



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

TRABAJO DE TESIS DOCTORAL

**AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN Y ESTUDIOS
DE ACTIVIDAD DE BACTERIÓFAGOS LÍTICOS
SOBRE *ENTEROCOCCUS* SPP. EN MODELOS *IN
VIVO* E *IN VITRO*.**

BENJAMÍN ALEJANDRO RAMÍREZ

DIRECTOR: HORACIO ÁNGEL LOPARDO

CODIRECTOR: DANIELA CENTRÓN

LA PLATA

2016

AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN Y ESTUDIOS DE ACTIVIDAD DE BACTERIÓFAGOS LÍTICOS SOBRE *ENTEROCOCCUS* SPP. EN MODELOS *IN VIVO* E *IN VITRO*.

El presente trabajo, uno de los requisitos para optar al grado académico de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata fue realizado en el laboratorio del Servicio de Microbiología del Hospital Nacional de Pediatría Prof. Dr. Juan P. Garrahan, en el Laboratorio de Microbiología del Departamento de Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP y en el Laboratorio de Investigaciones en Mecanismos de Resistencia a Antibióticos del Instituto IMPAM (UBA/CONICET) de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Buenos Aires bajo la dirección del Dr. Horacio Ángel Lopardo y la codirección de la Dra. Daniela Centrón.

DOCTORADO DE LA FACULTAD DE CIENCIA EXACTAS

Acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación

Universitaria

CONEAU

Categoría A

Resolución nº 521/01

A mis padres Rosa y Bubi

A Juliana y Martiniano

AGRADECIMIENTOS

A la memoria de mi papá Bubi, que aunque ya no está, fue, es y será mi referente en la vida, recuerdo que siempre me decía que “todo llega a su tiempo”, así hoy que estoy entregando mi tesis doctoral me viene al pensamiento esta frase “gracias pa” esto es para vos

A mi mamá Rosa por ser mi contención y puntal en todo momento, por inculcarme lo mejor siempre y por todo el esfuerzo que siempre hizo por nosotros.

A Juliana y Martiniano que desde hace un par de años alegran mis días y me dan fuerzas para todo

A mis hermanos Guille, José y Gabriel

A Leo , Iván, Alejandra, Jeni, Guada, y por estar siempre que los necesito y bancarme en diferentes etapas del trabajo

A mis directores el Dr. Horacio Lopardo y la Dra. Daniela Centron por haberme dado la oportunidad de realizar este trabajo, por confiar en mi todo este tiempo que trabajé con ellos y por sus enseñanzas y paciencia.

Al Dr. Pablo Pérez de la UNLP por su colaboración en el diseño de experimentos de modelo celular y animal y su buena predisposición.

A Gabriela Boscaro por su colaboración en los experimentos con cultivos celulares

Al Dr. Norberto San Juan de la Facultad de Medicina de la UBA por aportar su experiencia en microscopía electrónica.

A mis compañeros del Laboratorio de Antimicrobianos (L8) de la Facultad de Medicina: Sole, Kari, Ceci, Lili, Nancy por integrarme al equipo y ayudarme siempre que lo necesité.

A mis compañeros Kasdorf por ayudarme siempre

Al personal del Servicio de Microbiología del Hospital Garrahan por su buena predisposición y cordialidad.

A mis compañeros de Bacteriología del piso 12 de la Facultad de Medicina por su ayuda y consejos en todos estos años de trabajo

A mis amigos y compañeros de camino y de la vida que no los voy a nombrar para no olvidarme de ninguno.

A todas y cada una de estas personas que ayudaron de alguna manera a la concreción de este trabajo solo me queda decirles....**Gracias totales!**

ÍNDICE

Índice general	6
Índice de tablas y figuras	12
Glosario y Abreviaturas	15
Resumen	17
Introducción General	20
Características generales del género <i>Enterococcus</i> ..	21
Historia de los primeros aislamientos de <i>Enterococcus</i> spp.....	21
Taxonomía actual del género <i>Enterococcus</i> spp.....	21
Características bioquímicas del género <i>Enterococcus</i> spp.....	22
Epidemiología y Reservorio de <i>Enterococcus</i> spp.....	23
Factores de virulencia de <i>Enterococcus</i> spp.....	24
Infecciones producidas por <i>Enterococcus</i> spp.....	25
Sensibilidad a agentes antimicrobianos.....	26
Resistencia a vancomicina en <i>Enterococcus</i> spp.....	28
Emergencia de la resistencia a los antibióticos.....	35
Bacteriófagos.....	37
Biología de los Bacteriófagos: ciclos lítico y lisogénico.....	37
Enzimas líticas.....	39
Clasificación de los bacteriófagos.....	40
Bacteriofagoterapia.....	44
Antecedentes en el tema.....	44
Utilización actual de bacteriófagos o sus productos.....	48

Comparación entre fagos y antibióticos.....	50
Utilización de enzimas líticas fágicas como antibióticos. Enzibióticos.....	52
Hipótesis.....	54
Objetivo general.....	55
Objetivos específicos.....	55
Materiales y Métodos.....	56
Origen y conservación de los aislamientos bacterianos.....	57
Pruebas de sensibilidad a vancomicina.....	59
Pruebas de sensibilidad por dilución.....	59
Pruebas de sensibilidad por macrodilución en medio líquido.....	59
Pruebas de sensibilidad por difusión con discos.....	60
Método epsilométrico.....	60
Detección de genes implicados en mecanismos de resistencia a vancomicina.....	61
Aislamiento de bacteriófagos.....	63
Titulación de las suspensiones de bacteriófagos.....	64
Crecimiento de bacteriófagos por lisis en medio líquido.....	65
Curva de crecimiento de las cepas indicadoras en presencia y ausencia del fago.....	66
Preparación de suspensiones de bacteriófagos a gran escala.....	66
Purificación de bacteriófagos y obtención de títulos mayores.....	67
Conservación de bacteriófagos y cepas bacterianas.....	68
Conservación de las suspensiones mediante congelación.....	69
Análisis estadístico.....	69
Determinación del espectro de infectividad de los bacteriófagos sobre distintas cepas	

bacterianas.....	69
Extracción del material genético de los bacteriófagos.....	70
Cuantificación del material genético de los bacteriófagos.....	72
Microscopía electrónica.....	72
Extracción de ADN bacteriano.....	73
Clonado y secuenciación.....	74
Vector y huésped de clonado.....	74
Digestión del vector y del ADN blanco.....	75
Ligación.....	77
Preparación de las células competentes.....	77
Transformación.....	78
Selección de clones recombinantes.....	79
Extracción de ADN plasmídico.....	79
Análisis de los perfiles plasmídicos.....	81
Secuenciación y análisis de secuencias.....	81
Subclonado.....	82
Análisis taxonómicos y filogenético a partir de las secuencias obtenidas.....	82
Predicción <i>in silico</i> de estructuras proteicas secundarias y terciarias.....	82
Ensayos de adherencia de enterococos en modelo <i>in vitro</i>	83
Modelo animal.....	83
Análisis estadísticos.....	84

Resultados y Conclusiones.....	85
Capítulo 1. Aislamiento y conservación de los bacteriófagos y ensayos de estabilidad en el tiempo.....	86
Objetivos específicos.....	86
Caracterización de los aislamientos de <i>Enterococcus</i> spp.....	87
Identificación a nivel de género y especie.....	87
Pruebas de sensibilidad antibiótica.....	87
Identificación de los genes de resistencia a vancomicina.....	88
Aislamiento de bacteriófagos a partir de muestras fecales.....	89
Aislamiento del bacteriófago Φ BE1.....	89
Aislamiento del bacteriófago Φ BE2.....	91
Aislamiento de los bacteriófagos Φ BE3, Φ BE4 y Φ BE5.....	92
Titulación de las suspensiones.....	92
Purificación de los bacteriófagos.....	93
Conservación de los bacteriófagos.....	93
Conclusiones del capítulo 1.....	99
Capítulo 2. Caracterización fenotípica y genotípica de los bacteriófagos.....	100
Objetivos específicos.....	100
Espectro de infectividad de los bacteriófagos.....	101
Curvas de crecimiento de la cepa EN 307.....	102
Curva de crecimiento de la cepa EN 470.....	104
Curva de crecimiento de la cepa de <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 en presencia del bacteriófago Φ BE3.....	105

Curva de crecimiento de la cepa de <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 en presencia del bacteriófago Φ BE4.....	106
Curva de crecimiento de la cepa de <i>Enterococcus faecalis</i> AT85 en presencia del bacteriófago Φ BE5.....	107
Microfotografías electrónicas.....	107
Caracterización genotípica de los bacteriófagos.....	111
Análisis del material genético de los bacteriófagos.....	111
Extracción del material genético.....	111
Contrucción de una librería genómica.....	113
Ligación, transformación y selección de clones recombinantes.....	115
Selección de clones para secuenciación.....	117
Secuencias obtenidas de los plásmidos recombinantes.....	118
Análisis de las secuencias obtenidas.....	119
Selección de endolisina para subclonado y expresión.....	126
Endolisina del bacteriófago Φ BE2.....	126
Predicción <i>in silico</i> de estructura secundaria de la proteína.....	126
Predicción <i>in silico</i> de la estructura terciaria de la lisina del fago Φ BE2.....	128
Subclonado.....	128
Análisis filogenético a partir de las secuencias nucleotídicas y proteicas.....	130
Conclusiones del capítulo 2.....	133
Capítulo 3. Ensayos de descolonización <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	135
Objetivos específicos.....	135
Ensayos de adherencia de enterococos a células eucariotas.....	136
Estudios de descolonización en modelo celular.....	137

Estudios de descolonización en modelo murino.....	139
Experimento 1. Determinación de la actividad del fago Φ BE3 sobre enterococos colonizantes naturales en modelo animal.....	141
Experimento 2: Determinación de la actividad del fago Φ BE2 sobre enterococos colonizantes naturales en modelo animal.....	145
Experimento 3. Determinación de la actividad un cóctel de bacteriófagos sobre enterococos colonizantes naturales en modelo animal.....	147
Conclusiones del capítulo 3.....	148
Discusión.....	150
Bibliografía.....	153
Anexos.....	177

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Especies de enterococos actualmente reconocidas.....	22
Figura 1. Diagrama esquemático del mecanismo de resistencia a vancomicina.....	29
Figura 2. Alineamiento de los <i>clusters</i> génicos <i>vanA</i> , <i>vanB</i> y <i>vanD</i> de EVR.....	31
Figura 3. Comparación entre los ciclos lítico y lisogénico.....	39
Figura 4. Microfotografía electrónica de un bacteriófago de la familia <i>Myoviridae</i>	41
Figura 5. Microfotografía electrónica de un bacteriófago de la familia <i>Podoviridae</i> ...	42
Figura 6. Microfotografía electrónica de bacteriófagos de la familia <i>Siphoviridae</i>	43
Tabla 2. Comparación del uso profiláctico y/o terapéutico de fagos y antibióticos.....	51
Tabla 3. Cepas bacterianas utilizadas para distintos ensayos en este estudio.....	58
Tabla 4. Cebadores utilizados en los ensayos de amplificación y secuenciación.....	62
Figura 7. Mapa de restricción del plásmido <i>pUC19</i>	74
Figura 8. Gel de agarosa que muestra la amplificación mediante PCR múltiple utilizando cebadores para detectar los genes <i>vanA</i> , <i>vanB</i> y <i>ARNr 16S</i>	88
Tabla 5. Perfiles de sensibilidad y genotipo de cepas utilizadas en este trabajo.....	89
Figura 9. Fotografía de la placa de lisis producto de la infección del bacteriófago Φ BE1.....	90
Figura 10. Fotografía de las placas de lisis producidas sobre la cepa EN307 por el bacteriófago Φ BE1.....	91
Figura 11. Fotografía de la placa de lisis producto de la infección del bacteriófago Φ BE2.....	92
Figura 12. Variación del título del fago Φ BE2 en función del tiempo.....	94

Figura 13. Variación del título del fago Φ BE2 en caldo BHI + glicerol al 10%.....	96
Figura 14. Variación del título de la suspensión del fago Φ BE2 en <i>buffer</i> SM.....	96
Figura 15. Variación del título de la suspensión del fago Φ BE2 en <i>buffer</i> SM + sacarosa 0,5M.....	97
Tabla 6. Espectro de infectividad los dos bacteriófagos aislados en este trabajo.....	101
Tabla 7. Tipos clonales de <i>E. faecium</i> resistentes a vancomicina aislados en la Argentina clasificados mediante PFGE a los que Φ BE2 puede infectar.....	102
Figura 16. Curva de crecimiento del bacteriófago Φ BE1.....	103
Figura 17. Curva de crecimiento del bacteriófago Φ BE2.....	104
Figura 18. Curva de lisis empleando el fago Φ BE3.....	105
Figura 19. Curva de lisis empleando el fago Φ BE4.....	106
Figura 20. Curva de lisis del fago Φ BE5 sobre <i>Enterococcus faecalis</i> AT85.....	107
Figura 21. Fotografía electrónica de Φ BE2.....	108
Figura 22. Fotografía electrónica de Φ BE1.....	109
Figura 23. Fotografía electrónica de Φ BE3.....	109
Figura 24. Fotografía electrónica de Φ BE4.....	110
Figura 25. Fotografía electrónica de Φ BE5.....	110
Figura 26. Gel de agarosa de extracción de ADN viral.....	111
Figura 27. Perfiles de restricción del ADN viral con diferentes enzimas.....	112
Figura 28. Perfiles de restricción de ADN viral con diferentes enzimas.....	113
Figura 29. Restricción del vector pUC 19 con la enzima <i>Hind</i> III.....	114
Figura 30. Restricción del ADN de Φ BE2 con la enzima <i>Hind</i> III.....	115
Figura 31. Fotografía de colonias de <i>E. coli</i> DH5 α crecidas en medio LB agar con ampicilina, IPTG y X-gal.....	116
Figura 32. Extracción plasmídica de los clones obtenidos.....	117

Figura 33. Fotografía de extracción de ADN plasmídico mediante columnas de purificación.....	118
Figura 34. Alineamiento de secuencias aminoacídicas.....	120
Figura 35. Alineamiento de secuencias aminoacídicas.....	124
Figura 36. Secuencia aminoacídica de la endolisina del bacteriófago Φ BE2.....	126
Figura 37. Estructura secundaria de la lisina del bacteriófago Φ BE2.....	127
Figura 38. Predicción de la estructura tridimensional de la lisina del bacteriófago Φ BE2.....	128
Figura 39. Plásmido recombinante obtenido al insertar la secuencia nucleotídica de la lisina Φ BE2 de en el sitio de múltiple clonado.....	129
Figura 40. Alineamientos de la secuencia codificante de la lisozima realizados con la base de datos de GenBank.....	131
Figura 41. Relación genética del bacteriófago Φ BE2 comparado con otros fagos...	132
Figura 42. Ensayos in vitro de adherencia de enterococos a células eucariotas.....	136
Tabla 8. Variación de la concentración bacteriana en función de la concentración de bacteriófagos.....	138
Figura 43. Ensayos in vitro sobre la capacidad de descolonización de bacteriófagos sobre monocapa celular.....	138
Figura 44. Modelo animal de descolonización intestinal de enterococos con bacteriófagos.....	141
Figura 45. Descolonización de ratones con el bacteriófago Φ BE3.....	143
Figura 46. Descolonización de ratones con el bacteriófago Φ BE2.....	144
Figura 47. Descolonización de ratones utilizando un cóctel con los bacteriófagos Φ BE2, Φ BE3 y Φ BE5.....	146

GLOSARIO Y ABREVIATURAS

ADN	Acido desoxirribonucleico
ARN	Acido ribonucleico
ATP	Trifosfato de adenosina
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI o CCC	Caldo infusión cerebro corazón
CIM	Concentraciones inhibitorias mínimas
D-Ala	D-Alanina
D-Lac	D-Lactato
dNTPs	Desoxiribonucleótido trifosfato
DO	Densidad óptica
EDTA	Acido etilendiamino tetraacético
EVR	Enterococo resistente a vancomicina
ESP	Por su sigla en inglés (<i>enterococal surface protein</i>)
IPTG	Isopropil β -D-tiogalactopiranosido
Kb	Kilobase
LB	Caldo Luria-Bertani
Log	Logaritmo
ml	Mililitro
MH	Mueller Hinton
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina
nm	nanómetro
orf	Marco de lectura abierto por su sigla en inglés(<i>open reading frame</i>)
pb	Pares de bases

PBP	Proteínas ligadoras de penicilina (PBP)
PBS	Solución salina tamponada, por su sigla en inglés (<i>phosphate buffer solution</i>)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEG	Polietilenglicol
PFGE	Electroforesis en geles de campos pulsados
p/v	peso en volumen
Pyr	Pirridonilarilamidasa
RFLP	Polimorfismos de longitud en los fragmentos de restricción
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecilsulfato de sodio
Tris	N-tris-(hidroximetil)-aminoetano
U	Unidad de actividad enzimática
ufc/ml	Unidades formadoras de colonias por mililitro
ufp/ml	Unidades formadoras de placas por mililitro
UTI	Infección del tracto urinario
UV	Ultravioleta
van	Vancomicina
VRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a vancomicina
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indonil- β -D-galactopiranósido

RESUMEN

Desde su primera descripción en 1988, los enterococos resistentes a vancomicina (EVR) se han tornado un grave problema para la salud pública. La colonización precede y predispone generalmente a infecciones como endocarditis o bacteriemia especialmente en pacientes añosos, inmunocomprometidos o posquirúrgicos. Los EVR pueden colonizar el intestino de estos pacientes y pueden persistir durante largos períodos, lo cual resulta en costos muy elevados para los centros hospitalarios teniendo en cuenta los gastos de aislamiento y cohortización del paciente. Hasta el momento no ha podido establecerse un método que permita la descolonización de EVR en seres humanos. En este marco proponemos como objetivo general la utilización de bacteriófagos líticos como herramientas para ese fin. En la primera fase el objetivo específico fue el aislamiento y caracterización de bacteriófagos líticos apropiados para la descolonización. Para el aislamiento de los mismos se utilizaron muestras clínicas filtradas y ensayadas sobre cepas de enterococos tanto resistentes como sensibles a la vancomicina. Con este procedimiento se aislaron cinco bacteriófagos líticos sobre distintas cepas del género *Enterococcus* spp., los cuales fueron denominados siguiendo normativas taxonómicas internacionales como Φ BE1, Φ BE2, Φ BE3, Φ BE4, y Φ BE5 respectivamente. El fago Φ BE2 presentó un mayor espectro de infectividad, ya que resultó producir lisis sobre todas las cepas de EVR ensayadas. Se realizó la puesta a punto de un protocolo para la extracción y caracterización del material genético de cada uno de los bacteriófagos aislados y se construyó en particular una biblioteca genómica del bacteriófago Φ BE2. El fago Φ BE2 fue escogido además para realizar los experimentos de descolonización *in vitro* e *in vivo*. Se pusieron a punto las condiciones y medios apropiados para el almacenamiento a largo plazo de las suspensiones de

fagos. La combinación de la utilización del *buffer* SM con una temperatura de -20°C resultó ser la condición apropiada para este fin. Se logró demostrar la capacidad lítica de los bacteriófagos ensayados tanto *in vitro* como *in vivo*. Se pusieron a punto las diferentes variables para trabajar con el modelo *in vitro* como con el modelo animal. Se trabajó con los diferentes bacteriófagos aislados y se concluyó que los mismos eran capaces de lisar diferentes aislamientos clínicos de enterococos tanto sensibles como resistentes a vancomicina. Además, se tomaron microfotografías electrónicas de los bacteriófagos aislados para estudiar su morfología y clasificarlos taxonómicamente. Para ello se tuvieron en cuenta características morfológicas de la cabeza y cola, las dimensiones de los fagos como así también la homología de ácidos nucleicos realizando la comparación con secuencias almacenadas en bases de datos. La segunda fase tuvo como objetivo específico la evaluación de los fagos en un modelo animal. Los ensayos realizados en el modelo de descolonización con células Caco-2, demostraron que la actividad del bacteriófago $\Phi\text{BE}2$ se mantenía aun cuando las bacterias estaban adheridas a las microvellosidades. Se ensayaron diferentes variables para intentar determinar las vías y concentraciones óptimas de administración de los bacteriófagos en modelo murino. Se concluyó que la vía óptima de administración de las suspensiones de bacteriófagos de concentración conocida era la vía oral no forzada mediante la dilución de estas suspensiones en agua de bebida. Se determinó además la forma de recuento de las colonias bacterianas y de los bacteriófagos, como así también el agrupamiento y duración de cada experimento. En diferentes ensayos se observó que en los grupos de ratones tratados con las suspensiones fágicas individuales o un cóctel de tres fagos los recuentos de enterococos disminuyeron con valores estadísticamente significativos comparando con los grupos controles. Sin embargo no se logró la completa descolonización.

En conclusión, el bacteriófago Φ BE2 presenta características que nos permiten inferir su posible uso en la descolonización de pacientes portadores de EVR.

INTRODUCCIÓN GENERAL

Características generales del género *Enterococcus* spp.

Historia de los primeros aislamientos de *Enterococcus* spp.

“*Enterococcus*” etimológicamente deriva del vocablo Francés *entérocoque* y fue utilizado en 1899 para denotar el origen entérico de estos microorganismos. En ese mismo año se describió su capacidad de producir infecciones graves (Murray, 2000). Durante la tercera década del siglo pasado los enterococos, tal como se los nombra comúnmente, fueron incluidos dentro del género *Streptococcus* y se los consideró como parte integrante del mismo por largo tiempo. La característica que diferenciaba a estos estreptococos de origen fecal de los demás integrantes del género era su alta resistencia a agentes físicos y químicos. En la década del 30 los enterococos fueron clasificados por Rebecca Lancefield como pertenecientes al grupo D de los estreptococos, en base a pruebas serológicas (Lancefield, 1933). Durante las últimas décadas, sin embargo, con la utilización de nuevas herramientas para la clasificación de los microorganismos, como las técnicas moleculares, los estreptococos del grupo D sufrieron una profunda reacomodación taxonómica.

Taxonomía actual del género *Enterococcus*

En primer lugar se propuso la creación de un nuevo género para *Streptococcus faecalis* (la especie tipo) y *Streptococcus faecium* al que se denominó *Enterococcus* diferenciándolos así de *Streptococcus bovis*, que también posee antígenos del grupo D, pero que permaneció dentro del género *Streptococcus* (Schleifer *et al.*, 1984). La filogenia del grupo se fue construyendo utilizando aproximaciones moleculares como la comparación de homología de secuencia en los genes del ARNr 16S o la cinética de reasociación ADN-ADN entre diferentes especies. Estos ensayos combinados con

análisis proteómicos, composición de ácidos grasos de cadena larga mediante cromatografía líquido-gaseosa y los métodos fenotípicos tradicionales han contribuido al ordenamiento del género y a la inclusión de otras especies al mismo.

Tabla 1. Especies de enterococos actualmente reconocidas

Especies aisladas de materiales clínicos humanos	Especies aisladas de otras fuentes
<i>E. faecalis</i>	<i>E. saccharolyticus</i>
<i>E. faecium</i>	<i>E. columbae</i>
<i>E. casseliflavus</i>	<i>E. porcinus</i>
<i>E. gallinarum</i>	<i>E. ratti</i>
<i>E. mundtii</i>	<i>E. asini</i>
<i>E. avium</i>	<i>E. dispar</i>
<i>E. gilvus</i>	<i>E. sulfureus</i>
<i>E. malodoratus</i>	<i>E. moraviensis</i>
<i>E. pallens</i>	
<i>E. pseudoavium</i>	
<i>E. raffinosus</i>	
<i>E. cecorum</i>	
<i>E. durans</i>	
<i>E. hirae</i>	

(modificada de Teixeira *et al.* 2011)

Además se pudo determinar la relación genética del género *Enterococcus* con otros géneros de cocos gram positivos como *Vagococcus*, *Tetragenococcus* y *Carnobacterium*. Esta relación resultó ser más cercana que la que tenían con *Streptococcus* y *Lactococcus*, géneros con los cuales se halla muy emparentado fenotípicamente.

Características bioquímicas del género *Enterococcus* spp.

Los enterococos son cocos gram positivos, catalasa negativos, que se disponen en pares o en cadenas cortas. Son anaerobios facultativos con un metabolismo homofermentativo. Crecen en un intervalo de temperaturas que va desde los 10°C a los 45 °C con una temperatura óptima de desarrollo de 35° a 37°C.

Una característica de las especies de este género es su capacidad de crecer en concentraciones de 6,5% de cloruro de sodio. Además son capaces de hidrolizar la esculina y tolerar la presencia de sales biliares. De este modo, dan colonias negras en medio de agar bilis esculina.

Algunas de las especies son móviles y la mayoría de ellas puede hidrolizar el compuesto L-pirrolidonil- β -naftilamida (PYR) mediante la producción de la enzima pirrolidonilarilamidasa (PYRasa).

Todas las especies del género hidrolizan el compuesto leucina- β -naftilamida con la enzima leucinaminopeptidasa (LAPasa) y la mayoría de ellas contienen en la pared celular un tipo particular de ácido teicoico que es identificado mediante pruebas serológicas y determina la pertenencia al grupo D de Lancefield.

Ninguna de las especies de enterococos sintetiza porfirinas y por lo tanto no producen enzimas de la familia de los citocromos (Texeira y Facklam, 2003).

Epidemiología y Reservorio de *Enterococcus* spp.

Los microorganismos clasificados actualmente dentro del género *Enterococcus*, pueden ser aislados de seres humanos, de animales como aves, mamíferos, insectos, así como también como de cualquier parte del medio ambiente (suelos, plantas, agua, alimentos). Ellos tienen diversas características intrínsecas que le permiten la supervivencia en estos medios hostiles y algunos son patógenos oportunistas.

El tracto gastrointestinal de humanos y animales domésticos es el principal reservorio de los enterococos (Dodgson, 2004). En este sitio se pueden encontrar en concentraciones cercanas a 10^8 bacterias por gramo de materia fecal. Son menos abundantes en otros sitios del cuerpo como la cavidad oral o la piel. Es por esto que las muestras fecales o hisopados anales son apropiados para determinar el estado de

portación.

La prevalencia de las distintas especies del género varía de acuerdo al tipo de huésped y esta influenciada por diversos factores como la edad, la dieta, el estado de salud del individuo, el tratamiento antibiótico previo, etc. *Enterococcus faecalis* es la especie más comúnmente aislada del tracto gastrointestinal humano ya que representa alrededor del 80% de los aislamientos (Texeira y Facklam, 2003). Luego le sigue en frecuencia *Enterococcus faecium*, y en menor grado el resto de las especies. Entre las especies que no han sido aisladas de infecciones en humanos tenemos a *E. columbae*, *E. haemoperoxidans*, *E. malodoratus*, *E. moraviensis*, *E. porcinus*, *E. pseudoavium*, *E. ratti*, *E. sacharolyticus* y *E. sulfureus*. La información disponible acerca de la distribución de las especies del género *Enterococcus* en otros organismos o en el medio ambiente es escasa pero indica que estas proporciones son diferentes a las encontradas en el tracto gastrointestinal humano (Stern *et al.*, 1994).

Su rol como patógeno oportunista puede observarse especialmente en individuos añosos, pacientes sometidos a quimioterapia, inmunocomprometidos, pacientes que han sufrido una larga terapia antibiótica, pacientes posquirúrgicos o que se encuentren utilizando dispositivos invasivos como sondas o catéteres.

Factores de virulencia de *Enterococcus* spp.

Estas bacterias tienen varios mecanismos de virulencia recientemente identificados (Hancock *et al.*, 2000; Jett *et al.*, 1994) pero no está clara la importancia relativa de cada uno de ellos durante la infección en humanos. Entre los factores de virulencia o patogenicidad se encuentran las proteínas, adhesina de superficie ESP, por su sigla en inglés (*enterococcal surface protein*), la sustancia de agregación, las toxinas secretadas (citolisina/hemolisina) y las proteasas secretadas (gelatinasa y serina proteasa). El factor

MSCRAMM *ace*, el antígeno A de *Enterococcus faecalis*, la cápsula enterocócica, los superóxidos extracelulares y los polisacáridos de la pared celular también son factores de virulencia de los enterococos. Recientemente se ha identificado la isla de patogenicidad de *E. faecalis*, la cual posee un *cluster* génico que codifica elementos que actúan en conjunto para esquivar el sistema inmunológico de defensa del huésped (Im J *et al* 2015). No obstante, ninguno de estos factores ha sido identificado como el principal mecanismo predominante en la patogénesis de este género. Debido a esto, se considera que la resistencia antibiótica adquirida ya sea horizontal o verticalmente es una cualidad fundamental que poseen las cepas más virulentas del género y que las diferencia de las cepas indígenas o comensales (Texeira *et al.*, 2011). Este atributo además contribuye a la supervivencia de estas cepas durante largos periodos de tiempo en el medio nosocomial con elevada presión selectiva antibiótica y conduce además a transformarlas en un prominente patógeno hospitalario.

Infecciones producidas por *Enterococcus* spp.

Los enterococos pueden ser causa de infección tanto en el hospital como en la comunidad. En las últimas décadas aumentó su frecuencia como causa de infección hospitalaria paralelamente al aumento de la resistencia a la mayoría de los antibióticos.

Existe una gran variedad de infecciones que pueden ser causadas por enterococos (Hancock *et al.*, 2000; Murray, 2001). Las más importantes son las endocarditis, las infecciones del tracto urinario (UTI) y las bacteriemias. Las UTI son las infecciones más comunes causadas por enterococos y ocurren generalmente en pacientes con anomalías estructurales congénitas de la vía urinaria o en aquéllos que han sido sometidos a manipulaciones urológicas invasivas.

Otro tipo de infecciones a las que están asociadas los enterococos son las infecciones

intraabdominales, intrapélvicas e infecciones del tracto biliar, pero los cultivos obtenidos a partir de estos sitios son frecuentemente polimicrobianos.

También se pueden dar, pero con menor frecuencia, infecciones del sistema nervioso central, del tracto respiratorio, otitis, sinusitis, artritis séptica, etc. en pacientes con condiciones predisponentes.

Sensibilidad a los agentes antimicrobianos

La resistencia a los antibióticos puede ser clasificada como natural o adquirida. La resistencia natural está asociada a características inherentes a un género o especie, presentes en el cromosoma bacteriano. Por otro lado existen mecanismos de resistencia a antibióticos que pueden ser adquiridos por mutación de genes ya existentes en el genoma o transferidos de una bacteria a otra en forma horizontal mediante los mecanismos de la transferencia horizontal genética, ya sea la transformación, la conjugación o la transducción en los cuales también participan los elementos móviles tales como los plásmidos, los transposones, las islas genómicas móviles, los bacteriófagos y las secuencias de inserción (Hausler T et al, 2006).

Los enterococos presentan una resistencia natural a varios antibióticos. En principio son relativamente resistentes a los antibióticos de la familia de los β -lactámicos, particularmente a las cefalosporinas. Esta resistencia intrínseca a β -lactámicos se manifiesta mediante concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) más elevadas que las obtenidas para el género *Streptococcus* y como una resistencia a su actividad bactericida. También son resistentes a bajas concentraciones de aminoglucósidos, clindamicina, fluoroquinolonas y trimetoprima-sulfametoxazol (Gold *et al.*, 1996).

Además, algunos mecanismos de resistencia natural a ciertos antibióticos son particulares de cada especie, como por ejemplo los mecanismos de resistencia a vancomicina encontrados en *Enterococcus gallinarum* y en *Enterococcus casseliflavus*.

La terapia recomendada para infecciones severas como endocarditis, meningitis o cualquier otra infección sistémica grave causada por enterococos es la utilización de un agente activo sobre la pared celular como un β -lactámico o vancomicina con el agregado de un aminoglucósido, usualmente gentamicina o estreptomina. De esta manera se supera la limitación impuesta por la resistencia a la acción bactericida del inhibidor de la biosíntesis de la pared celular y se puede lograr un efecto sinérgico. (Texeira *et al.*, 2011).

Además estas bacterias pueden adquirir marcadores de resistencia mediante diversos mecanismos de la transferencia horizontal genética (Fernebro, 2011). Estos marcadores les confieren resistencia a antibióticos como cloranfenicol, tetraciclinas, macrólidos, lincosamidas, estreptograminas, altos niveles de aminoglucósidos, β -lactámicos, glucopéptidos, quinolonas, linezolid y daptomicina.

En los últimos años ha aumentado el número de casos reportados de cepas que adquirieron resistencia a diversos antibióticos como β -lactámicos, altos niveles de aminoglucósidos y glucopéptidos. También se han reportado cepas con multiresistencia antibiótica, lo cual complica los tratamientos de los pacientes infectados.

En los enterococos, el mecanismo de resistencia a penicilina más importante por su frecuencia y su efectividad en términos de valores de CIM es la modificación del sitio de acción por alteración de la afinidad de una o más proteínas ligadoras de penicilina (PBP) (Klare *et al.*, 1994; Lleó *et al.*, 1987). También, en menor proporción, se describieron cepas que se tornaban resistentes a estos antibióticos mediante la producción de β -lactamasas (Murray *et al.*, 1983; Murray *et al.*, 1992; Lopardo *et al.*, 1995).

La resistencia a altos niveles de aminoglucósidos se puede dar por mutación puntual de la secuencia genética que codifica para el ARN ribosomal o más frecuentemente por

acción enzimática (Murray, 1990).

Resistencia a vancomicina en *Enterococcus* spp.

La vancomicina se desarrolló en los años 50 como un agente antimicrobiano activo frente a gram positivos y, sobre todo, frente a los estafilococos productores de β -lactamasas (Dogdson, 2004; Dutka-Malen, 1994). El desarrollo de los nuevos antibióticos con menos efectos indeseables limitó su uso a los casos de alergia a los β -lactámicos. La aparición, en los años 80, de las cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina y el aumento en el número de pacientes susceptibles de presentar infecciones por microorganismos gram positivos, favoreció de nuevo el uso de la vancomicina. Esta droga, mejor purificada produjo un menor desarrollo de reacciones alérgicas y de toxicidad renal.

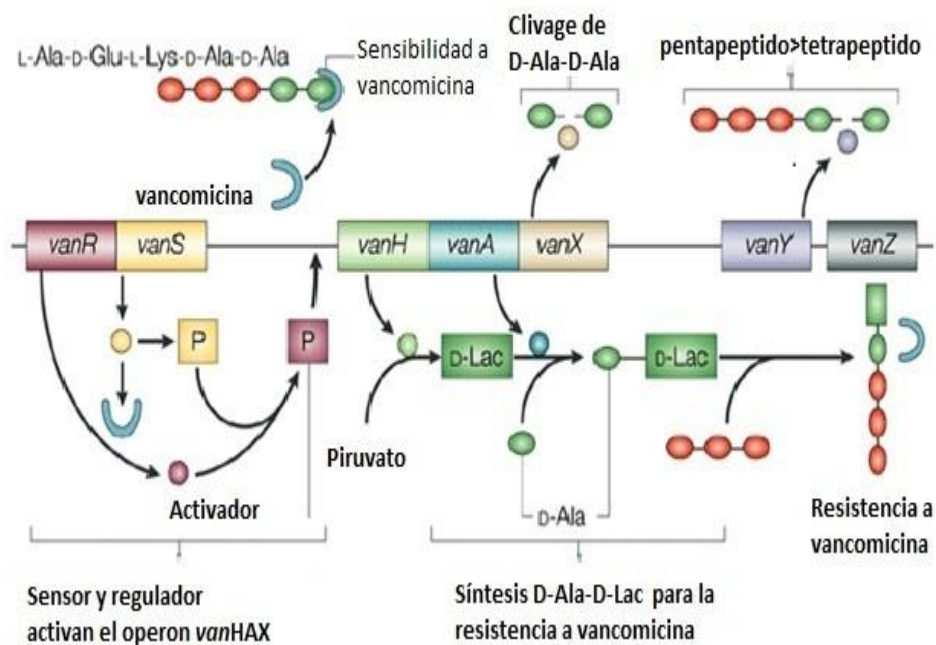
Desde su aparición en Inglaterra en el año 1986, los enterococos resistentes a vancomicina (EVR) se han tornado patógenos de gran importancia para los equipos de control de infecciones en los centros de salud (Uttley *et al.*, 1988).

La resistencia a los glucopéptidos en *Enterococcus* ocasiona la pérdida de una alternativa terapéutica importante en un género que de por sí presenta resistencia intrínseca a muchos antibióticos y que muestra una gran capacidad para adquirir nuevas resistencias. Además, no debe descartarse la posibilidad de que se produzca la transferencia *in vivo* de esta resistencia al género *Staphylococcus*, hecho que ya se ha detectado en varias cepas en los Estados Unidos (Chang *et al.*, 2003; Deshpande *et al.*, 2007).

En las cepas de los enterococos resistentes a la vancomicina, (EVR) se han descrito al menos seis mecanismos de resistencia, determinados por los genotipos *vanA*, *vanB*, *vanC*, *vanD*, *vanE* y *vanG*. Ellos se han observado primariamente en las especies más comúnmente aisladas a partir de seres humanos: *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus*

faecium, pero se ha demostrado que también otras especies pueden adquirir esta resistencia.

De los seis mecanismos, los más importantes son los VanA y VanB por estar determinados por *clusters* génicos que se encuentran sobre elementos genéticos móviles (Figura 1). Por este motivo son capaces de transmitirse horizontalmente a otras bacterias. Los restantes mecanismos, al estar codificados por el genoma bacteriano, no tendrían esta facilidad de transmisión.



(Tomado de Murray 2001, con modificaciones)

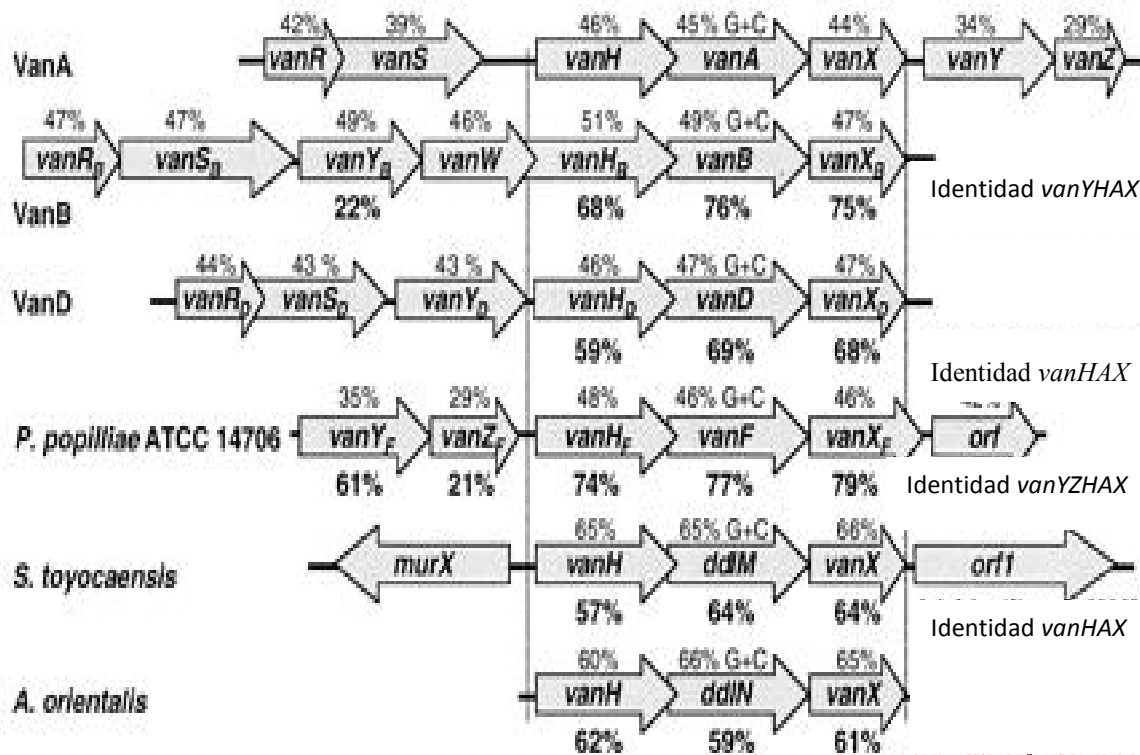
Figura 1. Diagrama esquemático del mecanismo de resistencia a vancomicina. Sistema regulador de dos componentes. El sistema VanR-Van S regula la resistencia a vancomicina en cepas enterococos resistentes a vancomicina (EVR) y en *Staphylococcus aureus* resistentes a vancomicina (VRSA). Van S es un sensor de vancomicina asociado a membrana que controla el nivel de fosforilación de VanR. VanR es un activador transcripcional del operon codificante para VanH, VanA y VanX. VanH es una enzima de la familia de las deshidrogenasas que reduce piruvato a D-Lac, mientras que VanA es una ligasa que cataliza la formación de un puente ester entre D-Ala y D-Lac (unión alanina-lactato). Esto resulta en que la vancomicina no se une a D-Ala y D-Lac lo cual conduce a la resistencia a la vancomicina. Van X es una dipeptidasa que hidroliza el componente normal de peptidoglicano D-Ala-D-Ala. VanY es una D-carboxipeptidasa que hidroliza el residuo terminal D-Ala del último precursor del peptidoglicano que es producido si la eliminación de D-Ala-D-Ala por VanX no es completa. Entonces, D-Ala-D-Lac reemplaza al dipéptido normal D-Ala-D-Ala durante la síntesis del peptidoglicano, hecho que da lugar a la resistencia a vancomicina. El gen *vanZ* confiere resistencia a teicoplanina por un mecanismo desconocido.

El mecanismo con fenotipo VanA está codificado por el *cluster* génico *vanA* y otorga un alto nivel de resistencia inducible a la vancomicina. Las cepas que lo poseen presentan una concentración inhibitoria mínima mayor de 64µg/ml y son concomitantemente resistentes a la teicoplanina, con concentraciones inhibitorias mínimas mayores de 16µg/ml.

El mecanismo con fenotipo VanB esta codificado por el *cluster* génico *vanB* y otorga alto nivel de resistencia a vancomicina pero no a teicoplanina (Murray, 2001).

El *cluster* o agrupamiento génico *vanA* esta asociado al elemento génico transponible Tn1546 de 10.581 pb situado sobre un plásmido, aunque algunas veces se ha transferido al cromosoma (Arthur *et al.*, 2001). El mismo contiene además los genes necesarios para la regulación de la expresión de la resistencia a la vancomicina. Estos genes se transcriben coordinadamente, es decir están regulados por un mismo promotor y por lo tanto trabajan como un operón.

El ordenamiento de los genes en el operón es el siguiente:



(Tomado de Patel *et al.*, 2000)

Figura 2. Alineamiento de los clusters génicos *vanA*, *vanB* y *vanD* de EVR. *Paenibacillus popilliae*, *Amycolatopsis orientalis* y *Streptomyces toyocaensis*. El porcentaje de identidad aminoacídica de los productos de *vanY*, *vanZ*, *vanH*, *vanA* y *vanX* se muestra debajo de los respectivos genes. El contenido G+C de cada gen está indicado arriba de los mismos.

La expresión del fenotipo VanA es un proceso complejo que implica la expresión coordinada de todos los genes del cluster. Todo esto genera una interferencia en la síntesis del peptidoglicano. La inducción de la expresión del cluster da como resultado la producción preferencial del dipéptido D-alanina-D-lactato (D-ala-D-lac) sobre el dipéptido D-alanina-D-alanina (D-ala-D-ala). Este dipéptido es la molécula que sirve de blanco para la unión de la vancomicina. Su función original es participar en el proceso de transpeptidación que tiene lugar durante la formación de la pared celular al unirse al UDP-N-acetilmuramil-tripéptido para formar la molécula N-acetilmuramil-pentapéptido. Esta molécula es incorporada al peptidoglucano permitiendo la transpeptidación, lo cual resulta en una pared celular resistente. La vancomicina se une con alta afinidad al extremo D-ala-D-ala y esto evita la transpeptidación, generando de este modo una pared débil.

La proteína VanA es una enzima de la familia de las ligasas. Es similar a la ligasa codificada cromosómicamente. Esta sintetiza preferentemente el dipéptido D-ala-D-lac en relación al D-ala-D-ala. La proteína VanH reduce el piruvato a D-lactato y produce un *pool* de D-lactato para ser utilizado en la construcción de la primera molécula. Por otro lado, las ligasas de codificación cromosómica, siguen sintetizando el dipéptido D-ala-D-ala que se unirá a los precursores de la pared celular y, por lo tanto, conservarán la afinidad a la vancomicina. La proteína VanX es una dipeptidasa que escinde al dipéptido D-ala-D-ala, reduciendo la cantidad disponible de éste para unirse al tripéptido. La proteína VanY hidrolizaría los D-ala-D-ala terminales ya incorporados a los precursores del peptidoglucano.

Los genes *vanR* y *vanS* forman el sistema regulador del *cluster*, controlando la transcripción del mismo. Se piensa que son sensibles a la presencia de vancomicina, la que actuaría como molécula inductora.

