/sj.icb.7100119](https://doi.org/10.1038/sj.icb.7100119).
- Shahin K, Zhang L, Mehraban MH, Collard JM, Hedayatkah A, Mansoorianfar M, Soleimani-Delfan A, Wang R. 2022. Clinical and experimental bacteriophage studies: recommendations for possible approaches for standing against SARS-CoV-2. *Microbial Pathogenesis* **164**(3):105442 DOI [10.1016/j.micpath.2022.105442](https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105442).
- Shigenobu S, Wilson ACC. 2011. Genomic revelations of a mutualism: the pea aphid and its obligate bacterial symbiont. *Cellular and Molecular Life Sciences* **68**(8):1297–1309 DOI [10.1007/s00018-011-0645-2](https://doi.org/10.1007/s00018-011-0645-2).
- Song J, Ruan H, Chen L, Jin Y, Zheng J, Wu R, Sun D. 2021. Potential of bacteriophages as disinfectants to control of *Staphylococcus aureus* biofilms. *BMC Microbiology* **21**(1):57 DOI [10.1186/s12866-021-02117-1](https://doi.org/10.1186/s12866-021-02117-1).
- Strathdee SA, Hatfull GF, Mutalik VK, Schooley RT. 2023. Phage therapy: from biological mechanisms to future directions. *Cell* **186**:17–31 DOI [10.1016/j.cell.2022.11.017](https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.11.017).
- Summers WC. 2012. The strange history of phage therapy. *Bacteriophage* **2**(2):130–133 DOI [10.4161/bact.20757](https://doi.org/10.4161/bact.20757).
- Wang B, Yao M, Lv L, Ling Z, Li L. 2017. The human microbiota in health and disease. *Engineering* **3**(1):71–82 DOI [10.1016/J.ENG.2017.01.008](https://doi.org/10.1016/J.ENG.2017.01.008).
- Zhang X, Wang S, Li T, Zhang Q, Zhang R, Zhang Z. 2021. Bacteriophage: a useful tool for studying gut bacteria function of housefly larvae, *Musca domestica*. *Microbiology Spectrum* **9**(1):e0059921 DOI [10.1128/Spectrum.00599-21](https://doi.org/10.1128/Spectrum.00599-21).
- Zhou JY, Suwan K, Hajitou A. 2020. Initial steps for the development of a phage-mediated gene replacement therapy using CRISPR-Cas9 technology. *Journal of Clinical Medicine* **9**(5):1498 DOI [10.3390/jcm9051498](https://doi.org/10.3390/jcm9051498).
- Zuo ZT, Ma Y, Sun Y, Bai CQ, Ling CH, Yuan FL. 2021. The protective effects of *Helicobacter pylori* infection on allergic asthma. *International Archives of Allergy and Immunology* **182**(1):53–64 DOI [10.1159/000508330](https://doi.org/10.1159/000508330).