



Facultad de Ciencias, Universidad de la República
Tesina de grado - Licenciatura en Ciencias biológicas

Evaluación de la capacidad lítica de fagos de *Klebsiella pneumoniae* sobre aislamientos locales resistentes a múltiples drogas y formadores de *biofilms*

Sebastián Rey

***Laboratorio de Virología Molecular, Centro de Investigaciones
Nucleares, Facultad de Ciencias, Universidad de la República***

Tutora: Dra. Natalia Echeverría

Co-tutora: Lic. María Victoria Gutiérrez

Montevideo, Uruguay

2025

Tabla de contenido

Resumen	3
1. Introducción	4
1.1 Resistencia antimicrobiana	4
1.2 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	7
1.3 El rol de los biofilms en la resistencia y la persistencia bacteriana	9
1.4 Impacto local de la resistencia a antimicrobianos (RAM)	10
1.5 Los bacteriófagos como agentes de biocontrol	11
1.5.1 Definición y clasificación filogenética	11
1.5.2 Ciclo viral	11
1.5.3 Terapia fágica	14
1.5.4 Otras aplicaciones de los fagos para control biológico	16
1.6 Situación en nuestro país	16
2. Objetivos	19
2.1 Objetivo general:	19
2.2 Objetivos específicos:	19
3. Materiales y métodos	20
3.1 Cepas bacterianas y condiciones de cultivo	20
3.2 Fagos ensayados	20
3.3 Generación de ministocks	22
3.4 Determinación de la MOI óptima para cada fago y preparación de stocks virales	22
3.5 Titulación de stocks virales	24
3.6 Ensayos de rango de hospedero	25
3.7 Eficiencia de plaqueo (EOP)	26
3.8 Selección de bacteriófagos y cepa bacteriana para caracterización adicional	27
3.9 Ensayos de estabilidad térmica y a diferentes valores de pH	28
3.9.1 Ensayos de estabilidad térmica	28
3.9.2 Ensayos de estabilidad a diferentes valores de pH	29
3.10 Curvas de infección de los fagos seleccionados	31
3.10.1 Curva de crecimiento en matraz, para recuento bacteriano	32
3.10.2 Curva de infección	32
3.11 Ensayo de formación de biofilms en placa en condiciones estáticas	34
3.12 Ensayo de erradicación de biofilms preformados	36
3.13 Secuenciación de Roth 23.2 y Roth 23.3	38
3.14 Secuenciación de bacterias empleadas para el rango de hospedero	39
4. Resultados y discusión	41
4.1 Generación de ministocks	41
4.2 Determinación de la MOI óptima para cada fago y preparación de stocks virales	43

4.2.1 Roth 23	44
4.2.2 Roth 8	45
4.2.3 Roth G	45
4.3 Ensayos de rango de hospedero y EOP	46
4.4 Ensayos de estabilidad térmica y diferentes valores de pH	51
4.4.1 Ensayos de estabilidad térmica	51
4.4.2 Ensayos de estabilidad a diferentes valores de pH	53
4.5 Ensayos de actividad antibiofilms	55
4.5.1 Ensayo de formación de biofilms	55
4.5.2 Ensayo de erradicación de biofilms	57
4.6 Curva de crecimiento	59
4.7 Curva de infección	61
4.8 Secuenciación	64
4.8.1 Fago Roth 23.2	64
4.8.2 Cepa <i>K. pneumoniae</i> M1443	66
5. Conclusiones	70
6. Perspectivas	71
7. Bibliografía:	72
APÉNDICE:	86

Resumen

La introducción de los antibióticos fue crucial para el control de las infecciones, pero la resistencia de *Klebsiella pneumoniae* a todos los antimicrobianos actuales ha impulsado el uso de bacteriófagos como alternativa terapéutica. En este estudio, se evaluó la capacidad lítica de seis fagos de *K. pneumoniae* aislados en Reino Unido sobre 25 cepas clínicas locales multirresistentes y formadoras de biofilms. Los fagos Roth 8 y Roth 23 mostraron los rangos de hospedero más amplios, infectando productivamente 8 cepas, y fueron seleccionados para evaluar su estabilidad a diferentes valores de pH y temperaturas. Ambos demostraron estabilidad a pH 5, 7, 9 y 11, y a temperaturas de 4°, 25°, 37° y 42°C, pero fueron inactivados a pH 3 y presentaron disminución de viabilidad a 60°C. Se evaluó la capacidad de formar biofilms de las 8 cepas susceptibles y se halló que la cepa M1443, productora de carbapenemasa, es fuertemente formadora de biofilms. Roth 23 mostró la mayor eficiencia de plaqueo en esta cepa, por lo que se evaluó su capacidad para erradicar biofilms preformados a diferentes concentraciones. Los resultados mostraron una disminución significativa en la biomasa a la mayor concentración de fago utilizada. Asimismo, ensayos de curvas de infección evidenciaron un control temprano del crecimiento bacteriano, con inhibición completa a MOIs altos. Sin embargo, emergieron cepas resistentes tras 4-5 horas de infección en todos los casos. Finalmente, se secuenció Roth 23 para verificar la ausencia de cambios en su secuencia respecto al original (N° acceso GenBank: PQ657796). Este estudio sugiere que Roth 23 es un candidato prometedor para el biocontrol de la cepa M1443 de *K. pneumoniae* y otras similares.

1. Introducción

1.1 Resistencia antimicrobiana

La introducción de los antibióticos en la práctica clínica representó una de las intervenciones más importantes para el control de las enfermedades infecciosas. Desde el descubrimiento de la penicilina en 1928 por Alexander Fleming, y su posterior producción industrial en 1940, los antibióticos surgen como principal estrategia antimicrobiana. Por su parte, la industria farmacéutica se inspiró en la plataforma de Waksman, lo que permitió descubrir más de 20 clases de antibióticos entre los años 1940 y 1970, evaluando actinomicetos (bacterias Gram-positivas) del suelo que tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de patógenos en placas de Petri, produciendo diversos antibióticos naturales. Entre estos compuestos antimicrobianos naturales se encuentran betalactámicos, aminoglucósidos, cloranfenicol, macrólidos, tetraciclinas y glucopéptidos (Brüssow, 2024). Los beta lactámicos constituyen el 60% del uso mundial de antibióticos, siendo los más utilizados y eficaces en el tratamiento de enfermedades infecciosas (Öztürk, Ozkirimli and Özgür, 2015). Incluyen penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos y monobactámicos. Su estructura central está basada en un anillo β -lactámico, cuya alta tensión interna y grupo carbonilo favorecen su reactividad, permitiendo la inhibición de proteínas *penicillin-binding proteins* (PBPs) (Lima *et al.*, 2020).

Desde la década de 1960, la eficacia del uso de actinomicetos disminuyó, y fueron considerados una fuente sobreexplotada de nuevos antibióticos (Brüssow, 2024). Desde los 80s, la investigación en nuevos antibióticos ha disminuido, y solo se han descubierto algunas nuevas clases, como las quinolonas y las sulfonamidas. La industria se ha centrado en la mejora de antibióticos existentes y en compuestos hemisintéticos, como el metronidazol y el cefiderocol, recientemente descubierto para combatir bacterias resistentes a carbapenémicos (Durand, Raoult and Dubourg, 2019). Sin embargo, la creciente resistencia bacteriana a los antibióticos ha deteriorado la eficacia de estos fármacos. Cuando la penicilina comenzó a utilizarse en la práctica clínica, la mayoría de las cepas de *Staphylococcus aureus* eran sensibles a ella. Sin embargo, en la actualidad, menos del 5-10% mantienen esta sensibilidad (Alós *et al.* 2015). Esto resalta la capacidad de adaptación de las

bacterias ante el uso de antibióticos y la necesidad de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas para combatir las infecciones resistentes.