El último gen del *cluster*, el gen *vanZ*, no está implicado en la resistencia a vancomicina pero sí en la resistencia a teicoplanina mediante un mecanismo desconocido.

El *cluster* génico *vanB* está asociado a un elemento genético transponible, el *Tn1547*, y confiere el fenotipo VanB caracterizado por resistencia moderada o alta a la vancomicina (CIM entre 4 y > 1000 µg/ml) pero no a teicoplanina. La resistencia VanB se transfiere en algunas cepas por conjugación y se asocia a la movilización de material genético de elevado peso molecular de cromosoma a cromosoma.

Las enzimas implicadas en este mecanismo de resistencia muestran una alta homología con las enzimas del mecanismo VanA (Dodgson, 2004). Por ejemplo las ligasas VanA y VanB muestran un 76% de homología en su secuencia de aminoácidos y la ligasa VanB también sintetiza el dipéptido D-ala-D-lac (Dodgson, 2004). Las proteínas VanH_b y VanX_b presentan homología del 70% y tienen funciones similares a las del *cluster*

vanA. Donde se encuentra un menor grado de homología en la secuencia aminoacídica es entre las proteínas reguladoras VanR y VanS que presentan sólo aproximadamente un 30% de homología con las proteínas del *cluster* vanA que cumplen funciones similares. Probablemente, las diferencias observadas en la expresión fenotípica y en las sustancias inductoras de la resistencia entre cepas con fenotipo VanA y VanB sean debidas a variaciones en este sistema regulador. Se cree que la diferencia funcional principal entre ambos mecanismos, en cuanto a la resistencia a teicoplanina, es producto de la ausencia del gen *vanZ* en el *cluster* vanB. Este gen está presente en el *cluster* vanA y parece estar implicado en la resistencia a teicoplanina. Recientemente se han descrito variantes en el mecanismo VanB a las que se denominó VanB-1, VanB-2 y VanB-3 respectivamente (Dahl *et al.*, 1999).

Debido a estas características los enterococos se han convertido en un patógeno de gran importancia en el ámbito hospitalario y constituyen un desafío terapéutico cuando están asociados a infecciones graves.

En la Argentina, al igual que lo que ocurre en otras parte del mundo, la mayoría de los aislamientos clínicos de EVR pertenecen a la especie *Enterococcus faecium* con genotipo *vanA* (Lopardo *et al.*, 2005). También se han aislado unas pocas cepas con genotipo *vanB* y con frecuencia variable *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus avium* y *Enterococcus raffinosus* con genotipo *van A* (Togneri *et al.*, 2003).

Los enterococos pueden sobrevivir por semanas en diversas superficies e incluso pueden soportar condiciones de sequedad (Dodgson, 2004). Ellos son aislados de virtualmente cualquier parte del medio hospitalario como las salas de internación, equipamientos y todo tipo de dispositivos médicos. Los trabajadores de la salud contaminan sus manos por contacto con estas fuentes o por contacto directo con el

paciente portador y dispersan al microorganismo a diversas partes del hospital. Por estas razones cuando se confirma en un paciente la colonización por EVR se deben extremar las medidas para evitar la diseminación hacia otros pacientes. Entre estas medidas está la cohortización o el aislamiento del portador y el control de los hábitos del personal que tiene contacto directo con el mismo (Boyce *et al.*, 1995).

Aún no ha sido posible la descolonización del tracto gastrointestinal por EVR y por lo tanto el paciente actúa como reservorio hasta que naturalmente se descolonice (Baden *et al.*, 2001). Es probable entonces que una cepa aislada en una infección sistémica sea la misma que la encontrada en el tracto gastrointestinal del mismo individuo.

Los análisis moleculares han sido de gran ayuda para conocer la epidemiología de los EVR. Entre ellos se pueden mencionar el estudio del ADN cromosómico mediante electroforesis en geles de campo pulsado (PFGE) (Texeira y Facklam, 2003), el estudio de los polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) y los estudios del ADN plasmídico y de los genes de resistencia mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La biología molecular ha permitido demostrar la rápida diseminación intra e interhospitalaria de un solo clon, así como la participación de más de un clon y de más de una especie en un mismo brote (Stosor *et al.*, 1999; Lopardo *et al.*, 2005).

La colonización por EVR puede persistir por largos períodos de tiempo. Se han descrito casos donde la misma se extendía a plazos superiores a un año (Baden *et al.*, 2001). Los costos que esto genera son elevados: cohortización, aislamiento de los pacientes en salas especiales con personal dedicado en forma exclusiva, equipos especiales para cada paciente, medidas para evitar su dispersión. Debido a estos altos costos que generan los pacientes colonizados con EVR y a la posibilidad de que ocurran infecciones graves, cualquier metodología que pueda aplicarse para la descolonización será de una

gran importancia en el control de la diseminación de este patógeno.

Lamentablemente, como ya se dijo, hasta el momento no se cuenta con ningún método eficaz que permita la descolonización de pacientes portadores de EVR. En este trabajo planteamos la evaluación de la utilización de bacteriófagos específicos de especie para tal fin. Para ello, en primer lugar es preciso el aislamiento y caracterización de bacteriófagos que cumplan con las propiedades que les permitan servir de herramientas para la descolonización.

Emergencia de la resistencia a los antibióticos

El cuerpo humano posee mecanismos de defensa ante la invasión microbiana, las cuales son denominadas defensas naturales. Estas hacen posible su existencia en un medio rodeado de microorganismos potencialmente patógenos. La razón de que nuestro organismo sobreviva frente a la exposición a estos agentes infecciosos se debe a que desarrollaron un complejo sistema de defensa. La primera línea de defensa está constituida por la denominada inmunidad innata o inespecífica, que incluye la piel, la conjuntiva de los ojos y las membranas mucosas que protegen a los epitelios respiratorio, digestivo y genitourinario. Estas membranas, además de la protección mecánica, secretan sustancias con efecto microbicida como la lisozima. Por otro lado existen epitelios especializados como los de las vías aéreas superiores, los cuales presentan cilias. Estas poseen la función de barrer a los agentes infecciosos u otros objetos extraños para que éstos sean expulsados del cuerpo. Cuando esta primera línea de defensa es superada por un microorganismo, éste se encuentra frente a una segunda línea de defensa constituida por las células blancas de la sangre, las tres vías del sistema del complemento y las inmunoglobulinas o anticuerpos.

A esta capacidad natural del cuerpo humano de luchar contra la invasión microbiana, se

le agregó en el siglo pasado la administración de sustancias naturales, sintéticas y semisintéticas que tienen la capacidad de inhibir el desarrollo de los microbios sin afectar significativamente al cuerpo humano. A finales del siglo XIX, el investigador alemán E. Freudreich encontró un pigmento proveniente de la bacteria actualmente denominada *Pseudomonas aeruginosa* que era capaz de inhibir el crecimiento de los agentes causantes de la fiebre tifoidea, el ántrax y la difteria. Ya en el primera década del siglo pasado P. Erlich descubrió el “Salvarsán” compuesto químico que unido al arsénico era útil en pacientes afectados de sífilis. La optoquina fue otra droga utilizada a principios del siglo pasado para tratar infecciones neumocócicas pero tuvo que ser abandonada a causa de su toxicidad (Austrian, 1994). Posteriormente, en 1920 Alexander Fleming descubrió que una sustancia proveniente de las lágrimas era capaz de inhibir el crecimiento de algunas bacterias. Mas adelante, en 1928 descubrió otro agente natural con un alto poder microbicida, que era producido por el hongo *Penicillium notatum*, al que llamó penicilina (Fleming, 1929). El amplio uso de la penicilina como agente terapéutico comenzó en 1942 y partir de entonces se ha transformado en uno de los antibióticos históricamente más utilizados.

El término “antimicrobiano” se le atribuye al biólogo S. Walksman quien fue el descubridor de la estreptomocina en 1943. Este término incluye a las sustancias con poder antibacteriano, antiviral, antimicótico y antiparasitario. Actualmente existen antimicrobianos de origen natural (β -lactámicos, macrólidos, aminoglucósidos, glucopéptidos etc.) producidos por hongos o bacterias. Otro grupo son los sintetizados por el hombre (sulfamidas, trimetoprima, nitrofuranos, quinolonas). Además existen los semisintéticos que son los que poseen en su estructura una base de un antimicrobiano natural sobre la que se hacen diferentes sustituciones químicas para obtener distintos derivados. De esta manera los antibióticos se convirtieron en el principal recurso de la

medicina para tratar las infecciones *in vivo*.

No obstante, transcurridos pocos años de uso, se describió que en ocasiones ocurría el fracaso terapéutico por el desarrollo de mecanismos de resistencia por parte de las bacterias. Los propios antibióticos actúan como selectivos para la aparición de cepas bacterianas resistentes a ellos mismos (Boucher *et al.*, 2009).

Las bacterias han habitado el planeta por más de 4.000 millones de años. El hombre con un recurso que lleva apenas un poco más de 100 años, selecciona bacterias cada vez más resistentes, sin poder mantener un ritmo de creación de nuevos antibióticos suficientemente acelerado para contrarrestarlas. Entre estas bacterias hay algunas que resisten la actividad de numerosos antibióticos como por ejemplo *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenemes, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) o enterococos resistentes a vancomicina (EVR).

Bacteriófagos

Biología de los Bacteriófagos: ciclos lítico y lisogénico

Los bacteriófagos también llamados fagos, son virus bacterianos y como tales son parásitos intracelulares obligados. Estos son capaces de infectar a un grupo específico de células huéspedes, determinado por interacciones de proteínas que forman la estructura viral y receptores proteicos en la superficie bacteriana (Guttman *et al.*, 2005).

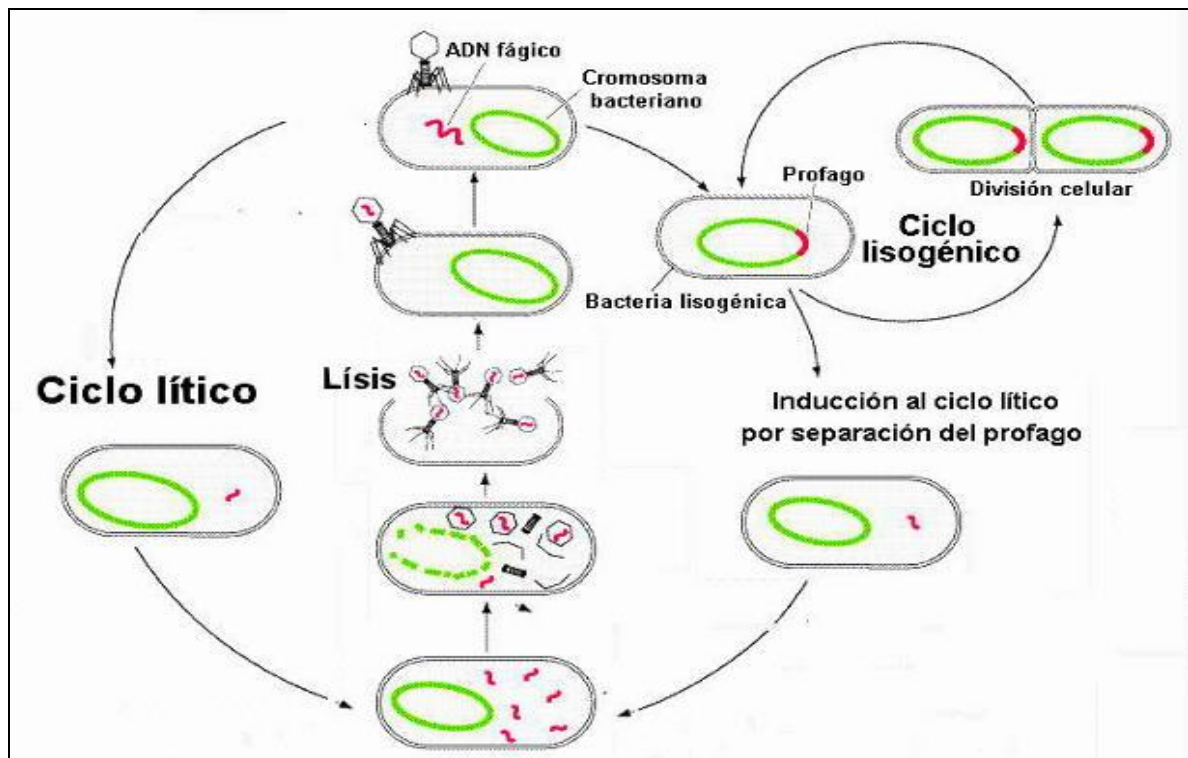
El primer paso de la infección viral es la adhesión del fago a la célula por medio de las interacciones proteína-proteína recién mencionadas. Luego, el siguiente paso es la inyección del material genético del fago dentro de la bacteria (Young *et al.*, 1992).

Este material genético puede ser ARN o ADN de simple o doble cadena. Una vez dentro de la célula, el ciclo de replicación del fago puede continuar de dos maneras que van a

tener consecuencias distintas sobre la viabilidad de la célula infectada (Canchaya *et al.*, 2003). Estas dos vías son llamadas ciclo lítico y ciclo lisogénico respectivamente (Figura 3).

En el ciclo lítico el material genético del fago utiliza la maquinaria de expresión genética de la célula huésped para generar copias completas de sí mismo. Este ciclo termina indefectiblemente con la lisis de la célula infectada y la liberación de las partículas de fagos al medio para comenzar nuevamente el ciclo infectando a otras bacterias. Generalmente el ciclo lítico comienza con la expresión de genes virales que inhiben la transcripción de los genes bacterianos y permite la expresión de los genes de bacteriófago. Además de las enzimas implicadas en la transcripción y traducción, el fago también utiliza la materia prima de su huésped como aminoácidos, nucleótidos y energía en forma de ATP. Al transcurrir el ciclo lítico se van acumulando las proteínas estructurales de la partícula viral y también se generan nuevas copias del genoma. Todos estos procesos dan como resultado el ensamble de las partículas de fagos que lisan la célula y se liberan al medio (Merril C *et al.*, 2006).

En el ciclo lisogénico el material genético del fago se integra al cromosoma de la célula huésped mediante un evento de recombinación específica de sitio y a partir de ese momento se replica como parte integrante del mismo (Brusow *et al.*, 2005; Little *et al.*, 2005; Snyder *et al.*, 2007). Entonces, el fago integrado recibe el nombre de profago y se mantiene en este estado lisogénico, multiplicándose junto con el ADN bacteriano mientras las condiciones del medio permitan a la célula huésped replicarse eficazmente. En ocasiones debido al efecto de agentes físicos como el calor, el frío, las radiaciones ultravioletas o agentes químicos como la mitomicina C o una carencia de nutrientes, el profago se escinde del cromosoma bacteriano. Este proceso llamado inducción permite al material genético del fago reingresar al ciclo lítico.



(Tomado de <http://www.biotech.bioetica.org/clase1-4.htm>)

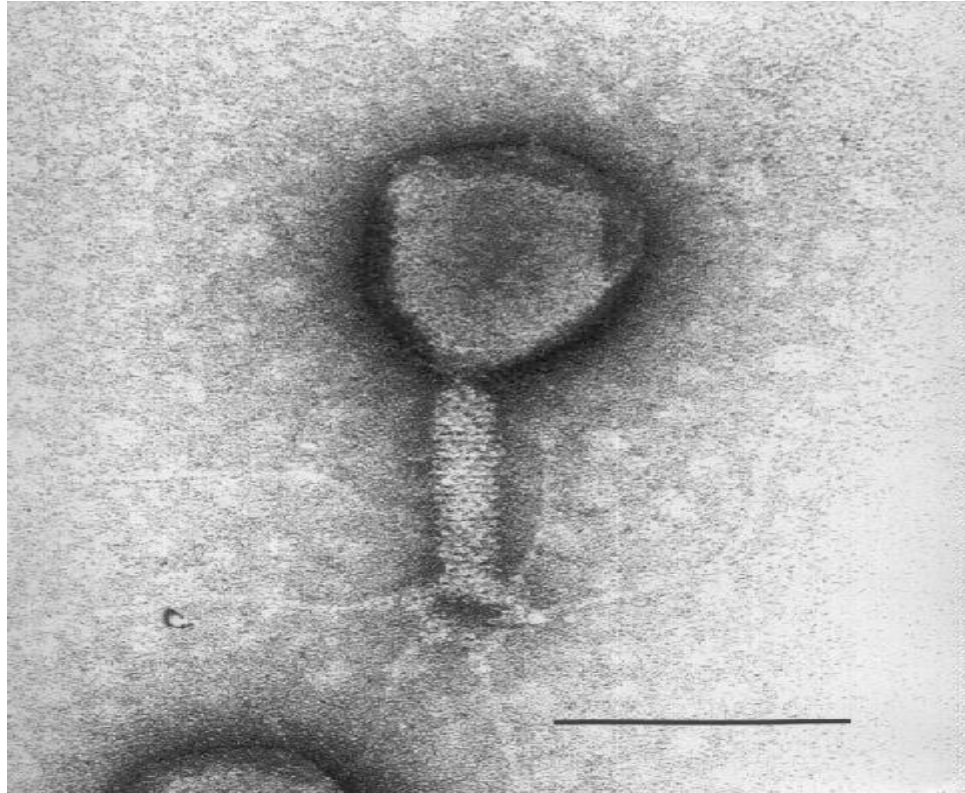
Figura 3. Comparación entre los ciclos lítico y lisogénico.

Enzimas líticas.

Al final del ciclo lítico los fagos terminan liberando la nueva progenie mediante una ruptura abrupta de la pared bacteriana, algo que recuerda mucho a un estallido. La rotura es producida por la acción en las enzimas líticas. Los genes que codifican las enzimas líticas se encuentran localizados en el genoma del fago. Estas enzimas líticas son mureínhidrolasas altamente evolucionadas que pueden actuar por dos mecanismos diferentes, o bien inhiben la síntesis del peptiglicano de la pared, o bien provocan una ruptura en la estructura de la pared. Las enzimas líticas o lisinas se clasifican según su función biológica. Pueden ser N-acetilmuramidasa (lisozimas o muramidasa), endo-beta-N-acetilglucosaminidasa (glucaminidasa), N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa (NAM-amidasa), endopeptidasa o transglucosidasa lítica (Scholl *et al.*, 2008; López *et al.*, 2000; Nelson *et al.*, 2002).

Clasificación de los bacteriófagos

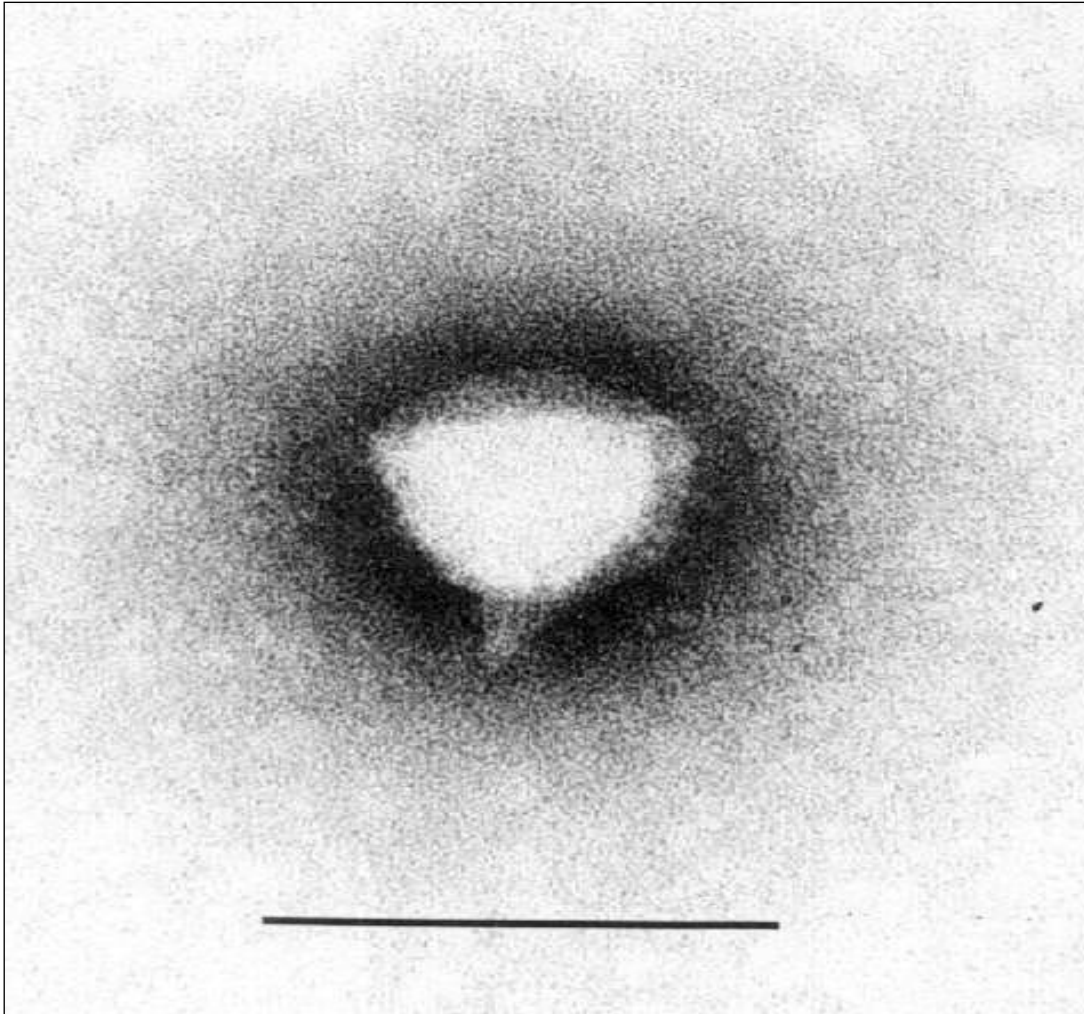
Hace casi 100 años Felix D' Herelle describió el primer bacteriófago, al que denominó *Bacteriophagum intestinale*, que en realidad parecería haber sido una mezcla de fagos (Calendar, 2006). A partir de ese momento fueron aislados una gran cantidad de estos agentes y se los denominó sin tener un sistema unificado de nomenclatura. D'Herelle publicó en 1922 un libro llamado "*The Bacteriophage*". En él describió varias características de los bacteriófagos aislados por él y por otros microbiólogos. Este fue el primer intento de organizar sistemáticamente la nomenclatura de estas entidades. En 1961 Eisenstark publicó una lista con los bacteriófagos estudiados hasta entonces mediante microscopía electrónica (Eisenstark, 1967). Esta lista incluía 111 bacteriófagos de distinta morfología (cúbica, filamentosa o icosaédrica). Años más tarde se publicó una lista que incluyó 411 bacteriófagos, en la que se detallaban las dimensiones y características fisicoquímicas de los mismos (Fraenkel-Conrat, 1974). En la actualidad hay más de 5.000 virus estudiados mediante microscopía electrónica, muchos de los cuales son bacteriófagos. Las reglas para la nomenclatura y clasificación son dictadas por el Comité Internacional de Taxonomía Viral (ICTV) (<http://www.virustaxonomyonline.com/>).



(Tomado de <http://www.mansfield.ohio-state.edu/~sabedon/names.htm>)

Figura 4. Microfotografía electrónica de un virus de la familia *Myoviridae*. El virus 31 de *Aeromonas* spp. aquí fotografiado es un representante típico de la familia *Myoviridae*: no posee envoltura lipídica, presenta una cabeza con simetría icosaédrica y una cola contráctil, constituida por un tubo central de simetría helicoidal, al que se unen las espículas o fibras. El genoma es de ADN doble de cadena. La barra representa 100 nm.

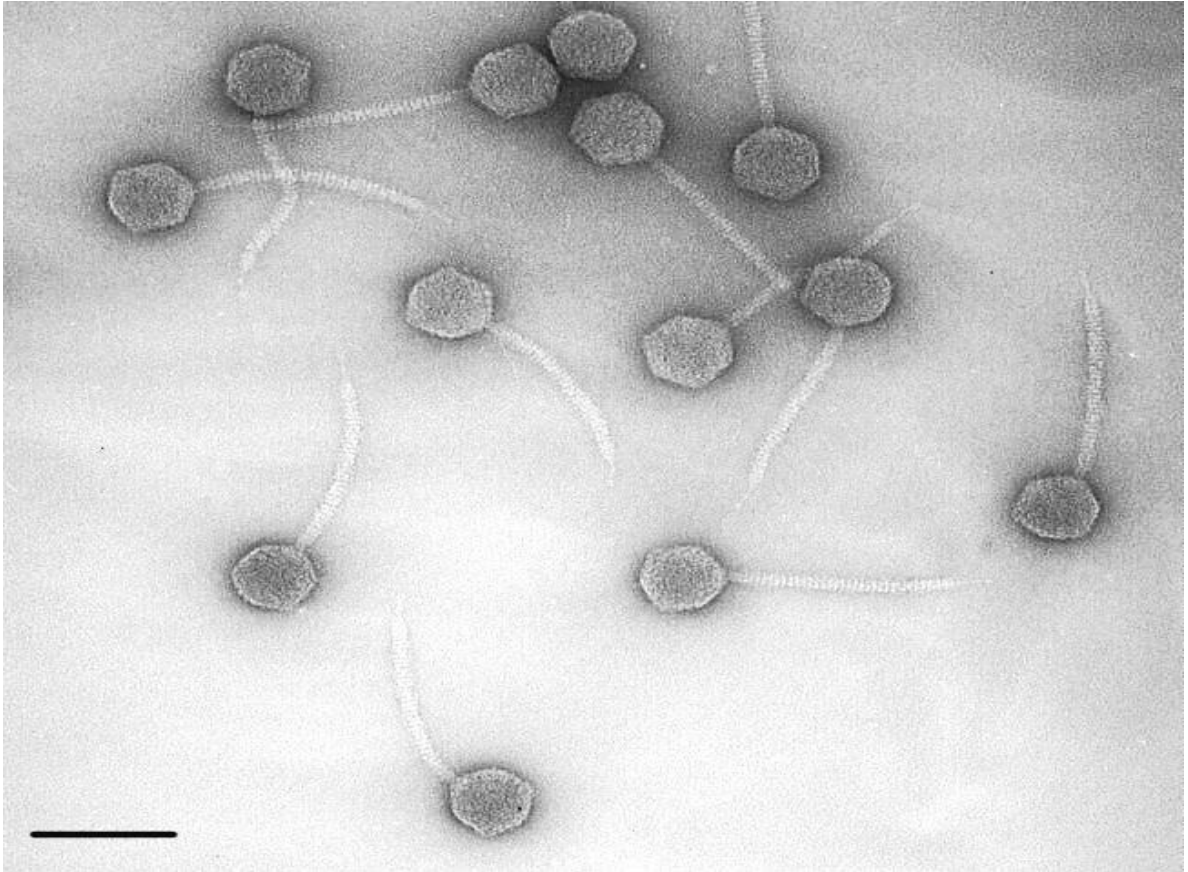
En la actualidad se pueden agrupar a los bacteriófagos en 11 familias, que se dividen en subfamilias. Por debajo de esta jerarquía taxonómica la clasificación se torna confusa (Ackermann *et al.* 1987; Ackermann, 2001).



(Tomado de <http://www.mansfield.ohio-state.edu/~sabedon/names.htm>)

Figura 5. Microfotografía electrónica de un bacteriófago de la familia *Podoviridae*. Está compuesto por una cabeza de simetría icosaédrica de 60 nm de diámetro y una cola no contráctil a la que se unen 6 cortas fibras. El material genético es ADN doble de cadena. La barra representa 100nm.

Los bacteriófagos del género *Enterococcus* descritos hasta el momento pertenecen a tres familias: *Myoviridae*, *Podoviridae* y *Siphoviridae* (orden *Caudovirales*) (Figuras 4-6).



(Tomado de <http://www.mansfield.ohio-state.edu/~sabedon/names.htm>)

Figura 6. Microfotografía electrónica de bacteriófagos de la familia *Siphoviridae*, orden *Caudovirales*. Estos fagos presentan una cabeza con simetría icosaédrica de 60 nm de diámetro y poseen una larga cola no contráctil con simetría helicoidal. El material genético es ADN de doble cadena. La barra representa 100 nm.

Bacteriofagoterapia.

Antecedentes en el tema.

La historia de los bacteriófagos comienza con el descubrimiento de los mismos durante la segunda década del siglo pasado (Twort, 1915; D'Herelle, 1933). Las primeras observaciones sobre la existencia de los mismos provienen del científico alemán Ernest Hankin quien informó acerca de una actividad antimicrobiana sobre *Vibrio cholerae* en el año 1896. Dos años después, Nikolay Fyodorovich Gamaleya observó el mismo fenómeno en *Bacillus subtilis*. Estos investigadores, sin embargo, no pudieron explicar la naturaleza del agente causante de esta actividad. En el año 1915 Frederick Twort estableció la hipótesis de que esa actividad antibactericida podía ser debida a un virus y en 1917 microbiólogo francocanadiense Félix D'Herelle demostró mediante experimentos que la actividad antimicrobiana era producida un virus capaz de infectar bacterias (Sulakvelizde *et al.*, 2001). El propio D'Herelle propuso el término bacteriófagos [del griego *phagein* = comer] para designarlos, nombre con el que se los conoce hasta la actualidad.

El descubridor de los bacteriófagos (fagos) fue el primero en utilizarlos como agente terapéutico para tratar la disentería en un niño de 12 años. D'Herelle observó que los síntomas de la enfermedad desaparecían después de una única administración de la suspensión de bacteriófagos. La eficacia de esta terapia fue confirmada poco tiempo después en tres pacientes con disentería a los que se los trató también con la suspensión de bacteriófagos y se recuperaron de la enfermedad. Estos resultados obtenidos por D'Herelle no fueron rápidamente publicados. La primera publicación sobre el uso de bacteriófagos como agentes terapéuticos la realizaron en 1921 Richard Bruynoghe y Joshep Maisin, quienes utilizaron suspensiones de fagos para tratar infecciones de piel producidas por *Staphylococcus* spp. Estos autores reportaron el uso de estas

suspensiones sobre las heridas y la recuperación de las mismas en 48 horas (Sulakvelizde *et al.*, 2001).

El estudio de la utilización de los bacteriófagos en el tratamiento de las enfermedades infecciosas quedó relegado luego del descubrimiento y amplio uso de distintos antimicrobianos. El inicio de la era antibiótica supuso el declive de la terapia fágica. La alta eficacia de estos compuestos llevó al abandono de esta terapia e incluso a un recorte de fondos en la investigación de este tipo de virus. Sin embargo, la aparición de cepas bacterianas resistentes a un elevado número de antibióticos (multirresistentes) obliga a investigar nuevas estrategias para identificar agentes antimicrobianos. Esto hace que se vuelva la vista de nuevo a terapias que en el pasado fueron efectivas (Mc Vay *et al.*, 2007; Raya *et al.*, 2006).

No obstante, el uso terapéutico de los bacteriófagos continuó creciendo principalmente en los países del este de Europa como Polonia, la Unión Soviética y Georgia (Housby *et al.*, 2009; Inal, 2003; Cervený *et al.*, 2003). En estos países se publicó una gran cantidad de trabajos en sus respectivos idiomas por lo que resultaron de difícil acceso para la comunidad científica occidental. Actualmente se han realizado revisiones de tales publicaciones en idioma inglés (Levin *et al.*, 1996; Carlton *et al.*, 1999; Barrow *et al.*, 1997). En estos trabajos se detalla el uso de bacteriófagos en el tratamiento de distintas infecciones causadas por agentes etiológicos diversos, como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp, *Proteus* spp., *Streptococcus* spp. En ellos se describen las vías de administración de los agentes y la evolución de los pacientes (Summers *et al.*, 2001; Denou *et al.*, 2009; Merrill *et al.*, 2003) como así también la farmacocinética de las suspensiones de fagos (Payne *et al.*, 2003). Entre los ejemplos más destacados y recientes de la utilización exitosa de la fagoterapia cabe citar el uso de bacteriófagos específicos en el control

biológico de *E. coli* O157 productora de colitis hemorrágica (en alimentos) (Kudva *et al.*, 1999; Barrow *et al.*, 1998; Rozema *et al.*, 2009; Abuladze *et al.*, 2008; Sharma *et al.*, 2009; Viazis *et al.*, 2011; Patel *et al.*, 2011; Niu *et al.*, 2008; Bueno *et al.*, 2012). También se ha estudiado en un modelo murino el tratamiento de infecciones peritoneales con bacteriófagos para combatir a *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina. En este estudio se logró la recuperación del 100% de los animales bacteriémicos luego de la administración de una única dosis de bacteriófagos a una concentración de 10^8 unidades formadoras de placas por mililitro (ufp/ml), 45 minutos después de la infección (Biswas *et al.*, 2002). En otros trabajos se utilizó la administración oral de suspensiones de bacteriófagos de concentración conocida, para reducir la colonización intestinal de *Campylobacter jejuni* y *Salmonella enteritidis* en aves de cría (Wagenaar *et al.*, 2005, Hanlon, 2007; Atterbury *et al.*, 2003; Atterbury *et al.*, 2007; El-Shibiny, 2009; Scott *et al.*, 2009; Sklar *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2001; Fiorentin *et al.*, 2005; Toro *et al.*, 2005; Andreatti Filho *et al.*, 2007; Borie *et al.*, 2008; Leverentz *et al.*, 2001, Higgins *et al.*, 2005; Higgins *et al.*; 2007) y en otros animales o productos vegetales para consumo humano (Pao *et al.*, 2004; Ye *et al.*, 2009; Hotton *et al.*, 2011; Dykes *et al.*, 2002; García *et al.*, 2009).

Recién desde hace unos pocos años se ha comenzado a reivindicar en la medicina occidental el papel que le otorgara Felix D'Herelle a la terapia con bacteriófagos como agentes antimicrobianos.

Es importante, sin embargo, conocer algunas objeciones a menudo hechas a la fagoterapia

1) El desconocimiento de la biología de los bacteriófagos.

La ignorancia era tal que hasta se llegó a afirmar que eran proteínas de alto peso molecular que parecían formarse en el interior de las células. Su verdadera naturaleza no

se conoció sino hasta 1943 cuando el grupo de trabajo de Luria y Delbruck tomó las primeras microfotografías electrónicas de partículas fágicas (Miedzybrodzki *et al.*, 2005).

2) La falta de diseño de protocolos experimentales adecuados.

No se incluyeron controles o grupos placebos adecuados para demostrar la real eficacia de la terapia. Este ha sido un punto muy criticado y sirvió como argumento para desestimar el éxito que los países de Europa oriental atribuyeron a la fagoterapia.

3) La utilización de cepas de bacteriófagos no estrictamente líticos.

No todos los fagos entran necesariamente en ciclo lítico tras la infección, sino que, en algunos casos, una parte de la población puede quedar en fase lisógena, transformando a la bacteria huésped en resistente a la infección por otros fagos (Parisien *et al.*, 2008). En este caso no se produce el efecto amplificador de partículas del que depende la terapia. Las cepas lisogénicas deberían haberse descartado para el uso terapéutico a causa de que no producen la lisis de la bacteria y aún como agravante pueden actuar como vectores de genes que codifiquen proteínas implicadas en factores de virulencia o mecanismos de resistencia a los antimicrobianos (transducción generalizada) (Boyd *et al.*, 2003). Así por ejemplo, el gen que codifica la toxina colérica reside en el genoma de un fago que queda en estado lisógeno inserto en el genoma de *Vibrio cholerae* (García Aljaro *et al.*, 2010)

4) Administración de suspensiones sin purificar, obtenidas únicamente mediante filtrado.

Por simple filtrado no se eliminaban ciertos detritos celulares como endotoxinas o exotoxinas, superantígenos, etc. de las paredes celulares bacterianas. Estos detritos son capaces de producir efectos adversos que se manifiestan como reacciones que hasta pueden llevar al *shock* tóxico en algunos casos debido a una estimulación excesiva del

sistema inmune (Hagens *et al.*, 2003; Moradpour *et al.*, 2011). Este inconveniente puede ser superado en la actualidad mediante la utilización de métodos de purificación por ejemplo la centrifugación en gradiente de densidad de cloruro de cesio (Sambrook *et al.*, 1989; Clokie *et al.*, 2009).

5) La ausencia de estudios de farmacocinética que determinaran la velocidad de eliminación de las partículas del torrente sanguíneo (Payne, 2003; Carlton *et al.*, 2005; Gill *et al.*, 2006; Marza *et al.*, 2006).

Se sugirió que los fagos eran eliminados de la sangre por medio del sistema inmune adaptativo a través de anticuerpos específicos. Luego se sin embargo se demostró (Merril *et al.*, 1996) que la pérdida de eficacia era debida a que los fagos eran retenidos en el bazo, que actuaría como filtro y se mantenían funcionales en ese lugar por varios días sin ser neutralizados ni fagocitados por los macrófagos.

Tomando todas las experiencias previas tanto en seres humanos como en animales de experimentación, los bacteriófagos parecerían ser inocuos. Estos han sido utilizados en concentraciones de 10^5 hasta 10^{11} unidades formadoras de placas por mililitro (ufp/ml), a través de diferentes estas vías de administración: aplicaciones tópicas, por vía oral (jarabes o píldoras) o mediante aerosoles.

No obstante aún hoy, se necesitan más estudios farmacológicos y toxicológicos para proponer a la fagoterapia como alternativa antimicrobiana (Payne *et al.*, 2000; Payne, 2003; Skurnik, 2006; Soothill *et al.*, 2004; Clark *et al.*, 2006).

Utilización actual de bacteriófagos o sus productos

Si bien el estudio de los bacteriófagos como agente terapéutico fue casi abandonado a partir del inicio de la era antibiótica, distinta fue la importancia que se le dio al uso de los bacteriófagos tanto el campo de la ciencia básica como aplicaciones

biotecnológicas de fagos o sus productos en la industria medica o alimenticia entre otras (McKinstry *et al.*, 2005; Sillankorva *et al.*, 2012; Suárez V *et al.*, 2002; Greer, 2005; Soni *et al.*, 2010; Lim D *et al.*, 2011; Carlton R *et al.*, 2005; Holck A *et al.*, 2009; Tabla R *et al.*, 2012).

Los experimentos clásicos de Mesehlson y Stahl, quienes utilizaron bacteriófagos marcados radiactivamente, permitieron confirmar estudios previos realizados por Avery y colaboradores en los cuales se determinó la naturaleza química del material hereditario (Summers *et al.*, 1999; Luke *et al.*, 2002). La aparente simplicidad de las partículas fágicas y el impulso brindado por estudios de Luria, Delbruk y Hershey fueron fundamentales para el nacimiento de la Biología Molecular.

Actualmente el uso de fagos es variado, por ejemplo se utilizan como criterio de clasificación de cepas patógenas (fagotipificación) (Matsuzaki S *et al.*, 2005). Se aprovecha su elevada especificidad para poder determinar si pertenecen a una cepa u otra. También se emplean en la industria alimenticia para eliminar bacterias lácticas que podrían estropear alimentos (Garcia P *et al.*, 2008) o reducir carga bacteriana en animales de cría (Goode *et al.*, 2006; Hurley A *et al.*, 2008; Johnson R *et al.*, 2008; Hagens S *et al.*, 2007; Wall S *et al.*, 2010; Guenther S *et al.*, 2009). En el ambiente biosanitario se utilizan para eliminar bacterias que forman biopelículas sobre material médico, catéteres (por ejemplo de diálisis) o válvulas de implante (como por ejemplo las cardíacas) (Fu W *et al.*, 2010; Climo M *et al.*, 1998; Siringan P *et al.*, 2011). Estas biopelículas son muy persistentes y difíciles de eliminar, por ello estos fagos pueden ser de gran ayuda. En biología molecular se utilizan los fagos como vectores de clonado de fragmentos de ADN que por su tamaño no permiten ser clonados en plásmidos. Se han publicado en los últimos tiempos diversos trabajos y revisiones en revistas científicas internacionales sobre la actualización de bacteriófagos como agente

antimicrobiano, tanto en modelos animales como en humanos (Bigwood *et al*, 2008; Verma *et al*, 2009; Kokai-Kun J *et al*, 2003; Higgins S *et al*, 2007).

Comparación entre fagos y antibióticos

Los fagos líticos son similares a los antibióticos ya que tienen al igual que varios de ellos, un alto poder bactericida. Su diferencia fundamental, además de su peso molecular muchísimo mayor, estriba en la capacidad de duplicarse a expensas de las bacterias.

Se han publicado varios ensayos en los cuales utilizaron fagos como agentes antimicrobianos, en humanos y en animales infectados experimentalmente (Kaczkowski *et al.*, 1990; Meladze *et al.*, 1982; Perepanova *et al.*, 1995, D'Herelle, 1915). Por ejemplo se emplearon para el tratamiento exitoso de infecciones pulmonares por estafilococos, infecciones debidas *Pseudomonas aeruginosa* en pacientes con fibrosis quística, infecciones oculares, sepsis neonatal, infecciones posquirúrgicas entre otras (Carlton *et al*, 1999; Levin *et al.*, 1996; Shabalova *et al.*, 1995). En estos trabajos se intentó demostrar la eficacia de la fagoterapia como tratamiento (Chibani *et al*, 2004).

En otros estudios se pudo observar además que la fagoterapia tenía una eficacia superior al tratamiento con antibióticos para el manejo de cierto tipo de infecciones (Smith *et al.*, 1982; Brussow H *et al*, 2005). Una ventaja potencial del uso de fagos como agentes terapéuticos sobre los antibióticos es el efecto de amplificación (Callaway *et al*, 2008; Matsuzaki *et al*, 2003, Guenther S *et al*, 2012) (Tabla 2). Si bien es posible que las bacterias generen resistencia frente a los fagos, ésta se da con una menor frecuencia que el desarrollo de resistencia a los antibióticos (Martínez B *et al*, 2008). Además se puede llevar a cabo el tratamiento con una suspensión que contenga múltiples fagos (cóctel) que infecten a la misma especie bacteriana.

Bacteriófagos	Antibióticos	Observaciones
Altamente específicos	Afectan tanto al patógeno como a la microflora normal. Lo que puede llevar a sobreinfecciones.	Los antibióticos tienen más probabilidad de ser efectivos cuando el agente etiológico es desconocido.
Efecto amplificador, se replican en el sitio de la infección.	Son metabolizados y eliminados del cuerpo y no concentran en el sitio de la infección.	Se necesitan menos administraciones de fagos para lograr un óptimo efecto terapéutico
No se han descrito efectos adversos graves.	Múltiples efectos adversos desórdenes intestinales, alergias, sobreinfecciones.	Un efecto adverso para ambos es la liberación de endotoxinas cuando la bacterias son lisadas.
Las bacterias que se tornan resistentes a una cepa de un fago permanecen sensibles a muchos otros.	La resistencia antibiótica no está limitada al antibiótico administrado.	A causa de su gran espectro de acción los antibióticos seleccionan resistencia en muchas especies además de las patógenas a las que están dirigidos.
La selección de nuevos fagos ante cepas resistentes es un proceso relativamente rápido (en el orden de semanas).	El desarrollo de nuevos antibióticos contra bacterias resistentes lleva años en ocasiones.	Los fagos mediante un proceso dirigido por la selección natural coevolucionan con sus huéspedes y cambian en el curso de la aparición de resistencia, los antibióticos no.

Tabla 2. Comparación del uso profiláctico y/o terapéutico de fagos y antibióticos.

Utilización de enzimas líticas fágicas como antibióticos. Enzibióticos

Una interesante alternativa al uso de fagos intactos para combatir a las bacterias patógenas se centra en el empleo algunos productos fágicos, en concreto las enzimas líticas codificadas por el genoma de los fagos (Cheng *et al*, 2005; Borysowski J *et al*, 2006; Duquesne S *et al*, 2008; Leverentz B *et al*, 2003). Las enzimas líticas o lisozimas de los fagos se utilizan para destruir la pared bacteriana desde el interior de la célula infectada y así facilitar la liberación de la descendencia fágica al final de la secuencia del ciclo lítico (Loeffler *et al*, 2001). Estas enzimas reciben diferentes denominaciones de acuerdo con el enlace químico que destruyen en la pared del huésped (Daw *et al*, 1996). De esta manera, se habla de glicosidasas, amidasas y endopeptidasas, las glicosidasas pueden clasificarse además como muramididasas glucosaminidasas, y transglucosidasas (Kenny *et al*, 2004). El grupo de Vincent Fischetti de la Universidad Rockefeller ha empleado recientemente tales enzimas para prevenir y eliminar microorganismos patógenos de ratones colonizados por estreptococos grupo A y neumococos (Loeffler *et al*, 2001; Nelson *et al*, 2001; Cheng *et al*, 2005). En el caso del grupo A se usó una enzima lítica, específica para los grupos A, C y para estreptococos, que fue purificada a partir de un extracto crudo de un lisado de fago. Estos autores demostraron que 10 ng (1000 U) de enzima purificada eran suficientes para esterilizar un cultivo de 10^7 bacterias en 5 segundos. En el modelo murino, 250 unidades de enzima añadidas en la cavidad bucal proporcionaban protección frente a 10^7 ufc/ml de estreptococos del grupo A sin afectar al resto de la microbiota indígena.