El principal problema con la terapia con antibióticos radica en que, después de la introducción de un nuevo antibiótico, eventualmente emergerá resistencia al mismo. Este escenario se ha repetido en múltiples ocasiones y, por lo tanto, existe una carrera continua entre el descubrimiento y desarrollo de nuevos antibióticos y las bacterias que responden a esta presión selectiva mediante la aparición de mecanismos de resistencia (Aminov et al. 2010). Dichos mecanismos llevan a la generación de organismos multi-drogo-resistentes (MDR) que se categorizan como tales debido a su resistencia *in vitro* a al menos un agente antimicrobiano dentro de 3 o más categorías de antibióticos (Magiorakos et al. 2012).

Uno de los principales organismos MDR son las bacterias Gram-negativas que presentan dos membranas (Figura 1), una externa, rica en lipopolisacáridos (LPS), que impide el paso de moléculas hidrofóbicas, y una membrana interna, que es una bicapa lipídica convencional, que restringe la entrada de moléculas hidrofílicas. Estas diferencias fisicoquímicas complican el diseño de antibióticos efectivos, lo que explica la baja tasa de éxito en el desarrollo de nuevos fármacos contra estos patógenos (Lewis, 2020). Además, algunas bacterias tienen la capacidad de generar β -lactamasas y/o β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), que son enzimas capaces de hidrolizar la amida del anillo β -lactámico en algunos antibióticos β -lactámicos (Tooke *et al.*, 2019). Las BLEE se definen como enzimas capaces de hidrolizar las cefalosporinas de amplio espectro y los monobactámicos, pero no las cefamicinas o los carbapenémicos (Khadka *et al.*, 2023).

Gram Negative Bacteria Cell Envelope

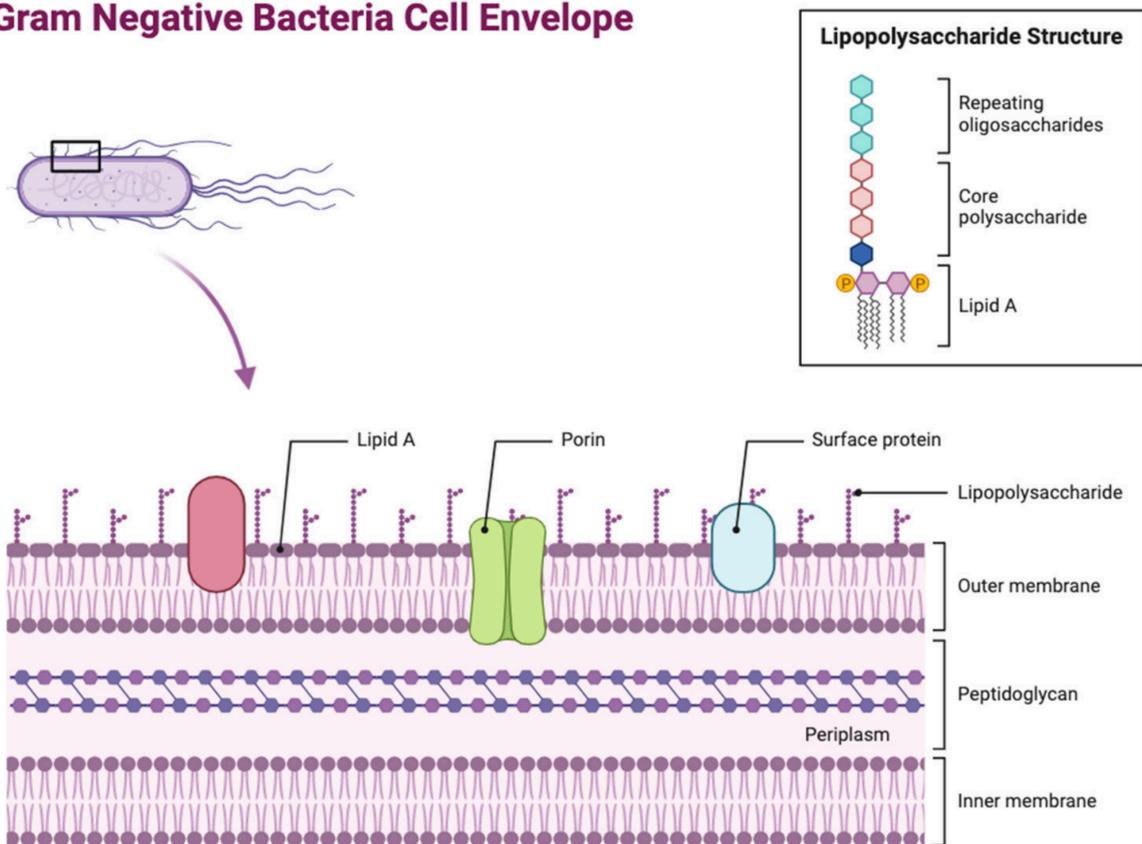


Figura 1: Estructura de la envoltura celular en bacterias Gram-negativas. Esquema de la envoltura celular de bacterias Gram-negativas donde se distinguen sus diferentes capas estructurales, incluida la capa de peptidoglicano localizada en el periplasma. Se representan múltiples moléculas de LPS ancladas a la membrana externa, junto con las principales proteínas. Imagen extraída de (Gaubá and Rahman, 2023)

Las infecciones causadas por bacterias productoras de BLEE, como *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*, representan un problema terapéutico y epidemiológico, debido a que estas resistencias suelen ir acompañadas de otros mecanismos que ocasionan un fenotipo resistente a múltiples antibióticos (co-resistencia a quinolonas, aminoglucósidos y tetraciclinas), dejando a los carbapenémicos como única opción efectiva. Estas bacterias, fácilmente transmisibles a través del contacto manual, tienen como principal reservorio el tracto digestivo y pueden causar brotes epidémicos tanto en hospitales como en la comunidad (Gobernado, 2005).

Las bacterias MDR no son un fenómeno reciente. Se han encontrado especies bacterianas MDR, así como genes de resistencia a antibióticos actualmente en uso,

en muestras arqueológicas y ambientales. Por ejemplo, los genes *blaOXA*, que codifican β -lactamasas, han sido datados en varios millones de años (Van Goethem *et al.*, 2018). Estos hallazgos sugieren que la resistencia a antibióticos ha existido a lo largo de la historia evolutiva de las bacterias, y que los mecanismos de resistencia han estado presentes en el ambiente mucho antes de la introducción de antibióticos en la medicina moderna.

La acción antropogénica ha acelerado la pérdida de la efectividad de los antibióticos, lo cual ha llevado a la Organización Mundial de la Salud a declarar a la resistencia a antimicrobianos (RAM) como una de las 10 amenazas a la salud pública global (<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>). Estudios recientes han señalado que en el 2019, las infecciones vinculadas a microorganismos MDR tuvieron una mortalidad atribuible de 1.27 millones de personas y una mortalidad asociada de 4.95 millones (Murray *et al.*, 2022).

1.2 *Klebsiella pneumoniae*

En este contexto *K. pneumoniae*, un bacilo Gram-negativo (BGN) perteneciente al orden Enterobacterales y la familia *Enterobacteriaceae*, se encuentra dentro de los seis patógenos más importantes a nivel mundial. Dentro de las combinaciones patógeno-RAM, *K. pneumoniae* resistente a cefalosporinas de tercera generación y *K. pneumoniae* resistente a carbapenemes estuvieron dentro de las 7 combinaciones más vinculadas a mortalidad en los últimos años (Murray *et al.* 2022). Incluso, puede ser resistente a todos los agentes antimicrobianos disponibles actualmente y solamente ser susceptible a agentes más antiguos y potencialmente más tóxicos, como las polimixinas, lo que deja opciones de tratamiento limitadas y subóptimas (Magiorakos *et al.* 2012).

K. pneumoniae es el agente causal de una variedad de infecciones, incluyendo, pero no limitándose a, neumonía, sepsis, infecciones del tracto urinario, bacteriemia, meningitis y abscesos hepáticos piógenos (Paczosa *et al.* 2016). Además, forma parte del grupo identificado con el acrónimo ESKAPE, que incluye los patógenos *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *K. pneumoniae*, *Acinetobacter*

baumannii, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter* spp. Este grupo es conocido por su capacidad para escapar de la actividad biocida de los antibióticos mediante múltiples mecanismos de resistencia. Estos patógenos comparten una capacidad notable para adaptarse al ambiente hospitalario, donde factores como el uso intensivo de antibióticos, la presencia de pacientes inmunocomprometidos y la utilización de dispositivos médicos invasivos favorecen la selección de clones multiresistentes. Esta adaptación no solo facilita su persistencia en superficies y reservorios clínicos, sino que también acelera la adquisición de resistencia antimicrobiana, tanto por mutaciones espontáneas como por mecanismos de transferencia horizontal (Pendleton and and Gilmore, 2013).

K. pneumoniae presenta una notable capacidad de resistencia a los antibióticos debido a la combinación de varios mecanismos que comprometen la eficacia de los tratamientos antimicrobianos. La inactivación enzimática mediante la producción de β -lactamasas, incluyendo BLEE, AmpC y carbapenemasas, constituye una de las principales estrategias, ya que estas enzimas hidrolizan los antibióticos β -lactámicos e inhiben su acción. Asimismo, la bacteria puede alterar sus estructuras diana a través de mutaciones en genes específicos o modificaciones postranscripcionales, como la metilación de bases, lo que reduce la afinidad de los antibióticos por sus blancos moleculares (Li *et al.*, 2023). Otra estrategia fundamental es la reducción de la permeabilidad de la membrana externa mediante la pérdida o mutación de porinas, lo que restringe la entrada de fármacos a la célula bacteriana. Además, la sobreexpresión de bombas de eflujo contribuye a la expulsión activa de los antibióticos, disminuyendo sus concentraciones intracelulares y reduciendo la susceptibilidad bacteriana (Li *et al.*, 2023). La complejidad de la resistencia a los antibióticos de las especies de *Klebsiella* no sólo radica en la cantidad de determinantes de resistencia que portan y su capacidad de movilizarlos vía transferencia horizontal de genes, sino también en su capacidad para formar biofilms, ya que se ha demostrado que la falta de penetración de algunos antibióticos en los biofilms impide la eliminación de cepas de este género (Townsend *et al.* 2020). El biofilm cumple un rol de barrera osmótica y dificulta la penetración de los antimicrobianos. Se ha observado que la formación de biofilms reduce significativamente la sensibilidad de *K. pneumoniae* a antibióticos como gentamicina, ampicilina y ciprofloxacina, además de estar implicada en la resistencia

a la colistina, lo que agrava aún más el desafío terapéutico que representa este patógeno (Li *et al.*, 2023).

1.3 El rol de los biofilms en la resistencia y la persistencia bacteriana

Los biofilms se definen como un agregado microbiano adherido o asociado a una superficie e incrustado en una matriz. Entendiendo un agregado, como un grupo cohesivo de células microbianas rodeadas de sustancias poliméricas extracelulares que pueden estar adheridas a una superficie o libres en fase líquida (Sauer *et al.*, 2022). Se estima que entre el 65% y el 80% de todas las infecciones bacterianas están relacionadas con biofilms, ya sea directamente o actuando como un reservorio del cual pueden proliferar organismos virulentos (Guerra *et al.* 2022).

La cápsula y las fimbrias de *K. pneumoniae* desempeñan un papel fundamental en su virulencia, capacidad de colonización y formación de biofilms. La cápsula, compuesta por una capa de polisacáridos de superficie cuya composición varía según la cepa, es el principal factor de virulencia, proporcionando resistencia a la fagocitosis, protección contra la desecación y defensa (Schembri *et al.*, 2005). Su presencia está fuertemente asociada con infecciones extraintestinales graves como septicemia, meningitis e infecciones del tracto urinario. Por otro lado, las adhesinas fimbriales, en particular las fimbrias de tipo 1 y tipo 3, permiten la adhesión a superficies específicas del huésped. Las fimbrias de tipo 1 facilitan la colonización del tracto urinario, mientras que las fimbrias de tipo 3, median la adhesión a células epiteliales traqueales y membranas basales. En conjunto, la cápsula y las fimbrias contribuyen a la persistencia de *K. pneumoniae* en el huésped y a su resistencia a mecanismos de defensa y tratamientos antimicrobianos (Schembri *et al.*, 2005).

Por tanto, la formación de biofilms representa un mecanismo intrínseco de resistencia bacteriana, más allá de la presencia de genes de resistencia antimicrobiana. Se trata de una estrategia adaptativa multifactorial que permite a las bacterias sobrevivir en condiciones ambientales adversas, incluyendo la exposición a antibióticos, defensas del huésped y estrés físico o químico.

Uno de los principales elementos que confieren esta resistencia es la matriz extracelular polimérica, una estructura tridimensional compuesta por polisacáridos, proteínas y ADN extracelular, que actúa como una barrera física y química frente a antimicrobianos y células inmunes. Esta matriz no solo limita la penetración de compuestos externos, sino que también genera gradientes de nutrientes y oxígeno, lo que favorece la aparición de subpoblaciones bacterianas con metabolismo reducido (Anderson and O'Toole, 2008; Hall-Stoodley and Stoodley, 2009).

Entre estas subpoblaciones destacan las denominadas "células persistentes", que, aunque genéticamente idénticas al resto de la comunidad, presentan una alta tolerancia a los antibióticos debido a su estado metabólicamente inactivo y a la activación de sistemas toxina-antitoxina, que bloquean las dianas antibióticas. La presencia de estas células explica la dificultad para erradicar completamente una infección, ya que pueden sobrevivir al tratamiento y reactivar la colonización una vez suspendida la terapia (Lewis, 2005). Además, la organización estructural del biofilm permite una comunicación coordinada mediante sistemas de *quorum sensing*, que regulan la expresión génica relacionada con la formación, maduración y dispersión del biofilm (Mah and O'Toole, 2001).

Desde el punto de vista clínico, esta estrategia resulta especialmente problemática en infecciones crónicas o recurrentes, como las asociadas a dispositivos médicos, heridas crónicas u osteomielitis. En estos contextos, los biofilms impiden la acción efectiva de tratamientos convencionales y dificultan la respuesta inmune, lo que contribuye a la persistencia y recurrencia de la infección (Mah and O'Toole, 2001; Stewart and Franklin, 2008).

1.4 Impacto local de la resistencia a antimicrobianos (RAM)

La RAM impacta significativa y negativamente en la economía mundial debido al aumento de los costos de prevención y mitigación de la diseminación de las bacterias MDR, así como del tratamiento de las infecciones causadas por estos microorganismos. Aunque a nuestro saber, no existen datos nacionales sobre los costos derivados de esta problemática, sí existen datos recientes sobre las Infecciones Asociadas a la Atención en Salud (IAAS). El Informe anual de las IAAS y

RAM 2019-2023 presenta un aumento significativo en las infecciones asociadas a dispositivos en Unidades de Cuidados Intensivos, especialmente exacerbado durante la pandemia (Alfonso et al. 2024). Se han descrito 91 brotes de BGN productores de carbapenemasas y 7 brotes de BGN productores de BLEEs, siendo uno de los principales microorganismos involucrados *K. pneumoniae* con un pico en el período 2021-2023. Asimismo, se observó un aumento en su resistencia a los β -lactámicos debido a la presencia de BLEEs y carbapenemasas, así como a antibióticos de último recurso como el colistín (Malik et al. 2020). Dada la problemática que representan los organismos MDR, se han propuesto estrategias terapéuticas sin antibióticos, como ser el uso de bacteriófagos, probióticos, postbióticos, simbióticos, nanopartículas, péptidos antimicrobianos, anticuerpos, medicinas tradicionales, los sistemas toxina-antitoxina, así como el trasplante de microbiota fecal (Yarahmadi et al., 2025). De todas ellas, en esta tesina nos centraremos en el uso de bacteriófagos como agentes antimicrobianos.