Recientemente, se ha conseguido aislar una amidasa producida por un fago que infecta a *Bacillus anthracis*. Como en los casos anteriores esta enzima se ha mostrado muy eficaz en los ensayos realizados *in vitro* e *in vivo* (Schuch R *et al*, 2002).

Se han publicado un gran número de trabajos en los cuales se utilizan estas enzimas

como agentes antimicrobianos. En los mismos se describe su alta eficacia y su potente y rápido efecto sobre cultivos bacterianos (Nelson *et al*, 2001; Fischetti, 2008; Witzentrath *et al*, 2009; Damasko *et al*, 2005; Smith T *et al*, 2000; Yoong T *et al*, 2004). El estudio de los fagos y de algunos de los productos por ellos codificados se presenta como un área de investigación prometedora en los próximos años a la hora de desarrollar nuevos mecanismos de antibiosis que tan necesarios son a causa de la creciente resistencia de las bacterias frente a los antibióticos clásicos.

HIPÓTESIS

Pese a que los fagos han sido reconocidos como posibles agentes terapéuticos desde hace varias décadas, son escasas las aplicaciones que se les ha dado hasta el momento. El aumento global de cepas bacterianas con multirresistencia y extrema resistencia antibiótica está llevando a desarrollar nuevas alternativas para el control de las infecciones bacterianas. Nuestra hipótesis, es que existen fagos líticos de cepas de *Enterococcus* spp. resistentes a la vancomicina que pueden ser usados con fines terapéuticos, colaborando de esta manera tanto a la prevención como al tratamiento de dichas infecciones.

OBJETIVOS

Objetivo General

El objetivo general de este trabajo de tesis es el aislamiento y caracterización tanto a niveles fenotípico como genotípico de bacteriófagos líticos que infectan específicamente a cepas pertenecientes al género *Enterococcus*. La meta final de esta investigación es la aplicación futura de estos bacteriófagos en la descolonización del tracto intestinal de pacientes internados portadores de enterococos resistentes a la vancomicina.

Objetivos específicos.

- Construir una colección de bacteriófagos líticos de cepas de *Enterococcus* spp.
- Caracterizar fenotípicamente a los bacteriófagos aislados mediante microscopía electrónica, morfología de las placas de lisis obtenidas y a nivel genotípico mediante la secuenciación y análisis del material genético de los mismos.
- Determinar el procedimiento más efectivo para la conservación de los bacteriófagos a largo plazo.
- Poner a punto sistemas de colonización *in vitro* e *in vivo* con enterococos multirresistentes y ensayar la capacidad de las suspensiones de los bacteriófagos aislados para actuar como agente bactericida mediante pruebas *in vitro* utilizando cultivos de líneas celulares intestinales humanas y la capacidad de estas suspensiones para la descolonización bacteriana del tracto gastrointestinal de animales colonizados experimentalmente.

MATERIALES & MÉTODOS

Origen y conservación de los aislamientos bacterianos

Se trabajó con cepas provenientes de materiales clínicos procesados en el Servicio de Microbiología del Hospital de Pediatría “Prof. Dr. Juan P. Garrahan” (Tabla 3). Estas cepas fueron conservadas en leche descremada al 4% P/V, a -80°C . Para la búsqueda inicial de bacteriofagos se utilizaron tres cepas EN307, EN470 y EN475. Estas son denominadas en este trabajo como indicadoras o de referencia debido a que con las mismas se realizó es tamizaje inicial o *screening*. Además se trabajó con cepas provistas por el Laboratorio de Mecanismos de Resistencia Antibiótica del Departamento de Microbiología, Parasitología e Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires. Estas cepas fueron conservadas en caldo infusión cerebro corazón (BHI) (Difco laboratories, Detroit, USA) con glicerol al 10%, a -80°C . También se utilizaron cepas de la *American Type Culture Collection* (ATCC), cepas cedidas por el Laboratorio de Mecanismos de Resistencia Antibiótica del Departamento de Microbiología, Parasitología e Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires, cepas cedidas por la Dra Barbara Murray, Universidad de Texas, como así también cepas disponibles comercialmente (Tabla 3).

Para descongelar las cepas a utilizar se las dejó a temperatura ambiente, se las transfirió con ansa estéril a placas de agar sangre y se incubó a las mismas a 37°C en estufa. Para confirmar la identidad de las cepas se realizaron pruebas bioquímicas convencionales siguiendo criterios internacionales (Teixeira y Facklam, 2003).

CEPA	ESPECIE	ORIGEN	ENSAYOS
EN 307	<i>E. faecalis</i>	1	Indicadora
EN475	<i>E. faecium</i>	1	
EN470	<i>E. faecium</i>	1	
AT85 = Tx2404	<i>E. faecium</i> VanA	5	Espectro de Infectividad
EN364, EN370, EN371 EN375, EN379, EN380, EN382 EN444, EN448, EN451, EN455 EN460, EN462, EN464, EN465 EN466, EN468, EN471, EN472 EN474 E968, E1130, TN918, E693, E104 E4, E5,E6,E7,E8, E9,E10,E11,EFCB	<i>Enterococcus faecium</i>	1	
		2	Pruebas de Sensibilidad a Vancomicina PCR
EN 34	<i>E. gallinarum</i>	1	Espectro de infectividad
AT 80	<i>E. hirae</i>	1	
AT 88	<i>E. dispar</i>	1	
AT 89	<i>E. raffinosus</i>	1	
AT84 = Tx2407	<i>E. casseliflavus</i> vanC ₂	5	
AT 93 = ATCC 43186	<i>E. mundtii</i>	3	
EN 129	<i>E. avium</i>	1	
ATCC 29212	<i>E. faecalis</i>	3	
TN 917	<i>S. aureus</i>	2	
SR737	<i>Gemella</i> sp.	1	
SR745	<i>S. oralis</i>	1	
SR756	<i>Aerococcus viridans</i>	1	
SR 198	<i>S. anginosus</i>	1	
ATCC 19615	<i>S. pyogenes</i>	3	
ATCC 13813	<i>S. agalactiae</i>	3	
AT 139	<i>S. salivarius</i>	1	
ATCC 49619	<i>S. pneumoniae</i>	3	
ATCC 29213	<i>S. aureus</i>	3	
AT 138	<i>S. sanguis</i> tipo 1	1	
ATCC 49456	<i>S. mitis</i>	3	
EN 232	<i>Pediococcus</i> sp.	1	
AT 97	<i>Listeria monocytogenes</i>	1	
AT 231	<i>E. rhusiopathiae</i>	1	
AT 127	<i>Rhodococcus equi</i>	1	
AT 184	<i>Enterobacter aerogenes</i>	1	
ATCC 25922	<i>E. coli</i>	3	
DH 5 α	<i>E. coli</i>	4	Clonado

Tabla 3. Cepas bacterianas utilizadas para distintos ensayos en este estudio.

1. Aislamientos clínicos del Servicio de Microbiología del Hospital de Pediatría “Prof Dr Juan P. Garrahan”
2. Laboratorio de Mecanismos de Resistencia Antibiótica del Departamento de Microbiología, Parasitología e Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires.
3. *American Type Culture Collection* (ATCC).
4. Cepa comercial (Invitrogen)
5. Cepas gentilmente cedidas por la Dra Barbara Murray, Universidad de Texas.

Pruebas de sensibilidad a vancomicina.

Se efectuaron pruebas de sensibilidad por difusión con discos de 30µg de vancomicina y 30µg de teicoplanina (BBL, EUA).

Se realizaron además pruebas de sensibilidad para determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) mediante el método epsilométrico (*Etest*, Biomérieux Argentina) y/o el método de macrodilución en medio líquido (CLSI b), siguiendo los criterios expuestos en el manual de procedimientos del Servicio de Microbiología del Hospital de Pediatría “Prof. Dr. Juan P. Garrahan”. El control de calidad se realizó utilizando las cepas de referencia *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 29213 y *E. faecalis* 29212 (Tabla 3).

Pruebas de sensibilidad por dilución.

Pruebas de sensibilidad por macrodilución en medio líquido.

Se utilizó caldo Mueller Hinton con o sin el agregado de cationes ($\text{Ca}^{++} = 20\text{-}25 \text{ mg/l}$, $\text{Mg}^{++} = 10 - 12,5 \text{ mg/l}$). En una batería de tubos se realizaron diluciones al medio de una concentración elegida del antibiótico a ensayar. A estos tubos se les agregó un volumen igual del inóculo bacteriano como para que quede en una concentración final de $5 \times 10^5 \text{ ufc/ml}$.

El inóculo bacteriano se preparó a partir de un número discreto de colonias crecidas en medio sólido (cultivo de no más de 24 horas). Con éstas se realizó una suspensión en caldo Mueller Hinton de modo que su turbiedad fuera equivalente al del tubo N°0,5 de la escala de McFarland.

La incubación se efectuó a 35°C, en atmósfera normal y durante 18-24 horas.

La lectura se efectuó a ojo desnudo reconociendo la turbiedad de los tubos. Así se

determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM), que es la menor concentración del antibiótico capaz de inhibir el desarrollo del microorganismo.

El control de calidad se efectuó con la cepa *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

Pruebas de sensibilidad por difusión con discos.

Se utilizó el agar Mueller Hinton. El inóculo bacteriano se preparó a partir de cinco colonias crecidas en medio sólido (cultivo de no más de 24 horas). Con éstas se realizó una suspensión en caldo Mueller Hinton de modo que su turbiedad fuera equivalente a la del tubo N°0,5 de la escala de McFarland.

Se embebió un hisopo en la suspensión, se rotó la punta de algodón sobre las paredes del tubo para eliminar el exceso y se dispersó el inóculo en la placa en tres direcciones.

Se dejó secar durante menos de 15 minutos y se aplicaron los discos manualmente con una pinza. Las placas se incubaron a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, en atmósfera normal y durante 18-24 horas.

La lectura se efectuó con calibre. Se anotó el diámetro de cada halo de inhibición en mm y se comparó con los datos de las tablas del CLSI para determinar la correspondiente interpretación (resistencia =R, sensibilidad intermedia = I, sensibilidad = S)

Método epsilométrico

Se emplearon tiras de Etest. El método de Etest fue desarrollado en Suecia y comercializado primariamente por AB Biodisk, Solna, Suecia. Actualmente las tiras las distribuye Biomérieux Argentina.

El método consiste en la realización de pruebas de sensibilidad por difusión utilizando tiras especiales que contienen un gradiente del antibiótico a ensayar.

Se determinó la CIM en el punto de intersección entre la línea del halo de inhibición y cada uno de los lados de la tira. En los casos en que hubo discrepancia entre los datos obtenidos en uno y otro lado, se tomó como válida la CIM más elevada de las dos. Cuando se obtuvieron datos intermedios entre las potencias de dos, características del método de dilución, el resultado se aproximó al valor próximo más elevado.

La interpretación R, I ó S se obtuvo de las tablas del CLSI para dilución.

Se utilizaron los mismos controles de calidad que para las pruebas de dilución en medio líquido.

Detección de genes implicados en mecanismos de resistencia a vancomicina

Se investigó la presencia de genes *vanA* y *vanB* que confieren los fenotipos VanA y VanB de resistencia a la vancomocina a las bacterias que los portan. Fue utilizada una amplificación múltiple mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR múltiple). Los cebadores utilizados se describen en la Tabla 4. La reacción de PCR múltiple fue llevada a cabo en un volumen final de 50µl que contenía: 5µl de *buffer* 10x (Invitrogen), 2,5µl de MgCl₂ 25mM, 0,25 µl de dNTPs 20mM (premezclados), 2µl de cada uno de los cebadores a una concentración de 5µM, 0,25 µl de Taq polimerasa 5U/µl (Invitrogen) y 100 ng de ADN como templado. El volumen final de la reacción se alcanzó agregando agua destilada. El protocolo de amplificación consistió en 1 ciclo inicial a 95°C durante 5 minutos, seguido por 35 ciclos que constaban de un paso de desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, el *annealing* a 52°C durante 30 segundos y la extensión a 72°C durante 1 minuto. La reacción se realizó en un termociclador Eppendorf Mastercycler (Hamburg Germany). Se utilizaron los controles positivos y negativos correspondientes.

A los productos de amplificación se los analizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% con el colorante bromuro de etidio (BrEt) incorporado. En dicho gel se sembraron 10µl de las muestras más 4µl de solución *buffer* de carga y se corrió a 80 V hasta que el frente de corrida alcanzó 2/3 del gel.

Se sembraron marcadores de tamaño de 1KB *ladder plus* (Invitrogen, Life Technologies) y se analizó el tamaño de las bandas.

Blanco	Cebador	Uso del cebador	Secuencia 5'a 3'	Referencia
<i>vanA</i>	vanA F vanB R	PCR múltiple	ctatccatgagtaggacacac ctctaacctagccatgacac	(98)
<i>vanB</i>	vanB F vanB R	PCR múltiple	taccatcggattctgataccatg cgcgacagattacgactaga	(98)
ARNr16S	16S F 16S R	PCR múltiple	gaattagatacctggtagtcc tcgttgcgggacttaaccaac	(98)
Secuencias flanqueantes del MCS de pUC19	M13 F M13 R	secuenciación	gtaaaacgacggccag caggaaacagctatgac	(36)
clon 4	clon4F clon4R	secuenciación	cgtagtacgatgtctgg gtgtgtaggagaaggtgtc	Este trabajo
clon 6	clon6R		ccaagttggtctgtccat	

Tabla 4. Cebadores utilizados en los ensayos de amplificación y secuenciación.

Aislamiento de bacteriófagos

Para el aislamiento de bacteriófagos se utilizaron muestras de coprocultivo, ya que éstas han sido descritas previamente como fuente de los mismos. Las muestras fueron obtenidas mediante hisopados de materia fecal de pacientes que consultaron en forma ambulatoria o estaban internados en las diferentes salas del Hospital de Pediatría “Prof. Dr. Juan P. Garrahan”.

Como cepas bacterianas indicadoras para el aislamiento de bacteriófagos se utilizaron tres aislamientos clínicos de enterococos tanto resistentes como sensibles a vancomicina (Tabla 3). Se resuspendieron las muestras de coprocultivo en conjuntos de cinco o diez en 5 ml de solución fisiológica. Estas suspensiones se homogeneizaron mediante un agitador mecánico y se centrifugaron a 2500 rpm durante 10 minutos (Jouan B4).

El sedimento fue descartado y el sobrenadante filtrado mediante filtros de nitrato de celulosa de 0,22 μm (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA) y colocado en tubos estériles. Se ensayaron las suspensiones filtradas mediante goteo con ansa calibrada o micropipeta (de manera que las gotas contuvieran aproximadamente 10 μl) sobre placas de Petri con agar Mueller-Hinton (Britania, Buenos Aires, Argentina) sembradas con la cepa de la bacteria indicadora de manera que ésta creciera en forma confluyente (césped bacteriano). Esto se logró sembrando con hisopo o espátula de Drigalski una suspensión bacteriana previamente crecida en caldo BHI hasta una turbiedad equivalente a la del tubo N° 0,5 de la escala de McFarland. Las placas fueron incubadas en posición invertida a 37°C durante 12-14 horas. Al cabo de este tiempo, la observación de zonas claras en el césped bacteriano, en el lugar donde habían sido colocadas las gotas, era indicativa de la presencia de bacteriófagos líticos o bacteriocinas.

Para distinguir entre estas dos opciones se cortaron con espátula las zonas claras o halos de inhibición del crecimiento bacteriano. Se resuspendieron en 1 ml de solución

fisiológica se agitó vigorosamente mediante vórtex. La suspensión fue filtrada, luego se hicieron diluciones del filtrado y éstas se probaron nuevamente por goteo sobre un césped bacteriano con la misma cepa indicadora. Al diluirse la suspensión sólo los bacteriófagos fueron capaces de formar un número discreto de placas de lisis.

Como alternativa se realizó el método de la doble capa de agar (Lopardo, 1980). Para esto se sembraron 0,3 ml de un cultivo de bacterias pertenecientes a la cepa indicadora en caldo BHI en fase logarítmica tardía de crecimiento junto con 3 ml de agar blando (7,5g de agar/L de solución fisiológica) fundido y enfriado a 45°C. Se utilizó esta cantidad de agar blando de manera de formar una fina capa sobre la superficie del agar Mueller-Hinton.

Antes de volcar la mezcla del cultivo bacteriano y agar blando en la placa de Petri se agregó una alícuota de 0,1 ml de la suspensión de bacteriófagos a ensayar. Se homogeneizó mediante agitador mecánico por 5 segundos y se volcó rápidamente sobre la placa con el medio sólido de manera que cubriera toda la superficie de la misma.

Se dejó solidificar a temperatura ambiente y luego se incubó con las placas invertidas a 37°C durante 18-24 horas.

Como control de crecimiento bacteriano fue utilizada una placa en la cual se volcó únicamente la suspensión de bacterias junto al agar blando fundido.

Titulación de las suspensiones de bacteriófagos

Se tituló la suspensión por el método de las diluciones seriadas y el método de la doble capa de agar (Lopardo, 1980). Este método de titulación consiste en hacer diluciones en agua destilada de la suspensión fagos que se quiere titular.

Las diluciones efectuadas a la suspensión a titular fueron las siguientes:

Suspensión original a titular, dilución de 10^{-2} , dilución de 10^{-4} , dilución de 10^{-6} , dilución

de 10^{-7} , dilución de 10^{-8} y dilución de 10^{-9} .

Una vez preparadas estas diluciones se procedió a titular por el método de la doble capa de agar descrito previamente, utilizando una placa por cada dilución realizada y colocando en cada una de ellas el agar blando, la suspensión bacteriana y la suspensión de bacteriófagos en las siguientes proporciones:

- 3 ml de agar blando fundido
- 0,3 ml de suspensión bacteriana
- 0,1 ml de cada una de las diluciones en cada placa

Además se sembró una placa únicamente con la suspensión bacteriana y el agar fundido como control de desarrollo bacteriano.

Las placas fueron incubadas en posición invertida a 37°C durante 12-14 horas. Al cabo de este tiempo se efectuó el recuento de las placas de lisis. Para realizar el recuento se seleccionaron las placas de Petri que presentaron números de placas de lisis adecuado. El criterio fue tomar aquellas que no presentaran un número de placas demasiado grande que hiciera muy dificultoso su recuento, ni tampoco un número muy pequeño, que introdujera un error estadístico demasiado grande. ($e = 2/(n)^{1/2}$) donde n = número de placas de lisis.

Luego, el número obtenido en el recuento de placas de lisis fue multiplicado por la inversa de la dilución efectuada. Este número correspondió al título de la suspensión original expresado en unidades formadoras de placas por ml (ufp/ml).

Crecimiento de bacteriófagos por lisis en medio líquido.

Se partió de 10ml de un cultivo bacteriano de la cepa indicadora apropiada, en fase logarítmica de crecimiento, en caldo cerebro corazón. Se centrifugó a 2.500 rpm durante 10 minutos (Sorvall RC-2, rotor SS-34), el sobrenadante fue descartado y al

precipitado se le agregó una alícuota (0,1 ml) de una suspensión de fagos de título mayor a 10^6 ufp/ml. Luego se incubó con agitación a 200 rpm durante 1 hora.

Finalmente, se agregó 10 ml de caldo cerebro corazón para completar el volumen inicial. Se continuó la incubación hasta que se observó el aclaramiento del medio de cultivo a simple vista, hecho que indicó la lisis total de las bacterias.

Curva de crecimiento de las cepas indicadoras en presencia y ausencia del bacteriófago

Para realizar la curva de crecimiento de la cepa indicadora en presencia del fago se partió con dos tubos de vidrio con 10 ml de caldo BHI en cada uno. En cada uno de ellos se sembró una única colonia de la bacteria indicadora y se determinó su densidad óptica a 600nm (DO_{600} , tiempo 0). Se incubaron los cultivos a $37^{\circ}C$ y se observaron los cambios en la turbiedad del medio monitoreando la DO_{600} cada 30 minutos a través de un espectrofotómetro. Cuando la DO_{600} de los cultivos alcanzó un valor de 0,2, en uno de los tubos se inocularon 50 μ l de una suspensión de bacteriófagos cuya concentración era de aproximadamente 10^8 ufp/ml. El otro tubo no fue inoculado con fagos. Se continuó con la incubación y se analizó la DO_{600} cada 30 minutos. Los datos se volcaron en una tabla y se graficaron.

Preparación de suspensiones de bacteriófagos a gran escala

Se utilizó el método de infección a alta multiplicidad descrito previamente por otros autores (Sambrook *et al.*, 1989), con las modificaciones necesarias.

Se sembraron 2-3 colonias aisladas de un cultivo de no más de 24 horas de la bacteria apropiada en 5 ml de caldo BHI y se incubó durante 12 horas a $37^{\circ}C$ con agitación (250 rpm).

Luego se inoculó 1 ml de este cultivo en 500 ml de caldo BHI precalentado a $37^{\circ}C$ y se

incubó con agitación (250 rpm) hasta que la densidad óptica del cultivo alcanzara el valor de 0,5 a 600 nm. Esto ocurrió aproximadamente a las 3-4 horas.

En este momento el cultivo fue inoculado con 1 ml de una suspensión de fagos de título mayor a 10^8 ufp/ml. Se continuó con la incubación hasta que se observó el aclaramiento del medio de cultivo. Este aclaramiento ocurrió entre las 2 y 3 horas después de la infección.

Finalmente se agregó 10 ml de cloroformo y se continuó con la incubación durante 10 minutos más, para luego almacenar esta suspensión a 4°C.

Purificación de Bacteriófagos y obtención de títulos mayores

Para purificar los bacteriófagos se partió de una suspensión preparada a gran escala como se describió previamente.

Se tomaron 100 ml de una suspensión lisada de un lote original de 500 ml. Se dejó enfriar la misma a temperatura ambiente. Luego se agregaron DNasaI y RNasaA (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA), cada una de ellas a una concentración de 1 µg/ml y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Se agregó NaCl sólido 1M (5,8 g en 100 ml de suspensión). Se disolvió mediante un agitador magnético y se dejó una hora en hielo. Esta suspensión se transfirió a dos tubos estériles de 50 ml.

Luego se centrifugó a 11.000 rpm (Sorvall RC-2, rotor SS-34) durante 10 minutos a 4°C para extraer los detritos celulares y el sobrenadante se volcó en un frasco estéril de 500 ml. Se agregó polietilenglicol PEG 6000 (Sigma Chemical Co. St Louis, MO, USA) a una concentración final de 10% (10 g /100 ml) y se disolvió mediante un agitador magnético a temperatura ambiente. La suspensión se transfirió a dos tubos de 50 ml y se incubó en baño de hielo durante 1 hora para que se produjera la precipitación de los

bacteriófagos.

Se centrifugó a 11.000 rpm (Sorvall RC-2, rotor SS-34) durante 10 minutos a 4°C para recuperar las partículas de bacteriófagos. Se descartó el sobrenadante y se dejó a los tubos en posición invertida para que la mayor cantidad de suspensión se desprendiera del sedimento. El sedimento se resuspendió suavemente en solución *buffer* SM (1,6 ml / 100 ml de sobrenadante descartado), utilizando una micropipeta de 1.000µl.

Se extrajo el PEG y los detritos celulares de la suspensión de bacteriófagos agregando un volumen igual de cloroformo y agitando mecánicamente por 30 segundos. La fase orgánica se separó de la acuosa mediante centrifugación a 3.000 rpm (Sorvall RC-2, rotor SS-34) durante 15 minutos a 4°C. Finalmente se recuperó la fase acuosa (superior) que es la que contenía las partículas de bacteriófagos. Estos se almacenaron a 4°C.

Se titularon las suspensiones obtenidas por el método de la doble capa de agar.

Conservación de bacteriófagos y cepas bacterianas y ensayos de estabilidad de las suspensiones en función del tiempo

Las suspensiones de bacteriófagos, se mantuvieron en buffer SM luego de su purificación. Estas suspensiones se titularon utilizando el método de la doble capa de agar inmediatamente luego de obtenidas y con una periodicidad de cuatro meses durante 2 años para determinar el efecto del almacenamiento a temperatura ambiente.

Conservación de las suspensiones mediante congelación

Una vez obtenidas las suspensiones fágicas, con el fin de analizar su estabilidad, se almacenaron a -20°C y -80°C . Además, se conservaron a esas temperaturas las suspensiones obtenidas luego de la purificación en buffer SM, a partir del lisado en caldo BHI y también con el agregado de glicerol (10%v/vol). Una vez obtenidas cada una de estas suspensiones se titularon y se almacenaron en tubos de plástico estériles (crioviales) a -20°C y -80°C . Estas suspensiones se descongelaron cada cuatro meses durante dos años para evaluar el efecto del almacenamiento en frío.

Análisis estadístico

Se realizó el análisis estadístico de los resultados obtenidos en el ensayo de estabilidad. Se efectuó un ensayo de análisis de la varianza de un solo factor (*one way* ANOVA) con un nivel de significación de 5% ($p < 0,05$). Cuando se compararon más de dos tratamientos se analizó la varianza para determinar si existían diferencias significativas entre los resultados, se aplicó además el test de Fisher de mínima diferencia significativa (LSD0.05) con un nivel de significación de 5% ($p < 0,05$) para determinar cuáles eran los resultados que diferían significativamente.

Determinación del espectro de infectividad de los bacteriófagos sobre distintas cepas bacterianas

La determinación del espectro de infectividad de los bacteriófagos se realizó mediante el método de la doble capa de agar sobre agar Mueller-Hinton. Se utilizaron suspensiones de bacteriófagos de títulos de entre 10^6 - 10^8 ufp/ml y cultivos en caldo BHI, de las distintas cepas bacterianas mostradas en la tabla 1. Como controles de

crecimiento se emplearon placas sembradas únicamente con la mezcla de suspensión bacteriana y agar blando fundido pero sin el inóculo de bacteriófagos. El procedimiento fue idéntico al descrito previamente.

Luego de la incubación de las placas en posición invertida durante 18-24 h a 37°C se efectuó el recuento de las placas de lisis. En este caso la presencia de placas de lisis implicaba que la cepa bacteriana utilizada como indicadora era hospedadora del bacteriófago ensayado.

En caso de no existir placas de lisis podría suceder que la cepa indicadora no fuera huésped del bacteriófago ensayado o que el mismo fuera capaz de lisogenizarla.

También se determinó el espectro de infectividad de los bacteriófagos mediante el método de goteo sobre una placa de agar Mueller-Hinton sembrada con la cepa bacteriana a ensayar en forma confluyente, como fuera explicado previamente.

Se depositaron las gotas con un ansa calibrada o con una micropipeta, se dejó secar la gota a temperatura ambiente y luego se incubó a 37°C durante 18-24h con la placa de Petri invertida. Luego de la incubación se observó la presencia o ausencia de halos de lisis, lo que nos indicó si la cepa bacteriana era o no hospedadora del bacteriófago ensayado. Este último método tiene la ventaja de ser menos costoso que el anterior.

Extracción del material genético de los bacteriófagos

Para la extracción del material genético se utilizó un protocolo previamente descrito (Sambrook *et al.*, 1989). Este fue modificado ya que el mismo fue desarrollado para la extracción de ADN del bacteriófago lambda λ , un virus lítico sobre cepas de *E. coli*. El protocolo modificado es el siguiente:

Se utilizaron las suspensiones de bacteriófagos purificadas cuyo título fuera mayor de 10^8 ufp/ml. A estas suspensiones se les agregó proteinasa K (Promega) a una

concentración final de 50 µg/ml y dodecilsulfato de sodio (SDS) de una solución *stock* de 10% p/v, a una concentración final de 0,5%. La suspensión se homogeneizó invirtiendo el tubo varias veces y luego se incubó a 56°C durante 1 hora. La mezcla de digestión se dejó enfriar a temperatura ambiente y se agregó un volumen igual de fenol equilibrado con Tris pH: 8. El tubo fue invertido varias veces hasta que se observó la formación de una emulsión. Se separaron las fases mediante centrifugación a 3.500 rpm (Eppendorf, Hamburg, Germany) a temperatura ambiente durante 5 minutos. Luego se transfirió la fase acuosa (superior) a un tubo estéril y se extrajo la misma con igual volumen de fenol equilibrado y cloroformo en proporciones 50:50 mediante centrifugación a 3.500 rpm a temperatura ambiente durante 5 minutos.

Se recuperó la fase acuosa (superior) como se indicó más arriba y se extrajo mediante un volumen igual de cloroformo.

Se centrifugó a 3.500 rpm a temperatura ambiente durante 5 minutos y se recuperó nuevamente la fase superior, la que se transfirió a un tubo estéril.

Se agregó 3 M NaAc (pH: 7) a una concentración final de 0,3 M y se mezcló bien por inversión.

Se agregaron dos volúmenes de etanol, se homogeneizó por inversión y esta suspensión se almacenó a temperatura ambiente durante 30 minutos. El ADN se recuperó mediante centrifugación a 12.000 rpm durante 2 minutos a temperatura ambiente.

El sobrenadante se descartó cuidadosamente por inversión y el ADN precipitado se dejó secar a temperatura ambiente. Finalmente éste se resuspendió en 50 µl de la solución TE (10mM Tris, 1mM EDTA pH: 8 y se almacenó a -20°C.

El ADN extraído se purificó mediante columnas comerciales (Wizard DNA Purification Kit, Promega). Luego se cuantificó mediante espectrofotómetro y se almacenó a -20°C.

Cuantificación del material genético de los bacteriófagos

Se realizaron diluciones de 1:50 del contenido de ADN extraído y mediante un espectrofotómetro UV (Hitachi UV200) se leyó la densidad óptica (DO) a 260 nm y se determinó la pureza del ADN por la relación de las DO a 260nm y a 280nm (260/280).

Para cuantificar el ADN se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{ADN } (\mu\text{g/ml}) = \text{DO} \times 1/50 \times 50$$

Donde DO es la densidad óptica a 260 nm, 1/50 es la dilución efectuada y 50 es la concentración en $\mu\text{g/ml}$ equivalente a 1 DO de ADN de doble cadena.

Microscopía electrónica

Se obtuvieron microfotografías electrónicas de los bacteriófagos aislados. Se partió de suspensiones purificadas según el protocolo previamente descrito en este trabajo y cuyos títulos eran superiores a 10^8 ufp/ml.

Resumiendo, una gota de la suspensión purificada se depositó sobre grillas (*grids Formvard*) cubiertas de cobre.

Se utilizó la técnica de tinción negativa con acetato de uranilo al 3% como colorante de contraste. Las microfotografías fueron tomadas con un microscopio electrónico de transmisión (Zeiss EM-109 T) a una aceleración de 80 kV sobre placas fotográficas (Agfa Scientific Film). Luego fueron reveladas y ampliadas sobre papel fotográfico. El aumento obtenido utilizando esta técnica fue de 100.000 X.

Extracción de ADN bacteriano

Las bacterias fueron cultivadas en 5 ml de caldo LB con agitación de 200 rpm durante toda una noche. Se centrifugaron a 6.000 rpm a temperatura ambiente durante 5 minutos y se descartaron los sobrenadantes por inversión. El sedimento se resuspendió en 500 µl de la solución SSC 0,1X y se homogeneizó mediante agitación mecánica. Luego los tubos se centrifugaron a 6.000 rpm a temperatura ambiente durante 5 minutos y se descartaron los sobrenadantes.

Los sedimentos del paso anterior se resuspendieron en 500 µl de una solución *buffer* de lisis recién preparada que contenía:

- 10mM de Tris-HCl pH: 8,0
- 20% de sacarosa
- 5 mg/ml de lisozima
- 30 unidades de lisostafina

Se incubó en esta solución *buffer* durante 45 minutos a 37°C. Al cabo de este tiempo se agregó un volumen de una mezcla fenol: cloroformo–alcohol isoamílico, se mezcló por inversión cinco o seis veces y se centrifugó a temperatura ambiente a 14.000 rpm. Se repitió el paso de extracción una vez más.

Se precipitó con 0,1 volúmenes de 3 M NaAc pH: 8,0 y 2 volúmenes de etanol al 100%. Se homogeneizó por inversión y se centrifugó a 14000 rpm a temperatura ambiente durante 15 minutos.

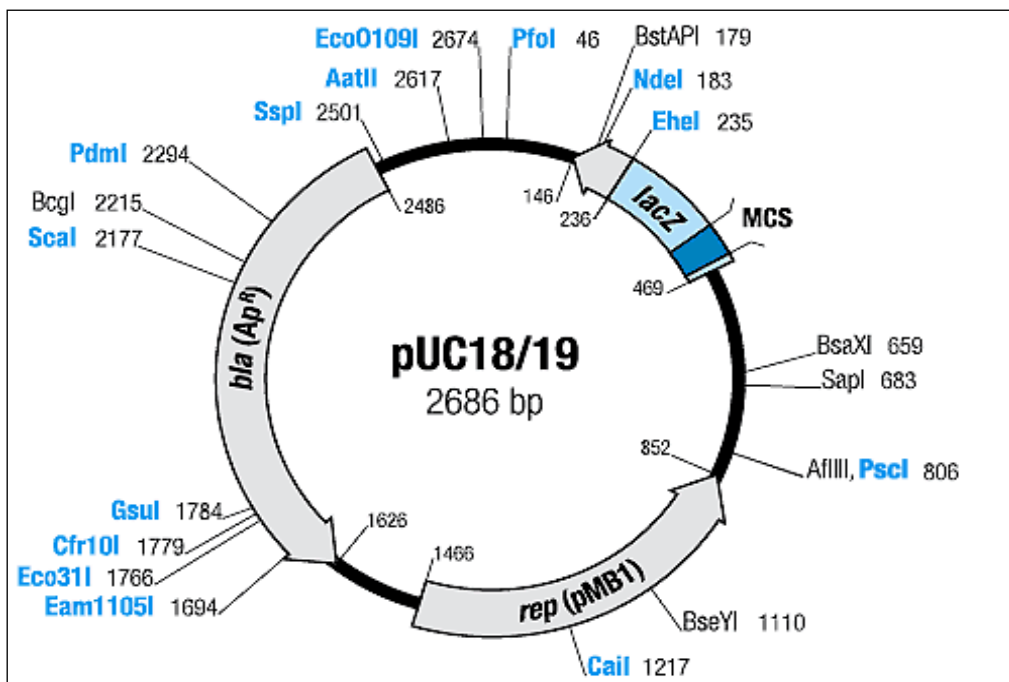
El ADN se resuspendió en solución *buffer* TE (10 mM Tris-HCl pH: 8, 1mM EDTA).

El mismo se cuantificó mediante espectrofotómetro y se almacenó a –20°C.

Clonado y secuenciación

Vector y huésped de clonado

En los ensayos de clonado se utilizó la cepa de *E. coli* DH5 α con genotipo [F'/endA1 hsdR17 (rk- mk+) glnV44 thi-1 recA1 gyr A] (Invitrogen, Life Technologies) como célula hospedadora aceptora de los plásmidos recombinantes.. Como vector de clonación se utilizó el plásmido pUC19 (Sigma Chemical Co. St Louis, MO, USA), que se muestra en la figura 7.



(Tomado de <http://www.fermentas.com/techinfo/nucleicacids/mappuc1819.htm>)

Figura 7. Mapa de restricción del plásmido pUC19.

El pUC19 es un plásmido artificialmente construido, de *E. coli*, de 2686pb, de alto número de copias. Posee el gen *bla* que codifica para una β -lactamasa que confiere resistencia a ampicilina. Además presenta el extremo 5' del gen *lacZ* que codifica al fragmento N-terminal de la β -galactosidasa del operón *lac* de *E. coli*. Este fragmento cuya síntesis puede ser inducida mediante isopropiltio- β -D-galactósido (IPTG), puede llevar a cabo una complementación intraalélica (α -complementación) con una forma defectiva de la enzima expresada por un huésped apropiado que lleve en su genoma la

mutación *lacZDM15*, (p. ej. la cepa *E. coli* DH5 α). En presencia de IPTG la bacteria con el plásmido incorporado sintetiza ambos fragmentos de la enzima, ésta es funcional y forma colonias azules en medio apropiado con el sustrato cromogénico 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactosido (X-Gal). La inserción de ADN en el sitio de múltiple clonado (MCS), localizado dentro del gen *lacZ* inactiva la expresión del fragmento N-terminal de la β -galactosidasa y con esto no se produce la enzima funcional. Debido a esto las bacterias que lleven estos plásmidos recombinantes no producirán colonias azules sino blancas, lo que permite la selección.

Se prepararon bibliotecas genómicas utilizando la técnica conocida como “*shotgun*” digiriendo el ADN del fago y del vector con la enzima *HindIII*, ya que ésta presenta una actividad óptima sobre ambos tipos de ADN.

Digestión del vector y del ADN blanco.

Los ADN virales y plasmídicos fueron digeridos con las siguientes enzimas de restricción de acuerdo con las instrucciones del proveedor:

HindIII, *SmaI*, *XbaI*, *KpnI*, *EcoRI* (New England Biolabs).

Las condiciones de restricción fueron las siguientes:

Restricción del plásmido pUC19 (430ng/ μ l)

ADN pUC19 (430ng/ μ l)	5 μ l
<i>Buffer</i> 2 (NEB)	3 μ l
H ₂ O	30 μ l
<i>HindIII</i> (NEB)	2 μ l
Volumen final	40 μ l

Tiempo de restricción: 4 horas

Temperatura de restricción: 37°C

Una vez terminada la incubación de la solución de restricción del vector, en primer lugar se inactivó la enzima mediante incubación a 80°C durante 20 minutos. Luego se agregó 1µl de fosfatasa alcalina de intestino de ternero (CIP) (New England Biolabs) y se incubó durante 1 hora a 37°C para desfosforilar los extremos 5' del plásmido y evitar la recircularización o la ligación en tandem de dos o más plásmidos durante el procedimiento de ligación.

Al cabo de este tiempo se purificó la solución mediante la siembra de la misma en un gel de agarosa al 1% y se corrió a 80V hasta que el frente de corrida hubiera avanzado 2/3 del gel. Se visualizó la banda de interés en fotodocumentador y se procedió a cortar con espátula la zona de dicha banda. Se eluyó del gel de agarosa el ADN plásmidico restringido y desfosforilado mediante una columna de purificación (Wizard DNA Purification Kit, Promega). Se almacenó hasta su uso a -20°C.

Restricción del ADN del bacteriófago ΦBE2

ADN ΦBE2 (900ng/µl)	5µl
<i>Buffer</i> 2(NEB)	3µl
H ₂ O	40µl
<i>Hind</i> III (NEB)	2µl
Volumen final	50µl

Tiempo de restricción: 4 horas

Temperatura de restricción: 37°C.

Todas las digestiones se realizaron a 37°C durante 4 horas. Las mismas se detuvieron por calentamiento a 80°C durante 20 minutos. Los fragmentos de restricción obtenidos fueron resueltos en geles de agarosa 0,8% en TBE 1X (0,09M Tris base, 0,09M ácido bórico, 0,02M EDTA) con el colorante intercalante Bret incorporado a una concentración de 1µl/ml. Se utilizó como marcador de peso molecular 1Kb *ladder plus* (Invitrogen, Life Technologies). Las condiciones de corrida fueron de 80 V hasta que el frente de corrida del azul de bromofenol alcanzara los 2/3 del gel.

La visualización del gel se realizó con fotodocumentador UV (Hitachi) y se tomaron fotografías para ser analizadas.

Además se cuantificó tanto el ADN plasmídico como el fragmento a clonar por medio de electroforesis en gel de agarosa comparando con el marcador de peso molecular *Low DNA Mass ladder* (Gibco, BRL, Life Technologies Inc, Gaithersburg, Mo).

Ligación

Se transfirieron 100 ng del vector y 200ng del ADN a insertar en un tubo de 0,5 ml y se agregó agua hasta completar un volumen de 10 µl. Luego a esta mezcla se le agragaron 2µl de *buffer* (New England Biolabs) de la ligasa del bacteriófago T4 y 2µl de dicha enzima (New England Biolabs). Se llevó la suspensión de ligación hasta un volumen final de 20 µl con agua bidestilada esteril. Seguidamente esta suspensión de ligación se incubó a 16°C durante 12 horas en Termociclador (Eppendorf Mastercycler, Hamburg Germany).

Preparación de las células competentes.

La preparación de las células competentes se realizó mediante un protocolo descrito por Sambrook *et al* en 1989.

Una colonia aislada de la cepa DH5α de *E. coli* tomada a partir de una placa con medio

CLDE cuyo crecimiento no fuera superior a 24 horas se transfirió a un frasco de vidrio que contenía 100ml de caldo Luria-Bertani (LB). Este cultivo se incubó durante aproximadamente tres horas a 37°C en agitador mecánico, a 200rpm. Se monitoreó la densidad óptica DO_{600} del mismo cada 30 minutos mediante espectrofotómetro de manera que éste no sobrepasara la concentración de 10^8 células/ml. Luego se transfirió asepticamente el cultivo a dos tubos de polipropileno de 50 ml (Falcon 2070) que se mantuvieron los mismos en hielo durante 10 minutos. Las células del cultivo se precipitaron mediante centrifugación a 4.000 rpm a 4°C durante 10 minutos en un rotor Sorvall S-34. Se decantó el medio mediante inversión y los tubos se dejaron en posición invertida hasta que hubiera drenado todo el líquido remanente. A continuación el sedimento fue resuspendido en 10ml de una solución de $CaCl_2$ 0,1 M previamente enfriada a 0°C y se almacenó en hielo durante 15 minutos. Las células se recuperaron mediante centrifugación nuevamente a 4.000 rpm a 4°C durante 10 minutos en un rotor Sorvall S-34. Se decantó el medio mediante inversión y los tubos se dejaron en posición invertida hasta que hubieran drenado todo el líquido remanente. A continuación cada sedimento se resuspendió con 2ml de una solución fría de $CaCl_2$ 0,1 M y se los almacenó en alícuotas de 0,5 ml a -80°C hasta su uso.

Transformación.

Los plásmidos recombinantes se introdujeron (transformaron) en las células competentes (*E. coli* DH5 α). Brevemente, se transfirieron 200 μ l de células competentes a un tubo estéril de 1,5 ml y se les agregó 100 μ l de una solución consistente de 20 μ l de la solución de ligación más 80 μ l de tampón de transformación. El tubo se agitó suavemente en forma manual y se incubó en hielo durante 30 minutos para que el ADN se adhiriera a la pared celular. Como control se transformaron células

competentes con ADN del plásmido intacto, de concentración conocida (control positivo de transformación) y además paralelamente se transformaron células sin ningún ADN (control negativo de transformación). Paso seguido, se transfirieron rápidamente los tubos a un baño precalentado a 42°C y se los dejó en el mismo exactamente 3 minutos para que el ADN penetrara en las células. Luego se dejaron los tubos a temperatura ambiente durante dos minutos y pasado este tiempo se les agregó 1ml de LB. Esta solución se incubó durante una hora a 37°C con agitación de 100 rpm para que las células se recuperaran.

Selección de clones recombinantes

Una vez transcurrida la incubación de 60 minutos se transfirieron 50µl del cultivo a una placa de Petri con medio LB que contenía ampicilina a una concentración de 100µg/ml, el sustrato cromogénico X-gal y el inductor gratuito IPTG. Se sembró sobre la superficie del agar mediante espátula de Drigalski esterilizada mediante flameado, y dejó secar a temperatura ambiente. Luego se incubaron las placas en posición invertida durante 24 horas a 37°C. Al cabo de este tiempo se colocaron las placas a 4°C para consolidar la diferencia en coloración entre las colonias blancas que incorporaron al plásmido recombinante y las azules que incorporaron el plásmido religado. (Sambrook *et al.*, 1989).

Extracción de ADN plasmídico

Para la extracción de los plásmidos recombinantes se siguió el protocolo de lisis alcalina (Birnboim y Doly, 1979) con modificaciones (Sambrook *et al.*, 1989). Cada una de las colonias blancas seleccionadas, se inocularon en un tubo de vidrio que contenía 5 ml de caldo LB con ampicilina a una concentración de 50µg/ml y se incubaron durante 12

horas a 37°C con agitación (200 rpm). Se transfirió un volumen de 1,5 ml de este cultivo a un tubo de microcentrífuga estéril y se centrifugó a 12.000 g durante 5 minutos a 4°C. El sobrenadante fue cuidadosamente y completamente descartado mediante inversión. El sedimento fue resuspendido en 100 µl de solución I previamente enfriada en hielo (D-glucosa 50 mM, Tris-ClH 25 mM pH: 8, EDTA 10mM pH: 8). Se agitó mediante vórtex asegurándose de que el sedimento quedara completamente disuelto en la solución. La resuspensión fue almacenada en hielo durante treinta minutos. Luego se agregaron 200µl de solución II (0,2 N Na (OH), SDS al 1%), se agitó suavemente invirtiendo los tubos y se conservó en hielo durante 5 minutos. Al cabo de este tiempo fueron agregados 150µl de solución III (5M KAc, ácido acético glacial 11,5%), se invirtieron los tubos 5 ó 6 veces para dispersar la solución y se almacenó en hielo durante 5 minutos. La solución se centrifugó a 12.000 g durante 5 minutos a 4°C y el sobrenadante fue transferido a un tubo estéril. Se realizó la extracción del mismo mediante el agregado de igual volumen de fenol-cloroformo para luego centrifugar y pasar la fase acuosa a otro tubo estéril. Finalmente se precipitó el ADN plasmídico mediante el agregado de 2 volúmenes de etanol absoluto. La solución se agitó mediante un agitador mecánico o vórtex y se centrifugó a 12.000 g durante 5 minutos a 4°C. El sobrenadante se descartó cuidadosamente por inversión de los tubos, el sedimento se lavó con 1ml de etanol 70% y se centrifugó nuevamente. Se descartó cuidadosamente el sobrenadante invirtiendo los tubos y se dejó a los mismos en esa posición durante 10 minutos hasta que hubiera drenado completamente el etanol. El sedimento se suspendió en 50 µl de la solución TE que contenía RNAasaA a una concentración de 20µg/ml y se almacenó a – 20°C hasta su uso.

Análisis de los perfiles plasmídicos

Se analizaron los plásmidos extraídos mediante el método detallado arriba a través de una corrida electroforética en gel de agarosa al 0,8% con el colorante intercalante Bret incorporado al gel a una concentración de 1 µl/ml y utilizando el *DNA supercoiled* (Gibco, BRL, Life Technologies Inc, Gaithersburg, Mo) como marcador de peso molecular. Además se corrió al plásmido nativo sin ningún inserto. La corrida electroforética se realizó a 80 V hasta que el frente de corrida avanzó 2/3 del gel. Se tomaron fotografías mediante un fotodocumentador UV.

Los plásmidos analizados y que presentaban ADN insertado fueron purificados para ser secuenciados. Partiendo del clon original previamente almacenado, se utilizaron columnas de purificación comerciales siguiendo las instrucciones del fabricante (Tip 100, Qiagen Inc, Studio City, CA). Finalmente se cuantificaron en gel de agarosa al 0,8% comparando con el marcador *DNA Low Mass ladder* y almacenados a -20°C.

Secuenciación

La secuenciación de los plásmidos recombinantes y de los productos obtenidos mediante PCR se llevó a cabo utilizando la metodología de Sanger (Sanger *et al.*, 1975), mediante el sistema de terminadores *BigDye*. Se empleó un secuenciador automático de ADN (ABI Prism 3100 DNA sequencer, Applied Biosystems/Perkin-Elmer, Foster City, California, USA). Se utilizaron los cebadores universales M13/pUC *Forward* y M13/pUC *Reverse* (Invitrogen) para la secuenciación de cada uno de los clones. Además se diseñaron cebadores internos para los plásmidos recombinantes que presentaban fragmentos insertados muy grandes y que no pudieron secuenciarse completamente utilizando los cebadores universales (Tabla 2). El diseño de tales *primers* se realizó empleando el programa OLIGO v6.0 (Molecular Biology Insights, Inc).

Análisis de secuencias

Todas las secuencias obtenidas fueron editadas manualmente y analizadas utilizando los programas GCG (Genetic computer Group), BLAST (Altschul *et al.*, 1997), Sequencher 4.5 (Gene Codes Corp, Ann Arbor, MI) y Clustal W (Thompson *et al.*, 1994), BIOEDIT Sequence Alignment Editor v.5.0.9 (Hall, 1999).

Subclonado

Para los ensayos de clonado de fragmentos específicos con fines de expresión se utilizó el sistema de clonado pMal (New England Biolabs). Este plásmido permite purificar el producto génico mediante un sistema de polihistidina.

Análisis taxonómicos y filogenéticos a partir de las secuencias obtenidas

Las secuencias nucleotídicas y aminoácidas se analizaron y compararon con las bases de datos para determinar la clasificación de los bacteriófagos. Para la construcción de árboles filogenéticos se utilizó el programa Mega versión 5.1.

Predicción *in silico* de estructuras proteicas secundarias

La predicción de la estructura secundaria de la endolisina se realizó mediante el servidor PSIPRED versión 3.0 (Bryson *et al.*, 2005) (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>). Para este análisis se utilizó la secuencia de 280 aminoácidos y se ingresó al servidor en formato FASTA. Se identificaron los posibles dominios proteicos y las regiones transmembrana.

Predicción *in silico* de estructuras proteicas terciarias

Se predijeron las posibles estructuras tridimensionales de la endolisina del bacteriófago Φ BE2 (número de acceso en GenBank JN898963) utilizando el servidor SWISS-MODEL Workspace (Arnold K, *et al* 2006).

Ensayos de adherencia de enterococos en modelo *in vitro*

La capacidad de diferentes cepas de enterococos de unirse a células eucariotas fue estudiada en cultivos de células Vero en monocapa mediante microscopia óptica. Se hicieron cultivos en caldo BHI de cada cepa bacteriana a estudiar, los mismos se centrifugaron y el precipitado se resuspendió en *buffer* PBS y se agregaron a los pocillos del cultivo celular (0,5ml/pocillo). Las placas fueron agitadas suavemente e incubadas a 37°C en atmósfera de 10% de CO₂, luego las células fueron lavadas tres veces con PBS y fijadas con etanol durante cinco minutos, lavadas nuevamente con PBS y coloreadas con una modificación de la técnica de Gram. (decoloración con etanol) y observadas al microscopio.

Modelo animal

Para los ensayos de descolonización en modelo murino, se trabajó con ratones hembras de la cepa C57 de 42 días de vida. Se identificaron las cepas de enterococos colonizantes naturales de los ratones y se determinó su sensibilidad respecto de los bacteriófagos a ensayar. Los animales fueron desafiados con los bacteriófagos mediante la inoculación de los mismos en el agua de beber a títulos conocidos. El diseño de los experimentos incluyó un grupo control de animales al cual no se le administraron los

fagos. Los ratones se sacrificaron utilizando una campana de dióxido de carbono. Se realizó la disección de los animales y se extrajo el tracto gastrointestinal. Este fue dividido en porciones proximal, media y terminal. Los lavados de la luz intestinal se realizaron utilizando 2 mililitros de buffer PBS.

Se realizó el recuento de enterococos mediante siembra en superficie en agar bilis esculina azida. El recuento de fagos se realizó utilizando el método de la doble capa de agar previamente descrito. El recuento se realizó con cada uno de los animales a partir de la materia fecal expulsada. Para estandarizar el recuento se trabajó con un gramo de materia fecal, la cual fue macerada en forma estéril en solución fisiológica.

Análisis estadísticos

Los resultados de recuentos de los grupos de ratones tratados y controles fueron analizados utilizando el *test* de Mann-Whitney para datos no paramétricos. Los valores de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos. Para los análisis estadísticos y gráficos se utilizó el programa GraphPad Prism (version 5.04).

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

CAPÍTULO 1

Aislamiento, purificación y conservación de bacteriófagos de *Enterococcus* spp.

Objetivos específicos.

- Aislar fagos líticos sobre cepas de enterococos a partir de diferentes muestras biológicas.
- Purificar los bacteriófagos aislados, titular las suspensiones que los contuvieran y determinar su espectro de infectividad sobre diferentes cepas bacterianas.
- Determinar el procedimiento más efectivo para la conservación de los bacteriófagos a largo plazo.

Caracterización de los aislamientos de *Enterococcus* spp.

Pruebas de sensibilidad antibiótica y confirmación de identidad mediante pruebas bioquímicas

La población bacteriana estudiada (n=62) pertenecía a aislamientos provenientes de varios centros de salud y también incluía cepas de referencia (Tabla 1). Los resultados de sensibilidad a vancomicina se muestran en la Tabla 3. Estos se obtuvieron por pruebas de difusión, *Etest* y/o macrodilución en medio líquido. La mayor parte de la población estudiada fue seleccionada por presentar resistencia a la vancomicina. El fenotipo predominante fue el denominado VanA, el más frecuente en la Argentina. Este fenotipo se caracteriza por su resistencia a altos niveles de vancomicina, y su resistencia a teicoplanina. Por otro lado, las pruebas bioquímicas realizadas permitieron confirmar la identidad de las cepas almacenadas a -80°C, en algunos casos durante largo tiempo.

Identificación a nivel de género y especie

Como todo coco gram-positivo catalasa-negativo alfa o gamma-hemolítico fue identificado a nivel de género con las siguientes pruebas convencionales: bilis esculina, tolerancia a 6,5% de NaCl, pirrolidonilarilmadasa, leucinaminopeptidasa, sensibilidad a vancomicina, observación de cadenas, tétradas o racimos en caldo tioglicolato y en el caso de los alfa-hemolíticos, optoquina y solubilidad en bilis.

Los enterococos dieron positivas las cuatro primeras pruebas, presentaron o no resistencia adquirida a vancomicina, se disponían en cadenas cortas y dieron negativas las pruebas de optoquina y solubilidad en bilis. Estas dos últimas prácticamente no se realizaron por la gran diferencia que existe habitualmente entre la morfología de las colonias de los enterococos y de los neumococos.

Las especies se definieron con las siguientes pruebas: arginina dihidrolasa, manitol, arabinosa, sorbosa, sorbitol, rafinosa, sacarosa, piruvato, telurito, alfa-metil-D-glucopiranosido, movilidad y pigmento.

Todas las cepas correspondieron con su descripción original. (Texeira *et al.*, 2007).

Identificación de los genes de resistencia a vancomicina.

La detección de los genes *vanA* y *vanB* que otorgan resistencia a los glucopéptidos (vancomicina y teicoplanina) se realizó mediante PCR múltiple como se explicó en la sección “Materiales y Métodos”.

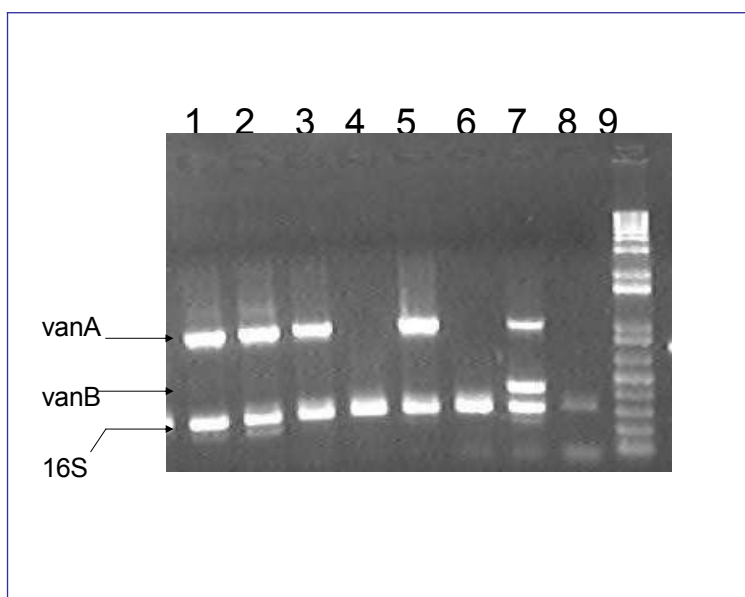


Figura 8. Gel de agarosa que muestra la amplificación mediante PCR múltiple utilizando cebadores para detectar los genes *vanA*, *vanB* y ADNr *16S*. Calle 1: EN 470 (*vanA*). Calle 2: EN 475 (*vanA*). Calle 3. EN 370 (*vanA*). Calle 4: EN 307. Calle 5: EN 371 (*vanA*). Calle 6: TN 917. Calle 7: EN 470 (*vanA*) y EFCB (*vanB*) en la misma reacción. Calle 8: ATCC 29212 *E. faecalis* (sensible a vancomicina). Calle 9: marcador de peso molecular (1Kb ladder, invitrogen).

Los tamaños esperados de los fragmentos amplificados utilizando los cebadores indicados en la Tabla 3, eran de 1000pb para el gen *vanA*, 300 pb para el gen *vanB* y

280 pb para el ADN que codifica para el ADNr 16S, que es utilizado como control positivo de extracción (Figura 8). Los resultados se muestran en la Tabla 5.

CEPA	Especie	Sensibilidad a vancomicina	Genotipo
EN364, EN370, EN371 EN375, EN379, EN380, EN382 EN444, EN448, EN451, EN455 EN460, EN462, EN464, EN465 EN466, EN468, EN471, EN472 EN474 E968, E1130, TN918, E693, E104 E4, E5, E6, E7, E8, E9, E10, E11	<i>Enterococcus faecium</i>	Resistente	<i>vanA</i>
EFCb			<i>vanB</i>

Tabla 5. Perfiles de sensibilidad y genotipo de cepas utilizadas en este trabajo.

Aislamiento de bacteriófagos a partir de muestras fecales

Aislamiento del bacteriófago Φ BE1

Utilizando la metodología de goteo de las suspensiones filtradas se aisló en primer lugar un bacteriófago al que se denominó Φ BE1. Las cepas bacterianas utilizadas como huéspedes se muestran en la Tabla 3. La placa de lisis (Figura 9) formada en el césped bacteriano fue indicativa de la actividad antibacteriana de bacteriófagos líticos, antibióticos o de bacteriocinas.



Figura 9. Fotografía de la placa de lisis producto de la infección del bacteriófago Φ BE1. Se observan placas de lisis sobre un césped bacteriano sembrado con la cepa indicadora de *E. faecalis* EN307.

El método de la doble capa de agar permitió determinar la naturaleza del agente productor de las placas de lisis (Figura 10). En esta figura se puede apreciar la presencia de múltiples placas todas con el mismo tamaño y morfología. Este hecho demostró la presencia de bacteriófagos líticos y descartó que se tratara de alguna bacteriocina o antibiótico, en cuyo caso no habiéramos visto un número discreto de placas de lisis nítidas, sino un patrón de lisis difuso. Los bacteriófagos lisogénicos, por otra parte, producen placas opacas o con un desarrollo bacteriano central en forma de ojo de buey (Lopardo, 1980).



Figura 10. Fotografía de las placas de lisis producidas sobre la cepa EN307 por el bacteriófago Φ BE1. Se observan placas de lisis homogéneas sobre la cepa indicadora EN307 de *E. faecalis* utilizando el método de la doble capa de agar.

Aislamiento del bacteriófago Φ BE2

Utilizando los mismos métodos de búsqueda de bacteriófagos, y las mismas cepas de referencia o indicadoras (EN307, EN470, EN475), se logró aislar un segundo bacteriófago al que se denominó Φ BE2. Este fago producía placas de lisis sobre dos de las tres cepas indicadoras utilizadas en la búsqueda o tamizaje (EN470 y EN475), aunque no resultó lítico sobre la cepa EN307 de *E. faecalis*. Para tener la seguridad de que se trataba de un virus y no de bacteriocinas o antibióticos del mismo modo que para Φ BE1, se realizó la técnica de la doble capa de agar. Los resultados fueron los esperados, es decir compatibles con la presencia de un bacteriófago (Figura 11).

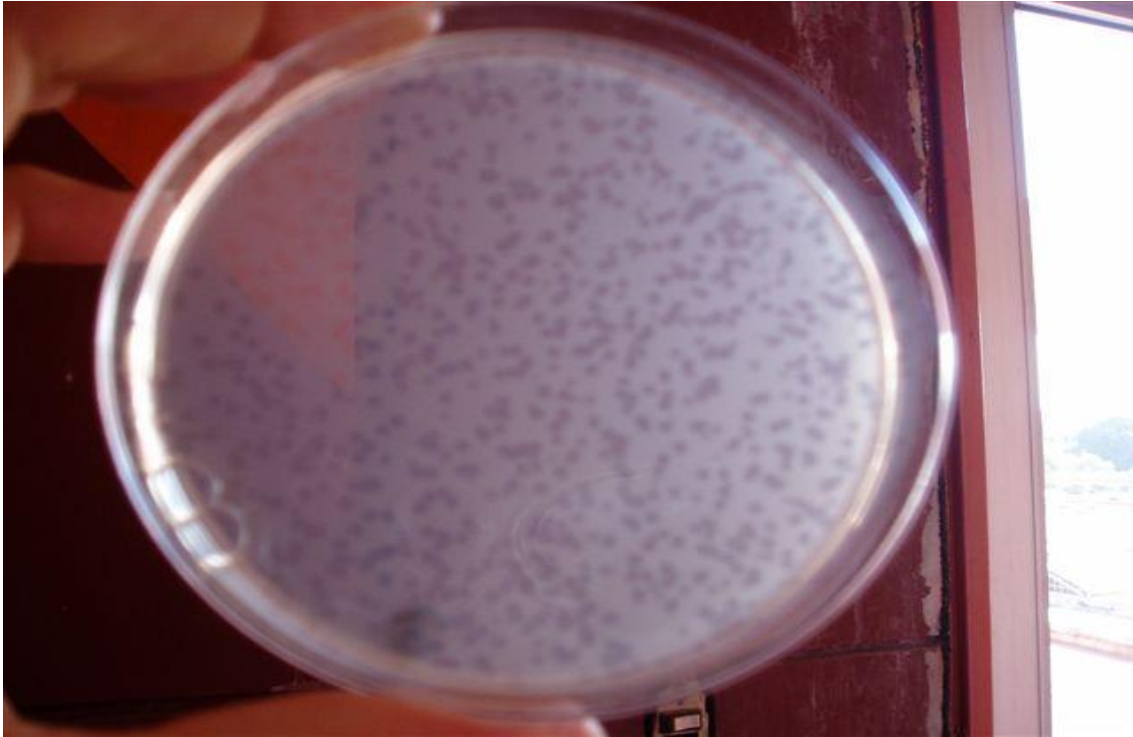


Figura 11. Fotografía de la placa de lisis producto de la infección del bacteriófago Φ BE2. Se observan placas de lisis empleando el método de la doble capa de agar sembrado con la cepa indicadora de *E. faecium* EN470 resistente a vancomicina.

Aislamiento de los bacteriófagos Φ BE3, Φ BE4 y Φ BE5

Utilizando la misma metodología se aislaron otros tres bacteriófagos, los que fueron denominados Φ BE3, Φ BE4 y Φ BE5 respectivamente.

Titulación de las suspensiones

La titulación se realizó según la metodología previamente explicada. Se hicieron diluciones de las suspensiones originales y se sembró utilizando la cepa bacteriana apropiada para cada bacteriófago. Para obtener la concentración de cada suspensión se contaron las placas de lisis y se multiplicó este valor por la inversa de la dilución efectuada. La fórmula utilizada es la siguiente:

$$\text{Concentración de bacteriófagos (ufp/ml)} = \text{N}^\circ \text{ de placas} \times 1/\text{dilución efectuada.}$$

La concentración de la suspensión original a partir de la cual se aisló Φ BE1 fue de 6×10^3 ufp/ml y la concentración de la suspensión a partir de la que se aisló Φ BE2 fue de $1,6 \times 10^3$ ufp/ml.

Purificación de los bacteriófagos

Se efectuó el crecimiento de los bacteriófagos por lisis en medio líquido para obtener volúmenes mayores para proceder a la purificación. Éste se realizó utilizando la técnica descrita en la sección “Materiales y Métodos”. Se almacenaron alícuotas de estas suspensiones a -80°C, -20°C, 4°C y a temperatura ambiente. Estas suspensiones fueron tituladas mensualmente para comprobar el mantenimiento de la capacidad infectiva de los virus almacenados a distintas temperaturas. Se observó que las suspensiones almacenadas a temperatura ambiente sufrían contaminación bacteriana y fúngica lo que hacía imposible su titulación. Las demás suspensiones mantuvieron tanto su capacidad infectiva como su concentración inicial al cabo de 8 meses.

Conservación de los bacteriófagos

Es común cuando se trabaja con bacteriófagos en suspensión, mantener las mismas a temperatura ambiente o en refrigeración a 4°C. Este sistema de almacenamiento tiene como ventaja la facilidad de la manipulación de las suspensiones, siempre y cuando se trabaje en condiciones asépticas de manera que se evite contaminaciones mantienen el título de las suspensiones a corto plazo (Hyman P *et al*, 2009; Hazem A *et al*, 2002).

Es necesario conocer sin embargo la estabilidad de las suspensiones a largo plazo para establecer un procedimiento de almacenamiento adecuado que minimice la disminución de la concentración de las suspensiones.

Dos de los posibles sistemas de almacenamiento a largo plazo son la liofilización y el congelamiento.

La liofilización es un proceso que consiste esencialmente de dos pasos: en primer lugar se somete a la muestra a congelación y posteriormente se procede a la deshidratación de la muestra mediante vacío. Es en este proceso cuando es posible la desnaturalización proteica de las partículas virales.

El congelamiento es proceso más sencillo y es el que elegimos para evaluar estabilidad de las suspensiones.

En este trabajo se evaluó la estabilidad de las suspensiones fágicas a temperatura ambiente, en refrigeración a 4°C, y en congelamiento a -20° y -80°C.

En la Figura 12 se muestra el análisis de la variación en el tiempo de la concentración del lisado/filtrado en caldo BHI del bacteriófago Φ BE2 comparado con la suspensión en *buffer* SM, ambas conservadas a temperatura ambiente. Se observó una caída en la concentración en ambos medios de almacenamiento a medida que transcurría el tiempo. Las muestras se titularon mensualmente durante un periodo un año.

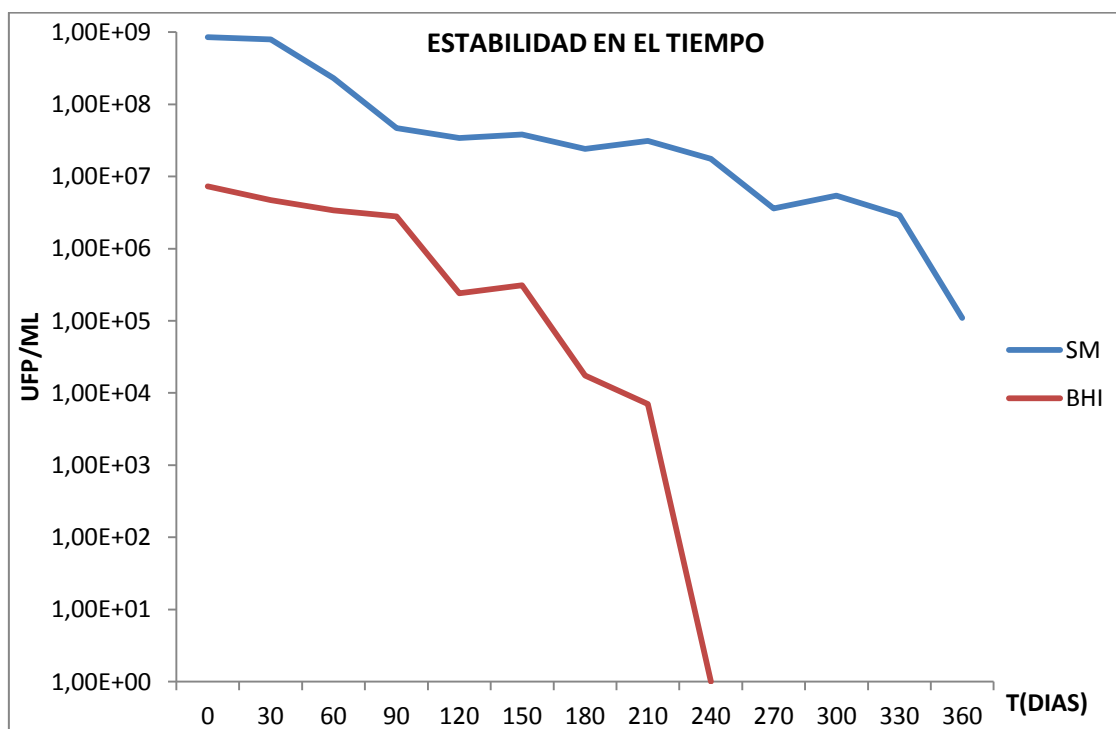


Figura 12. Variación del título del fago Φ BE2 en función del tiempo a temperatura ambiente. Análisis de la variación en el tiempo de la concentración del lisado/filtrado del bacteriófago Φ BE2 en caldo cerebro corazón (BHI) comparado con la suspensión en *buffer* SM, ambas conservadas a temperatura ambiente. Se observó una caída en la concentración en unidades formadoras de placas por mililitro (ufp/ml) en ambos medios de almacenamiento a medida que transcurría el tiempo.

Se observó que la suspensión lisada y filtrada, línea roja presentaba un descenso pronunciado a partir del primer mes. A partir del séptimo mes ya no se detectaron placas de lisis en esta suspensión debido posiblemente a la contaminación del caldo de almacenamiento. La suspensión almacenada en buffer SM (línea azul) también presentó un descenso del título pero menos pronunciado. Igualmente al cabo de un año presentó un descenso de 3 log respecto del título original.

Estos resultados demuestran que resulta riesgoso el almacenamiento de las suspensiones de fagos a temperatura ambiente, independientemente del título inicial o del medio de almacenamiento. Además resulta necesario determinar un sistema de almacenamiento que asegure la estabilidad de las suspensiones a largo plazo y minimice el riesgo de pérdida del stock como ocurrió con el lisado mantenido a temperatura ambiente.

Los sistemas evaluados para el almacenamiento a largo plazo fueron tres: suspensiones lisadas en caldo BHI y filtradas en filtros de acetato de celulosa de 0.45μ con el agregado de glicerol como crioprotector a una concentración de 10%v/v; suspensiones purificadas en buffer SM y suspensiones en buffer SM utilizando como agente crioprotector sacarosa a una concentración final de 0.5M.

Las temperaturas evaluadas fueron 4°C , -20°C y -80°C y las titulaciones se hicieron en forma mensual durante un año y cada tres meses en el siguiente año (ver Figura 13).

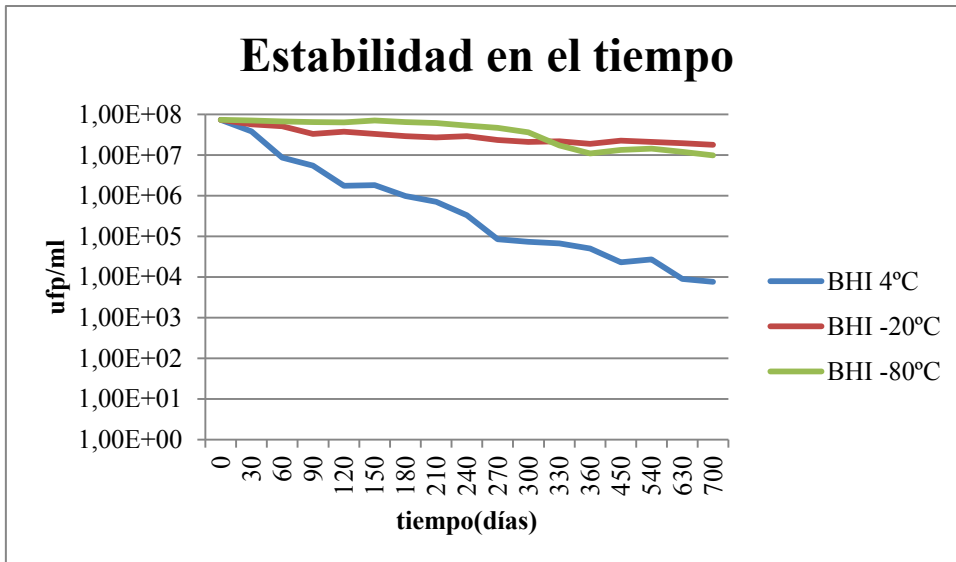


Figura 13. Variación del título del lisado del fago ΦBE2 en caldo BHI+glicerol 10% a 4°C, a -20°C y a -80°C. Los resultados del ensayo de conservación del lisado en caldo BHI demostraron que si bien estas suspensiones podían mantenerse refrigeradas a 4°C a largo plazo, el título descendía en forma constante y al cabo de 2 años de almacenamiento sufrirían una disminución de aproximadamente 4 log respecto del título original. Las suspensiones congeladas a -20 sin embargo presentaron un descenso menor del título. Si bien se produjo una caída inicial de la concentración ésta se estabilizó y al cabo de dos años descendió 0,6 log en su concentración. El lisado congelado a -80°C presentó un comportamiento similar al congelado a -20°C y al final del ensayo sufrió una caída de concentración en el orden de 0,7 log.

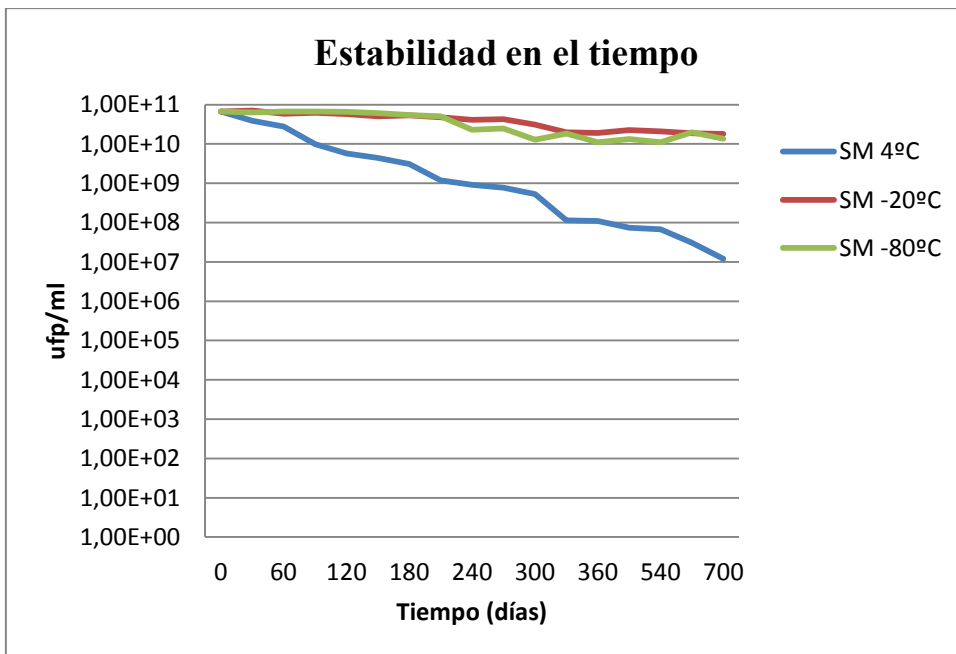


Figura 14. Variación del título de la suspensión del fago ΦBE2 en buffer SM a 4°C, a -20°C y a -80°C. Los resultados del ensayo de conservación del lisado en buffer SM demostraron que si bien estas suspensiones podían mantenerse refrigeradas a 4°C a largo plazo, el título descendía en forma constante y al cabo de 2 años de almacenamiento sufrirían una disminución de aproximadamente 3 log del título original. La suspensión congelada a -20 sin embargo presentó un descenso menor del título. Si bien se produjo una caída inicial de la concentración, ésta se estabilizó y al cabo de dos años descendió 0,6 log. El lisado congelado a -80°C presentó un comportamiento similar al congelado a -20°C y al final del ensayo sufrió una caída de concentración en el orden de 0,7 log.

En el ensayo de almacenamiento del fago en suspensión en buffer SM demostró que el mismo es un medio eficaz para mantener estable el título en períodos prolongados. Se observa en el gráfico que las suspensiones congeladas a -20 y -80°C son las más adecuadas ya que logran estabilizar la concentración y mantenerla durante el período del ensayo. La muestra almacenada a 4°C tuvo un descenso de casi 3 log en ese lapso.

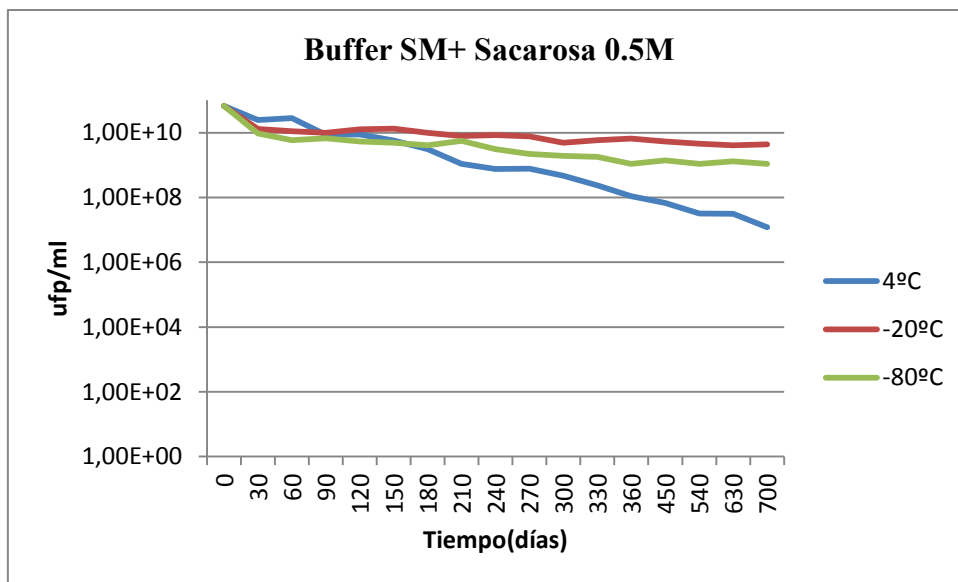


Figura 15. Variación del título de la suspensión del fago Φ BE2 en buffer SM+ sacarosa 0,5M a 4°C, a -20°C y a -80°C. Comparando este sistema con el almacenamiento en buffer SM sin agregado de sacarosa no se encontraron diferencias significativas en las muestras congeladas a -20 y -80°C. Sí se notaron diferencias comparando las muestras refrigeradas a 4°C. En *buffer* SM adicionado con sacarosa a 4°C se evidenció un mayor descenso de la concentración de la suspensión y la caída al final del tiempo del ensayo fue de casi 4 log.

Se ensayó además el efecto crioprotector del agregado de una solución de sacarosa al caldo SM de manera de obtener una concentración final de 0,5M.

Haciendo la comparación de este sistema con el almacenamiento en buffer SM sin agregado de sacarosa no se encontraron diferencias significativas en las muestras congeladas a -20 y -80°C.

En cambio se notaron diferencias comparándolas con las muestras refrigeradas a 4°C. A esa temperatura en buffer SM adicionado con sacarosa se evidenció un mayor descenso de la concentración de la suspensión y la caída al final del tiempo del ensayo fue de casi 4 log (Figura 15).

Estos ensayos permiten afirmar que una forma eficaz de almacenar bacteriófagos en suspensión y mantener un título estable en el tiempo es utilizar el buffer SM y congelar a -20 o -80°C.

Conclusiones del capítulo I

- En la actualidad existen múltiples aplicaciones de bacteriófagos o sus componentes ya sea en biotecnología, biología molecular, control de patógenos (fagoterapia), entre otras. Esto implica la necesidad de contar con un sistema de almacenamiento que garantice la viabilidad de las partículas virales a lo largo del tiempo. En este capítulo se describió el aislamiento de cinco bacteriófagos líticos de enterococos a partir de muestras clínicas provenientes de pacientes internados en el Hospital Nacional de Pediatría Prof. Dr. Juan P Garrahan. Los mismos fueron aislados en el lapso de dos años de ensayos. Contrariamente a la facilidad con la que se aíslan bacteriófagos de otros grupos bacterianos, como por ejemplo las enterobacterias (Brussow et al, 2005), los fagos de enterococos no resultaron abundantes en el material biológico utilizado y tras el procesamiento de casi tres mil muestras de hisopados perianales se lograron aislar únicamente 5 bacteriófagos líticos.
- Además, se ensayaron diferentes métodos de conservación de las suspensiones de bacteriófagos, probando diferentes temperaturas y condiciones de almacenamiento a largo plazo como así también el efecto de sustancias crioprotectoras sobre la viabilidad de estas suspensiones. Teniendo en cuenta todos los resultados obtenidos en los ensayos de conservación del presente trabajo, se puede concluir que el medio de almacenamiento que presenta un mejor rendimiento a largo plazo es el buffer SM y las temperaturas apropiadas serían las de congelamiento a -20°C o -80°C . Esta combinación de medio y temperatura será la utilizada para el almacenamiento de las suspensiones de nuevos bacteriófagos aislados, lo cual concuerda con las condiciones sugeridas en la bibliografía consultada (Hyman P *et al* 2009; Hazem A *et al*, 2002).

CAPÍTULO 2

Caracterización fenotípica y genotípica de los bacteriófagos

Objetivos específicos

- Caracterizar fenotípicamente a los bacteriófagos aislados por morfología de las placas de lisis obtenidas así como mediante microscopía electrónica,
- Poner a punto una técnica de extracción del material genético viral.
- Caracterizar a los bacteriófagos a nivel genotípico por secuenciación y análisis del material genético de los mismos.
- En base a diferentes características de importancia taxonómica, encuadrar a los bacteriófagos aislados en la clasificación actual.

Espectro de infectividad de los bacteriófagos

Ninguno de los fagos aislados fue capaz de lisar a las bacterias pertenecientes a otros géneros bacterianos ensayadas (Tabla 6). No obstante, el espectro de cepas de enterococos a las que cada uno de los bacteriófagos podía infectar difirió marcadamente. El bacteriófago Φ BE1 tenía como huésped a una sola cepa de enterococos entre la población ensayada (EN307), que fue la que sirvió para su aislamiento (Tabla 6).

cepa	Especie	Rango de huésped					
		Φ BE1	Φ BE2	Φ BE3	Φ BE4	Φ BE5	
EN307	<i>Enterococcus faecalis</i>	+	-	-	-	-	
EN364, EN370, EN371	<i>Enterococcus faecium</i>	-	+	-	+	-	
EN375, EN379, EN380, EN382		-	+	-	+	+	
EN444, EN448, EN451, EN455		-	+	-	-	-	
EN460, EN462, EN464, EN465		-	+	-	+	+	
EN466, EN468, EN471, EN472		-	+	-	-	-	
EN474, EN470, EN475		-	+	-	-	-	
E968, E1130, TN918		-	+	-	+	-	
E693, E104, E4, E5, E6, E7, E8, E9, E10, E11, EFCB		-	+	-	+	-	
ENC57		<i>Enterococcus faecalis</i>	-	+	+	-	+
AT85		<i>Enterococcus faecalis</i>	-	+	+	+	+
EN 34	<i>Enterococcus gallinarum</i>	-	+	-	+	+	
AT 80	<i>Enterococcus hirae</i>	-	+	-	-	-	
AT 88	<i>Enterococcus dispar</i>	-	+	-	-	-	
AT 89	<i>Enterococcus raffinosus</i>	-	-	-	-	-	
AT84	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	-	+	-	-	-	
AT 93	<i>Enterococcus mundtii</i>	-	+	-	-	-	
EN 129	<i>Enterococcus avium</i>	-	-	-	-	-	
ATCC 29212	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	+	+	+	+	
TN 917	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	-	
SR 737	<i>Gemella sp.</i>	-	-	-	-	-	
SR 745	<i>Streptococcus oralis</i>	-	-	-	-	-	
SR 756	<i>Aerococcus viridans</i>	-	-	-	-	-	
SR 198	<i>Streptococcus anginosus</i>	-	-	-	-	-	
ATCC 19615	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	-	-	-	-	
ATCC 13813	<i>Streptococcus agalactiae</i>	-	-	-	-	-	
AT 139	<i>Streptococcus salivarius</i>	-	-	-	-	-	
ATCC 49619	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-	-	-	-	-	
ATCC 29213	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	-	
AT 138	<i>Streptococcus sanguinis</i>	-	-	-	-	-	
ATCC 49456	<i>Streptococcus mitis</i>	-	-	-	-	-	
EN 232	<i>Pediococcus sp.</i>	-	-	-	-	-	
AT 97	<i>Listeria monocytogenes</i>	-	-	-	-	-	
AT 231	<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	-	-	-	-	-	
AT 127	<i>Rhodococcus equi</i>	-	-	-	-	-	
AT 184	<i>Enterobacter aerogenes</i>	-	-	-	-	-	
ATCC 25922	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	

Tabla 6. Espectro de infectividad de los bacteriófagos aislados en este trabajo. El símbolo + indica sensibilidad de la cepa hacia el bacteriófago. El símbolo – indica resistencia

El bacteriófago Φ BE2 en cambio pudo infectar a un amplio rango de cepas de distintas especies del género *Enterococcus*, incluyendo tanto especies resistentes como sensibles a vancomicina (Tabla 6). Se observó que Φ BE2 era capaz de infectar a cepas pertenecientes a los distintos clones circulantes en nuestro país (Lopardo *et al.*, 2005; Jeric, 2002) (Tabla 7). El fago Φ BE3 es lítico sobre aislamientos clínicos y cepas de colección de *E. faecalis*. El fago Φ BE4 resultó tener un espectro de infectividad variado ya que pudo infectar a cepas de diferentes especies del género *Enterococcus*. El espectro de infectividad del fago Φ BE5 incluyó principalmente a diversas cepas del *Enterococcus faecalis* y a una cepa de *Enterococcus gallinarum*.

Cepa	Genotipo	<i>Sma</i> I PFGE	Referencia	Actividad de Φ BE2
EN 364	<i>van A</i>	A1	(119)	si
EN 451	<i>van A</i>	A2	(119)	si
EN 448	<i>van A</i>	A3	(119)	si
EN 468	<i>van A</i>	A4	(118)	si
EN 460	<i>van A</i>	A5	(118)	si
EN 462	<i>van A</i>	B	(118)	si
EN 475	<i>van A</i>	C	(118)	si
EN 471	<i>van A</i>	D	(118)	si
EN472	<i>van A</i>	E	(118)	si
EN 465	<i>van A</i>	F	(118)	si
EN 474	<i>van A</i>	G	(118)	si
EN 466	<i>van A</i>	H	(118)	si
EN 470	<i>van A</i>	I	(118)	si
EN 444	<i>van A</i>	J	(118)	si
E4	<i>van A</i>	A1	(98)	si
E8	<i>van A</i>	A3	(98)	si
E9	<i>van A</i>	A2	(98)	si
E10	<i>van A</i>	B	(98)	si
E11	<i>van A</i>	C	(98)	si

Tabla 7. Tipos clonales aislados en Argentina de *E. faecium* resistentes a vancomicina obtenidos mediante PFGE a los que Φ BE2 puede infectar.

Curvas de crecimiento

Curvas de crecimiento de la cepa EN 307 de *Enterococcus faecalis* en presencia del bacteriófago Φ BE1

Las curvas de crecimiento de las bacterias indicadoras se realizaron en medio líquido LB midiendo los cambios en la densidad óptica (DO) a través del tiempo. En la figura 16 se observa la curva de crecimiento de EN 307 en presencia y ausencia de Φ BE1. En esta figura se muestra el aumento de la DO luego de inocular al medio líquido con una colonia de la cepa *E. faecalis* EN 307. A las dos horas y media se agregó el bacteriófago al medio y se continuó con la incubación. Como control de crecimiento se sembró además otro tubo con la misma cepa bacteriana, pero a este cultivo no se le inoculó la suspensión de bacteriófagos. Los resultados muestran una disminución de la DO en el tubo en el cual fue inoculado el virus, hecho que se pudo comprobar también a simple vista por la disminución de turbiedad del medio.

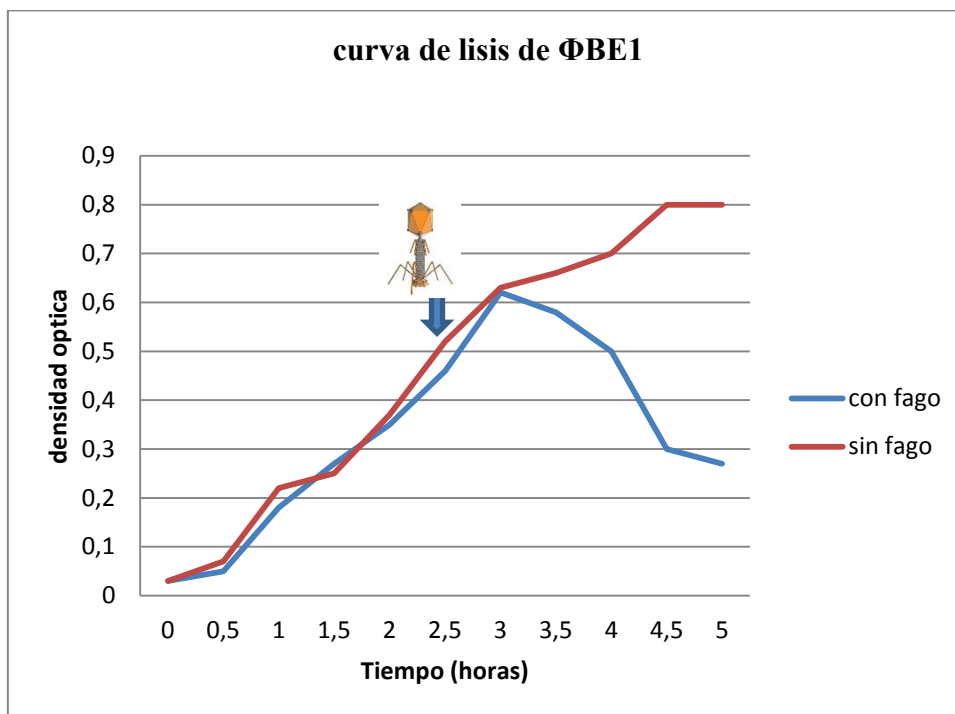


Figura 16. Curva de crecimiento de la cepa de *Enterococcus faecalis* EN 307 en presencia y en ausencia del bacteriófago Φ BE1. En las ordenadas se observa la densidad óptica (DO), y en las abscisas el tiempo (t) en horas. A las dos horas y media de inocular el caldo con una colonia de la cepa EN 307 se agregó el bacteriófago en uno de los tubos (flecha) y se midieron los cambios en la DO. Se utilizó un cultivo sin la presencia del bacteriófago (línea fucsia) como control positivo de crecimiento. Se observó la caída de la DO un tiempo después de la inoculación de la suspensión viral en el tubo tratado (línea azul) pero no en el tubo no tratado con dicha suspensión (línea roja).