1.5 Los bacteriófagos como agentes de biocontrol

1.5.1 Definición y clasificación filogenética

En el contexto de la amenaza global que presupone la RAM, ha resurgido el interés en emplear bacteriófagos, virus que infectan bacterias, como alternativa terapéutica. Los fagos son las entidades biológicas más abundantes y ubicuas de nuestro planeta y su genoma puede componerse de ADN o de ARN, el cual puede ser de cadena doble o simple (Clokier et al. 2011). Morfológicamente, aquellos con cabeza-cola son los más abundantes y más frecuentemente aislados. Éstos eran anteriormente clasificados según el largo y tipo de cola en las familias virales *Podoviridae* (con colas cortas), *Myoviridae* (con colas contráctiles) y *Siphoviridae* (con colas flexibles)(Valencia-Toxqui and Ramsey, 2024). Actualmente, este factor es solo descriptivo y no determinante en la taxonomía. En 2022, el Subcomité de Virus Bacterianos del Comité Internacional de Taxonomía de Virus adoptó una clasificación basada en la secuenciación y el análisis filogenético, donde la identificación de relaciones evolutivas se realiza a través de comparaciones nucleotídicas y la presencia de proteínas clave, lo que facilita la clasificación a nivel de especie, género y familia (Turner et al., 2023). Así es que en la actualidad se habla de la clase Caudoviricetes dentro de la cual se clasifican todos los fagos de

ADN doble hebra con morfología cabeza-cola, manteniéndose los nombres de Myovirus, Podovirus o Siphovirus para referirse exclusivamente a la morfología (Valencia-Toxqui and Ramsey, 2024).

1.5.2 Ciclo viral

Los fagos presentan diversos ciclos de infección que dependen de las condiciones del huésped y del ambiente. El ciclo lítico (Figura 2Ai) provoca la lisis de la bacteria tras la replicación viral, liberando nuevos viriones. Por otra parte, en el ciclo lisogénico (Figura 2Aiii), el genoma viral se integra en el cromosoma bacteriano, replicándose pasivamente como profago hasta que factores ambientales inducen su activación lítica. Es así que, dependiendo del ciclo de vida, los fagos pueden clasificarse como virulentos (si únicamente realizan el ciclo lítico) o temperados (si realizan el ciclo lisogénico y el lítico). Es importante mencionar que una bacteria que contiene profagos, se denomina lisógena. Si una bacteria lisógena adquiere nuevas características fenotípicas como resultado de la integración del genoma de un fago temperado, a este proceso se lo denomina conversión lisogénica. Este mecanismo ha desempeñado un papel clave en la evolución de numerosas bacterias patógenas, ya que los fagos pueden transferir a la célula huésped una amplia variedad de genes que potencian su capacidad adaptativa. Entre ellos se incluyen genes de virulencia como toxinas, enzimas extracelulares, proteínas de membrana, factores de adhesión y moduladores del sistema inmune así como genes asociados a la resistencia a antibióticos (Waldor, 1998). Además, algunos fagos filamentosos, como los de la familia *Inoviridae*, siguen un ciclo de infección crónica (Figura 2B), en el cual la célula bacteriana no se lisa y produce viriones de manera continua, favoreciendo la persistencia viral y la transferencia genética (Venturini *et al.*, 2022). Finalmente, la pseudolisogenia (Figura 2Aii) representa un estado transitorio en el que el fago no se replica activamente ni se integra en el genoma bacteriano, ocurriendo en condiciones de estrés y permitiendo la supervivencia viral hasta que el ambiente favorezca la entrada en un ciclo lítico o lisogénico. Estos diferentes estilos de vida influyen en la dinámica fago-bacteria y poseen rol clave en la terapia con fagos y la evolución bacteriana (Venturini *et al.*, 2022).

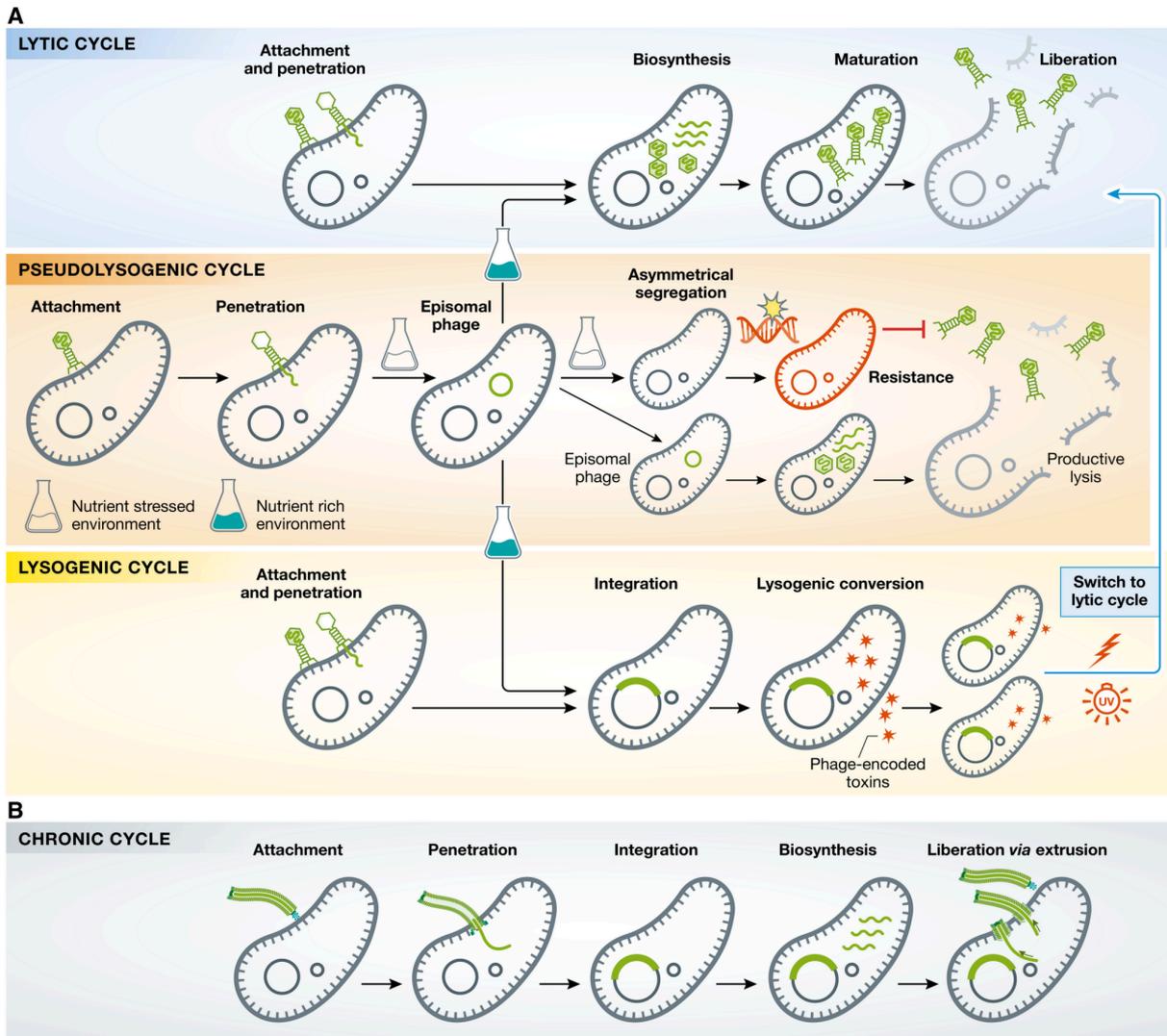


Figura 2: Modos de infección fágica. (A) Los bacteriófagos con cola pueden seguir distintos ciclos de infección: (i) en el ciclo lítico, la replicación del fago ocurre de inmediato tras la infección, culminando con la lisis celular y la liberación de nuevas partículas virales capaces de iniciar nuevos ciclos infecciosos; (ii) en el ciclo lisogénico, el genoma del fago se integra al cromosoma bacteriano como profago, replicándose junto a él hasta que se activa el ciclo lítico; (iii) en la pseudolisogenia, el ADN del fago persiste en la célula hospedadora en forma episomal, sin integración ni replicación inmediata, resolviéndose posteriormente hacia un ciclo lítico o lisogénico. **(B)** Los ciclos de infección crónica, propios de fagos filamentosos (familia *Inoviridae*), se caracterizan por la producción continua de viriones, los cuales son liberados por extrusión sin causar la muerte de la célula hospedadora. Imagen extraída y adaptada de (Venturini *et al.*, 2022).