Curva de crecimiento de la cepa EN 470 de *Enterococcus faecium* en presencia del bacteriófago Φ BE2

La curva de crecimiento de EN 470 también se realizó en medio líquido LB, utilizando al fago Φ BE2. Esta bacteria fue la cepa sobre la cual el fago fue aislado originalmente (Figura 17).

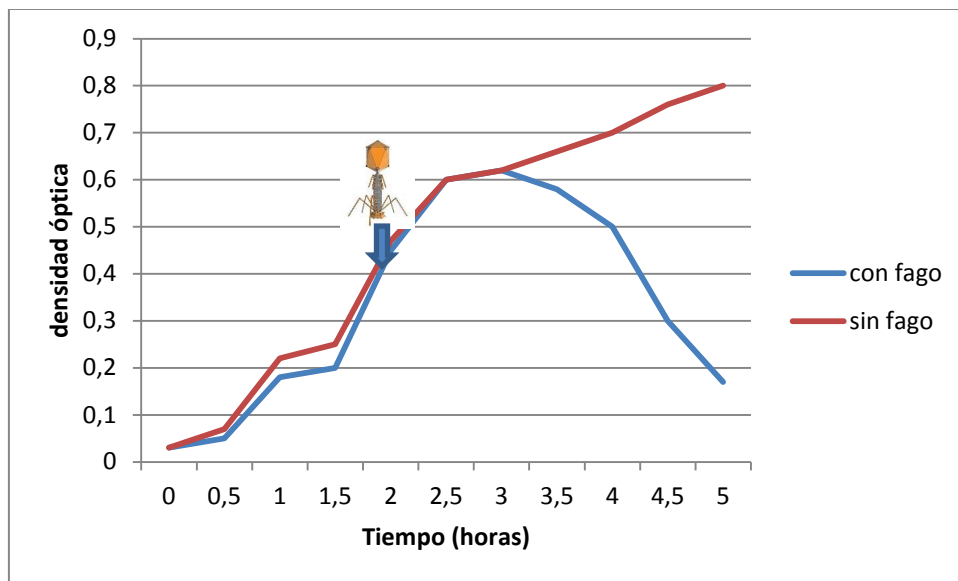


Figura 17. Curva de crecimiento de la cepa de *Enterococcus faecium* EN 470 en presencia y en ausencia del bacteriófago Φ BE2. En las ordenadas se observa la densidad óptica (DO) y en las abscisas el tiempo (t) en horas. A las dos horas de inocular el caldo con una colonia de la cepa EN 470 se agregó el bacteriófago en uno de los tubos (flecha) y se midieron los cambios de DO. Se utilizó un cultivo sin la presencia del bacteriófago (línea fucsia) como control positivo de crecimiento. Se observó la caída de la DO un tiempo después de la inoculación de la suspensión viral en el tubo tratado (línea azul) pero no en el tubo no tratado con dicha suspensión (línea fucsia).

Como control de crecimiento se utilizó un medio sembrado con dicha cepa que no fue tratado con la suspensión viral. El comportamiento fue similar al mostrado en la curva de crecimiento del bacteriófago Φ BE1. El inóculo de la suspensión se agregó sobre el cultivo bacteriano dos horas después. Se produjo la disminución de la DO en el cultivo tratado y no así en el cultivo no tratado.

Curva de crecimiento de la cepa de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 en presencia del bacteriófago Φ BE3

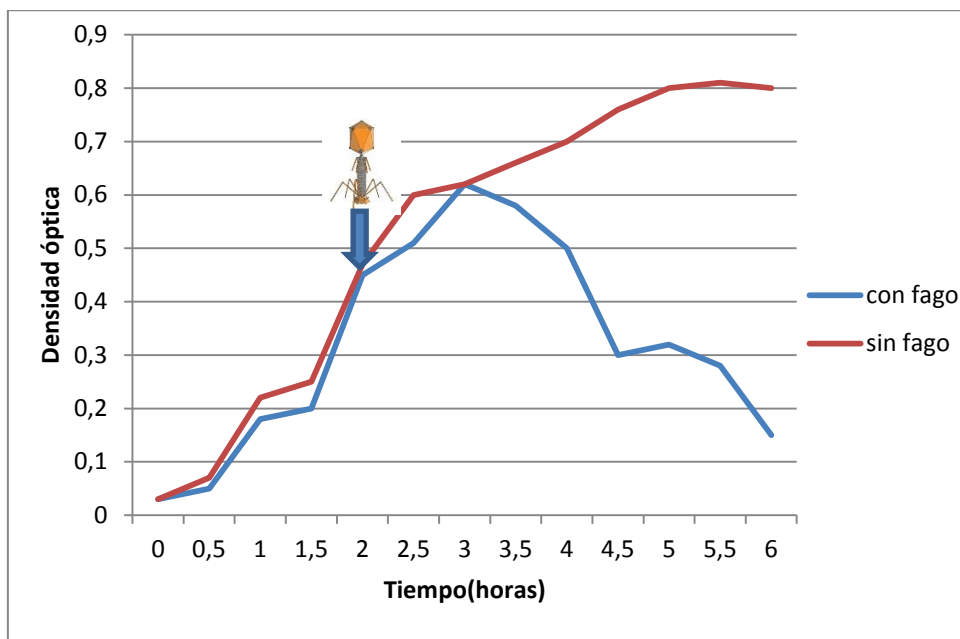


Figura 18 . Curva de crecimiento de la cepa de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 en presencia y en ausencia del bacteriófago Φ BE3. La curva de lisis de la cepa de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 en presencia del fago Φ BE3 muestra como el cultivo tratado con dicho fago sufre un descenso en la concentración bacteriana hasta la lisis completa y el clarificado del caldo. El tiempo empleado en lograrse la lisis es mayor comparado con el del resto de los fagos ensayados.

Curva de crecimiento de la cepa de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 en presencia del bacteriófago Φ BE4

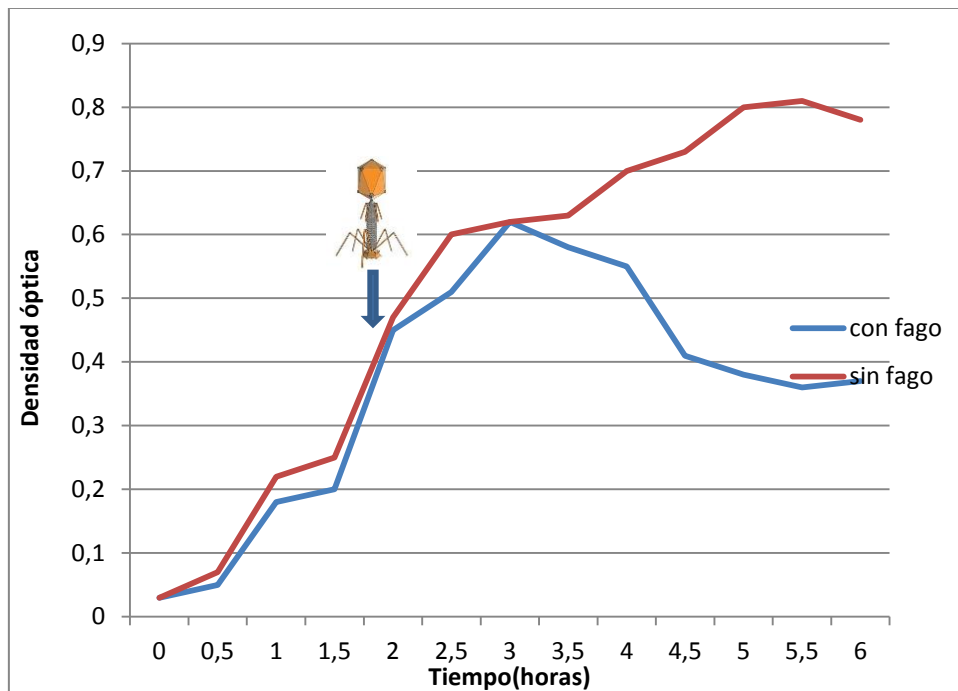


Figura 19. Curva de crecimiento de la cepa de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 en presencia y en ausencia del bacteriófago Φ BE4. La curva de lisis de la cepa de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 utilizando el bacteriófago Φ BE4 mostró un patrón similar al de los demás fagos líticos aislados en esta investigación. Se logró una reducción en la concentración bacteriana a partir de su aplicación al caldo de cultivo.

Curva de crecimiento de la cepa de *Enterococcus faecalis* AT85 en presencia del bacteriófago Φ BE5

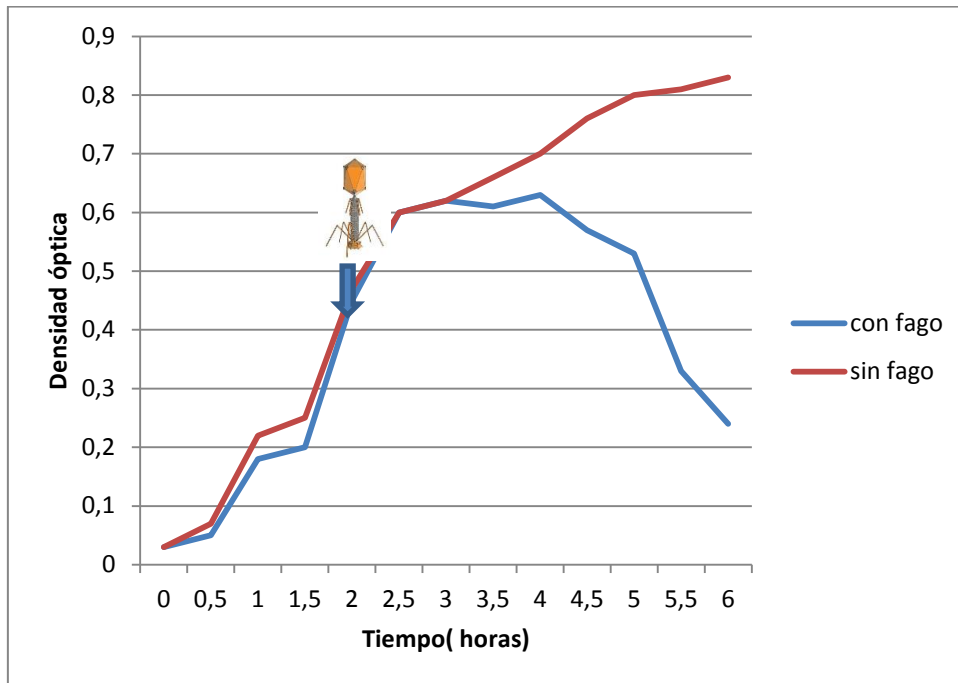


Figura 20. Curva de crecimiento de la cepa de *Enterococcus faecalis* AT85 en presencia y en ausencia del bacteriófago Φ BE5. La curva de lisis de la cepa de *Enterococcus faecalis* AT85 en presencia del fago Φ BE5 muestra como el cultivo tratado con dicho fago desciende en su concentración bacteriana hasta la lisis completa y el clarificado del caldo.

El último de los bacteriófagos aislados fue Φ BE5. Éste presentó también una cinética de lisis concordante con la de un bacteriófago lítico ya que produjo una lisis completa del cultivo al cabo de cuatro horas de la aplicación (Figura 20)

Microfotografías electrónicas

Las fotografías electrónicas de Φ BE2 se muestran en la figura 21. En la misma se puede observar la estructura icosaédrica de la cabeza viral.

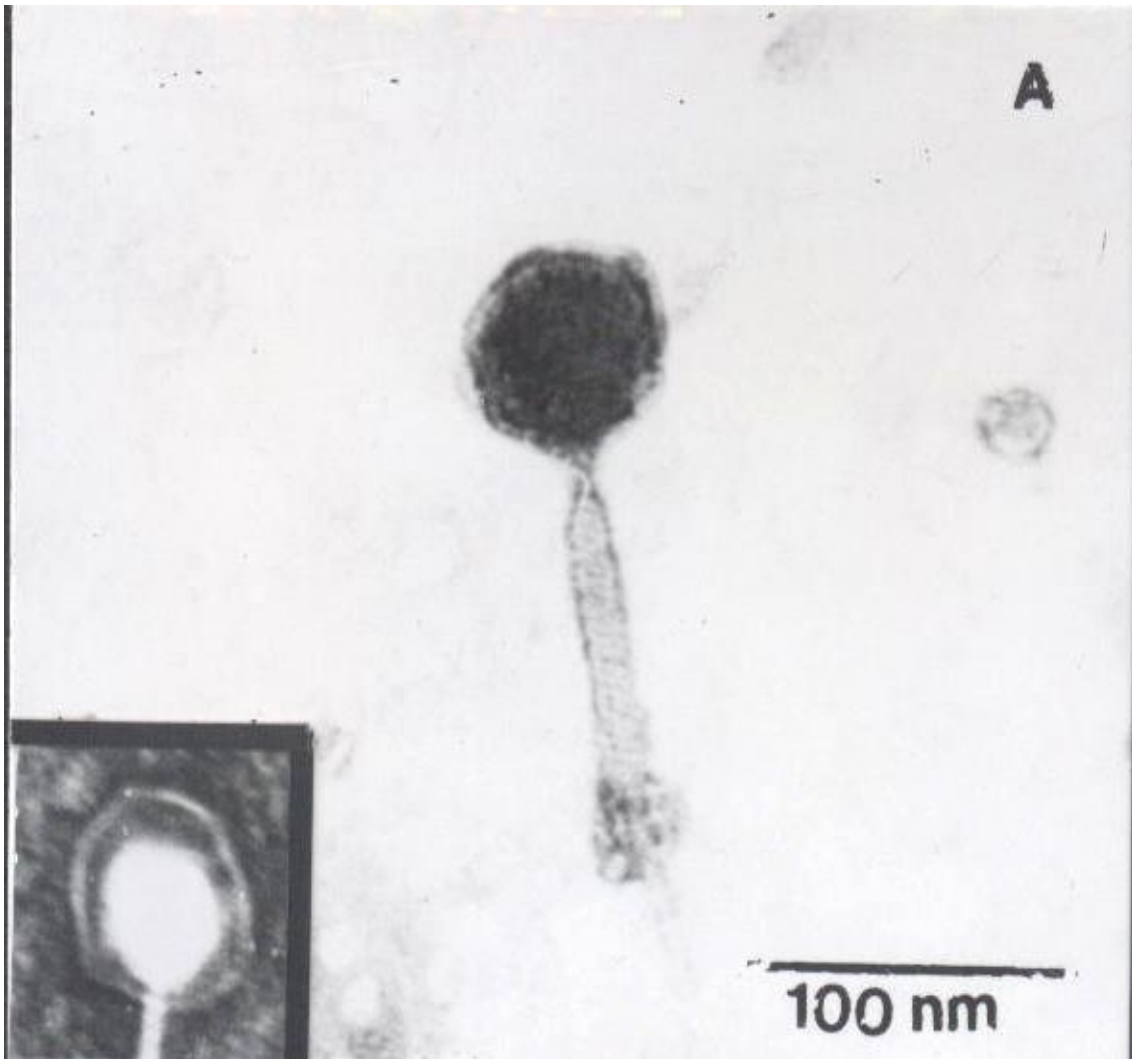


Figura 21. Fotografía electrónica de Φ BE2 (x100.000). La barra indica 100 nm. En el recuadro de la parte inferior izquierda se puede ver la cabeza de una partícula viral con el ADN intacto.

El color negro indica que esta cabeza está vacía, es decir se ha producido el escape del ADN. Además se puede visualizar el cuello de simetría helicoidal y una parte de la cola. En el recuadro situado en la parte inferior izquierda se observa la microfotografía de otra partícula viral con el material genético intacto.

Según la nomenclatura de la ICTV, actualmente en uso, el mismo pertenecería a la familia *Siphoviridae* y de acuerdo a la clasificación de Bradley (Bradley, 1967) pertenecería al morfotipo B. De los bacteriófagos descritos que infectan a cepas del género *Enterococcus*, ninguno ha sido secuenciado en forma completa hasta la fecha.



Figura 22. Fotografía electrónica de Φ BE1 (x50.000). La barra indica 100 nm .

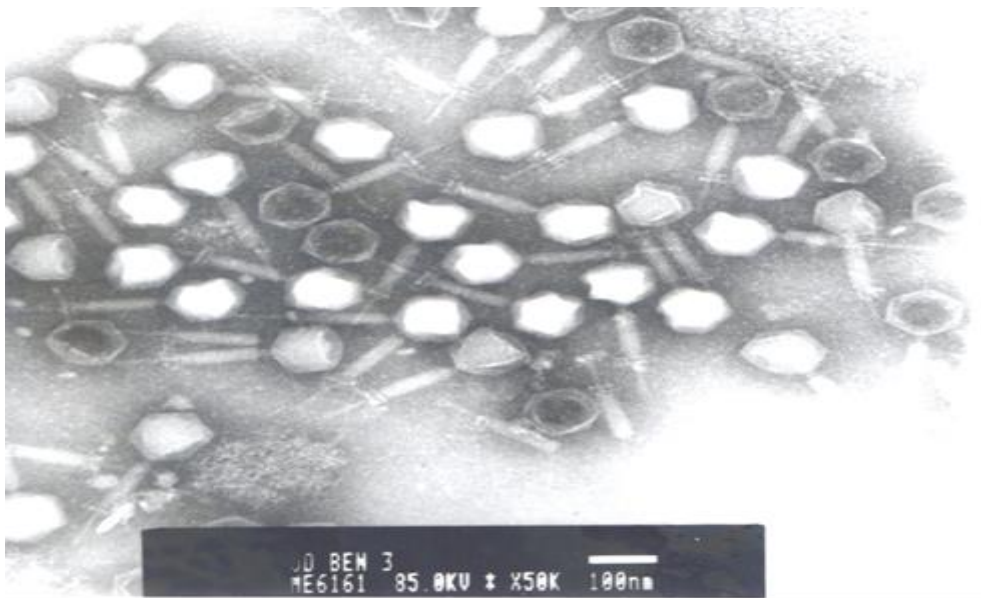


Figura 23. Fotografía electrónica de Φ BE3 (x50.000). La barra indica 100 nm. Se observa una gran cantidad de partículas virales purificadas intactas y otras cuyo material genético se ha escapado como resultado del procesamiento para la tinción.



Figura 24. Fotografía electrónica de Φ BE4 (x50.000). La barra indica 100 nm. Se observa la partícula viral completa e intacta. El material genético aún se encuentra presente en la cabeza. Se observa además la placa basal desde donde nacen las espículas.



Figura 25. Fotografía electrónica de Φ BE5 (x80.000). La barra indica 100 nm. Se observa una única partícula viral cuyo material genético ha escapado de la cabeza. Se observa el cuerpo y la placa basal

Caracterización genotípica de los bacteriófagos

Teniendo en cuenta el objetivo a largo plazo de este trabajo que es la aplicación futura de bacteriófagos como agente terapéutico en pacientes colonizados con EVR, se ha elegido principalmente al bacteriófago Φ BE2 para una mejor caracterización a nivel genotípico. Esta elección se fundamentó en el mayor espectro de infectividad de dicho bacteriófago, además de una mayor velocidad de lisis *in vitro*.

Análisis del material genético de los bacteriófagos

Extracción del material genético

Una vez puesta a punto la técnica de extracción, se extrajo el material genético de las cepas virales y se lo analizó por electroforesis en gel de agarosa (Figura 26).

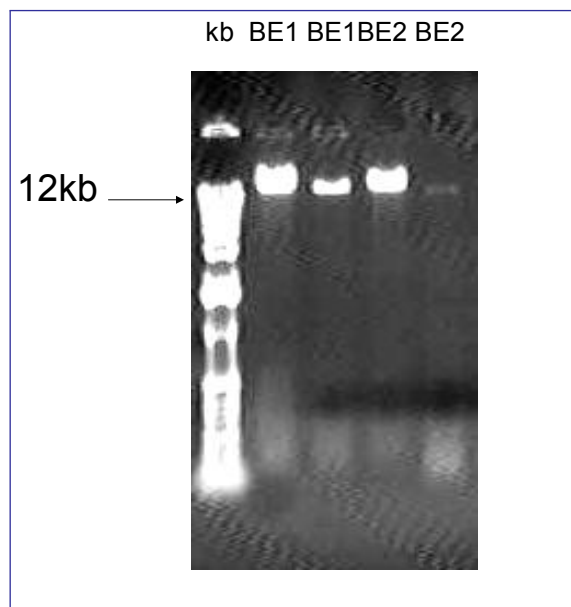


Figura 26. Gel de agarosa de extracción de ADN viral. En la calle 1 se muestra el marcador de peso molecular. En las calles 2 y 3 se observan bandas correspondientes a ADN de Φ BE1 y en las calles 4 y 5 a ADN de Φ BE2.

En la Figura 26 se observa que ambos genomas parecen tener el mismo tamaño y presentan un tamaño mayor a 10 kb que es la banda más grande del marcador. Se logró determinar su naturaleza mediante cortes con endonucleasas de restricción específicas y mediante secuenciación de la misma. (Figura 27). Se midió además su densidad óptica a diferentes longitudes de onda

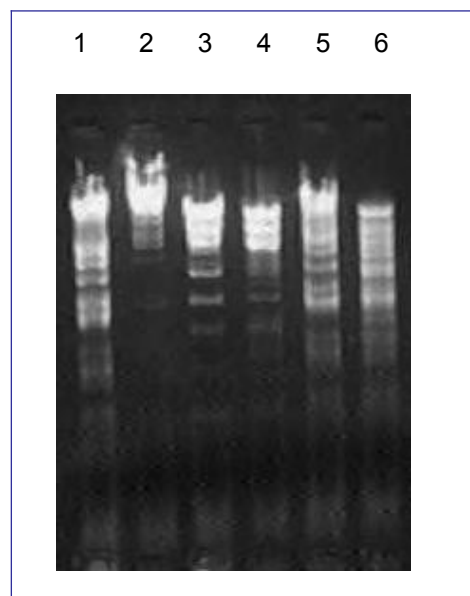


Figura 27. Perfiles de restricción del ADN viral con diferentes enzimas. Las calles 1 a 3 representan la digestión del ADN del bacteriófago Φ BE1 con las enzimas de restricción *Hind*III, *Xba*I y *Acc*I respectivamente. En las calles de 3 a 6 se observa la digestión del ADN de Φ BE2 con las mismas enzimas y en el mismo orden.

El material genético de los cinco bacteriófagos resultó ser ADN de doble cadena.

Los patrones de restricción con diferentes enzimas fueron diferentes como se puede ver en las figuras 27 y 28. El tamaño estimado de ambos bacteriófagos a partir del análisis de los fragmentos de restricción sería de aproximadamente 60kb, cifra que está de acuerdo con el tamaño genómico de otros bacteriófagos emparentados.

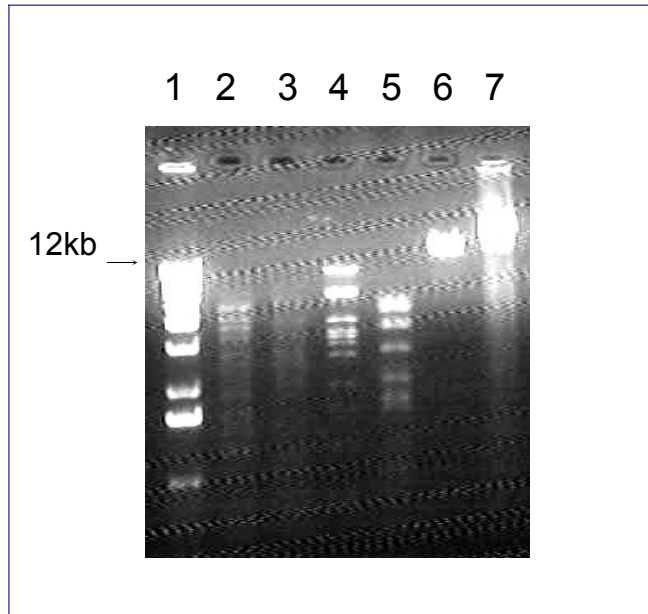


Figura 28. Perfiles de restricción de ADN viral con diferentes enzimas. En la calle 1 se observa el marcador de peso molecular. En las calles 2 y 3 se ven las bandas del ADN del bacteriófago Φ BE1 tratado con las enzimas *EcoRI* y *SmaI* respectivamente. En las calles 4 y 5 se muestra el ADN del bacteriófago Φ BE2 tratado con las mismas enzimas en el mismo orden. En la calle 6 se ve el ADN de Φ BE1 sin tratar y en la 7 el ADN de Φ BE2 también sin tratamiento enzimático.

Construcción de una biblioteca genómica

En los ensayos de clonado se utilizó como vector al plásmido pUC 19. Este se digirió con la enzima *HindIII*. Esta enzima corta en un único sitio al vector dando como resultado un vector linealizado. Este último puede distinguirse mediante una corrida electroforética, ya que migra en el gel a menor velocidad que la forma superenrollada.

Esto se observa en la Figura 29.

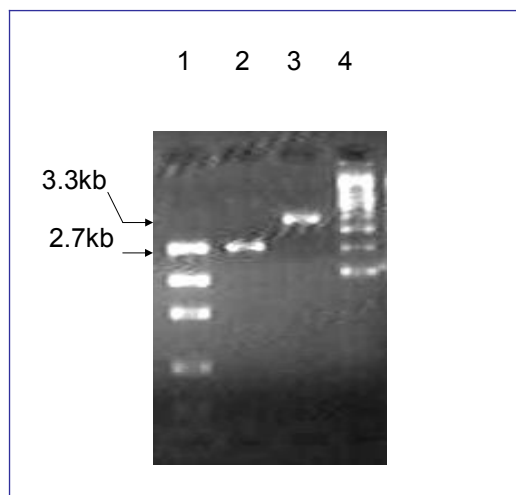


Figura 29. Restricción del vector pUC 19 con la enzima *HindIII*. En la calle 1 se ve el marcador de cuantificación y peso molecular y en la 2 se encuentra el vector superenrollado. En la calle 3 se ve la banda correspondiente al vector linealizado y en la calle 4 se ven las bandas del marcador de peso molecular.

El ADN del bacteriófago Φ BE2 también se digirió con la misma enzima que el vector. Cuando la digestión se completó, se inactivó la enzima por calor y se corrió una alícuota de la mezcla de restricción para verificar que ésta se produjera correctamente (Figura 30).

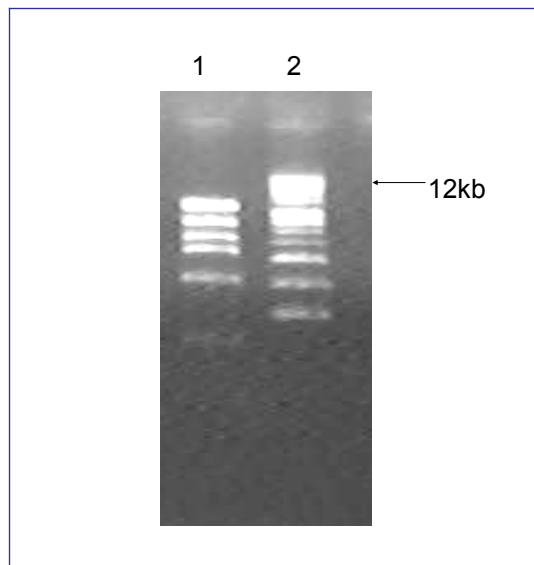


Figura 30. Restricción del ADN de Φ BE2 con la enzima *HindIII*. En la calle 1 se observa el ADN viral restringido y en la calle 2 el marcador de peso molecular.

Ligación, transformación y selección de clones recombinantes

Las reacciones de digestión fueron religadas y luego transformadas en un lote de células previamente competentes de *E. coli* DH5 α . Luego se realizó la siembra de las células en placas de Petri que contenían agar LB con ampicilina como antibiótico para la selección y X-gal e IPTG para la selección por color de los clones recombinantes. Se incubaron las placas en posición invertida durante 12 horas. Al cabo de este tiempo se había producido el crecimiento de colonias de dos colores diferentes. Los resultados se muestran en la figura 31.

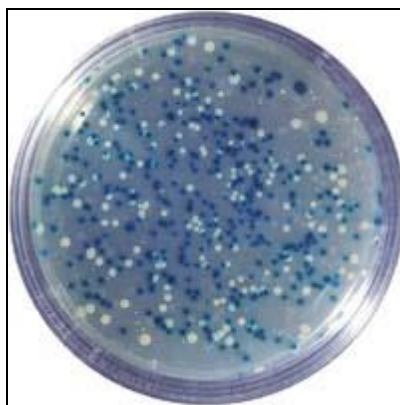


Figura 31. Fotografía de colonias de *E. coli* DH5 α crecidas en medio LB agar con ampicilina, IPTG y X-gal. Estas fueron transformadas y luego incubadas durante 12 horas. Las colonias blancas son clones recombinantes.

En la figura 31 se observan colonias de color azul que representan a células que han sido transformadas con el vector intacto. Durante el proceso de la transformación estas células incorporaron un plásmido en el que se produjo la religación de sus extremos. En este tipo de células se produjo la α -complementación entre los genomas del plásmido y de la bacteria, produciendo entonces la enzima β -galactosidasa completa y funcional. Esta enzima actúa sobre el x-gal. Este es un sustrato cromogénico que al ser escindido por la enzima otorga al medio el color azul característico. Las colonias de color blanco que se observan en la figura corresponden a células que fueron transformadas con plásmidos recombinantes, es decir que durante el proceso de ligación, ésta se produjo entre el vector y el ADN viral. Esto a su vez suprime la complementación entre los genomas. Como resultado, en la mayoría de los casos, se obtienen células que no pueden producir la enzima β -galactosidasa funcional. Esto implica que las células que llevan estos plásmidos recombinantes pueden crecer en el medio con el antibiótico pero no desarrollan color, al no poder escindir el X-gal.

Selección de clones para secuenciación

Los posibles clones recombinantes fueron rotulados; la nomenclatura utilizada fue la numeración ascendente a partir del número 1. Los clones fueron repicados en forma estéril en placas de LB agar con ampicilina para su conservación. A su vez se realizó la siembra de las colonias en medio líquido LB con ampicilina a una concentración de 100µg/ml para realizar la extracción de los plásmidos según el método de Birnboim y Doly descrito previamente. Luego de la extracción plasmídica se realizó la corrida electroforética de los fragmentos de ADN obtenidos para observar si realmente llevaban insertos. Los resultados se pueden ver en la Figura 32. En ella se observan plásmidos recombinantes que llevan insertos de distintos tamaños.

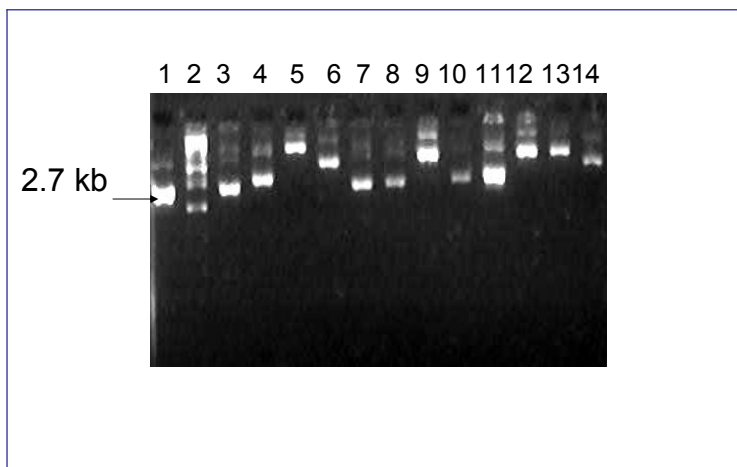


Figura 32. Extracción plasmídica de los clones obtenidos. En la calle 1 se encuentra la siembra del vector pUC19 intacto, utilizado como control positivo. En la calle 2 están las bandas del marcador de peso molecular. En las calles 3 a 14 se encuentran las bandas correspondientes a los clones 1 a 12 respectivamente. Todos tienen un tamaño mayor que el vector intacto.

Los clones que llevaban plásmidos recombinantes fueron aislados y se los hizo crecer nuevamente en medio líquido para realizar una nueva extracción con columnas de

purificación. Esto aseguró la pureza del ADN plasmídico y mejoró los resultados en el proceso de secuenciación. En la figura 33 se observa una corrida electroforética de ADN de los clones recombinantes obtenidos mediante columnas de purificación.

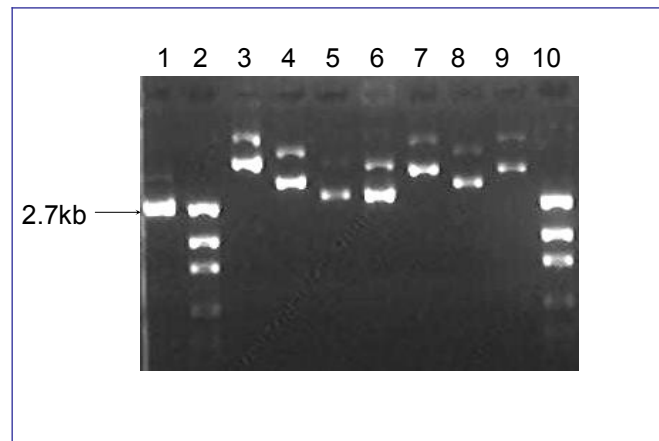


Figura 33. Fotografía de extracción de ADN plasmídico mediante columnas de purificación. En la calle 1 se observa el vector pUC 19 sin ningún inserto. En las calles 2 y 10 se ven las bandas correspondientes al marcador de peso molecular. En las calles 3 a 8 se ven las bandas de los clones correspondientes. En la calle 9 se observan las bandas del clon 10.

Secuencias obtenidas de los plásmidos recombinantes

Los plásmidos recombinantes fueron secuenciados con los cebadores M13F y M13R flanqueantes al sitio de clonado del vector pUC19. Los plásmidos que no pudieron ser secuenciados por completo utilizando estos cebadores fueron secuenciados mediante cebadores internos diseñados para este trabajo. Las secuencias obtenidas y los ensamblajes conseguidos se presentan en el anexo I en sentido 5'-3'.

Análisis de las secuencias obtenidas

El análisis de las secuencia nucleotídicas obtenidas luego del clonado y secuenciación aún parcial del genoma del bacteriófago Φ BE2 arrojó un porcentaje de G+C de 38 %, tomando en cuenta los aproximadamente 12.000 pb secuenciados hasta el momento. Se efectuó la comparación de la secuencia nucleotídica con las bases de datos (GenBank, EMBL-Bank y DDBJ). Se obtuvieron regiones cortas de homología con las secuencias de bacteriófagos pertenecientes en su mayoría a las familias *Siphoviridae* y *Myoviridae*. Un detalle a tener en cuenta es que las regiones de homología tenían menos de 200 nucleótidos, es decir que no se encontraron regiones extensas de similitud a nivel nucleotídico. Esto estaría de acuerdo con los análisis de secuencias hechas en otros trabajos (García et al., 2003).

Las secuencias obtenidas fueron traducidas a aminoácidos y se identificaron posibles marcos de lectura abierta (*open reading frame*, ORF). Se utilizó el programa BLAST X para realizar la comparación de las secuencias aminoacídicas con las bases de datos de proteínas (SWISSPROT, PIRPROTEIN, UNIPROT). Los posibles ORF fueron denominados de acuerdo al clon del cual provenían, p.ej: El ORF encontrado en el clon 3 secuenciado con el cebador M13F fue designado ORF3a. El criterio adoptado para asignar como probable ORF a una secuencia, fue que la misma codificara para una secuencia peptídica encontrada en alguno de los bancos de datos consultados. Además la codificación podría darse en cualquiera de sus seis posibles marcos de lectura, independientemente de si se contaba con las secuencias iniciadoras y terminadoras de la traducción.

Análisis de la secuencia del clon 3

La secuencia nucleotídica del clon 3 obtenida con el cebador M13F fue traducida a aminoácidos y comparada con las bases de datos de proteínas. Los resultados indicaron

que en el marco de lectura -3 existía un ORF designado ORF3a según la nomenclatura previamente definida. La secuencia aminoacídica tenía un porcentaje de homología de 66% con una proteína de la cola del bacteriófago A511 (familia *Myoviridae*) de *Listeria monocitogenes* (Figura 34) y con la proteína Tsh del Bacteriófago P100 de *Listeria monocitogenes*. Además se encontraron homologías del 57 % con el ORF011 del bacteriófago Twort, con una probable proteína de la cola del bacteriófago K, y con el ORF 011 del bacteriófago G1. Estos tres últimos infectan a *S. aureus* y pertenecen también a la familia *Myoviridae*. Estos datos indicarían que la secuencia del clon 3 codificaría para una proteína estructural de la cola de la partícula. En la secuencia no aparecen el codón de inicio, generalmente ATG, ni la secuencia terminadora. Como consecuencia de esto no se cuenta con la totalidad de la secuencia codificante para la probable proteína. Además se puede ver mediante análisis de las proteínas codificadas por el clon 3, que éstas tenían un mayor porcentaje de similitud con proteínas estructurales de fagos pertenecientes a la familia *Myoviridae*. Este hecho no es coincidente con la clasificación sugerida por el análisis de los datos morfológicos de la partícula viral (Figuras 15 y 16).

Marco de lectura -3	Positivos = 116/159 (72%)	Identidad = 106/159 (66%)
Clon3	1 PRKKVSRPHTEITVDTSGIGGASNSSEKTLMLVGSAGGKPNVYRFRNYQQAKATLRSG	
A511	2 PRK VSRPHTEI+VDTSGIGG+S+ SEK L LVGSA GGKPN VY+ RNY QAK+ RSG	
Cons.	3 PRKPVSRPHTEISVDTSGIGGSSSGSEKILCLVGSATGGKPNVYKVRNYSQAKSVFRSG	
	1 ELLDAIELAWNASDVNTASAGDILALRVENATNAKIKKGGLTIASTIYGLDANEMQVALE	
	2 ELLDAIE AWN + AGDILA+RVE A A + G+ ++STIYG DAN++QVALE	
	3 ELLDAIERAWNPGE--GTGAGDILAMRVEEAKEATFEAEGVKVSSTIYGADANDIQVALE	
	1 DNSLTHTKRLTIAFAKDGYNKVFNDNLGKIFSISKYKGEQA	
	2 DN++T TKRL+I FAK+ N+V+DNLG IFSISKYK +A	
	3 DNTITGTKRLSIVFAKERVNQVYDNLGSIIFSISKYKTEA	

Figura 34. Alineamiento de secuencias aminoacídicas entre el clon 3 (fila 1) y una proteína de la cola del bacteriófago A511. (fila 2). En la fila (3) se muestra la secuencia “consenso”. El marco de lectura fue -3 y la identidad observada del 66%(106/159).

Análisis de la secuencia del clon 4

Se produjo el ensamblado de las secuencias del clon 4 obtenidas con los cebadores M13R y 4R int y la secuencia resultante fue la siguiente:

```
5'AAAAATGAATTACCCAAGCTTCCTTCTCTATTAAGAAGATACATTACTAAGAAGGCAAATA
TCCTTATTCTAAGTGCAGGTGCTGAGGTTGAGTCCCAAACCTCCTGTAATGGAATATAGCTTA
GGCAAGGTATTTACTCTGATACAAACGTATTAGTAAGTGCAATTAACAGTCTACCTGACTG
GGAAGCTAAATTATCCCTATCGGAGATAAAAATGTACCTACTGAAACATTTGATAAAGTAG
ACAAAGCTGATGTTAAAACAGGTGAGAAATATGTTGAAGCTCTAGGCGGAGACATTGCTAA
ACAATTGGAATATAACGACTACGTAACAGTAGAAATTGACCGTGCAACTCCAATTCAGACT
TTGCGTTAACTAATCTTTCTGGTGGTACAGATGGAACAGTTCCAGAATCTTGGGCTGACAAA
TTCCCTCTACTAGCTAATGAAGGTGGTACTACTTAGTACCATTGACAGACAAACAAGCTGT
CCATTCAGAAGCTTTTAAAGTCTTTTCACCTAACATACCTCCTGAGAAGTCTTCTGACTTGCC
CCAAAGATGTGTAACCGGTCTTTACCACCATTTTTTAAGACCACGAGTAACCTAAAGTT
GTCGTGTAACCTTTGTGTGTAGGAGAAGGTGTGCTCTACGGATTCAATATAGTATTTCCACA
ATTCGTTATTCTGTTTCATCTACTACGAATAGTCTTCCACCTAACGATATTCTGGGCTTCCCTT
AACTACGATGTCTCCACTATAGAAGTTAGGATTCTCACAGTACCAGTTAGCTAACCGTTTTGT
AACTCTTTTACATATTTTGTATCAGAACCAGAACTGTTGTGCTATCACTCGGATTGTTCTT
CATGATTTTCATCGTATCTAGTTTTAcgTAAACTTTTTTACCTACAAATTCCTAGCAATGGAT
GTAGCTTGATTGTCTGTTAAGTTGAACCTTATTCATAAGCTCATTCTTAATAGTAGTAGTTTCT
TTATTATCCGCTTCATCCTTGTAATCTTCTAAGAATTTTACAATTTTTTTATAGGTAGGTTTTT
CTTCCCGTTACCTTTGCTAGCATTCTTTTCGTTGATACCAGTTATATCCGTGAAGTCTCTTT
TGCAAGCTCTGTGTCATGATATACTGGTCAATGATTTTTGTCTGCCATTGTCCTGTGATACG
TCTGTCTACTTGAAGTATCTTAGCTCGCACATTACCACGTTTCACCCTAAGATGTCTAATGG
GGTAACCACGTAGATAGTTCACTACTGTGCCATAAGTCGTATCAAACGCACTAGATTCATTT
GTATCTTTGTCTCTAGTTGCACGTCTTTCCGTGCAGTATCTTCGTTAGTTTCTGTATCCCCATC
TGTAGTTGTATCAGCACTATCTGCATTATCCCCACTATCTACATTGCaCCTTGTAATATTTTGT
TATCAACTTCTAGCTTCTTATAGCCATATTGTTAACTAAGCGGGAATACCTGgGGTTTA3'
```

La traducción y la comparación con las bases de datos proteica de la secuencia nucleotídica del clon 4 con el cebador M13F mostraron que en el marco de lectura +3 este fragmento (ORF4a) tenía 48 % de homología con la región carboxilo terminal de una proteína de la cola del bacteriófago phi adh (*Siphoviridae*). Este bacteriófago infecta a cepas del género *Lactobacillus*. Luego se observaron homologías de un 45% con la región carboxilo terminal de proteínas de la cola de los siguientes bacteriófagos: el ORF 098 del bacteriófago LP65 (*Myoviridae*) que infecta a *Lactobacillus plantarum*, bacteriófago phi, bacteriófago 47, bacteriófago Phi 12. Todos estos últimos infectan a *Staphylococcus aureus* y pertenecen a la familia *Siphoviridae*. Estos datos indicarían

que la proteína codificada por esta región del genoma del bacteriófago Φ BE2 sería una proteína estructural de la cola del mismo. El análisis de la secuencia ensamblada del clon 4 por su parte mostró homología también con proteínas estructurales de la cola de diferentes virus. El mayor porcentaje de identidad (57%) luego de realizar el alineamiento de la secuencia traducida en el marco de lectura +1 (ORF4b), fue con la proteína mayor de la cola del bacteriófago A 511 (*Myoviridae*) y con una proteína del fago P100. Luego con un 39% de homología se encontró a otra proteína mayor de la cola, la del bacteriófago K, y con los ORF011 de los bacteriófagos G1 y Twort (*Myoviridae*). Esto indica que posiblemente también este fragmento del genoma del fago Φ BE2 podría codificar para una proteína estructural de la cola.