1.5.3 Terapia fágica

La fagoterapia se describe como la aplicación de bacteriófagos virulentos de manera directa en un paciente, con el objetivo de destruir la bacteria patógena responsable de una infección clínicamente significativa (Viertel, Ritter and Horz, 2014). Los antecedentes históricos de su descubrimiento se remontan a 1896, cuando Ernest Hankin observó en la India un principio antibacteriano en el agua que eliminaba los cultivos de bacterias inductoras del cólera. Años más tarde, en 1915, Frederick Twort descubrió un “agente filtrable” capaz de lisar bacterias, y en 1917, Félix d'Herelle identificó de forma independiente un “microbio anti-Shiga”, describiendo al mismo como un bacteriófago obligado, marcando así el inicio de la fagoterapia (Wittebole, De Roock and Opal, 2014).

Mientras que en occidente el interés en la utilización de fagos como terapia decayó con la llegada de los antibióticos, en países de Europa del Este como Rusia, Polonia y Georgia fue investigada y desarrollada, mientras que recientemente ha empezado a tomar relevancia en países de occidente debido a la emergencia de la RAM (Segundo et al. 2010). Su efectividad como agentes bioterapéuticos requiere un diagnóstico preciso de la infección y un inicio temprano de la terapia, como sugieren estudios *in vivo* (Chhibber, Kaur and Kumari, 2008). Estos hechos justifican la creación de colecciones de fagos bien caracterizados y disponibles, que posean rasgos biológicos deseables como un tiempo de latencia corto, un tamaño de progenie grande y un amplio rango de hospedero (Gordillo et al. 2019). La ventaja de la terapia con fagos es su alta especificidad objetivo, que deja el microbioma humano natural prácticamente inafectado; situación que rara vez se ve cuando se usan antibióticos, lo cual frecuentemente ocasiona efectos secundarios indeseados asociados a una disbiosis como candidiasis, diarrea, y colitis (Viertel, Ritter and Horz, 2014). En Georgia, Polonia y Rusia, la fagoterapia se ha administrado con éxito por diversas vías, incluyendo tópica, intravenosa, oral y transrectal. Estudios clínicos recientes han demostrado su eficacia independientemente de la vía de administración, destacándose la oral por su simplicidad y versatilidad. Aunque se están investigando los mecanismos de translocación de los fagos en la sangre y su efecto inmunomodulador, la información sobre su dinámica en el cuerpo humano sigue siendo limitada (Górski, Międzybrodzki and Borysowski, 2019). Pero se ha observado que pueden inducir una respuesta inmune, en particular, la aparición de

anticuerpos neutralizantes entre los 6 y 35 días de iniciado el tratamiento, lo que puede reducir su actividad lítica y provocar fallos del tratamiento, especialmente en terapias prolongadas (Pirnay *et al.*, 2024).

Deducir el beneficio potencial de la fagoterapia a partir de la literatura publicada resulta difícil debido a la falta de grupos control en la mayoría de los estudios clínicos, la heterogeneidad en la administración y dosificación de los fagos, su uso combinado con antibióticos, la falta de estandarización en las pruebas de susceptibilidad a fagos y el sesgo de publicación que favorece la divulgación de resultados positivos (Suh *et al.*, 2022). Gran parte de estas limitaciones se debe a que el uso clínico de fagos se encuentra, en la mayoría de los países, restringido a situaciones compasivas, es decir, cuando han fracasado múltiples líneas de tratamiento antibiótico y no existen otras opciones terapéuticas (Yang *et al.*, 2023).

En la literatura se documentan varios casos exitosos de resolución de infecciones por *K. pneumoniae* tratadas con fagoterapia, lo cual sugiere, que a pesar de las diferentes dificultades que representa este patógeno, la alternativa de biocontrol con fagos es prometedora. A continuación se resumen tres casos de infecciones en diferentes sitios y con diferentes modos de resolución, a modo de ejemplificar las diferentes opciones terapéuticas que pueden emplearse.

En un paciente con riñón único, se documentó la resolución de una colonización prolongada por *K. pneumoniae* multirresistente tras tres semanas de tratamiento con terapia de bacteriófagos personalizada, a pesar del fracaso previo de dos ciclos con los antibióticos ceftazidima-avibactam. Esta terapia consistió de un único fago, administrado cada 12 horas por vía oral e intrarrectal. Aunque el paciente presentó episodios posteriores de infección urinaria complicada y sepsis, no se detectó la reaparición del patógeno durante más de un año, sugiriendo su erradicación (Corbellino *et al.*, 2020).

Una infección urinaria recurrente causada por *K. pneumoniae* productora de BLEE fue tratada y resuelta exitosamente mediante una combinación de meropenem y un *cocktail* de bacteriófagos provenientes del Instituto Eliava en Georgia, tras múltiples fracasos con terapia antibiótica convencional. La administración oral e intravesical

de fagos durante 16 semanas cada 12-24 horas, coincidió con la resolución rápida de los síntomas y la ausencia de infecciones en los 14 meses posteriores (Kuipers *et al.*, 2019).

Por otro lado, un paciente con infección crónica asociada a prótesis de rodilla fue tratado con terapia intravenosa monofago junto con un antibiótico oral (minociclina), logrando resolución de síntomas, reducción de inflamación y recuperación funcional sin necesidad de retirar el implante. Interesantemente, la presencia de anticuerpos específicos contra fagos no impidió el éxito clínico (Cano *et al.*, 2021).

1.5.4 Otras aplicaciones de los fagos para control biológico

La terapia con bacteriófagos en medicina veterinaria surge como una alternativa prometedora frente al aumento de infecciones bacterianas resistentes a los antibióticos, tanto en animales de producción como en animales de compañía. En especies como aves, cerdos y bovinos, los fagos han demostrado eficacia frente a *Salmonella spp*, *E. coli* y *S. aureus*, mientras que en mascotas se han documentado casos exitosos de tratamientos personalizados (Loponte *et al.*, 2021). En la producción porcina, la suplementación de la dieta con bacteriófagos ha mostrado mejorar el rendimiento del crecimiento, reducir la incidencia de diarrea y modular positivamente la microbiota intestinal en lechones destetados. Un estudio encontró que 400 mg/kg de bacteriófagos en la dieta aumentaron la ganancia diaria de peso y mejoraron la integridad de la barrera intestinal, comparables a los efectos de antibióticos tradicionales (Zeng *et al.*, 2021). Distintos bacteriófagos, tanto individualmente como en *cocktail*, demostraron ser altamente efectivos para reducir *Listeria monocytogenes* en superficies de acero inoxidable, incluyendo aquellas contaminadas con residuos de pescado, típicas de entornos de procesamiento de mariscos. El *cocktail* fágico logró eliminar células adheridas y células de biofilms desprendidas a niveles no detectables en menos de 75 minutos. La eficacia fue mayor contra células desprendidas que contra biofilms intactos, sugiriendo la necesidad de estrategias de disrupción de biofilm antes del tratamiento fágico (Ganegama Arachchi *et al.*, 2013). La administración de bacteriófagos puede, también, modular la microbiota intestinal, reduciendo bacterias patógenas y promoviendo un equilibrio saludable. En un modelo de ratón, la suplementación con

bacteriófagos reguló la inflamación intestinal y mejoró la función de la barrera intestinal, aliviando la diarrea inducida por *E. coli* enterotoxigénica (Dong *et al.*, 2024). Además, en otro estudio, la administración oral de bacteriófagos ha demostrado ser una estrategia eficaz y segura para modular patobiontes intestinales asociados a enfermedades inflamatorias crónicas. En modelos murinos predispuestos a colitis, una combinación lítica de cinco fagos dirigida específicamente contra *Klebsiella pneumoniae* permitió suprimir selectivamente este patógeno, atenuando la inflamación intestinal y reduciendo la gravedad de la enfermedad. Además, estudios en modelos de intestino humano artificial y en voluntarios sanos confirmaron la viabilidad y seguridad de esta intervención terapéutica, mostrando que los fagos son capaces de resistir las condiciones gástricas y alcanzar el intestino delgado sin alterar drásticamente el microbioma comensal (Federici *et al.*, 2022).

1.6 Situación en nuestro país

En Uruguay, la resistencia a múltiples antibióticos constituye una problemática creciente, destacándose la presencia de bacterias multirresistentes (MDR) como *K. pneumoniae* productora de carbapenemasas (KPC y NDM), *A. baumannii*, *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos, y *S. aureus* resistente a metilicina (Juan, 2018). El Ministerio de Salud Pública (MSP) ha documentado estos agentes patógenos en su Informe Anual de Infecciones Asociadas a la Atención en Salud (IAAS) y Resistencia Antimicrobiana, donde se señala una alta frecuencia de infecciones nosocomiales asociadas a estas bacterias en unidades de cuidados intensivos. Entre los años 2019 y 2023, en Uruguay, se identificaron en promedio 28 brotes anuales relacionados con IAAS, predominando microorganismos Gram-negativos resistentes, especialmente *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *Clostridium difficile* y *E. cloacae*. El principal mecanismo de resistencia reportado fue la producción de carbapenemasas, destacándose el tipo NDM, presente de forma consistente en todos los años analizados. Se observó un incremento progresivo en la proporción de IAAS con mecanismos de resistencia fenotípica, pasando del 7,3 % en 2019 al 13,7 % en 2023, con mayor impacto en unidades de cuidados intensivos médico-quirúrgicos de adultos. En cuanto a los patrones de sensibilidad, se evidenció una resistencia creciente a carbapenémicos y cefalosporinas de tercera

generación en *K. pneumoniae* y *E. cloacae*. Asimismo, se detectó una elevación en la resistencia a colistina en *Acinetobacter* sp. y *K. pneumoniae*, mientras que la resistencia a meticilina en *S. aureus* mostró una tendencia al descenso en el período evaluado. Estos hallazgos reflejan la persistencia y evolución de la resistencia antimicrobiana en contextos hospitalarios (Informe anual - Infecciones asociadas a la atención en salud y de resistencia antimicrobiana, 2024). Como respuesta institucional, Uruguay implementó un Plan Nacional contra la Resistencia Antimicrobiana, alineado con el enfoque de “Una Salud”, que integra estrategias sanitarias humanas, veterinarias y ambientales (Hacia un plan de acción nacional único contra la resistencia antimicrobiana (RAM) en Uruguay, 2023).

En Uruguay, la única aplicación de los bacteriófagos actualmente en desarrollo es la fagoterapia, la cual no se encuentra regulada por ley, pero una reciente ordenanza permite a la empresa Kinzbio el uso de terapia personalizada con bacteriófagos, siempre que la solicite un médico y el paciente suscriba un consentimiento informado de la técnica (*Ordenanza N° 1.162/024 Autorización para práctica de terapia personalizada con bacteriófagos*, 2024). La empresa ha documentado varios casos exitosos en los que, ante la imposibilidad de erradicar una infección bacteriana por medios convencionales, se optó por un tratamiento con bacteriófagos. El primer caso describe una neumonía asociada a ventilación mecánica en un paciente oncológico, causada por *P. aeruginosa* extremadamente resistente (XDR), que requirió internación en UCI y fue tratado por nebulización. El segundo caso corresponde a una infección periprotésica posquirúrgica por múltiples patógenos multirresistentes, como *S. aureus*, *K. pneumoniae* y *A. baumannii*, en un paciente internado en UCI o cuidados intermedios, tras la remoción de una prótesis de cadera. Finalmente, el tercer caso se trata de una infección urinaria recurrente en un paciente ambulatorio, causada por *Proteus mirabilis* productor de BLEE, tratada por vía intravesical (*Primera Jornada Médica sobre Avances de la Fagoterapia en Uruguay*, 2025). Estos escenarios reflejan la complejidad del manejo de infecciones en el contexto de la resistencia antimicrobiana, tanto en ámbitos hospitalarios críticos como en el manejo ambulatorio. El seguimiento clínico y microbiológico evidenció la ausencia de efectos adversos y una evolución favorable, sin recurrencia de síntomas ni cultivos positivos, permitiendo el alta domiciliaria de los pacientes

(Los científicos uruguayos que usan "verdugos buenos" para combatir una gran amenaza a la salud global, <https://www.bbc.com/mundo/articles/c1w7p115j9zo>).

Desde la academia, nuestro grupo es el primero en abordar el aislamiento y la caracterización de bacteriófagos como agentes de biocontrol. Como parte de esta línea, hemos establecido una colaboración con el grupo del Dr. Nobrega, quien amablemente nos ha cedido fagos específicos de *K. pneumoniae* que han aislado en su laboratorio (University of Southampton, UK) y que pertenecen a la colección KlebPhaCol (<https://www.klebphacol.org/>). El interés de nuestro laboratorio se centra en aislar y caracterizar fagos que tengan potencial para ser empleados para el control biológico, por tanto nos enfocaremos en fagos con ciclo de vida exclusivamente lítico ya que son potencialmente útiles para combatir infecciones (Clokier et al. 2011).

2. Objetivos

2.1 Objetivo general:

Evaluar la capacidad lítica de 6 fagos de *Klebsiella pneumoniae* (Kp) aislados en Reino Unido, sobre cepas locales de Kp de fenotipo multirresistente y formadoras de biofilm.

2.2 Objetivos específicos:

1. Determinar las condiciones y multiplicidades de infección (MOI) óptimas para generar stocks de alta concentración de cada fago a estudiar y calcular sus títulos virales.
2. Determinar el rango de hospedero de cada fago por el método de *spot test* y su eficiencia de plaqueo (EOP).
3. Seleccionar dos bacteriófagos que tengan mejor EOP y/o mayor rango de hospedero y determinar su estabilidad a diferentes temperaturas y niveles de pH.
4. Evaluar la capacidad de formar biofilms de aquellas cepas bacterianas que sean susceptibles a la infección por los fagos seleccionados.
5. Analizar la capacidad de alguno de los bacteriófagos seleccionados para disgregar biofilms preformados de la cepa bacteriana con mayor capacidad de formar biofilms y estudiar la dinámica de la infección viral mediante curvas de infección.
6. Analizar por secuenciación masiva:
 - a. El genoma de al menos un stock viral generado y comparar con la secuencia del fago original.
 - b. El genoma de la bacteria más formadora de biofilms, identificando genes de resistencia a antibióticos, secuenciotipo, tipo capsular y grupos de incompatibilidad plasmídica.

3. Materiales y métodos

3.1 Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Las cepas de *Klebsiella spp* que se emplearon para el aislamiento de los fagos (cepas indicadoras/de producción) son cepas clínicas aisladas en Reino Unido (L0240, 164413U/2 y 164125A) y cedidas amablemente por el Dr. Franklin Nobrega de la University of Southampton, Reino Unido. También se empleó una cepa comercial: ATCC 700603 (<https://www.atcc.org/products/700603>) (Apéndice: Tabla suplementaria 1).

La selección de cepas utilizadas para los ensayos de rango de hospedero (Sección 3.6) se determinó contemplando la epidemiología local de Uruguay de los últimos años, incluyendo 25 aislamientos productores de BLEEs y/o carbapenemasas previamente caracterizados fenotípicamente y para algunos de los cuales se contaba con datos de secuenciación genómica. Asimismo, se incluyeron representantes de otras especies bacterianas (BGNs) para verificar la especificidad de los fagos por *Klebsiella spp* (Tabla 1). Estos aislamientos fueron provistos, en el marco de colaboraciones, por la Unidad de Microbiología del departamento de Bioquímica Clínica de Facultad de Química y por el Laboratorio de Genómica Microbiana del Institut Pasteur de Montevideo.