Análisis de las secuencias del clon 6

Los resultados de la traducción de la secuencia ensamblada del clon 6 como secuencia aminoacídica mostraron que en el marco de lectura +3 (ORF6a) se producía un alineamiento con la enzima timidilato sintetasa de varios virus. La enzima proveniente del bacteriófago beta-22 (*Myoviridae*), es la que tiene mayor número de aminoácidos en común, dado que posee un porcentaje de homología de 51 %. Casi en el mismo orden de homología siguen las enzimas de otros virus distintos, la mayoría pertenecientes a la familia *Myoviridae*. Este fragmento del genoma analizado también parece estar relacionado con bacteriófagos pertenecientes a la familia *Myoviridae*, contradiciendo nuevamente los resultados de microscopía electrónica. También se encontró el ORF6b en el marco de lectura -1 , el que presentó un 44% de homología con una proteína del fago RB43.

Análisis de las secuencias del clon 11

Este clon mostró en el marco de lectura -1 el ORF11 que presentó una homología del 52 % con el ORF005 del fago Twort citado anteriormente. Además en el mismo marco y no superpuesta a la anterior secuencia se encontró un porcentaje de homología (32%) con un región corta (78 aminoácidos) de proteínas estructurales pequeñas de los bacteriófagos *Cherry* y *Gamma* de *Bacillus anthracis* y que pertenecen a la familia *Siphoviridae*. En este caso la secuencia analizada está relacionada con bacteriófagos de la familia *Siphoviridae*, lo que sí estaría de acuerdo con los datos obtenidos mediante microscopía electrónica.

Análisis de las secuencias del clon 12

Las secuencias obtenidas a partir de este clon presentaron en el marco de lectura +2(ORF12) un 43% de homología con la proteína gp29 del fago P100 y 36% de homología con el ORF134 del bacteriófago LP 65 de *L. plantarum*. El fragmento alineado fue de 137 residuos y la homología se encontró en la región carboxilo terminal del péptido codificado por el ORF134. Con otras secuencias virales el porcentaje de homología fue muy pequeño como para ser tenido en cuenta.

Análisis de las secuencias del clon 13

Los alineamientos conseguidos con este clon mostraron que el mismo tenía en el marco de lectura -1 (ORF13a) un 74 % de homología con una proteína estructural del fago P100, 65% con una proteína putativa producida por el recientemente secuenciado bacteriófago K y con el ORF012 del bacteriófago Twort. Además se encontró el

ORF13b en el marco de lectura -3, el que presentaba una homología del 78 % con una proteína estructural de la cápside del bacteriófago Twort (Figura 35) y del 73 % con proteínas de la cápside de los bacteriófagos A511 y P100.

1	SLRQKTVNMKYVSDTKNMSIATGLVNNIEDPMQILTDDAISVVAKTIEWASFYGDADLSE
2	++RQKTV MKYVSDTKN+SIA+ LVNNI+DPMQILT+DAI+VVAKTIEWASFYGDA L+
3	NIRQKTVEMKYVSDTKNLSIASTLVNNIQDPMQILTEDAIAVVAKTIEWASFYGDASLTA
1	NPERDSGLEFDGLVKLIDKHNVIDAKG
2	+P GLEFDGL KLIDK NVIDAKG
3	DP-TGQGLEFDGLAKLIDKDNVIDAKG

Figura 35. Alineamiento de secuencias aminoacídicas entre el clon 13 (Fila 1) y una proteína estructural producida por el bacteriófago Twort (fila 2). En la fila 3 se muestra la secuencia consenso. El porcentaje de homología en las secuencias fue del 78 %.

Análisis de las secuencias del clon 14

Se obtuvo toda la secuencia del clon 14, ya que las secuencias obtenidas con los cebadores M13F y M13R pudieron ser ensambladas, tomando como cadena positiva la hebra secuenciada con el primer cebador. La búsqueda de similitud de secuencia con las bases de datos arrojó los siguientes resultados:

Se encontró el ORF14a en el marco de lectura (-2) con un porcentaje de homología del 56% con la región amino terminal de una proteína hipotética del fago K. La región de coincidencia fue de 143 aminoácidos. También se produjo alineamiento con el ORF 003 del bacteriófago Twort (52%), el fragmento alineado fue de 148 residuos y el marco de lectura fue también -2. En otro marco de lectura (+2) en posiciones no superpuestas al anterior se encontró otro ORF (ORF14b). Se produjeron alineamientos con un 46% de homología hacia la proteína gp 36 del bacteriófago P100 de *Listeria monocytogenes* y con un 44% de homología con una proteína hipotética de función desconocida codificada por el ORF034 del fago K. La región de coincidencia se extendía desde el aminoácido inicial de ambas proteínas hasta el n° 108. Además se encontró un

porcentaje de homología del 42 % con el ORF073 del fago Twort. La región de homología en este caso abarca el extremo amino terminal del ORF. En el marco de lectura (-1) se encontró homología del 40% con el ORF090 del fago LP65. La región de coincidencia fue de 84 residuos.

Análisis en conjunto de las secuencias

El análisis realizado en la sección precedente de la secuencia de nucleótidos traducidos a aminoácidos produjo resultados diferentes al análisis de secuencia nucleotídica. Se identificaron varios posibles ORF. La mayoría de éstos codificaban para proteínas estructurales de la partícula viral, ya sean proteínas de la cola o que forman parte de la cabeza. Con la excepción de la enzima timidilato sintetasa codificada por el clon 6 y la secuencia codificante completa de una enzima implicada en el ciclo lítico del fago Φ BE2, entre las demás secuencias analizadas no se encontraron ORF que codificaran para enzimas implicadas en la replicación, reparación, recombinación o en la transcripción del ADN ni codificantes para factores de virulencia bacterianos. Una posible explicación al factor que causa la ausencia de las enzimas nombradas anteriormente entre las proteínas encontradas, sería que los fragmentos clonados que codifican estas enzimas puedan provocar la inhibición de la célula transformante. Ya que el plásmido utilizado se replica en la célula huésped en alto número de copias, cualquiera de estas proteínas o enzimas que sea codificada por el genoma del bacteriófago y pueda expresarse, se encontrará en una cantidad que podría hacer imposible el crecimiento de la célula transformada. Ejemplos de fragmentos del genoma viral que frecuentemente son difíciles de clonar son las regiones con promotores fuertes o que codifiquen para enzimas implicadas en el ciclo lítico, como por ejemplo las lisinas con actividad muramidasa codificadas por muchos bacteriófagos líticos (Deutsch *et al.*, 2004).

Selección de endolisina para subclonado y expresión.

Se escogió para clonar, expresar y purificar una enzima implicada en el ciclo lítico del bacteriófago Φ BE2. la misma se encontraba en forma completa con sus secuencias promotoras, codones de inicio y finalización. Se determinó mediante alineación de aminoácidos contra una base de datos que dicha enzima pertenece a la familia de las muramidasa. Esta secuencia fue incorporada a la base de datos nucleotídica del NCBI (GenBank) con número de acceso JN898963 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/379047488>)

La secuencia nucleotídica codificante para la enzima endolisina del bacteriófago Φ BE2 se tradujo a secuencia aminoacídica y resultó tener la siguiente alineación de 280 aminoácidos, desde la metionina inicial hasta el codón de terminación Figura 36

```
MVRIINQSVCGGIAGRRPNATPKGVVIIHNDAGSIYATAEQYVN
ALSVMSPTQLANGFAHYIDRNTIARVEDTFNAAWHTANTDG
NLNYVGYEVCQSMGASDADFLANEQMTFKQVAEDMKFWG
MQPNRDTVRLHKEFSATACPHRSWELHGSETNSVKDYFISQI
KKYMGNTGTNTENNSSNNQNNIEKGGETTMQCLYERPINS
KTGALEWNGDAWTVMFCNGVNTRRVYHPDEMKVIEKVYKD
NNGRSIPFYSQKEWKNAPWYNRLESMFPVVK
```

Figura 36. Secuencia aminoacídica de la endolisina del bacteriófago Φ BE2.

Esta enzima es utilizada para degradar la pared bacteriana al final del ciclo viral infectivo (ciclo lítico), actúa coordinadamente con otro grupo de enzimas llamadas holinas para lograr este fin y permitir la lisis celular y el escape de las partículas virales completas para reiniciar un nuevo ciclo infectivo. (O'Flaherty *et al.*, 2005)

Predicción *in silico* de la estructura secundaria de la lisozima.

Los resultados de la simulación *in silico* demuestran que la enzima tiene regiones con láminas β y otras con α -hélices, con predominio de las primeras.

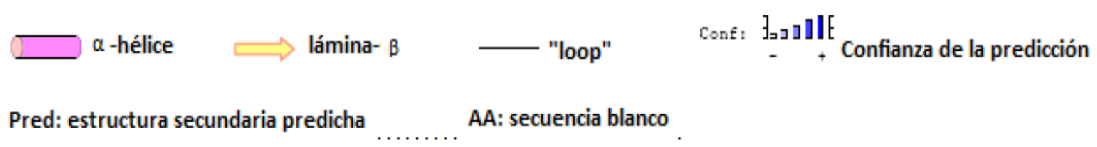
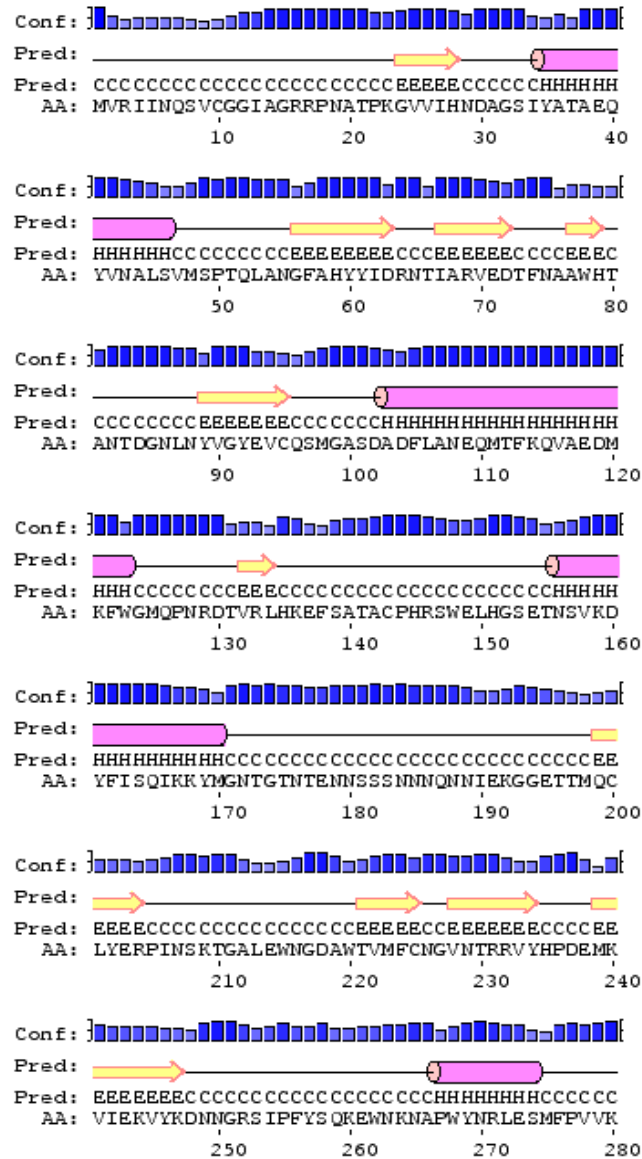


Figura 37. Estructura secundaria de la lisina del bacteriófago ΦBE2 (280 aminoácidos). Esta estructura fue predicha utilizando el servidor PSIPRED versión 3.0 (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>).

Predicción *in silico* de la estructura terciaria de la lisina del fago Φ BE2.

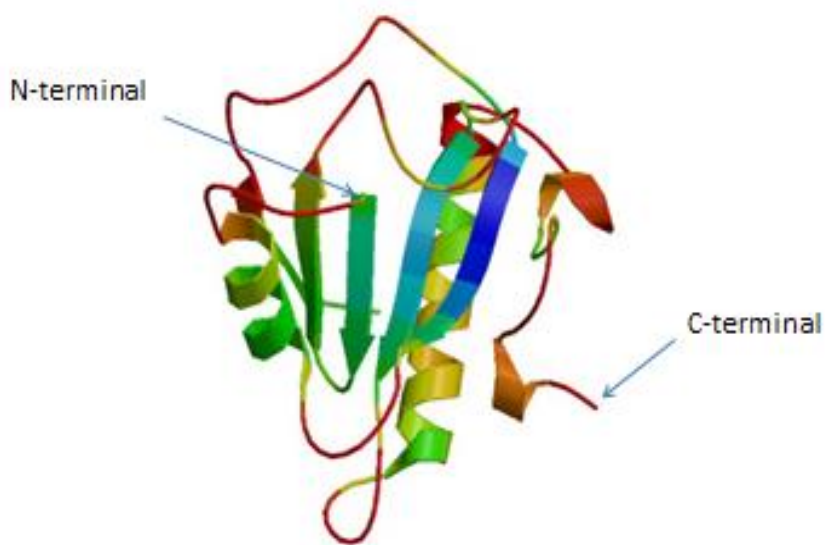


Figura 38: Predicción de la estructura tridimensional de la lisina del bacteriófago Φ BE2. La misma se obtuvo *in silico* a partir del servidor SWISS-MODEL Workspace. (<http://swissmodel.expasy.org/workspace>). Se pueden observar las estructuras transmembrana en forma de α -hélices y láminas plegadas β .

Subclonado.

Se realizó el subclonado del fragmento codificante de la lisina con sus secuencias promotoras cortando con enzimas de restricción *Hind*III y *Bam*HI, cuyos sitios de corte fueron incluidos en los cebadores utilizados para amplificar el marco de lectura de la enzima. Se utilizó el vector de expresión del plásmido pMal. Este plásmido posee un

sistema de purificación que garantiza una eficiente obtención de productos, inclusive de proteínas hidrosolubles. Además se intentaron realizar ensayos funcionales con la enzima purificada y la predicción *in silico* de las estructuras tridimensionales

Se logró obtener un clon con el peso molecular indicado en el vector pMal. El mismo fue purificado utilizando las instrucciones del fabricante y al ser ensayado *in vitro* no presentó actividad lítica sobre la cepa indicadora de enterococo. Debido a esto en próximos ensayos se pondrá a punto el sistema de clonado, ajustando variantes, como por ejemplo, la secuencia de los cebadores para el subclonado y las condiciones de purificación. El próximo paso en la investigación sería obtener la enzima purificada en forma activa y funcional para realizar ensayos *in vitro*.

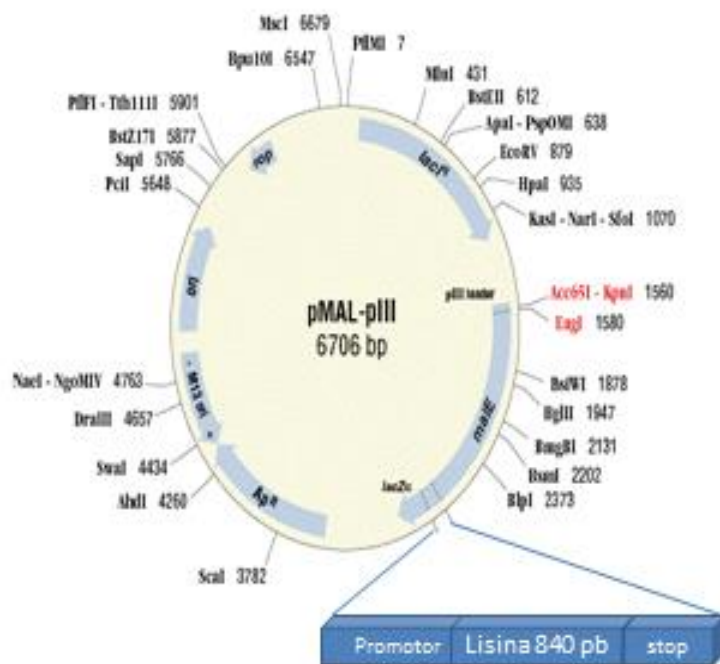


Figura 39. Plásmido recombinante obtenido al insertar la secuencia nucleotídica de la lisina Φ BE2 de en el sitio de múltiple clonado. Se utilizaron las enzimas de restricción HindIII y BamHI cuyos sitios de corte fueron incluidos en los cebadores utilizados para amplificar el marco de lectura de la enzima.

Análisis filogenético y taxonómico a partir de las secuencias nucleotídicas y proteicas

Se realizó un alineamiento de secuencias nucleotídicas y aminoacídicas para determinar relaciones filogenéticas. La base de datos utilizada fue la de NCBI, y los algoritmos utilizados fueron BLAST n y BLASTp.

El resultado de los alineamientos en esta base de datos muestra que el bacteriófago Φ BE2 está emparentado con virus pertenecientes a la familia *Siphoviridae*. Presenta un alto grado de homología con los bacteriófagos de *Bronchotrix thermosphacta* NF5 y BL3 y a Φ NF de *Enterococcus faecalis*. De este modo, teniendo en cuenta además la morfología de las microfotografías electrónicas, resulta concluyente que el bacteriófago Φ BE2 pertenecería a la familia *Siphoviridae*.

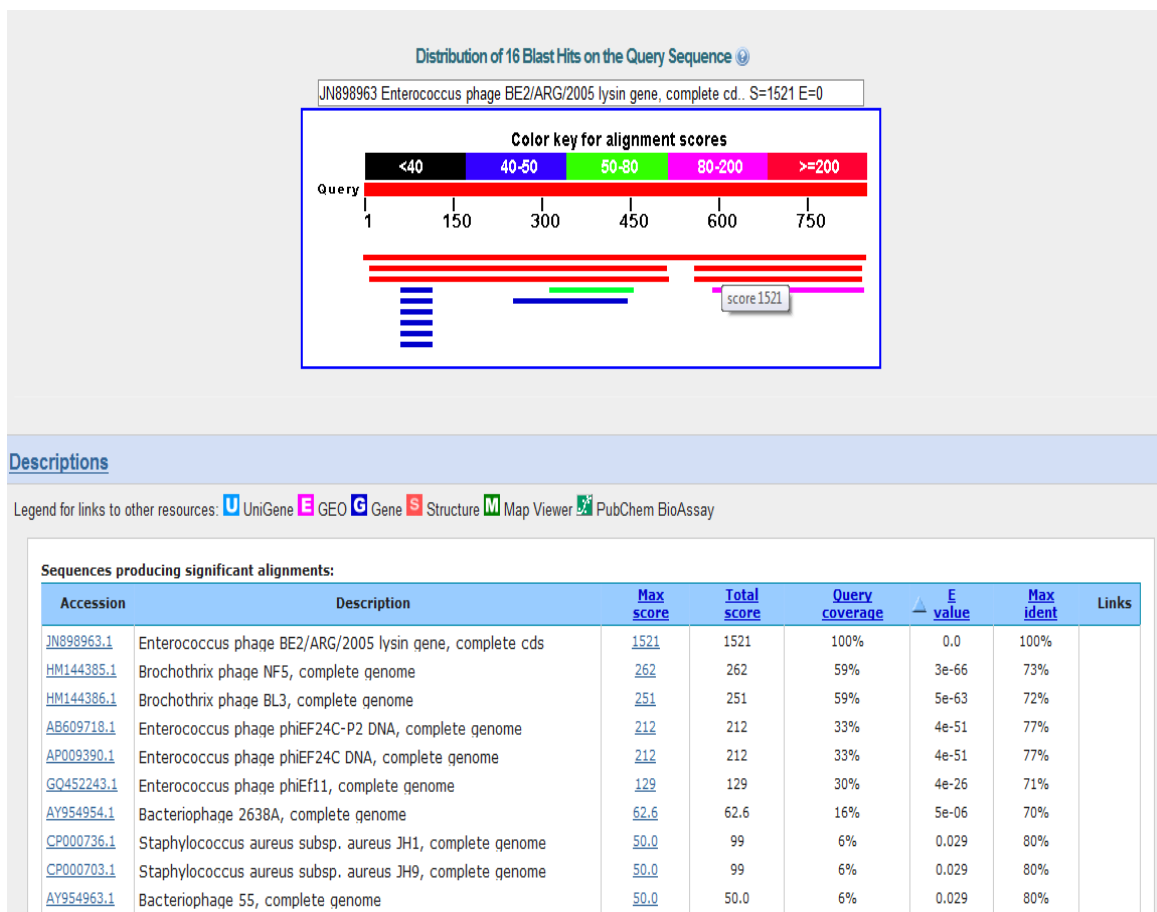


Figura 40. Alineamientos de la secuencia codificante de la lisozima realizados con la base de datos de GenBank. Se puede observar que el bacteriófago está emparentado con virus pertenecientes a la familia *Siphoviridae*. Presenta un alto grado de homología de secuencia con los bacteriófagos de *Bronchothrix thermosphacta* NF5 y BL3 y a Φ NF de *Enterococcus faecalis*.

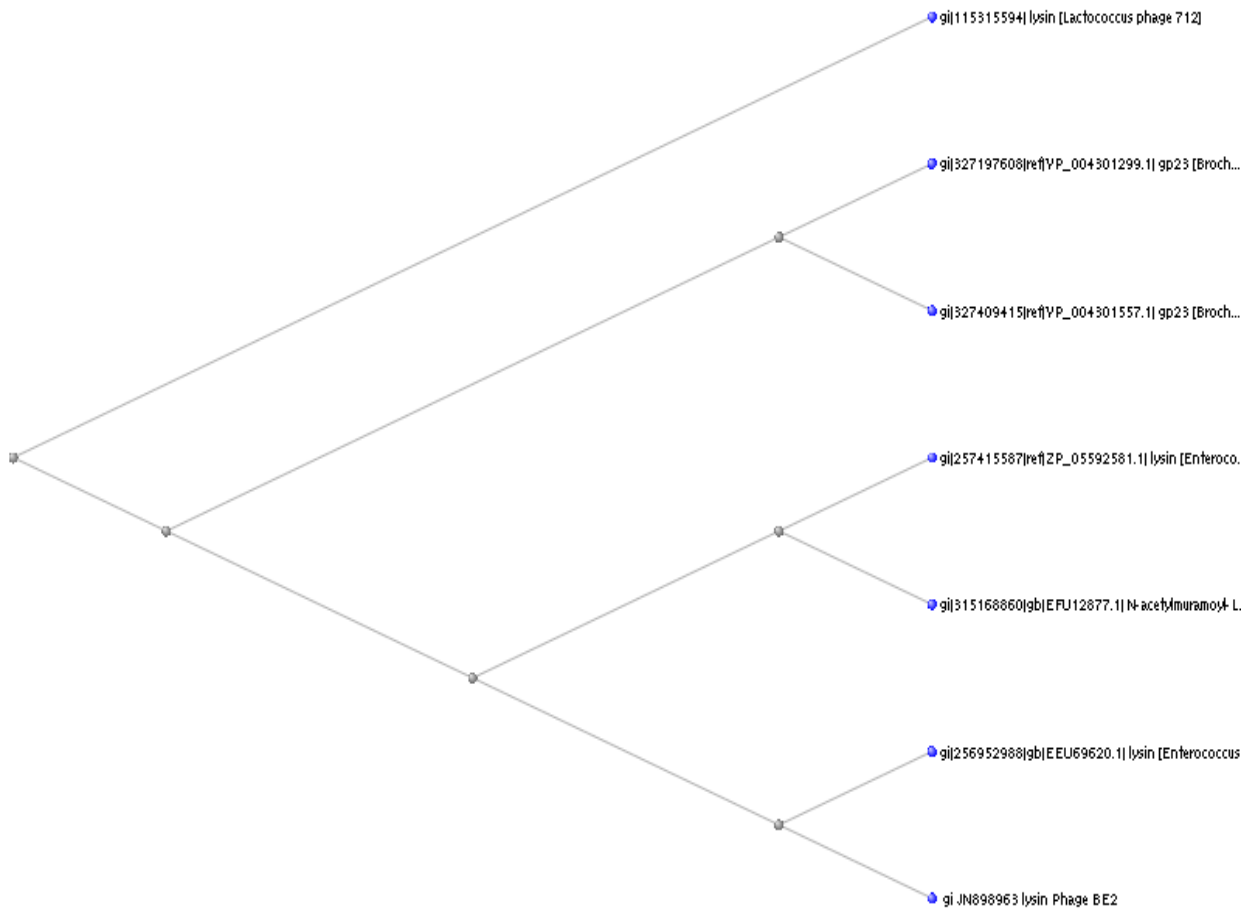


Figura 41. Relación genética del bacteriófago Φ BE2 comparado con otros fagos. Un árbol filogenético basado en la similitud de la secuencia de aminoácidos de la enzima lisina de diferentes fagos. Los números entre paréntesis indican los números de acceso de las bases de datos DDBJ/EMBL/Genbank.

Conclusiones del Capítulo 2

- En este capítulo se trabajó en la caracterización fenotípica y genotípica de los bacteriófagos aislados. Primeramente se determinó el espectro de infectividad de cada uno de los fagos aislados. El fago Φ BE1 tuvo como huésped únicamente a la cepa de *Enterococcus faecalis* EN307. Φ BE2 tuvo un espectro de acción mas amplio, ya que mostró actividad sobre la mayoría de las cepas de las diferentes especies de enterococos ensayadas (n=40) entre las que se encontraban tanto cepas resistentes como sensibles a vancomicina.
- Ninguno de los cinco fagos mostró actividad sobre las cepas ensayadas pertenecientes a otros géneros. Φ BE3 resultó activo principalmente sobre cepas de enterococos sensibles a vancomicina. Φ BE4 y Φ BE5 tienen como hospedadoras a algunas de las cepas de enterococos ensayadas pero presentan un rango menor de infectividad que Φ BE2.
- En los ensayos de cinética de lisis se demostró que todos los bacteriófagos aislados seguían estrictamente el ciclo lítico. Es decir que una vez que se ponen en contacto con su célula hospedadora, ingresan y dirigen la maquinaria sintética celular para generar una nueva progenie de fagos que luego es liberada para recomenzar el ciclo infectivo. Los bacteriófagos Φ BE2 y Φ BE5 mostraron las mejores cinéticas de lisis y fueron capaces de lisar completamente el cultivo en menos de dos horas.
- Teniendo en cuenta las características deseables para utilizar a los fagos como agentes terapéuticos (amplio espectro de infectividad y rápida cinética de lisis), se escogió el fago Φ BE2 para ser caracterizado con mayor detalle.
- Se logró poner a punto técnicas de extracción de material genético, con las cuales se determinó que todos los fagos aislados tenían ADN de doble cadena

como material genético. Con el objetivo de secuenciar el genoma de Φ BE2, el ADN viral fue cortado con con varias enzimas de restricción y fue clonado en el vector pUC19. Luego los plásmidos recombinantes fueron transformados en células competentes *E. coli* DH5 α a partir de las cuales se purificaron para realizar la secuenciación.

- Se logro identificar a varias proteínas estructurales de la partícula viral y a enzimas que participan en los ciclos infectivos. Se escogió una enzima implicada en el ciclo lítico para subclonar y purificar. Este procedimiento se realizó utilizando el vector de expresión pMal c2x. La secuencia nucleotídica de 802 bases se tradujo a aminoácidos y se realizó un análisis computacional *in silico* para determinar las estructuras secundaria y terciaria de esta enzima.
- Otro dato importante obtenido del análisis de las secuencias, luego de compararlas con las bases de datos disponibles, fue que ninguna de ellas codificaba para productos implicados en factores de virulencia bacterianos o mecanismos de resistencia a antibióticos. La carencia de estas secuencias es fundamental, para tener la seguridad que las mismas no sean transmitidas entre las distintas cepas bacterianas mediante el proceso de transducción generalizada. Esto es a su vez una condición para la futura utilización de los bacteriófagos como agente terapéutico en seres humanos.

CAPÍTULO 3

Ensayos de descolonización *in vitro* e *in vivo*

Objetivos específicos

- Poner a punto sistemas de colonización *in vitro* e *in vivo* con enterococos multirresistentes.
- Ensayar la capacidad de las suspensiones de los bacteriófagos aislados para actuar como agente bactericida mediante pruebas *in vitro* utilizando cultivos de líneas celulares intestinales humanas y la capacidad de estas suspensiones para la descolonización bacteriana del tracto gastrointestinal de animales colonizados experimentalmente.
- Determinar las vías y concentraciones óptimas de administración de los bacteriófagos en modelo murino.

Ensayos de adherencia de enterococos a células eucariotas

La capacidad de diferentes cepas de enterococos de unirse a células eucariotas fue estudiada en cultivos de células Vero en monocapa mediante microscopía óptica. Se hicieron cultivos en caldo BHI de cada cepa bacteriana a estudiar, los mismos se centrifugaron y el precipitado se resuspendió en *buffer* PBS y se agregaron a los pocillos del cultivo celular (0,5ml/pocillo). Las placas fueron agitadas suavemente e incubadas a 37°C en atmósfera de 10% de CO₂, luego las células fueron lavadas tres veces con PBS y fijadas con etanol durante cinco minutos, lavadas nuevamente con PBS y coloreadas con una modificación de la técnica de Gram. (Decoloración con etanol) y observadas al microscopio (Figura 42).

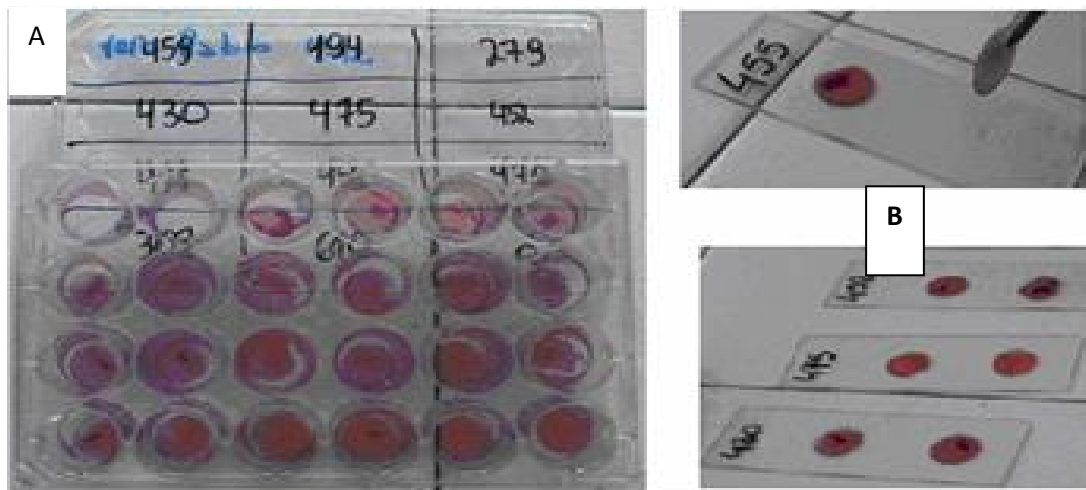


Figura 42. Ensayos in vitro de adherencia de enterococos a células eucariotas. Cada well (pocillo) contiene células Vero incubadas con una cepa de enterococo para determinar la capacidad de adherencia de estas bacterias a la monocapa (A). Se observaron los extendidos coloreados con la técnica de Gram modificada con aceite de inmersión con un aumento de 1000X (B)

Estudios de descolonización en modelo celular

Se diseñó un experimento con el fin de demostrar la capacidad de descolonización de bacteriófagos sobre una monocapa de enterocitos humanos Caco2 infectada experimentalmente con enterococos. Diferentes concentraciones de enterococos se agregaron a la monocapa celular. Luego de la infección se cultivó durante una hora a 37°C y al cabo de este tiempo se desafió el cultivo con una suspensión de concentración conocida del bacteriófago Φ BE2 durante una hora. Se utilizaron distintas concentraciones de cultivos bacterianos y de suspensiones del bacteriófago Φ BE2. El tiempo de exposición fue de una hora. Al cabo de este tiempo se realizaron los recuentos para determinar la variación en el título bacteriano en presencia y en ausencia de bacteriófagos.

Los resultados obtenidos en los ensayos de descolonización celular muestran que la concentración de enterococos sobre la monocapa disminuía a medida que se aumentaba la concentración de fagos administrada. Se observó además que la descolonización no fue completa y que estaba directamente relacionada a la multiplicidad de infección (Figura 43 y Tabla 8).

	Título de suspensión de enterococo (ufc/ml)		
Título del fago (ufp/ml)	1×10^6	1×10^5	1×10^4
Sin fago	$1,2 \times 10^5$	$4,1 \times 10^4$	$1,35 \times 10^4$
1×10^4	$2,45 \times 10^5$	$4,6 \times 10^4$	$5,04 \times 10^3$
1×10^5	$1,28 \times 10^5$	$3,7 \times 10^3$	$1,95 \times 10^3$
1×10^6	$3,43 \times 10^4$	$1,06 \times 10^4$	$5,06 \times 10^2$

Tabla 8. Variación de la concentración bacteriana en función de la concentración de bacteriófagos

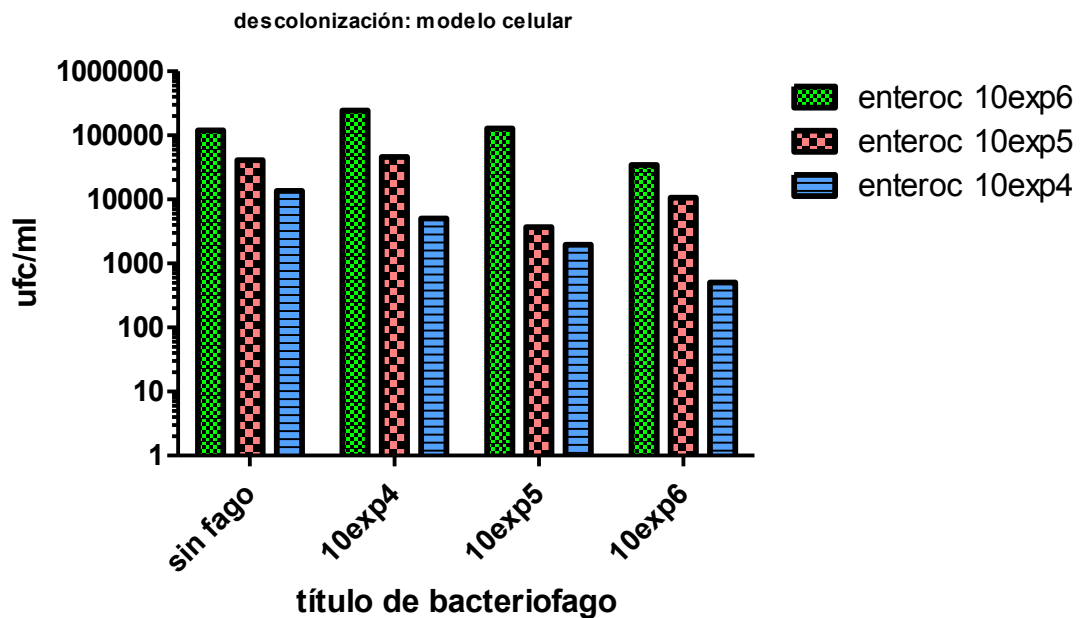


Figura 43. Ensayos *in vitro* sobre la capacidad de descolonización de bacteriófagos sobre monocapa celular. Cambios en la concentración bacteriana debido al tratamiento con diferentes concentraciones de bacteriófagos en un modelo *in vitro* utilizando enterocitos humanos.

Referencias: 10exp4, 10exp5 y 10exp6: títulos de los bacteriófagos agregados (en ufp/ml)
 enteroc10exp6, enteroc10exp5, enteroc10exp4: concentración de enterococos expresada en ufc/ml.

Estudios de descolonización en modelo murino

Modelo de descolonización *in vivo*

El modelo elegido para los ensayos de descolonización *in vivo* fue un modelo murino utilizando la línea de ratones C57BLACK6 (C57/BL6), hembras de 5 semanas de edad.

Antes del inicio de los ensayos de descolonización *in vivo* se determinaron algunas variables como la forma de administración de los fagos, la estandarización del método de recuento de bacterias y fagos, la necesidad o no de la administración previa de una sustancia protectora para neutralizar los ácidos estomacales que podrían dañar a los bacteriófagos, el número de animales de cada grupo (tratados y controles), la posibilidad de trabajar con cepas colonizantes naturales o la necesidad de establecer la colonización experimental con enterococos de nuestra colección (Kasman L *et al*, 2002; Stanford K *et al*, 2010; Bach S *et al*, 2002; Huff *et al*, 2006; Sheng H *et al*, 2006; Oliveira A *et al*, 2010; Rivas L *et al*, 2010; O'Flynn G *et al*, 2004; Ma Y *et al*, 2008).

Como vías de administración de los bacteriófagos se disponía de dos opciones:

- La administración directa de las suspensiones de alto título por vía oral y en forma forzada.
- La inoculación de suspensiones de bacteriófagos en el agua estéril de bebida.

Se escogió la inoculación de los mismos en agua de bebida. Esta vía tiene las ventajas de no ser traumática para los animales, de ser continua la administración y de permitir inferir en forma aproximada la cantidad de bacteriófagos ingresada efectivamente a partir del volumen ingerido en forma diaria por los animales.

Como se dijo, un aspecto a considerar era trabajar con cepas de enterococos colonizantes naturales (indígenas) de los ratones a ensayar o realizar una infección experimental con una cepa conocida (Raya R *et al*, 2011). Para decidir entre estas dos opciones se realizó el aislamiento e identificación de las bacterias de la microbiota

intestinal de los ratones a ensayar. Se determinó que los ratones provenientes del bioterio de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Nacional de La Plata presentaban una colonización homogénea con una cepa de *E. faecalis* (denominada ENC57). Luego se analizó la lisis de cada uno de los fagos aislados sobre esta cepa colonizante natural de los ratones. Los bacteriófagos Φ BE2, Φ BE3 y Φ BE5 resultaron ser líticos sobre esta cepa y por ello fueron elegidos para realizar los ensayos de descolonización in vivo.

Se trabajó con un grupo control de ratones (n=5) y un grupo que recibió el tratamiento con mediante la administración en agua de bebida de títulos conocidos de bacteriófagos (n=5). Cada grupo se mantuvo en jaulas separadas. Los recuentos de enterococos y bacteriófagos se realizaron en un gramo de materia fecal expulsada por cada ratón. La unidad empleada fue ufc/g o ufp/g de materia fecal expulsada respectivamente. En caso de que un animal no alcanzara a expulsar el gramo requerido para realizar los recuentos se multiplicó el peso obtenido por el factor de corrección correspondiente. La misma fue macerada y resuspendida en solución fisiológica y las diluciones fueron realizadas también en solución fisiológica. Para el recuento del tracto intestinal se lavó la luz del tracto con un mililitro de PBS luego se realizaron las diluciones correspondientes.

Una vez fijadas todas las variables, los experimentos se efectuaron durante una semana. Se obtuvieron recuentos en el día de la administración de la suspensión a partir de materia fecal, al día siguiente del inicio del ensayo y cada dos días. Transcurrida una semana desde el inicio del experimento, los animales fueron sacrificados y se cuantificaron las bacterias y los fagos a partir de la materia fecal y de los intestinos (Figura 44). Los datos fueron procesados y analizados mediante el programa Graphad versión 5.4. El análisis estadístico escogido fue el test de Mann-Whitney para datos no paramétricos debido a la alta dispersión que a priori se espera de un modelo de recuento

en modelo animal. Los resultados fueron considerados estadísticamente significativos con un valor de p menor de 0,05 ($p < 0,05$)



Figura 44. Modelo animal de descolonización intestinal de enterococos con bacteriófagos. El día cero se realizó la inoculación de la suspensión de fagos de concentración conocida vía oral. Además se realizó el recuento inicial de la carga bacteriana en materia fecal expulsada por cada animal de la población estudiada. Se realizaron recuentos tanto de fagos como de la cepa bacteriana indicadora en los días uno, tres, cinco y al séptimo día de iniciado el experimento.

Experimento 1. Determinación de la actividad del fago Φ BE3 sobre enterococos colonizantes naturales en modelo animal

Siguiendo con el modelo animal detallado se inició el primer experimento de descolonización de enterococos en ratones C57. Se utilizó el bacteriófago Φ BE3. Una suspensión de alto título del mismo fue disuelta en 100 mililitros de agua de bebida estéril hasta lograr una concentración final de 1.5×10^8 ufp/ml.

Antes del inicio del tratamiento se cuantificó la carga inicial de enterococos colonizantes naturales.

Se trabajó con un grupo control de ratones ($n=5$) y un grupo que recibió el tratamiento

(n=5). Cada grupo se mantuvo en jaulas separadas. Los recuentos se realizaron a partir de materia fecal expulsada en forma natural por cada ratón. La progresión de los resultados se muestra en la figura 45(A-D). Se observó una disminución estadísticamente significativa en la concentración de enterococos comparando los grupos control y tratado ($p=0.0317$). Al día siguiente de iniciado el ensayo el grupo tratado mostró una disminución en la carga bacteriana. Debido al rápido metabolismo de los ratones, los bacteriófagos ingeridos atravesaron todo el tracto gastrointestinal de los mismos, ya que se recuperaron en la materia fecal expulsada al día siguiente de iniciado el experimento. En los siguientes días y tras el sacrificio de los animales se observó una estabilización en los títulos de enterococos. Las diferencias entre los grupos control y tratado se mantuvieron dentro de valores estadísticamente significativos pero no se logró la completa descolonización de la cepa ENC57 por parte del fago Φ BE3. En la figura 46 E se observa un resumen del experimento. Las medias de concentración bacteriana de cada grupo en función de tiempo transcurrido mostraron la disminución de la carga bacteriana en el grupo tratado pero sin llegar a una completa descolonización.

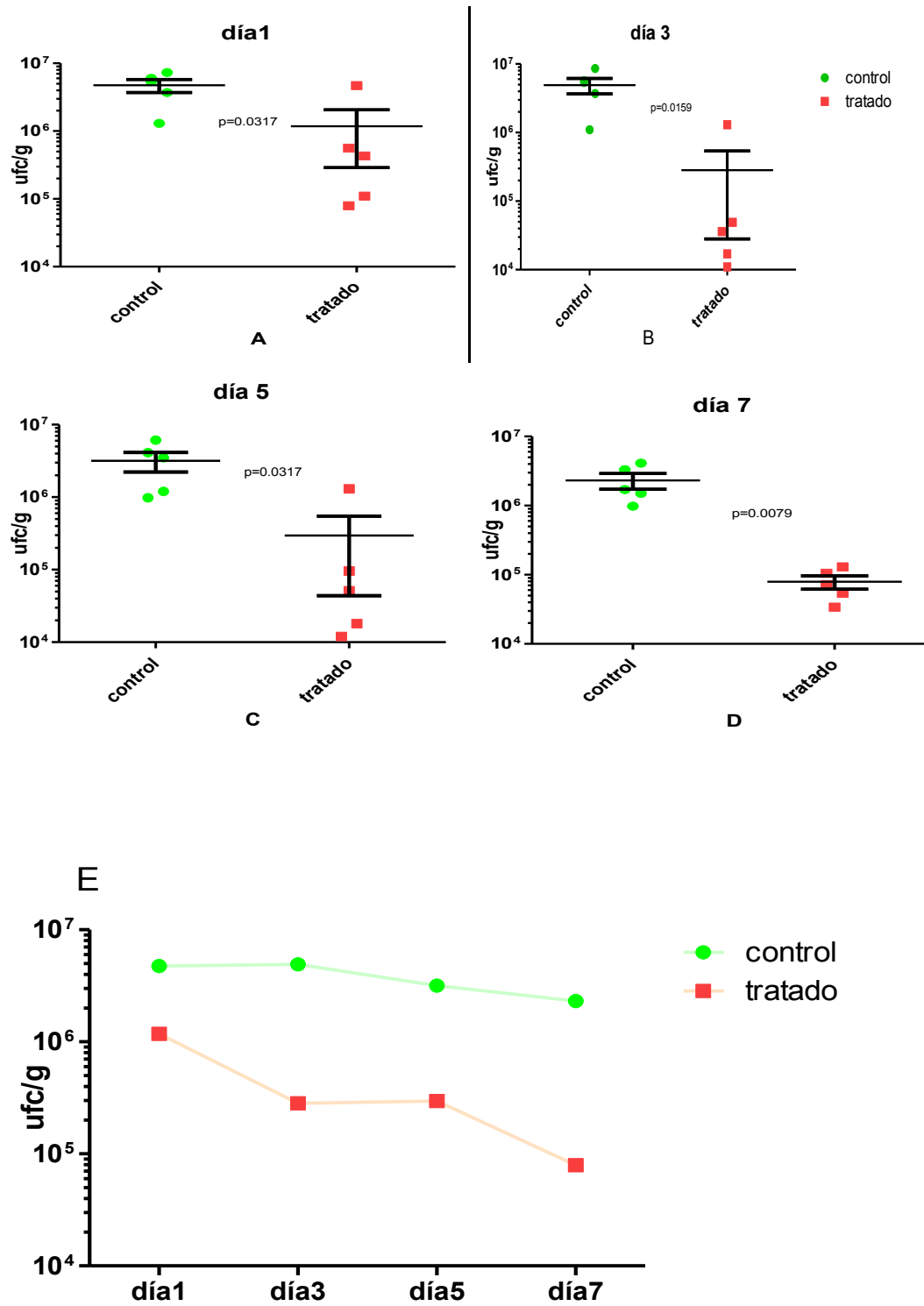


Figura 45. Descolonización de ratones con el bacteriófago Φ BE3. A. recuento luego de un día del inicio tratamiento. B, C, D. Recuento a los tres, cinco y siete días de tratamiento respectivamente. E. Resumen del experimento, se grafican las medias de las concentraciones de enterococos de cada grupo.

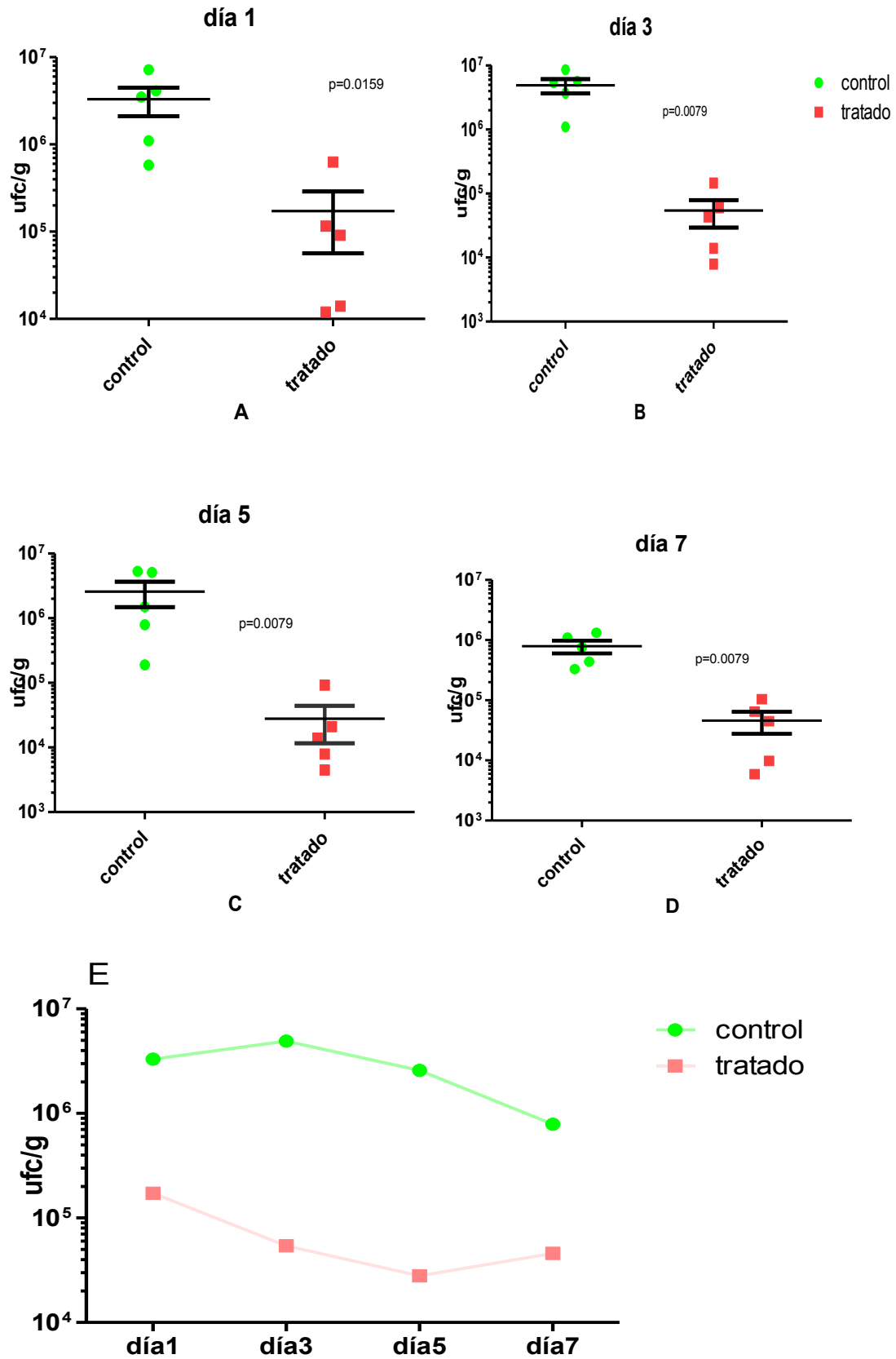


Figura 46. Descolonización de ratones con el bacteriófago Φ BE2. A. recuento luego de un día del inicio tratamiento. B, C, D. Recuento a los tres, cinco y siete días de tratamiento respectivamente. E. Resumen del experimento, se grafican las medias de las concentraciones de enterococos de cada grupo.

Experimento 2: Determinación de la actividad del fago Φ BE2 sobre enterococos colonizantes naturales en modelo animal

Siguiendo con el mismo desarrollo experimental, se realizó un ensayo de descolonización de enterococos utilizando el bacteriófago Φ BE2. Se disolvió una suspensión de fagos de alto título en agua de bebida de los ratones hasta lograr una concentración final de 3.2×10^9 ufp/ml. Al grupo control se le administró agua estéril sin la adición de bacteriófagos.

Los resultados obtenidos durante el experimento mostraron que el fago Φ BE2 también era capaz de hacer descender la carga bacteriana de los ratones del grupo control (Figura 46 A-D). Sin embargo no fue posible la descolonización total ya que el grupo de ratones tratados presentó una carga remanente de enterococos que en algunos casos fue del orden de 10^3 ufc/g de materia fecal. La figura 46 E muestra un resumen del experimento. En ella se grafican las medias de cada grupo en los diferentes días en que se efectuaron los recuentos. Se puede observar un rápido descenso de la carga bacteriana a partir del primer día del experimento, seguido por una estabilización de los recuentos hasta el final del mismo.

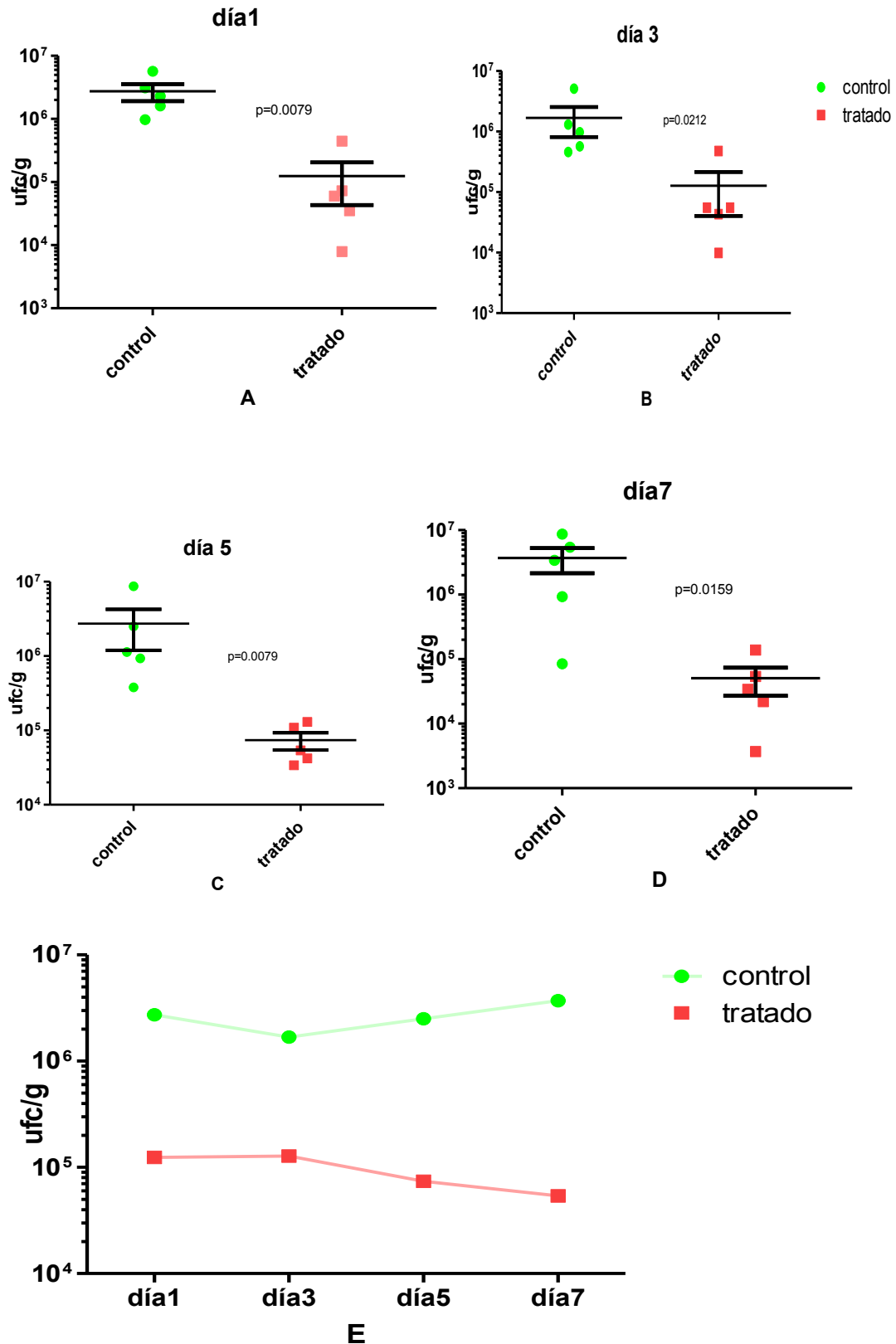


Figura 47. Descolonización de ratones utilizando un cóctel que contenía a los bacteriófagos Φ BE2, Φ BE3 y Φ BE5. Los recuentos de enterococos permanecieron estables hasta el fin del experimento y no se observó un comportamiento sinérgico entre los tres fagos con respecto a las concentraciones halladas al utilizarlos separados en los experimentos anteriores.

Experimento 3. Determinación de la actividad de un cóctel de bacteriófagos sobre enterococos colonizantes naturales en modelo animal

El siguiente intento de descolonización de enterococos del tracto intestinal de ratones naturalmente portadores de la cepa ENC57 se realizó utilizando una mezcla o cóctel de tres bacteriófagos líticos sobre dicha cepa. Se emplearon los fagos Φ BE2, Φ BE3 y Φ BE5 aislados en esta investigación. El diseño experimental fue el mismo al seguido en los dos intentos de descolonización descritos previamente en este capítulo.

Se realizaron diluciones en el agua de bebida de los ratones de las suspensiones de alto título de cada uno de los fagos hasta lograr concentraciones aproximadas de $1,5 \times 10^8$, $3,5 \times 10^9$ y $2,5 \times 10^8$ ufp/ml de agua para los fagos Φ BE2, Φ BE3 y Φ BE5 respectivamente. Los resultados se muestran en la figura 47. En ella se observan descensos rápidos y de hasta 4 log a partir del día posinfección en el grupo tratado. Sin embargo tampoco se obtuvo una completa descolonización de enterococos en la materia fecal de los ratones de dicho grupo. Los recuentos de enterococos permanecieron estables hasta el fin del experimento y no se observó un comportamiento sinérgico entre los tres fagos con respecto a las concentraciones halladas al utilizarlos separados en los experimentos anteriores.

Conclusiones del capítulo 3

- En los experimentos realizados en esta parte del proyecto se logró demostrar la capacidad lítica de los bacteriófagos ensayados tanto *in vitro* como *in vivo*. Se pusieron a punto las diferentes variables para trabajar con el modelo *in vitro* como con el modelo animal. Se trabajó con los diferentes bacteriófagos aislados y se concluyó que los mismos eran capaces de lisar diferentes aislamientos clínicos de enterococos tanto sensibles como resistentes a vancomicina. Los ensayos realizados en el modelo de descolonización con células Caco-2, demostraron que la actividad de los bacteriófagos se mantenía aún cuando las bacterias estaban adheridas a las microvellosidades. Se ensayaron diferentes variables para intentar determinar las vías y concentraciones óptimas de administración de los bacteriófagos en modelo murino. Se concluyó que la vía óptima de administración de las suspensiones de bacteriófagos de concentración conocida era la vía oral no forzada mediante la dilución de estas suspensiones en agua de bebida.
- En los experimentos 1 y 2 se ensayó la capacidad de descolonización de los bacteriófagos Φ BE2 y Φ BE3 respectivamente sobre enterococos que formaban parte de la microbiota indígena de una población de ratones. Estos ensayos concluyeron en que los recuentos bacterianos disminuían luego de la aplicación la suspensión fágica pero sin lograrse una completa descolonización al cabo del experimento. En un tercer experimento se ensayó la capacidad de un cóctel compuesto por los fagos Φ BE2, Φ BE3 y Φ BE5. Los resultados de estos ensayos indican que la utilización de la mezcla de fagos logró hacer descender los títulos de enterococos en la materia fecal expulsada por los ratones del grupo tratado en comparación con el grupo control. Sin embargo la descolonización no fue

completa en ninguno de los ratones del grupo tratado y no se observó un comportamiento sinérgico entre los fagos. De todos modos, la utilización de un cóctel de fagos podría prevenir la aparición de mutantes resistentes a alguno de ellos.

- Los ensayos in vivo evidencian la potencialidad de los bacteriófagos seleccionados en la descolonización selectiva de enterococos y abren el campo para diseñar nuevas estrategias de descolonización como la de ensayar un cóctel de fagos en combinación con antibióticos o enzimas líticas o prolongar los días de administración entre otras variables a ensayar.

DISCUSIÓN

Teniendo en cuenta el objetivo a largo plazo del proyecto que es la utilización de bacteriófagos como agentes terapéuticos en pacientes colonizados con cepas de enterococos resistentes a vancomicina, este trabajo se centralizó primeramente en el aislamiento de bacteriófagos líticos potencialmente útiles para este fin. Se trabajó en la puesta a punto de sistemas de aislamiento descritos en la bibliografía y se lograron aislar cinco bacteriófagos líticos estrictos sobre diferentes cepas de enterococos. Se los designó Φ BE1, Φ BE2, Φ BE3, Φ BE4 y Φ BE5 respectivamente, siguiendo las reglas de nomenclatura internacional (ICTV). Se determinó además un método para el correcto almacenamiento de suspensiones fágicas a largo plazo, concluyendo al final de los ensayos que el sistema que mejor garantiza la viabilidad y estabilidad de estas suspensiones es la conservación a -20°C en *buffer* SM (Clokier *et al* 2009; Clark W, 1962; Date *et al*, 2010; Day *et al*, 2007).

Se estudió la cinética de lisis de cada uno de los fagos sobre sus respectivas cepas hospedadoras. De estos ensayos se puede concluir que todos los bacteriófagos aislados siguen el ciclo lítico y por lo tanto son potencialmente útiles a los fines de ser utilizados como agentes terapéuticos.

Para realizar un estudio morfológico de los bacteriófagos aislados se tomaron microfotografías electrónicas de transmisión.

Se determinó el espectro de infección de cada uno de los bacteriófagos. Uno de ellos Φ BE1 resultó ser lítico únicamente sobre la cepa EN 307 de *Enterococcus faecalis* en la cual fue aislado. El resto de los fagos tuvo un espectro de infectividad más amplio y presentaron actividad lítica sobre varias cepas de diferentes especies del género, incluidas varias cepas de EVR.

En base a su amplio espectro de infectividad y su cinética de lisis adecuada, se escogió al bacteriófago Φ BE2 para una caracterización más detallada.

Se extrajo el material genético del fago Φ BE2 y se determinó que consiste de ADN de doble cadena, al igual que el del resto de los fagos de este estudio. El mismo fue digerido utilizando diferentes enzimas de restricción.

Se secuenció el el genoma de Φ BE2 para conocer si contenía regiones que codificaran genes de resistencia antimicrobiana o factores de virulencia capaces de ser transferidos horizontalmente entre diferentes cepas en el proceso infectivo,.

El proceso de clonado incluyó, luego de la extracción y restricción del ADN, la inserción de estos fragmentos en el vector de clonado pUC 19 mediante la metodología conocida como “*shotgun*”, que consiste en la ligación de los fragmentos a clonar con el plásmido previamente digerido con la misma enzima seguido de la transformación de los plásmidos recombinantes en células competentes, a partir de las cuales los mismos fueron recuperados. La secuenciación se realizó mediante secuenciadores automáticos utilizando la metodología de Sanger.

Durante el análisis de las secuencias obtenidas no se detectaron genes de virulencia o de resistencia antibiótica. Se detectaron genes implicados en la codificación de proteínas y enzimas involucradas en el ciclo infectivo del fago.

Se identificó la secuencia codificante de la enzima endolisina, que actúa al final del ciclo lítico atacando la pared celular de la bacteria para generar la salida de las partículas infectivas al medio externo y recomenzar el ciclo.

La secuencia de la endolisina de 802 nucleótidos fue insertada en el vector de expresión pMalc2x y el plásmido insertado en células competentes *E.coli* DH5 α

Se realizó un análisis computacional *in silico* para intentar predecir las estructuras secundarias y terciarias de la endolisina del fago Φ BE2. Se observó que la estructura

secundaria estaba conformada por regiones con láminas β y otras con hélices α . La estructura terciaria muestra la disposición tridimensional y organizada entre las láminas plegadas β y hélices α , organización que coincide con lo descrito en la bibliografía para enzimas de esta familia.

En base a características morfológicas y luego de una comparación de homología de ácidos nucleicos y aminoacídica con las respectivas bases de datos, se determinó que el fago Φ BE2 pertenecería a la familia *Siphoviridae*.

En el modelo de descolonización in vitro, el título de enterococos disminuyó a medida que se aumentó la concentración del fago. Sin embargo, se vio que la eliminación no era total y que a su vez el grado de descolonización estaba en relación directa con la multiplicidad de infección. Se realizaron experimentos para evaluar la capacidad de las suspensiones de fagos en la descolonización del tracto gastrointestinal. En diferentes ensayos se observó que en los grupos de ratones tratados con las suspensiones fágicas individuales o con un cóctel de tres fagos los recuentos de enterococos disminuyeron en valores estadísticamente significativos comparando con los grupos controles. Sin embargo tampoco se logró la descolonización completa.

En conclusión, el bacteriófago Φ BE2 presenta características que nos permiten inferir su posible uso en la descolonización de pacientes portadores de EVR.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo alientan la realización de nuevos ensayos en modelo animal para abordar el desafío de la descolonización completa recurriendo a herramientas como la sinergia con antibióticos o la utilización de las enzimas líticas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abedon ST. 2008. Bacteriophage ecology: population growth, evolution and impact of bacterial viruses. Cambridge University Press, Cambridge, New York.
2. Abuladze T, Li M, Menetrez M, Dean T, Senecal A, Sulakvelidze A. 2008. "Bacteriophages reduce experimental contamination of hard surfaces, tomato, spinach, broccoli, and ground beef by Escherichia coli O157:H7," Applied and Environmental Microbiology. 74:6230–6238,
3. Abedon ST, Culler R. 2007. Bacteriophage evolution given spatial constraint. J Theor Biol **249**: 111-119
4. Ackermann H, Tremblay D, Moineau S. 2004. Long-term bacteriophage preservation. World Federation for Culture Collections Newsletter. **38**:35-40
5. Ackermann H, Dubow M. 1987. Viruses of prokaryotes, p. 13–28. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fl.
6. Ackerman H. 2001. Frequency of morphological phage descriptions in the year 2000. Arch Virol. **146**:843-857.
7. Ackerman H. 2003. Bacteriophage observations and evolution. Res Microbiol. **154**:245-251.
8. Alisky J, Iczkowski K, Rapoport A, Troitsky N. 1998. Bacteriophages show promise as antimicrobial agents. J. Infect. **36**:5-15.
9. Altschul S, Madden T, Schaffer A, Zhang Z, Miller W, Lipman D. 1997. Gapped Blast and PSI-BLAST: a new generation of protein database search program. Nucleic Acids Res. **25**:3389-3402.

10. Andreatti Filho R, Higgins J, Higgins S. 2007. Ability of bacteriophages isolated from different sources to reduce *Salmonella enterica* serovar *Enteritidis* in vitro and in vivo. *Poultry Science*. 86:1904–1909,
11. Arendt EK, Daly C, Fitzgerald GF, Van de Guchte M. 1994. Molecular characterization of lactococcal bacteriophage Tuc2009 and identification and analysis of genes encoding lysin, a putative holin, and two structural proteins. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:1875-1883.
12. Arthur M, Quintiliani R. 2001. Regulation of VanA- and VanB-type glycopeptide resistance in enterococci. *Antimicrob Agents Chemother.* **45**:375-81.
13. Atterbury R, Connerton P, Dodd C, Rees E, Connerton I. 2003. Application of host-specific bacteriophages to the surface of chicken skin leads to a reduction in recovery of *Campylobacter jejuni*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:6302–6306.
14. Atterbury R, van Bergen M, Ortiz F. 2007. Bacteriophage therapy to reduce *Salmonella* colonization of broiler chickens. *Applied and Environmental Microbiology*.73: 4543–4549.
15. Austrian R. 1994. Confronting drug-resistant pneumococci. 1994. *Ann Intern Med.* **121**:807-809.
16. Bach S, McAllister T, Veira D, Gannon V, Holley R. 2003. “Effect of bacteriophage DC22 on *Escherichia coli* O157:H7 in an artificial rumen system (Rusitec) and inoculated sheep,” *Animal Research*.52:89–101,
17. Baden L, Thiemke W, Skolnik A, Chambers R, Strymish J, Gold H, Moellering R, Eliopoulos G. 2001. Prolonged colonization with vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in long-term care patients and the significance of "clearance". *Clin Infect Dis.* **33**:1654-1660.

18. Barrow P A, Soothill J S.1997. Bacteriophage therapy and prophylaxis: rediscovery and renewed assessment of potential. *Trends Microbiol.* **7**: 268-271.
19. Bigwood T, Hudson J, Billington C, Carey Smith G, Heinemann J. 2008. Phage inactivation of foodborne pathogens on cooked and raw meat. *Food Microbiol* **25**:400-406
20. Birnboim H, Doly J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**:1513-1523.
21. Biswas B, Adhya S, Washart P, Paul B, Trostel AN, Powell B, Carlton R, Merrill CR. 2002. Bacteriophage Therapy rescues bacteremic mice from a clinical isolate of vancomycin-resistant *Enterococcus Faecium*. *Infect Immun.* **70**: 204-210.
22. Borie C, Albala I, Sánchez P. 2008. Bacteriophage treatment reduces *Salmonella* colonization of infected chickens. *Avian Diseases.* **52**: 64–67.
23. Borysowski J, Weber-Dabrowska B, Górski A. Bacteriophage endolysins as a novel class of antibacterial agents. *Exp Biol Med.* 2006.231:366-77.
24. Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS, Edwards JE, Gilbert D, Rice LB, Scheld M, Spellberg B, Bartlett J. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 2009.48:1-12.
25. Boyce J, Mermel L, Zervos M, Rice L, Potter- Bynoe G, Giorgio C, Medeiros A.1995 Controlling vancomycin-resistant enterococci. *Infect Control Hosp Epidemiol.* **16**:634-637.
26. Boyd E, Brussow H. 2002. Common themes among bacteriophage- encoded virulence factors and diversity among the bacteriophages involved. *Trends Microbiol.* **10**:521–529.

27. Bradley D. 1967. Ultrastructure of bacteriophages and bacteriocins. *Bacteriol Rev.* **31**:230-314.
28. Brussow H. 2005. Phage therapy: the *Escherichia coli* experience. *Microbiology.* **151**:2133-2140.
29. Brussow, H., C. Canchaya, and W. D. Hardt. 2004. Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**:560–602.
30. Bueno E, García P, Martínez B, Rodríguez A. 2012. Phage inactivation of *Staphylococcus aureus* in fresh and hard-type cheeses. *International Journal of Food Microbiology.* **158**:23–27.
31. Calendar R. 2006. *The Bacteriophages.* Ed 2nd. Oxford University Press, Oxford; New York.
32. Callaway T, Edrington T, Brabban A, Anderson R, Rossman M, Engler J, Carr M, Genovese K, Keen J, Lopper M, Kutter E, Nisber D. 2008. Bacteriophage isolated from feedlot cattle can reduce *Escherichia coli* O157: H7 populations in ruminant gastrointestinal tracts. *Foodborne Pathog Dis.* **5**:183-191
33. Canchaya C, Proux G, Fournous A, Bruttin H, Brussow H. 2003. Prophage genomics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**:238–276.
34. Capparelli R, Parlato M, Borriello G, Salvatore P, Iannelli D. 2007. Experimental phage therapy against *Staphylococcus aureus* in mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**:2765–2773.
35. Carlton RM. 1999. Phage therapy: past history and future prospects. *Arch Immunol Ther Exp.* **47**: 267–274.
36. Carlton R, Noordman W, Biswas B, de Meester E, Loessner M. 2005. Bacteriophage P100 for control of *Listeria monocytogenes* in foods:

- genome sequence, bioinformatic analyses, oral toxicity study, and application. Regul Toxicol Pharmacol 43: 301–312.
37. Carvalho C. 2010. The in vivo efficacy of two administration routes of a phage cocktail to reduce numbers of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* in chickens. BMC Microbiol. 10:232.
38. Cervený K, De Paola A, Duckworth H, Gulig P. 2002. Phage therapy of local and systemic disease caused by *Vibrio vulnificus* in iron- dextran-treated mice. Infect. Immun. 70:6251–6262.
39. Cheng Q, Nelson D, Zhu S, Fischetti V. 2005. Removal of group B streptococci colonizing the vagina and oropharynx of mice with a bacteriophage lytic enzyme. Antimicrob Agents Chemother. 49:111-117.
40. Chivani-Chenoufi S, Sidoti J, Bruttin A, Kutter E, Sarker S, Brussow H. 2004. In vitro and in vivo bacteriolytic activities of *Escherichia coli* phages: implications for phage therapy. Antimicrob Agents Chemother. 48:2558-2569.
41. Chivani-Chenoufi S, Sidoti J, Bruttin A, Kutter E, Quadri F, Sarker S, Brussow H. 2004. Isolation of *Escherichia coli* bacteriophages from the stool of pediatric diarrhea patients in Bangladesh. J Bacteriol. 186: 8287-8294
42. Clark W. 1962. Comparison of several methods for preserving bacteriophages. Appl Microbiol. 10:466-471.
43. Clark J, March J. 2006. Bacteriophages and biotechnology: vaccines, gene therapy and antibacterials. Trends Biotechnol 24: 212–218.
44. Climo M, Patron R, Goldstein B, Archer G. 1998. Lysostaphin treatment of experimental methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* aortic valve endocarditis. Antimicrob Agents Chemother. 42:1355–60.
45. Clokie M, Kropinski A. 2009. Bacteriophages: methods and protocols. Humana

- Press. London Springer distributor. Totowa NJ.
46. Dahl K, Simonsen G, Olsvik O, Sundsfjord A. 1999. Heterogeneity in the vanB gene cluster of genomically diverse clinical strains of vancomycin-resistant enterococci. *Antimicrob Agents Chemother.* **43**:1105-1510.
 47. Damasko C, Konietzny A, Kaspar H, Appel B, Dersch P, Strauch E. Studies of the efficacy of Enterocoliticin, a phage-tail like bacteriocin, as antimicrobial agent against *Yersinia enterocolitica* serotype O3 in a cell culture system and in mice. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2005.52:171-9.
 48. Date P, Samad A, Devarajan P. 2010. Freeze thaw: a simple approach for prediction of optimal cryoprotectant for freeze drying. *AAPS Pharm Sci Tech.* 11:304-311.
 49. Day J, Stacey G. 2007. Cryopreservation and freeze-drying protocols, Ed 2nd. Humana Press. Totowa NJ
 50. Daw MA, Falkiner FR. Bacteriocins: nature, function and structure. *Micron* 1996.27:467-79.
 51. Denou E, Bruttin A, Barreto C, Ngom-Bru C, Brussow H, Zuber S. 2009. T4 phages against *Escherichia coli* diarrhea: potential and problems. *Virology.* **388**:21-30.
 52. Deshpande L, Fritsche T, Moet G, Biedenbach D, Jones R. 2007 Antimicrobial resistance and molecular epidemiology of vancomycin-resistant enterococci from North America and Europe: a report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. *Diagn Microbiol Infect Dis* 58: 163–170.
 53. Deutsch S, Guezenec S, Piot M, Foster S, Lortal S. 2004. Mur-LH, the broad-spectrum endolysin of *Lactobacillus helveticus* temperate bacteriophage ϕ 0303. *Appl Environ Microbiol.* **70**: 93-103.

54. D'Herelle F. *Le Bactériophage et ses Applications Thérapeutiques*. Doin, Paris 1933.
55. Dini C, De Urza P. 2010. Isolation and selection of coliphages as potential biocontrol agents of enterohemorrhagic and Shiga toxin-producing *E. coli* (EHEC and STEC) in cattle. *J Appl Microbiol.* 109:873-879
56. Dodgson K. 2004. VRE Detection: A new gold standard?. *Clinical Microbiol. Newsl.* **26**: 25-30.
57. Duquesne S, Petit V, Peduzzi J, Rebuffat S. Structural and functional diversity of microcins, gene-encoded antibacterial peptides from enterobacteria. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 2007.13:200-9.
58. Dutka-Malen S. 1994. Emergence of high- level resistance to glycopeptides in *Enterococcus gallinarum* and *Enterococcus casseliflavus*. *Antimicrob Agents Chemother.* **38**:1675-1677.
59. Dykes G, Moorhead S. 2002. Combined antimicrobial effect of nisin and a listeriophage against *Listeria monocytogenes* in broth but not in buffer or on raw beef. *International Journal of Food Microbiology.*73:71–81,
60. Eisenstark, A. 1967. Bacteriophage techniques. In: Maramorosch, K., Koprowski, H. (eds.), *Methods in Virology*, vol. 1. Academic Press, New York, pp. 449-525.
61. El-Shibiny A. 2009. Application of a group II *Campylobacter* bacteriophage to reduce strains of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* colonizing broiler chickens. *J. Food Prot.* 72:733–740.
62. Fernebro J. 2011. Fighting bacterial infections-future treatment options. *Drug Resist Updat.* 14(2):125-39.
63. Fiorentin L, Vieira N, Barioni W Jr. 2005. Oral treatment with bacteriophages

- reduces the concentration of *Salmonella* Enteritidis PT4 in caecal contents of broilers. *Avian Pathology*. 34: 258–263.
64. Fleming A. 1929. On the antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenza*. *British Journal of Experimental Pathology* 10: 226-36.
65. Fraenkel-Conrat, H., 1974. Descriptive catalogue of viruses. In: Fraenkel-Conrat, H., Wagner, R.R. (eds.), *Comprehensive Virology*, vol. 1, Plenum Press, New York, pp. 121-156.
66. Fu W, Forster T, Mayer O, Curtin JJ, Lehman SM, Donlan RM. Bacteriophage cocktail for the prevention of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* on catheters in an *in vitro* model system. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010:397-404.
67. Garcia Aljaro C, Muniesa M, Jofre J, Blanch A. 2006. Newly identified bacteriophages the carrying stx2g Shiga toxin gene isolated from *Escherichia coli* strains in polluted water. *FEMS Microbiol Lett*.258:227-235.
68. García P, Ladero V, Suárez J. 2003. Análisis of the morphogenetic cluster and genome of the temperate *Lactobacillus casei* bacteriophage A2. *Arch Virol*. 148:1051-1070.
69. Garcia P, Martinez B, Obeso J, Rodriguez A. 2008. Bacteriophages and their applications in food safety. *Lett Appl Microbiol*. 47:479-485.
70. García P, Madera C, Martínez B, Rodríguez A. 2007. Biocontrol of *Staphylococcus aureus* in curd manufacturing processes using bacteriophages. *International Dairy Journal*.17:1232–1239.
71. Gill J, Pacan J, Carson M, Leslie E, Griffiths M, Sabour P. 2006. Efficacy and

- pharmacokinetics of bacteriophage therapy in treatment of subclinical *Staphylococcus aureus* mastitis in lactating dairy cattle. *Antimicrob Agents Chemother* 50: 2912–2918.
72. Gold H, Moellering R. 1996. Antimicrobial Drug Resistance. *N Engl J Med.* **335**:1445-1453.
73. Goode D, Allen V, Barrow P. 2006 Reduction of experimental Salmonella and Campylobacter contamination of chicken skin by application of lytic bacteriophages. *Appl Environ Microbiol.* 69: 5032-5036.
74. Greer G. 2005. Bacteriophage control of foodborne bacteria, *Journal of Food Protection.* vol. 68:1102–1111.
75. Guenther S, Herzig O, Fieseler L, Klumpp J, Loessner M. 2012. Biocontrol of Salmonella Typhimurium in RTE foods with the virulent bacteriophage FO1-E2. *International Journal of Food Microbiology.* 154:66–72.
76. Guenther S, Huwyler D, Richard S, Loessner M. 2009. Virulent bacteriophage for efficient biocontrol of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. *Applied and Environmental Microbiology.* 75:93–100.
77. Guttman B, Raya R, Kutter E. 2005. Basic Phage Biology. En E Kutter, A Sulakvelizde eds. *Bacteriophages: Biology and applications.* CRC Press, Boca Raton, FL. Pag 42-79.
78. Hagens S, Habel A, von Ahsen U, von Gabain A, Blasi U. 2004. Therapy of experimental Pseudomonas infections with a nonreplicating genetically modified phage. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48:3817–3822.
79. Hagens S, Loessner M. 2007. Application of bacteriophages for detection and control of foodborne pathogens. *Appl Microbiol Biotechnol* 76: 513–519.
80. Hall T. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and

- analysis program for Window 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series. 41:95-98.
81. Hancock L, Gilmore M. 2000. Pathogenicity of enterococci, p. 251-258. En Fischetti V, Novick R, Ferretti J, Portnoy D, Rood J, Gram-Positives Pathogens. ASM Press, Washington D.C., EUA.
 82. Hanlon G. 2007. Bacteriophage: an appraisal of their role in the treatment of bacterial infections. Int J Antimicrob Agent. 30: 118-128.
 83. Hausler T. 2006. Viruses vs superbugs: a solutions a antibiotics crisis?. Mc Millan Basingstoke
 84. Hazem A. 2002. Effect of temperatures, pH- values, ultra-violet light , ethanol and chloroform on the growth of the isolated thermophilic Bacillus phages. New Microbiol. 25:469-476.
 85. Higgins J, Higgins S, Guenther K. 2005. Use of a specific bacteriophage treatment to reduce *Salmonella* in poultry products. Poultry Science.84:1141–1145,
 86. Higgins S, Higgins J, Bielke L, Hargis B. 2007. Selection and application of Bacteriophages for Treating *Salmonella enteritidis* Infections in Poultry. Int J Poult Sci .6:163–168.
 87. Holck A, Berg J. 2009. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cooked ham by virulent bacteriophages and protective cultures. Applied and Environmental Microbiology.75:6944–6946.
 88. Hooton S, Atterbury R, Connerton F. 2011. Application of a bacteriophage cocktail to reduce *Salmonella Typhimurium* U288 contamination on pig skin. International Journal of Food Microbiology.151:157–163.
 89. Housby J, Mann N. 2009. Phage Therapy. Drug Discov Today. 14:536-540.

90. <http://www.virustaxonomyonline.com>
91. Huff W, Huff G, Rath N, Donoghue A. 2006. "Evaluation of the influence of bacteriophage titer on the treatment of colibacillosis in broiler chickens," Poultry Science. 85:1373–1377.
92. Hurley A, Maurer J, Lee M. 2008. Using bacteriophages to modulate Salmonella colonization of the chicken's gastrointestinal tract: lessons learned from in silico and in vivo modeling. Avian Dis. 52: 599-607.
93. Hyman P, Abedon S. 2009. Practical methods for determining phage growth parameters. Methods Mol Biol. 501:175-202.
94. Im J, Baik J, Kim K, Kang S, Jeon J, Park O, Kim H, Kum K, Yun CH2, Han S. 2015. Enterococcus faecalis lipoteichoic acid suppresses Aggregatibacter actinomycetemcomitans lipopolysaccharide-induced IL-8 expression in human periodontal ligament cells. Int Immunol. 2015 Apr 3
95. Inal JM.2003. Phage therapy: a reappraisal of bacteriophages as antibiotics. Arch Immunol Ther Exp. 51:237-44.
96. International Committee on Taxonomy of Viruses. Van Regenmortel M. International Union of Microbiological Societies. Virology Division. 2000. Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press, San Diego.
97. Jado I, Lopez R, Garcia E, Fenoll A, Casal J, Garcia P. 2003. Phage lytic enzymes as therapy for antibiotic-resistant Streptococcus pneumoniae infection in a murine sepsis model. J Antimicrob Chemother. 52:967-973.
98. Jeric PE. 2001. Caracterización molecular de una cepa de *Streptococcus* grupo G con alto nivel de resistencia a aminoglucósidos: análisis epidemiológico de la

dispersión de dicha resistencia en una población de bacterias gram positivas.

Tesis Doctoral. Facultad de Medicina. Universidad de Buenos Aires.

99. Jett B, Huycke M, Gilmore M. 1994. Virulence of enterococci. *Clin Microbiol Rev.* 7: 462-478.
100. Johnson R, Gyles C, Huff W, Ojha S, Huff G, Rath N, Donoghue A. 2008. Bacteriophages for prophylaxis and therapy in cattle poultry and pigs. *Anim Health Res Rev.* 9:201-215.
101. Kaczkowski H, Weber-Dabrowska B, Dabrowski M, Zdrojewicz Z, Cwioro F. 1990. Use of bacteriophages in the treatment of chronic bacterial diseases. *Wiad Lek.* 43:136–141.
102. Kasman L, Kasman A, Westwater C, Dolan J, Schmidt J, Norris J. 2002. Overcoming the phage replication threshold: a mathematical model with implications for phage therapy. *J Virol.* 76: 5557-5564.
103. Klare I, Rodloff A, Wagner J, Witte W, Hakenbeck R. 1994. Overproduction of a penicillin-binding protein is not the only mechanism of penicillin resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother.* 36:783-787.
104. Kokai-Kun J, Walsh SM, Chanturiya T, Mond JJ. 2003. Lysostaphin cream eradicates *Staphylococcus aureus* nasal colonization in a cotton rat model. *Antimicrob Agents Chemother.* 47:1589–97.
105. Kropinski J
106. Kutter E and Sulakvelizde A. 2005. Bacteriophages biology and applications. CRC Press, Inc, Boca Raton, Fla
107. Lancefield R. 1933. A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. *The Journal of Experimental Medicine.* 57:

- 571-595.
108. Lavigne R. 2009. Classification of Myoviridae bacteriophages using protein sequence similarity. *BMC Microbiol.* 9:224.
 109. Lee N, Harris L. 2001. The effect of bacteriophage treatment as a preharvest intervention strategy to reduce the rapid dissemination of *Salmonella typhimurium* in pigs. En *Proceedings of the American Association of Swine Veterinarians.* 555–557,
 110. Leverentz B, Conway W, Alavidze Z. 2001. Examination of bacteriophage as a biocontrol method for *Salmonella* on fresh-cut fruit: a model study,” *Journal of Food Protection.* 64:1116–1121.
 111. Leverentz B, Conway W, Camp M. 2003. Biocontrol of *Listeria monocytogenes* on fresh-cut produce by treatment with lytic bacteriophages and a bacteriocin. *Applied and Environmental Microbiology.* 69: 4519–4526.
 112. Leverentz B, Conway W, Janisiewicz W, Camp M. 2004. Optimizing concentration and timing of a phage spray application to reduce *Listeria monocytogenes* on honeydew melon tissue. *Journal of Food Protection.* 67:1682–1686,
 113. Levin J, Bull J. 1996. Phage therapy revisited: the population biology of a bacterial infection and its treatment with bacteriophage and antibiotics. *Am Naturalist.* **147**: 881-898.
 114. Lim T, Lee D, Lee Y. Efficacy of bacteriophage therapy on horizontal transmission of *Salmonella Gallinarum* on commercial layer chickens. *Avian Diseases.* 55:435–438, 2011.
 115. Little J. 2005. Lysogeny, prophage induction, and lysogenic conversion. En: Waldor MK, Friedman DI, Adhya SL, editors. *Phages: Their Role in*

- Bacterial Pathogenesis and Biotechnology. Washington DC: ASM Press. pp. 37–65.
116. Lleó M, Canepari P, Cornaglia G, Fontana R, Satta G. 1987. Bacteriostatic and bactericidal activities of beta-lactams against *Streptococcus (Enterococcus) faecium* are associated with saturation of different penicillin-binding proteins. *Antimicrob Agents Chemother.* **31**:1618-1626.
117. Loc Carrillo C, Atterbury R, El-Shibiny P, Connerton E, Dillon A, Scott T, Connerton I. 2005 Bacteriophage therapy to reduce *Campylobacter jejuni* colonization in broilers chickens. *Appl Environ Microbiol.* **71**:6554-6563
118. Loeffler JM, Nelson D, Fischetti VA. Rapid killing of *Streptococcus pneumoniae* with a bacteriophage cell wall hydrolase. *Science* 2001.294:2170-2.
119. Lopardo H, Corso A, Gagetti P, Carbonaro M, Andino E, Ruvinsky S, Torroija C, Mastroianni A, Bologna R. 2005. XVIth Lancefield Internacional Symposium on Streptococci and Streptococcal Diseases. Cairns, Australia. Abstract. N° 198.
120. Lopardo H, Venuta M, Ruboglio E. 1995. Penicillin resistance and aminoglycoside-penicillin synergy in enterococci. *Chemotherapy.* **41**: 165-171.
121. Lopardo H. 1980. Aislamiento y caracterización de bacteriófagos de *Rhizobium*. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata.
122. Lopez R, Gonzalez M, Garcia E, Garcia J, Garcia P. 2000. Biological roles of two new murein hydrolases of *Streptococcus pneumoniae* representing examples of module shuffling. *Res. Microbiol.* **151**:437–443.
123. Luke K, Radek A, Liu X, Campbell J, Uzan M, Haselkorn R, Kogan Y.

2002. Microarray analysis of gene expression during bacteriophage T4 infection. *Virology*. **299**:182-191.
124. Ma Y, Pacan J, Wang Q. 2008. "Microencapsulation of bacteriophage *phi*1 into chitosan-alginate microspheres for oral delivery," *Applied and Environmental Microbiology*. **74**:4799–4805.
125. Martínez B, Obeso J, Rodríguez A, García P. 2008. Nisin-bacteriophage crossresistance in *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Food Microbiology*. **122**:253–258.
126. Marza J, Soothill JS, Boydell P, Collyns T. 2006. Multiplication of therapeutically administered bacteriophages in *Pseudomonas aeruginosa* infected patients. *Burns* **32**: 644–646.
127. Matsuzaki S, Yasuda M, Nishikawa H. 2003. Experimental protection of mice against lethal *Staphylococcus aureus* infection by novel bacteriophage fMR11. *J Infect Dis*. **187**:613–24.
128. Matsuzaki S, Rashel M, Uchiyama J, Sakurai S, Ujihara T, Kuroda M, Ikeuchi M, Tani T, Fujieda M, Wakiguchi H, Imai S. 2005. Bacteriophage therapy: a revitalized therapy against bacterial infectious diseases. *J. Infect. Chemother*. **11**:211–219.
129. McKinstry M, Edgar R. 2005. Use of phages in therapy and bacterial detection, In Waldor MK, Friedman DI, Adhya S. In: Waldor MK, Friedman DI, Adhya S, editors. *Phages: Their Role in Bacterial Pathogenesis and Biotechnology*. Washington, DC: ASM Press. pp. 430–440.
130. McVay CS, Velásquez M, Fralick JA. Phage therapy of *Pseudomonas aeruginosa* infection in a mouse burn wound model. *Antimicrob Agents Chemother*. **2007**. **51**:1934-8.

131. Meladze G, Mebuke M, Chkhetia N, Kiknadze N, Koguashvili G, Timoshuk I, Larionova N, Vasadze G. 1982. The efficacy of staphylococcal bacteriophage in treatment of purulent diseases of lungs and pleura. *Grudn Khir.* **1**:53–56.
132. Merril C, Biswas B, Carlton R, Jensen NS, Creed G, Zullo S, Adhya S. 1996. Long-circulating bacteriophage as antibacterial agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **8**: 3188-3192.
133. Merril C, Scholl D, Adhya SL. 2003. The prospect of bacteriophage therapy in western medicine. *Nat Rev Drug Discov.* **2**:489–97.
134. Merril C, Scholl D, Adhya S .2006. Phage therapy. *The Bacteriophages, Second Edition* (Calendar R & Abedon ST, eds), pp. 725–741. Oxford University Press, New York.
135. Miedzybrodzki R, Fortuna W, Weber-Dabrowska B, Gorski A. 2005. Bacterial viruses against viruses pathogenic for man? *Virus Res.* **110**:1–8.
136. Moradpour Z, Ghasemian A. 2011. Modified phages: novel antimicrobial agents to combat infectious diseases. *Biotechnol Adv.* **29**(6):732-8
137. Murray BE. 2000. Vancomycin-resistant enterococcal infections. *N. Engl. J. Med.* **342**: 710–721.
138. Murray B, Lopardo H, Rubeglio E, Frosolono M, Singh K. 1992. Intrahospital spread of a single gentamicin-resistant, beta-lactamase-producing strain of *Enterococcus faecalis* in Argentina. *Antimicrob Agents Chemother.* **36**:230-232.
139. Murray B, Mederski-Samoraj B. 1983. Transferable beta-lactamase. A new mechanism for in vitro penicillin resistance in *Streptococcus faecalis*. *J Clin Invest.* **72**:1168-1171.
140. Murray B. 1990. The life and times of the *Enterococcus*. *Clin Microbiol*

Rev. 3:46-65.