En todos los casos, las cepas bacterianas fueron crecidas en caldo LB (broth, Miller) o placas de TSA (Oxoid LP0011) a 37°C. Hasta ser repicadas, se conservaron a -80°C en medio *Brain-Heart-Infusion* (BHI) con 20% (v/v) de glicerol.

3.2 Fagos ensayados

Se trabajó inicialmente con seis fagos virulentos de la colección KlebPhaCol (<https://www.klebphacol.org/>), aislados en Reino Unido en el Nobrega Lab (*University of Southampton*). Todos pertenecen a la clase *Caudoviricetes* (morfología cabeza-cola, genoma de ADNdc) y sus genomas están secuenciados. Para la elección de los fagos a trabajar, no solo se priorizó que tuvieran diferente morfología viral (Figura 3), sino también que pertenecieran a diferentes familias

virales. Más allá de los criterios establecidos, la selección individual de cada fago presentó un componente parcialmente aleatorio (Tabla 1).

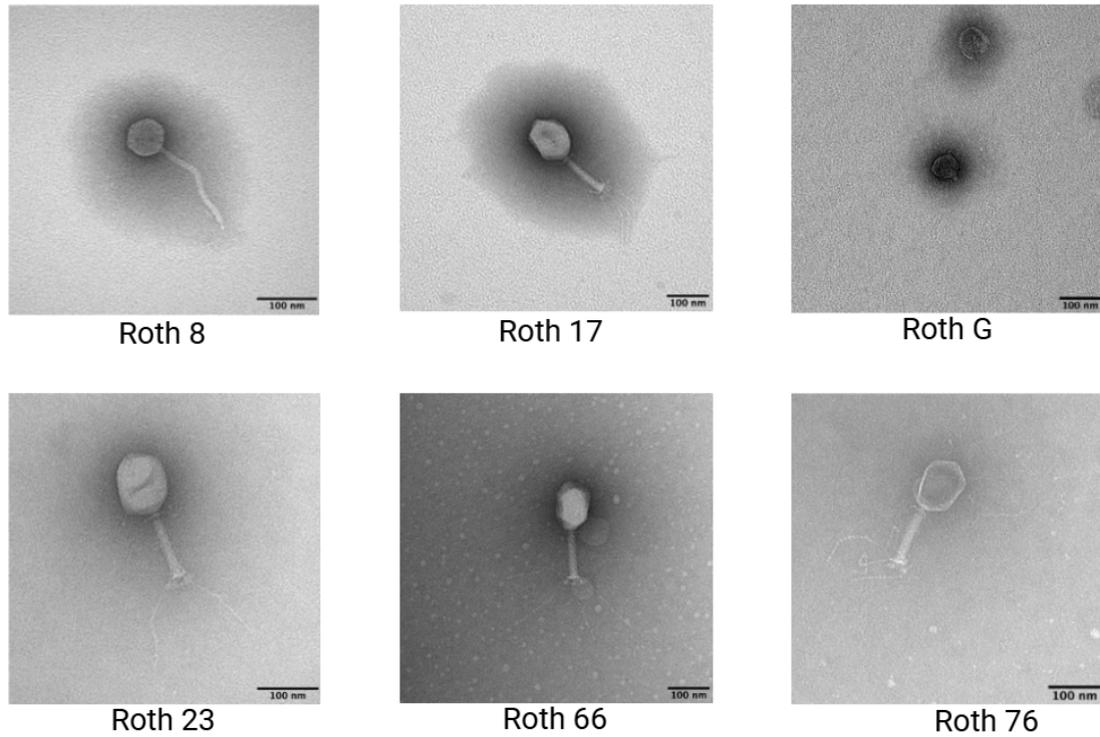


Figura 3: Micrografías electrónicas de los fagos empleados en este trabajo. Se muestran las imágenes correspondientes a los fagos Roth 8, Roth 17, Roth G, Roth 23, Roth 66 y Roth 76. Imágenes tomadas y adaptadas de (Rothschild-Rodriguez *et al.*, 2024)

Tabla 1: Principales características de los fagos estudiados

Fago	Roth G	Roth 08	Roth 23	Roth 76	Roth 66	Roth 17
Cepa de producción	L0240	164125A	164413U/2	164413U/2	ATCC 700603	ATCC 700603
Morfología viral	Podovirus	Siphovirus	Myovirus	Myovirus	Myovirus	Myovirus
Clasificación filogenética	<i>Autographiviridae</i> , <i>Drulisvirus</i>	<i>Drexelviridae</i> , <i>Webervirus</i>	<i>Straboviridae</i> , <i>Slopekvirus</i>	<i>Straboviridae</i> , <i>Jiaodavirus</i>	<i>Straboviridae</i> , <i>Jiaodavirus</i>	<i>Straboviridae</i> , <i>Jiaodavirus</i>
Morfología de placa en cepa de producción	halo	halo	pequeña sin halo	halo	pequeña con halo	pequeña sin halo
Tamaño genoma (pb)	43.182	50.204	174.483	166.283	166.36	167.079

3.3 Generación de ministocks

A partir de alícuotas de stocks fágicos recibidos del Nobrega Lab (*University of Southampton*) se realizaron minipropagaciones “en ciego”, es decir, sin cálculo de una multiplicidad de infección (MOI, del inglés: *Multiplicity of Infection*) por desconocer si el título viral se había mantenido estable durante su envío y hasta el momento de su utilización. Estos ministocks se realizaron en 3 mL de medio LB, con 15 μ L de la bacteria de producción correspondiente en fase de crecimiento exponencial, densidad óptica (OD, del inglés: *Optical Density*) a 600nm - OD600 ~ 0.2, y 20 μ L de fago, y se incubó *overnight* (ON) a 37°C y con agitación (100 rpm). Posteriormente se centrifugó a 5000 rpm durante 10 minutos y recolectamos el sobrenadante en tubos de 15 mL. Si bien para obtener una solución viral pura, se debe filtrar por un filtro de 0.22 μ m, en este punto se trabajó con el ministock sin filtrar debido al poco volumen, con el objetivo de emplearlo para determinar la MOI óptima para cada fago (sección 3.4) y realizar la preparación de stocks virales.

3.4 Determinación de la MOI óptima para cada fago y preparación de stocks virales

Para determinar cuál es la MOI que genera los títulos virales más elevados para cada fago, realizamos propagaciones a distintas MOI y diferentes tiempos (*overnight* y aproximadamente 6 hs de infección). Estas propagaciones se realizaron en 20 mL de cada cepa indicadora en fase exponencial, que fueron inoculados con las diferentes MOIs a testear (0.1, 0.01, 0.001, 0.0001, 0.00001), a 37°C - 100 rpm por 6 hs u *overnight* o hasta que el cultivo clarificara, indicando lisis bacteriana (midiendo OD600, incluyendo un control positivo de crecimiento bacteriano - sin fago, y un control negativo o blanco - sin bacteria). Todas las propagaciones fueron suplementadas con CaCl₂ 2 mM, para favorecer la adsorción viral, (Abdel-Aal *et al.*, 2024; Fujimura and Kaesberg, 1962). Luego de centrifugar (8000 g por 10 minutos) para remover *debris* celular o bacterias no lisadas, el sobrenadante se pasó por un filtro de Polietersulfona (PES) de 0.22 μ m, obteniendo así los stocks virales. Posteriormente, estimamos su título mediante un ensayo de doble capa de agar (DLA) por *spot assay* o *spot test* (Kutter, 2009). Para ello, 100 μ L del cultivo de la bacteria de producción en fase exponencial se agregaron a 2 mL de agar soft al 0.5% (p/v) fundido y se vertieron sobre una placa de Petri con una fina capa de TSA,

para posteriormente agregar 4µL de cada dilución de la propagación generada sobre el césped bacteriano (Figura 4). Luego de una incubación *overnight* a 37°C, se determinaron las unidades formadoras de placas por mililitro (UFP/mL) según la fórmula:

$$UFP/ml = \text{número de placas de lisis} / \text{volumen del inóculo} \times \text{dilución sembrada}$$