141. National Committee for Clinical laboratory Standards. 2003a. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test, 8th ed. M2-A8. National Laboratory for Clinical laboratory Standards. Wayne, PA.EEUU.
142. National Committee for Clinical laboratory Standards. 2003b. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically, 6thed. M7-A6. National Laboratory for Clinical laboratory Standards. Wayne, PA.EEUU.
143. Nelson D, Loomis L, Fischetti VA. Prevention and elimination of upper respiratory colonization of mice by group A streptococci by using a bacteriophage lytic enzyme. Proc Natl Acad Sci U S A 2001.98:4107-12.
144. Niu Y, Xu Y, McAllister T.2008.Comparison of fecal versus rectoanal mucosal swab sampling for detecting Escherichia coli O157:H7 in experimentally inoculated cattle used in assessing bacteriophage as a mitigation strategy,” Journal of Food Protection. 71:691–698,
145. O’Flaherty S, Coffey A, Meaney W, Fitzgerald GF, Ross RP. 2005. The re- combinant phage lysin LysK has a broad sprectrum of lytic activity against clinically relevant staphylococci including methicillin-resistant Staphylococcus aureus. J Bacteriol.187:7161–4.
146. O’Flaherty S, Ross R, Flynn J, Meaney W, Fitzgerald G, Coffey A. 2005. Isolation and characterization of two anti-staphylococcal bacteriophages specific for pathogenic Staphylococcus aureus associated with bovine infections. Letters in Applied Microbiology.41:482–486.
147. O’Flynn G, Ross R, Fitzgerald G, Coffey A.2004. “Evaluation of a cocktail of three bacteriophages for biocontrol of Escherichia coli O157:H7,”

- Applied and Environmental Microbiology, vol. 70, no. 6, pp. 3417–3424,
148. Oliveira A, Sereno R, Azeredo .2010. “In vivo efficiency evaluation of a phage cocktail in controlling severe colibacillosis in confined conditions and experimental poultry houses,” *Veterinary Microbiology*.146:303–308,
 149. Parisien A, Allain B, Zhang J, Mandeville R, Lan C. 2008. Novel alternatives to antibiotics: bacteriophages, bacterial cell wall hydrolases, and antimicrobial peptides. *J Appl Microbiol*.104(1):1-13
 150. Patel R, Pipper K, Franklin R, Steckelberg J, Yousten A. 2000. The Biopesticide *Paenibacillus popilliae* has a Vancomycin Resistance Gene Cluster Homologous to the Enterococcal VanA Vancomycin Resistance Gene Cluster. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **44**:705-709.
 151. Patel J, Sharma M, Millner P, Calaway T, Singh M. 2011. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 attached to spinach harvester blade using bacteriophage. *Foodborne Pathogens and Disease*. 8:541–546.
 152. Payne R, Jansen V. Pharmacokinetic principles of bacteriophage therapy. *Clin Pharmacokinet*. 2003.42:315-25.
 153. Payne R, Jansen VA. 2000.Phage therapy, the peculiar kinetics of self - replicating pharmaceuticals. *Clin Pharmacol Ther.*;68:225–230
 154. Perepanova T, Darbeeva O, Kotliarova G, Kondrateva E, Maiskaia L, Malysheva V, Baiguzina F, Grishkova N. 1995. The efficacy of bacteriophage preparations in treating inflammatory urologic diseases. *Urol Nefrol*. **5**:14–17.
 155. Raya R, Varey P,Oot R .2006.“Isolation and characterization of a new T-even bacteriophage, CEV1, and determination of its potential to reduce *Escherichia coli* O157:H7 levels in sheep,” *Applied and Environmental Microbiology*. 72:6405–6410.

156. Raya R, Oot R, Moore-Maley B. 2011. "Naturally resident and exogenously applied T4-like and T5-like bacteriophages can reduce Escherichia coli O157:H7 levels in sheep guts," *Bacteriophage*, vol. 1, no. 1, pp. 15–24,
157. Rivas L, Coffey B, McAuliffe O. 2010. "In vivo and ex vivo evaluations of bacteriophages e11/2 and e4/1c for use in the control of Escherichia coli O157:H7," *Applied and Environmental Microbiology*. 76:7210–7216,
158. Rozema EA, Stephens TP, Bach SJ, Okine EK, Johnson RP, Stanford K, McAllister TA. 2009. Oral and rectal administration of bacteriophages for control of Escherichia coli O157:H7 in feedlot cattle. *J Food Prot*. 72(2):241-50.
159. Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed., vol. 1. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor N.Y, EEUU.
160. Sanger F, Coulson A. 1975. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol*. 94:441-448.
161. Scott A, Timms A, Connerton P, Loc Carrillo C, Adzfa Radzum K, Connerton I. 2007. Genome dynamics of *Campylobacter jejuni* in response to bacteriophage predation. *PLoS pathogens*. 3:e119.
162. Sheng H, Knecht H, Kudva I, Hovde C. 2006. Application of bacteriophages to control intestinal Escherichia coli O157:H7 levels in ruminants. *Applied and Environmental Microbiology*.72:5359–5366,
163. Schleifer K, Kilpper-Balz. 1984. Transfer of *Sreptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol*. 34: 31-34.
164. Scholl D, Martin DW Jr. Antibacterial efficacy of R-type pyocins

- towards *Pseudomonas aeruginosa* in a murine peritonitis model. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008.52:1647-52.
165. Schuch R, Nelson D, Fischetti VA. A bacteriolytic agent that detects and kills *Bacillus anthracis*. *Nature* 2002.418:884-9.
166. Shabalova, I.; Karpanov, N.; Krylov, V.; Sharibjanova, T.; Akhverdijan, V. Proceedings of IX International Cystic Fibrosis Congress. Zurich, Switzerland: International Cystic Fibrosis Association; 1995. *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophage in treatment of *P. aeruginosa* infection in cystic fibrosis patients; p. 443.
167. Sharma M, Patel J, Conway W, S Ferguson, Sulakvelidze A. 2009. "Effectiveness of bacteriophages in reducing *Escherichia coli* O157:H7 on fresh-cut cantaloupes and lettuce," *Journal of Food Protection.* 72: 1481–1485,
168. Sillankorva SM, Oliveira H, Azeredo J. 2012. Bacteriophages and their role in food safety. *Int J Microbiol.*2012:863-945.
169. Siringan P, Connerton P, Payne R, Connerton F. 2011. Bacteriophage-mediated dispersal of *Campylobacter jejuni* biofilms. *Applied and Environmental Microbiology.*77:3320–3326.
170. Sklar I, Joerger R. 2001. Attempts to utilize bacteriophage to combat salmonella enterica serovar enteritidis infection in chickens. *Journal of Food Safety.*21:15–29,
171. Skurnik M, Strauch E. Phage therapy: facts and fiction. *Int J Med Microbiol.* 2006;296:5-14
172. Smith T, Blackman S, Foster S. 2000. Autolysins of *Bacillus subtilis*: multiple enzymes with multiple functions. *Microbiology* 146:249– 262.
173. Smith H, Huggins M. 1982. Successful treatment of experimental *Escherichia*

- coli* infections in mice using phages: its general superiority over antibiotics. *J. Gen. Microbiol.* **128**: 307-318.
174. Snyder L, Champness W. 2007. Lytic bacteriophages: genetic analysis and use in transduction. En *Molecular Genetics of Bacteria*, L. S. A. W. Champness, Ed., pp. 293–305, ASM Press, Washington, DC, USA,
175. Soni K, Nannapaneni R. 2010. Removal of *Listeria monocytogenes* biofilms with bacteriophage P100,” *Journal of Food Protection.*73:519–1524,
176. Soothill JS. 1992. Treatment of experimental infections of mice by bacteriophage. *J. Med. Microbiol.* **37**: 258-261.
177. Soothill J, Hawkins C, Anggard E, Harper D. 2004. Therapeutic use of bacteriophages. *Lancet Infect. Dis.* 4:544–545.
178. Stanford K, McAllister TA, Niu YD, Stephens TP, Mazzocco A, Waddell TE, Johnson RP. 2010. Oral delivery systems for encapsulated bacteriophages targeted at *Escherichia coli* O157:H7 in feedlot cattle. *J Food Prot.* 73(7):1304-12.
179. Stern C, Carvalho M, Teixeira L. 1994. Characterization of enterococci isolated from human and no human sources in Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis.* **20**: 61-67.
180. Stosor V, Kruszynski J, Suriano T, Noskin G, Peterson L. 1999. Molecular epidemiology of vancomycin-resistant enterococci: a 2-year perspective. *Infect Control Hosp Epidemiol.* **20**:653-659.
181. Suárez V, Quiberoni A, Binetti A, Reinheimer J.2002. “Thermophilic lactic acid bacteria phages isolated from Argentinian dairy industries,” *Journal of Food Protection.*65:1597–1604,
182. Sulakvelizde A, Alavizde Z, Morris G. 2001. *Bacteriophage Therapy.*

- Antimicrob Agents Chemother. **45**: 649-659.
183. Summers W. 1999. Felix d'Herelle and the origins of molecular biology. New Haven, Conn: Yale University Press.
184. Summers W. 2001. Bacteriophage therapy. *Annu Rev Microbiol.* **55**:437-451.
185. Tabla R, Martínez B,Rebollo J.2012. Bacteriophage performance against *Staphylococcus aureus* in milk is improved by high hydrostatic pressure treatments. *International Journal of Food Microbiology.*156:209–213.
186. Texeira L, Facklam R. 2003. *Enterococcus*. En Murray P, Baron E, Jorgensen J, Pfaller M, Tenover FC, Tenover FC. *Manual of Clinical Microbiology*, 8th ed. P. 422-433. ASM Press, Washington DC, EEUU.
187. Teixeira LM, Siqueira Carvalho MG, Facklam RR. *Enterococcus*. En: Murray P, Baron E, Jorgensen JH *et al.* (eds). *Manual of Clinical Microbiology*. 9th ed. Vol 1. ASM Press, Washington, D.C., 2007 , p 430-442.
188. Teixeira L, Carvalho M, Shewmaker P, Facklam R. 2011. *Enterococcus*, p 350-364. In Versalovic J, Carroll K, Funke G, Jorgensen J, Landry M, Tenover FC, Tenover FC (ed), *Manual of Clinical Microbiology*, 10th Edition. ASM Press,
189. Thompson J, Higgins D, Gibson T. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**:4673-4680.
190. Togneri A, Corso A, Gonzalez J, Lopardo H, Podesta L, Gaggetti P, Perez M, Rodríguez V, Rodríguez M, Rios L, Dinerstein E. 2005. Clinical and epidemiologic analysis of intestinal tract colonization with vancomycin-resistant enterococci in an intensive care unit. *Rev Argent Microbiol.* **37**:26-33.

191. Toro H, Price S, McKee S . 2005. Use of bacteriophages in combination with competitive exclusion to reduce *Salmonella* from infected chickens. *Avian Diseases*. 49:118–124,
192. Twort F.1915. An investigation on the nature of ultra-microscopic viruses. *Lancet*.186:1241–43.
193. Uttley A, Collins C, Naidoo J, George R. 1988. Vancomycin-resistant enterococci. *Lancet* i: 57-58.
194. Verma V, Harjai K, Chhibber S. Characterization of a T7-like lytic bacteriophage of *Klebsiella pneumoniae* B5055: a potential therapeutic agent. *Curr Microbiol*. 2009; 59:274-81.
195. Viazis S, Akhtar M, Feirtag J, Diez-Gonzalez F. 2011. Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 viability on hard surfaces by treatment with a bacteriophage mixture. *International Journal of Food Microbiology*.145:37–42,
196. Wagenaar J, Van Bergen M, Mueller M, Wassenaar T, Carlton R. 2005. Phage therapy reduces *Campylobacter jejuni* colonization in broilers. *Vet Microbiol*. **109**:275-283.
197. Wang J, Jiang Y, Vincent M, Sun Y, Yu H, Wang J, Bao Q, Kong H, Hu S. 2005. Complete sequence of bacteriophage T5. *Virology*. **332**:45-65.
198. Wall S, Zhang J, M Rostagno, Ebner P. 2010. Phage therapy to reduce preprocessing *Salmonella* infections in market-weight swine. *Applied and Environmental Microbiology*.76:48–53,
199. Watanabe R, Matsumoto T, Sano G, Ishii Y, Tateda K, Sumiyama Y, Uchiyama J, Sakurai S, Matsuzaki S, Imai S, Yamaguchi K. 2007. Efficacy of bacteriophage therapy against gut-derived sepsis caused by *Pseudomonas aeruginosa* in mice. *Antimicrob. Agents Chemother*. 51:446– 452.

200. Weinstein W, Onderdonk A, Bartlett J, Gorbach S. 1974. Experimental intra-abdominal abscesses in rats: development of an experimental model. *Infect. Immun.* 10:1250–1255.
201. Witzernath M, Schmeck B, Doehn JM, Tschernig T, Zahlten J, Loeffler JM, Zemlin M, Müller H, Gutbier B, Schütte H, Hippenstiel S, Fischetti VA, Suttorp N, Rosseau S. Systemic use of the endolysin Cpl-1 rescues mice with fatal pneumococcal pneumonia. *Crit Care Med.* 2009.37:642-9.
202. Ye J, Kostrzynska M, Dunfield K, Warriner K. 2009. Evaluation of a biocontrol preparation consisting of enterobacter asburiae JX1 and a lytic bacteriophage cocktail to suppress the growth of *Salmonella javiana* associated with tomatoes. *Journal of Food Protection.* 72:2284–2292.
203. Yoong P, Schuch R, Nelson D, Fischetti V. 2004. Identification of a broadly active phage lytic enzyme with lethal activity against antibiotic-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *J. Bacteriol.* 186: 4808–4812.
204. Young R. 1992. Bacteriophage lysis: mechanism and regulation. *Microbiol. Rev.* 56:430–481.

ANEXOS

Anexo I:

Secuencias corregidas manualmente, obtenidas mediante secuenciación automática de los plásmidos recombinantes y secuencias ensambladas mediante el programa Sequencher. Todas las secuencias son mostradas en dirección 5' a 3'.

Secuencia del clon 3 con el cebador M13F

```
5'GTGCTTGTTCTCCTTTATACTTGATAGAGAAGATTTTACCTAGGTTATCGAATACTTTGTTG
TATCCATCTTTTGCAAATGCGATTGTTAGACGTTTAGTATGTGTTAAACTATTGTCTTCCAAA
GCAACTTGCATTTTCGTTTGCATCTAAACCATAAATAGTAGATGCGATGGTTAAACCACCTTTT
TTGATTTTTGCGTTAGTAGCATTCTTCTACACGCAATGCTAAAAATGTCACCTGCGGATGCAGTG
TTCACATCAGAAGCGTTCATGCTAATTCAATAGCATCCAATAGCTCACCCTACGTAATGT
AGCTTTAGCTTGTTGGTAGTTACGGAAACGATAAACTGTATTTGGTTTACCACCTTTAGCAGA
ACCTACTAACATTAATGTTTTTTCAGAACTGTTAGATGCACCACCGATACCAGAAGTATCTA
CAGTAATTTTCAGTATGTGGACGGGACACTTTTTTCTTGGAAATTGTTCTACAGCCATTTATTA
TTAACTTCCTTTCCTATATACTTTTCCAAAAACGGAACAAAGTCGGCATCATCGTGCTGATA
CTCTCCTGCATGAATGCTTTGAGCCTGCTACTTGATACTTACTCATCGTAAAGTACTTGTG
CATAGCCAAAATGTATCTACATGACGTACCTTTAGCTTTGGACTTTTAGGTGTCTTTGACCC
CTGTTAGCTTGTGTTCTTTGCATAGCTCTCCCCTTGAAAATTCCGATTGCCGTATCAACTAA
GATAGTCCTTACGATTACGCTACAAACACTGTCCTGATCATAAAGTGCATGTTCCAGTTTGT
TGACAGAAC3'
```

Secuencia del clon 3 con el cebador M13R

```
TCGCCAGCTTTGTACTTAGCAGTATATGTCGTGCTGTCTACTTCGTATAAATTCAGCTTGTGCT
AAATAAGTTGGGTATTCATTTTTAACAAATGTCCACTCTTTTAGTAAGTCTAGCTTCTCACTA
GGAGTCAAACGGTATCACTAGCCATATCAGAAATAATTTGATTTGCTCTGTCTGCATCTTCT
TGGGCTTGTTAATAGCCTCTGCCATGTCTACGATAGAAGTGTCAATCATGTCTTGTACTTCT
GTTGCACTTACTTTAGACTCTACTTTACCGGCTACAATTGTAATTTCTGTTTCTAGATTTACAA
TTTTACCATCTTGTACTTCTGATTTATCAGCTAAAATTTCAAGGACTCATTTGTCTTATTAAT
TTCAAAGTAACATTAGCTAACTTTTCATAAATATCATCAAGATTGATACTTTCTGTAATTAG
TTTACCTTGGGAATAGATACCGTCTTACGAACTTCTAAGTCCATATCCCCATTACGTAGGTA
AACGATACCTTCTTCAATTAACCTAGCTCACCAATCTCAAAACCATCGTTTAAAGCGTACAGT
ATCTCCCTGTCTACGTAACGTAATTTACCTTCTGGTGTCAATTTCAAACATTGTCCGCCAGTC
TTGTTCCGTATCCATCATAGATGTACGTATGTTCCATCTGGGTTATGTGAATCATGAAGTTAT
GTGTATCAGGTTTATTGTCATCGTCAGAATACTTGTGCTTGAATAACCATTAGTGCCCGACTT
TCATCGTCATAGTCCGTCATTGAAAAATGTCTAGCTTCTACGAAACGTAACATTGTCATGG
GAGTTGCATGGCTTTGGATCAATGCAAAAGATTTAACTGAAATACATCCGTACCTCCCAACA
ATGTTTAGAGTCGGGTGTCAACTATTTGAACTGTCTGCTAGCT
```

Secuencias del clon 4 con el cebador M13F

5'TCGCTTCTAAGCAACTTGGGGTAGACGTTACTGACCAAGATGTGGACACATTACTTAAACT
GATTCAAGCAGAGTCTAATGGTGATGAAAAAGCTGTCCAACAAATCATTGATGAGAATAAC
TTAATGGCTCTGGTGGTGCTAAAGGACTTCTACAATATATCCAATCTACATTGATGCTTAC
AAAGTAAACGGACACGATGACATCATGAGTGGTTATGACCAACTACTAGCGTTCTTTAACAA
TAGTAAGTGGCAAAAAGACCTAAGCTCATGGAATAATCGTTACCAAAAATGGTAGTACGGGC
TGGGGTCCAACGGGTAGTAAGACTCACGCAATGGGTGGACATATCACTTCTCCGGAACATGC
CTTACTTGGTGAGGTACCGGGACAAGATGAATATGTTATTAACCCGCACCAACCTACAGCTC
CTAGACTATTACAAAGCTACTCGTAAACTGCACAGAAATCCGTTTGTGGTAATGGTTCTG
GGATAACTGGTCTTCTCGTGTAGGTGGAATTACCCATCAGGTTCCGGTAATTCACGCATCAC
CACATTAACATAACAATTTAAGGTTAATGTACTGTTCAAGTGCGAACCTTCTAAAAGATT
GTAATGAAATTGGCATAAACACAGGTAATTCTGCATCGGCATAATCATGGATTTCTTTACA
AAAAATGAACAAGTTAAAAACAGGGGGACCGTTCCCTTTTTTTT3'

Secuencia del clon 4 con el cebador M13R

5'AAAAATGAATTACCCAAGCTTCCTTCTCTATTAAGAAGATACATTACTAAGAAGGCAAATA
TCCTTATTCTAAGTGCAGGTGCTGAGGTTGAGTCCCAAACCTCCTGTAATGGAATATAGCTTA
GGGCAAGGTATTTACTCTGATACAAACGTATTAGTAAGTGCAATTAACAGTCTACCTGACTG
GGAAGCTAAATTATCCCTATCGGAGATAAAAATGTACCTACTGAAACATTTGATAAAGTAG
ACAAAGCTGATGTTAAACAGGTGAGAAATATGTTGAAGCTCTAGGCGGAGACATTGCTAA
ACAATTGGAATATAACGACTACGTAACAGTAGAAATTGACCGTGCAACTCCAATCAAGACT
TTGCGTTAACTAATCTTTCTGGTGGTACAGATGGAACAGTTCAGAAATCTTGGGCTGACAAA
TTCCCTCTACTAGCTAATGAAGGTGGTACTACTTAGTACCATTGACAGACAAACAAGCTGT
CCATTCAGAAGCTTTTAAAGTCTTTTACCTAACATACCTCCTGAGAAGTCTTCTGACTTGCC
CCAAAGATGTGTAACCGGTCTTTACCACCATTTTTTAAAGACCACGAGTAACCTAAAGTT
GTCGTGTAACCTTTGTGTGTAGGAGAAGGTGTGCTCTACGGATTCAATATAGTATTTCCACA
ATTCGTTATTCTGTTTACTACTACGAATAGTCTCCACCTAACGATATTCTGGGCTTCCCTT
ACTACGATGTCCTCACTAAAGAAGTTAGGATTCTCCAGTACCAGTTAGCTAACCGGTTGT
AACTCTTTACATATTTTGTATCAGAAcCCAGAAACTGTGGGGCTATCaCTCGGAATG3'

Secuencia del clon 4 con el cebador interno 4Rint

5'TACTACGAATAGTCTTCCACCTAAACGATATTCTGGGCTTCCCTTAACTACGATGTCTCCAC
TATAGAAGTTAGGATTCTCACAGTACCAGTTAGCTAACCGTTTTGTAAACTCTTTTACATATT
TTGTATCAGAACCAGAACTGTTGTGCTATCACTCGGATTGTTCTTCATGATTTTATCGTATC
TAGTTTTAcgTAAACTTTTTTGACCTACAAATTCCTAGCAATGGATGTAGCTTGATTGTCTGT
TAAGTTGAACTTATTCATAAGCTCATTCTTAATAGTAGTAGTTTCTTTATTATCCGCTTCATCC
TTGTAATCTTCTAAGAATTTTACAATTTTTTATAGGTAGGTTTTTCTTTCCCGTTACCTTGC
TAGCATTCTTTTCGTTGATACCAGTTATATCCGTGAACCTGCTCTTTTGTCAAGCTCTGTGTGAT
GATATACTGGTCAATGATTTTGTCTGCCATTGTCCCTGTGATACGTTCTGTCTACTTGAAGTAT
CTTAGCTCGCACATTACCACGTTTACCCTTAAAGATGTCTAATGGGGTAACCACGTAGATAG
TTCATTACTGTGCCATAAGTTCGATCAAACGCACTAGATTCATTTGTATCTTTGTCTCTAGTT
GCACGCTTTCCGTGCAGTATCTTCGTTAGTTTCTGTATCCCATCTGTAGTTGTATCAGCACT
ATCTGCATTATCCCCACTATCTACATTGCaCCTTGTAAATTTTTGTTATCAACTTCTAGCTTCT
TATAGCCATATTGTTAACTAAGCGGGAATACCTGgGGTTTA3'

Secuencia del clon 6 con el cebador M13F

5'ATGGTTGGCAATTAGCTAATAAAAAAGATGGGTTCCGGCATCTTCTATTGGGGAGTTCTC
CCAGATTTTTGACCAAGTTAGCTATGTTGTTACCAGTTGAAGCACAACCCTAGTTCTCGCAg
AATTATGACTACTTTGTGGGATGTTGAAGACTTAGACGAGATGGCGCTAGAGCCTTGTGTAT
GGGCTACTCACTGGACAGTTTACAGAGTGGTAAATTTGAATTTACATGTTAAGCAACGTtCCGGT
GACGTTTGTTTAGGGCTTCCATTTAATGTATTGCAGTATCATGCGTTACATGTAGTTATGGCT
AAGGTATCTGATTTAGAAGTACGAACTATGTTCTGGAATATTGACAATGCACATATCTATGA
CCGTCATATGGAACGAGCTGTCGAACAAGTAACTGCTCCTATGACAGAGGAAGTTTTAAACG
CAgAACCTAAGCTAGTATTACCTTGGGAAGAGCTGGTATGACTAACTTCTTTGAGTGCCCACT
ATCTGACTTAAGGGTTGAAGGCTACgAtCATAccSGGAGGATTTaATTACGAGGTGCCAATCTA

ATGAGTACAGCTTCCTCTTTACCAAATCTTTTAGCTATTGccGAGTCTGCGATTTACtGGAGAG
CGTAAAcTTTTGCGAGAAAGACTTTTATTAG3'

Secuencia del clon 6 con cebador el M13R

5'GACATGAATTACGCCAGCTTATCTTCCCAGTTCGAGCGTTAGAATCTGTAAGCTCTTCAAA
GTATAGCCTGACCGAGACCATATTGTTTTACCTGTTAGCTCCGATTTAATACGTTTAGCTAAA
GGCAGTAGAACTTGKGTATTTAAGAAAGGTTCCCCACCTAACAAAGTAATACCATCACAATA
ATCTTGTGCAATGTCTTTAAGGATTTGGTCTTCTACTTCTTGGGTATAATCTTTTCCCAACTA
AAGTTTTGTGCTTTTTATTGTAACACCCTAAGCAATTAACGGGCAACCGGAGACGTATAT
ACTTCCACGTACCCCGATACCGTCTACCATTACAGGAAATTTATAATCAGCATATTTACCCTT
AGACAGTCTTTCTGCTGTCCATGTGATTGGGTCTTACTCATCTTTATTTCCCTCTTTCTTAAC
ATGTAACCTTCGTCATAACCTGATTGGGTAAACTTAGCTTGGCAAATTGCACACTTATAGG
CTTTATACCCCAAATTATTGTACGGtACCacTTGcTCTTCTCCATCTTcaTcTGAAtGGGTACAtGT
TTT3'

Secuencia del clon 6 con el cebador interno 6Rint

5'CTcTCTTGATGGGTAcTGTTTTTTGTAATGCTtCTAGTATtTcAttTCTTTGCTTAATTAATTGTTT
TTTCTTCGCAAGATGTCTACGCTCTTCATGTAAAATCGCAGACTCCGCAATAGCTAAAAGAT
TTTGTAAGAGGAAGCTGTACTCATTAGATTGCCACCTCGTAATTAATCTTCCGTTATGTTT
GTAGCCTTCAACCTTAAGTTCAGATAGTGGGCACTCAAAGAAGTTAGTCATACCAGCTTCTT
CCCAAGGTAATACTAGCTTAGGTTCTGCGTTTTAAACTTCCTCTGTCATAGGAGCAGTTACTT
GTTTCGACAGCTCGTTCCATATGACGGTCATAGATATGTGCATTGTCAATATTCCAGAACATA
GTTCCCTAGTTCTAAATCAGATACCTTAGCCATAACTACATGTAACGCATGATACTGCAATAC
ATTAATGGAAGCCCTAAACAAACGTCACCGGAACGTTGCTTAACATGTAAATTCAATTTAC
CACTCTGAACTGTCCAGTGAGTAGCCATACACAAGGCTCTAGCGCCATCTCGTCTAAGTCT
TCAACATCCCACAAAGTAGTCATAATTCTGCGGAACTAGGGTTGTGCTTCAACTGGTGAAC
AACATAGCTAACTTGATCAAAATCTGGGAGAACTCCCAATAGAAGATGCCGGAACCCATC
TTTTTTTATTAGCTAATTGCCAACATAAGCTTGCATGCCTGCAGTCGACTCTAGAGGATCCC
GGGTACCGAGCTCGAATTCCTGGCCGTCGTTTAcACGTCGTGACTGGAAAACCCTGCGTTA
CCACTATCGCCTTGCAGCcATCCCTTCGCCAGCTGCGTAtAGCGAaaaAGCCGCACGATCGCTCA
CGTGcCCaCTGATGGSATGGGCCTGATGCGGATTCTCTTACgATCTGgGCGATTCaACCgATAT
GTGCA3'

Secuencia del clon 11 con el cebador M13F

5'ATGAGGGTGTCTATCAAAATCAAGAATGATAGTATTAATAATTCAAGAGGGAGCAAAAACAA
CTAAACCATCTTGGAACCTAACTTATTAGCTGAACCATATGAGATTGGTGACGTTCCCGTA
CAGCCTAATATTGCTGACCCTACAGTTAAATTTCCAATTAATGTTAATACGTACAAGGTATAT
GAAGGAGATATGCTTGAGTCGTTTAAAGGTTGGAGAAACATATACTGTAACCTATTAAGGGTAG
AAAGCCAGCTCAAAAACATTTAGTGTTTACAATGCTGGTACTGTTTTCTAGGACATTTAA
CTCCAGTAGAAGGGTTATCAGATGTATGGACAGGTACTTTTACAGTATCATTAGTTAATCTT
TTTATCCTAATAGATTGCAAATATATCAATTGGGTAATGACAATCAAAATGGAGAAGTTCA
AATTGACTGGTTAAAAATCGAAAAGGCAACACCAGAACTCCTAACATTGATCTACGACTAC
GTAGCTCTGATAgAAGATACAGAAACcCCTACATAgACCCGACTAGTAAcATGGACGTAAA
TGGGGATGTAAcAAATAAAAAGCATACTGGTGTGAafTAAAATTATGAAgAAATATGCTaCG
AATTGAAAACCTTGTGCTGACTAGtGAAACCACGtGGAAcctGGTTGAACCTTAATCCTCCGACT
AGGCTTAfTAGTCCAGTTCCAATAACTTCCGGgGATATGCTTTCCaAGGCTGCAAGTACGGaGC
TGACCGGtTCGCaCCCTTAGCACCGTtC3'

Secuencia del clon 11 con el cebador M13R

5'CTGGATTACGCcCGCTtAGCCATTCATACCCAgAgeCRttARCTACCTGTTCTGCGGGAGGTAA
CTGATAgATTACTACTTTTTGCAGTATCGGTGGTTGTCTGCATAATTTTTAGATTACCTGTCCAT
GACCAGTATTAGGTAAACCTTCAACGGCAACAAGATGACCTTGAAACTCGGTACTTACTCC
GTTTGTCTGTTTGAATGTAAAAACCAATTGTTTCGTATTAGGTTTTGTTCTTTAATGTAAA
GGTTAcTTTTTCCCCACTTTACTGACTTCTTAATAGGAAACGACCCAATTAGATAAATTAGA
GTTACTGTAGCTTTTTGATTCAATTAATTTTCATTCAATGCAGTTTTCCCTAAGTAGTAAGG
TGCATTAAGTAAATTAGGTTGATATGGGGTATTGGTGTCTCCACGCTCAATTTTTATGTTTCT

GATTTTAAGTGTACCAGTCGGGTTAGTATCACTCGCAACTGTTTGCCAACATAAAGTATAATA
CTTAGGAACTCTTCCTTGGTAATTCGTAGTAGATGTTCCCTTACTGTTATCCAAGTATCTCT
AGGAGCATTTCAGATAGCCTTGATGTTTGCAGTACAGTATACCCACCATCAAGATACGCAT
AGTTAGCAAATATCTGGTCAACATACCGGTATAATCAgAACCAACATACATTTCACAAAGAA
GtGtTAgTgTTTTATCGCAGATAcCcCTATTTTACCATCGGTATTGTATCTACTCATCTAGCAG
TCATCAATAAATGGGgATTCCCATTTAAGAAGTTCCcCcCGTCTAGTTAAGTTTGCTCAGT
CAATtATTAGGATCC3'

Secuencia del clon 12 con el cebador M13F

5'ACTAGAAGACCAAGAAAAGAAAAACAATGAAAACAATAGTAATTCTGGCTCTAGCGGTG
GTTCAAGTGGTGGCACAAACCCATCGAATATTCCGGGAGGTACAGTAGCTATGAAAGCTGT
AAACTGGGGACGTTCTCACTCTAAGACGGAATCTTCCTTTAGGTCTGCATACGACTGGGGAG
GCGGACGTACAGGTAGAGACCCATTTGAAAGCTCACCTATTGCTACAGACTGTTTCGTCATTT
GTATGGTGGTGTTTTAAACATGCAGGTGTAGAATTGAATGGTGGGGCAACTGGGATGACTAC
ATGGAGATTATTGCGGATACGAAACTTGAAACAATAGCTACCCGTGGTCAAAGAAGAACTCG
CTATTTTTGATAAGATGAAAGCAGGAGACATTATCTGGTCCGTAAGTGTGAGCATATTGGA
ATTTACTGTGGTGAAGGAAAAATGGTTGCATGTAATGGTTCAGGTAATATGAACGAAAGCC
TACAGCCGGTATTATTGTGTCAGATATGACAAGTGGATACTGGTGGGATACATTCGATGGAG
ACGTA AAAAGATACTAACTAACCTCGTTAATAGCGAGGTTTTTTTACTGTAAAAACAAGTAC
TATGTGTCTATAATATTAAGTAGAGACACATACAGAGAAAGGATGGTATCAACTTGGCAG
AGGACGTAGATTTTACGAGGTTAGTTCCGAACATAAAAGATTATACAAGAGACAACAATTA
ATACTTGTGCTAGCCCAGTATCCAGTATATAAATATAATACAGTGATTATAGCATACAGCAT
AAGAGTTTCAAACCTCATTGCATGAGTAGATCCCTGCTCGTTAC3'

Secuencia del clon 12 con el cebador M13R

5'CATGATTACGCCAGCTTTGTACTTAGCAGTCTATGTCGTGCTGTCTACTTCGTATAATTTCAG
CTTGTGCTAAATAAGTTGGGTATTCATTTTTAACAAATGTCCCACTCTTTTAGTAAGTCTAGCT
TCTCACTAGGAGTCAAACGGTTATCACTAGCCATATCAGAAATAATTTGATTTGCTCTGTCTG
CATCTTCTTGGGCTTGTTTAATAGCCTCTGCCATGTCTACGATAGAAGTGTCAATCATGTCTT
GTACTTCTGTTGCACCTTACTTTAGACTCTACTTTACCGGCTACAATTGTAATTTCTGTTTCTAG
ATTTACAATTTTACCATCTTGTACTTCTGATTTATCAGCTAAAATTTTCAAGGACTCATTGTCT
TTATTAATTTCAAAGTAACATTAGCTAACTTTTCATAAATATCATCAAGATTGATACTTTCT
GTAATTAGTTTACCTTGGGAATAGATACCGTCTTACGAACTTCTAAGTCCATATCCCCATTA
CGTAGGTAACGATACCTTCTTCATTAATACCTAGCTCACCAATCTCAAACCATCGTTTAA
GCGTACAGTATCTCCCTGTCTACGTAACGTATTTTACCTTCTGGTGTCAATTCAAACATTGT
CCGCCAGTCTTGTCCGTATCCATCATAGATGTACGGTATGTTCCATCTGGGTTAATGTGAAT
CATGAAGTTATGTGTATCAGTTTATTGTCATCGTCAGAATACCTTGGTGCTTGAATAACACAT
TAGTGCTCGACCTTTCATCGGTCAATTAGTCCCGTCATGTATAGATGTTCCCTAGTCTTCATAC
GAGACCGTAGCTAGCATCTGTCATTGGAAAGTTTGCAGTCTTTTGGATCAATGCGTTAGT3'

Secuencia del clon 13 con el cebador M13F

5'TCACCTTTAGCATCAATAACGTTATGTTTGTCAATTAATTTAACTAAACCGTCAAATTCTAG
ACCGGAGTCACGTTCTGGGTTTTTCAGATAAGTCAGCATCTCCATAGAAAGAAGCCCATTCAA
TTGTTTTAGCAACAACAGAGATAGCATCGTCTGTAAAGATTTGCATTGGGTCTTCGATGTTGT
TAACTAAACCAGTTGCGATACTCATGTTCTTAGTATCAGAAACGTATTTTCATGTTAACAGTTT
TTTGACGTAAGCTTGCATTTTCTTTTTGAGTTACCCTCGTTTTAAGAACCACCTTTAGAACC
AGTTGCTCCTCATTATTCGGGAAGTTAATTTACGCGGGTCAATCCCATACAACGCAGAAA
TTACATTGATTAATAAGTTCAACCATTTTCAAACCTGCATATCATTAGCAGATGGTGTCTATGT
TAACGAACTTAACGTTCTTGCAGGATACTACTGGGATTTGCCATGAACCATTAATACCTGAT
AAGGAGCTTCTCATTCTCTACGGAAAATATCTAATGCTTGCTGACTTTGTTGTTGCTCCTGCT
TTAACATGTAAGATAACCAGTGTGTTCCCTCCGTGAGAGAAAAATCGGTCATTAACGTTCTC
GGTGTTTTCATGTGCATAAACTGCTTCAAGGCAATCTCTAGTTCTGGATACCGTACTGACCTA
CTTCATATCAGCACGTGGGTTACGACAGCAAAGCCATTCACGTTCAATTAATTTGCTACGAT
TCGATTGTCTAGTACTTGTACAATCGTCTCCTTTTTCATATTTTCTTACGTAGTAGCTAAAAGA
TTGTTGGGGGGCCAAGATCAATTTATAT3'

Secuencia del clon 13 con el cebador M13R

5'CTTGGATTACGCCAGCTTTTTAGAAAATACCTCAGTATTCAAAGACCAAAAATAGGGATAAT
TTTACTGCTTTTTGTAAGAAGATGGTACGTGCAACTTATATGTATGACCAAGTTAACTTTGAG
AAGGTATTCGATAAAGATGGTAACTTTATTAAATTTGATACTGTAGACCCCAACAACATCTT
CTTAGCTACTAACGGTAAAGGAAAAATTATTGAAAAGGGAGAACGATTTGTACAAGTACTA
GACAATCGAATCGTAGCCAAATTTAATGAACGTGAAATGGCTTTTGTCTGTTGTAACCCACG
TGCTGATATTGAAGTAGGTCAGTACGGTTATCCAGAAGTAGAGATTGCCTTGAAGCAGTTTA
TTGCACATGAAAACACCGAGACGTTTAATGACCGATTTTTCTCTCACGGAGGAACAACACGT
GGTATCTTACATGTTAAAGCAGGACAACAACAAGTCAGCAAGCATTAGATATTTCCGTAG
AGAATGGAGAAGCTCCTTATCAGGTATTAATGGTTCATGGCAAATCCCAGTAGTATCCGCAG
AAGACGTTAAGTTCGTTAACATGACACCATCTGCTAATGATATGCAGTTTGAAAATGGTTGA
ACTATTTAATCAATGTAATTTCTGCGTTGTATGGGATTGACCCCGCTGAAATTAACCTCCCGA
ATAATGGAGGAGCACTGGTTCTAAGGTGTTCTTTAACGAGGTAACCTCAAAGAGAAAATGCA
GCTTACGTCAAAAACCTGTTAAATGAATACGTTCTGAACTAAAACATGAGTATCGCACTGTTT
AGTAACAACATCGAAAACCAATGCAATCTTAACGAACGATGCTTTCTCTTGTGTGTTGCTAAA
CCATGAATGGCTTCTTTTAAGGGAATGTTGACTTATCTGGAAACCAGAACGTGACTCGGCA3'

Secuencia del clon 14 con el cebador M13F

5'CATCATCGTTTACTCCTAGTACAACCTGTTTCTCTAGACGGTCTGCACCTTCTGAGAAATGA
CTAGGAACGCCACTTGTGGTCTAACAAGGTTGGGTCATCTTCTGCGGTAATTACCTTTTGA
ACAAGTTTAACACCAATGTACTCAGTACCTCTACCTGTGATTTCAATACTTTGTTTCGTTAAG
TTACGCATTTTACCACCAAGGAATACTTTACCTTTTTTAACAGTAAGCGTAGTTCCTTGAAGG
ATATACTCCATACCTGTTTGAATATCCCATCACTGAAAATAGCTTCTGCTACGTTAGATAAC
GCATAGTTCTGCATAGATTGCATTTCTGTTAAGCTCTGCTTGTGTAGGGGCTTATCTGGTTTG
AACAGCACCATGGTTCTGTTCTGGTCTTCTCAAAGCGGTCAAGGTATGGGCTTTACTTAAA
TCGTCATTTGTAATTTCTTTTGCCAATGCTTATCATCTCTCTTACGCTTTTAAATGTTTTGCCG
TTTTCCATTGTAACGATAAAATTTTTCTCGGATTGTTACATCGGCAGTTCTGTTTTGTTGTCGTC
TGTTTTCAAAGAATTGTAATAACCTGCATTTGTTACCTCGCTAGGTATAGTGCATCTTTATC
TACACCTGTTTTGGTACTAGGTGAGTATGCAGTCTACTTGTCTaAATGTACCTAAGTATCGTC
ACTACGATTCGATCGAttCtACATCATGCATTTTctATAGCATCTCATCTAGAtCAAGTaAAtT
TTCgAGCaCcGTAAtTgATTACTG3'

Secuencia del clon 14 con el cebador M13R

5'AGCCTTACTCGGACAGAAGCtaTTAAGCTaCTTCAaTTTGTAGTAAAtGGTTCCTTACTTGAAC
AAGTAGTTGGGGCAGTTACCGTATTCTCAAATAAAGTAGTGTCTACACTTATTCCTTTGTTTA
ATGATATAGATATAAGCTTGAAAAAGGAGATACAAGAAGTCTTAACTTACATTGATTCCTATACTT
ACCACGGTACAATTTTAACTACATCCGAAGaATCACCAAAAGACCCTAATGCGTATACATGG
TCTAGTATCTAAATAGGGATAGCagAATAATATGCTATAATATAAATAGGGCACGATGCTGT
GCCCTATTTTTTAATTGAATGCTATATTATCTAATGAAACCATAgAAgAAAAGAGGTTATAAA
GTGGCTATTGCAACTAATAATTTCCGAGTGTATGCTTCATTACAACCTTAAAAACAAAAAAGA
CAGCaTGTACTTAGTTATCGGTAAAACCTCACCTTGGACAAATGAAGATGCTCCACCCGCTAC
TGACCCAAACACTTCAACATTACAAGAAGTTGTCGGTTACAAAAAAGTAAGTAAAGCATCTC
TATGTCGTGAATACGTTGCAGATGACGAGAACAAGTACCAGTAATCAATTACGGTGCTCGA
AAATTTACTTTGATACCAGATGAGGATGCTTATAGAGAAAAAGCATGGATGGTATATATCGA
ATCTGAAATCGTAGTGACGAATTACCTTTAGGTACATTTAgACAGTAGGACTCCATACTGAC
CTAGTACCAAAACAGGTGTAGATGAGATGCACTATACTAGCGAGTACAATGCAGTATTTAcA
TTCTTTGAAAcgACGACAACAAACAgACTGCCGATGTAACATCCGAgAAAATTaTCGTTAcATG
GAAACGGCTACT3

Anexo II: Soluciones, medios de cultivo y *buffers*.

Todos los medios y buffers utilizados para cultivo, se esterilizaron durante 15 min a 121°C y una atmosfera de presión

Caldo Luria-Bertani: (x1L)

Triptona 10g

Extracto de Levadura 10g

NaCl 5g

H₂O 1L

Para prepara agar LB Agregar 12g de agar.

Agar blando: agar bacteriológico 7.5g/l

Buffer Tris Borato EDTA (TBE) 5X (x1L)

Tris base 54g

Ácido Bórico 27,5g

0.5M EDTA 20ml

Buffer Tris –EDTA (TE)

10mM Tris-HCl

1mM EDTA pH : 8

Buffer de carga 6X

0,25% azul de bromofenol

0,25% xylen cyanol

30% glicerol en Agua

Buffer SM (x1L)

NaCl 5.8 g

MgSO₄·7H₂O 2 g

1 M Tris, pH 7.5, 50 ml

pH: 7.5

PBS(phosphate buffered saline)

NaCl 137mM

KCl 2.7mM

Na₂HPO₄ 10mM

KH₂PO₄ 2mM

Buffer de PCR

Tris-HCl 200mmol l⁻¹

KCl 500mmol l⁻¹

pH 8.3

Soluciones para extracción plasmídica (Miniprep)

Solución I:	Solución II	Solución III
50mM glucosa	0,2 N NaOH	5M acetato potasio 60ml
25mM Tris-HCl pH: 8	1% SDS	ácido acético glacial 11.5ml
10mM EDTA		H ₂ O 28.5ml