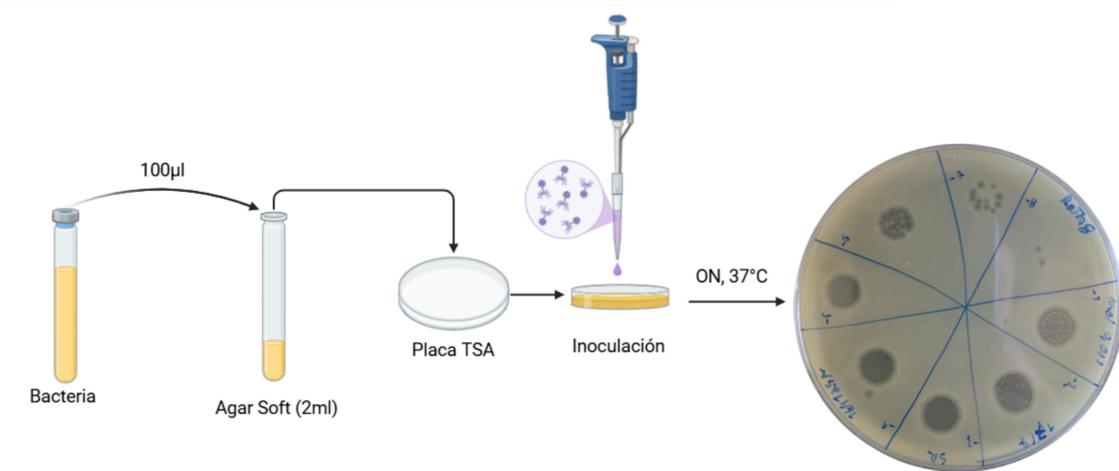


Figura 4: Esquema de titulación de stocks virales por el método de *spot assay*. Se añadieron 100 µL de cultivo bacteriano en fase exponencial en 2 mL de agar *soft* al 0,5% (p/v) y se vertieron sobre una placa con TSA. Sobre el césped bacteriano se aplicaron 4 µL de cada dilución de la propagación fágica. Tras incubación *overnight* a 37 °C, se determinaron las unidades formadoras de placas por mililitro (UFP/mL). Imagen creada con [BioRender.com](https://www.biorender.com).

Los conceptos de Generación y Propagación viral fueron utilizados para diferenciar cada stock de fagos. La generación está definida a partir del número de stock viral utilizado para producir el stock subsiguiente. Por otro lado, la propagación se utiliza para diferenciar los distintos stocks virales generados a partir de una misma generación (Figura 5).

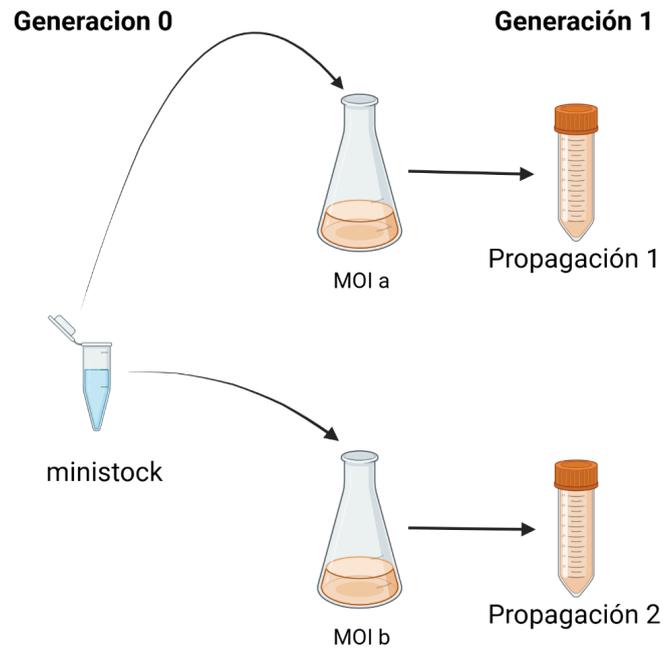


Figura 5: Esquema explicativo sobre los conceptos de generación y propagación virales. Nuestros ministocks se consideraron generación 0 (G0), y a partir de allí, la generación 1 (G1) corresponde a los stocks originales obtenidos en matraces. Las distintas propagaciones a partir de la G1 se obtuvieron empleando diferentes MOIs. Imagen creada con [BioRender.com](https://www.biorender.com).

3.5 Titulación de stocks virales

La titulación se realizó por la técnica de superposición de doble capa de agar (DLA) (Kropinski et al. 2009) en placa completa, donde 100 μ L de diferentes diluciones del stock viral, 100 μ L del cultivo de la bacteria hospedadora y 3 mL de agar *soft* al 0.5% (p/v) se vertieron sobre una placa de Petri con una fina capa de TSA (Figura 6). Luego de una incubación *overnight* a 37°C, se determinaron las UFP/mL según la fórmula detallada en la Sección 3.4. Se contaron placas en aquellas diluciones que presentaron entre 30 y 300 placas de lisis (dependiendo del tamaño de cada una).

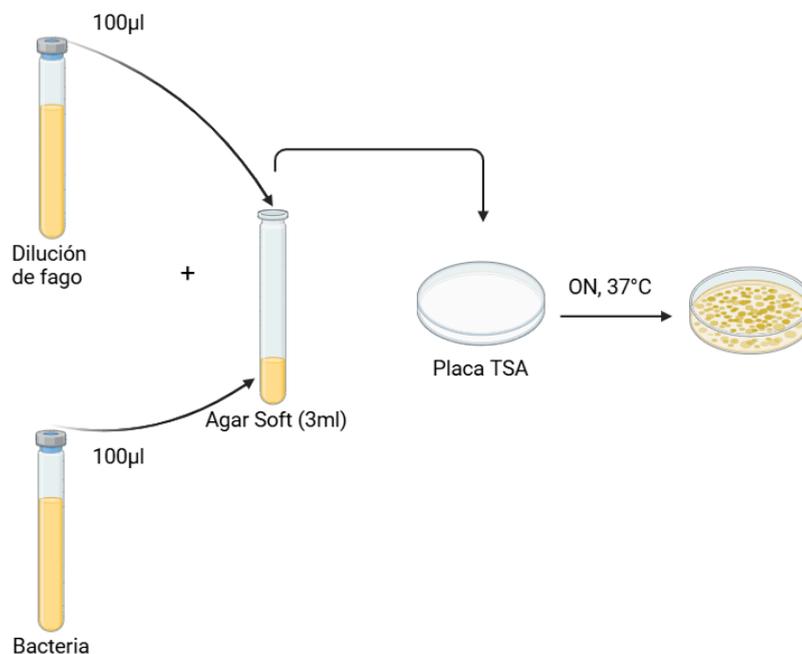


Figura 6: Esquema de titulación de stocks virales por el método de superposición de doble capa de agar. Se utilizó agar *soft* (0.5% p/v) como medio semisólido para restringir el movimiento de las partículas virales, lo que permitió la formación de placas de lisis visibles sobre el césped bacteriano (Kropinski et al 2009). Imagen creada con [BioRender.com](https://www.biorender.com).

3.6 Ensayos de rango de hospedero

Se utilizó la técnica de *spot test* (Kutter, 2009) para determinar qué cepas bacterianas eran susceptibles de ser lisadas por los fagos en estudio. Para este ensayo, se prepararon tapices bacterianos mezclando 100 µL de cada cultivo bacteriano en fase exponencial con 2 mL de agar *soft* 0.5% (p/v), el cual se vertió sobre cada mitad de placa de TSA de dos divisiones, permitiendo así realizar 2 réplicas técnicas para cada ensayo. Luego de solidificar el soft agar, se sembraron 4 µL de los stocks virales (sin normalizar los títulos) sobre el tapiz bacteriano, utilizando dos réplicas biológicas de cada fago (es decir, dos stocks de distintas propagaciones), a excepción de Roth 66 y Roth 17, y se incubó a 37°C *overnight*. Posterior a la incubación, se observó la capacidad de cada fago de lisar la cepa bacteriana del césped (Figura 7).

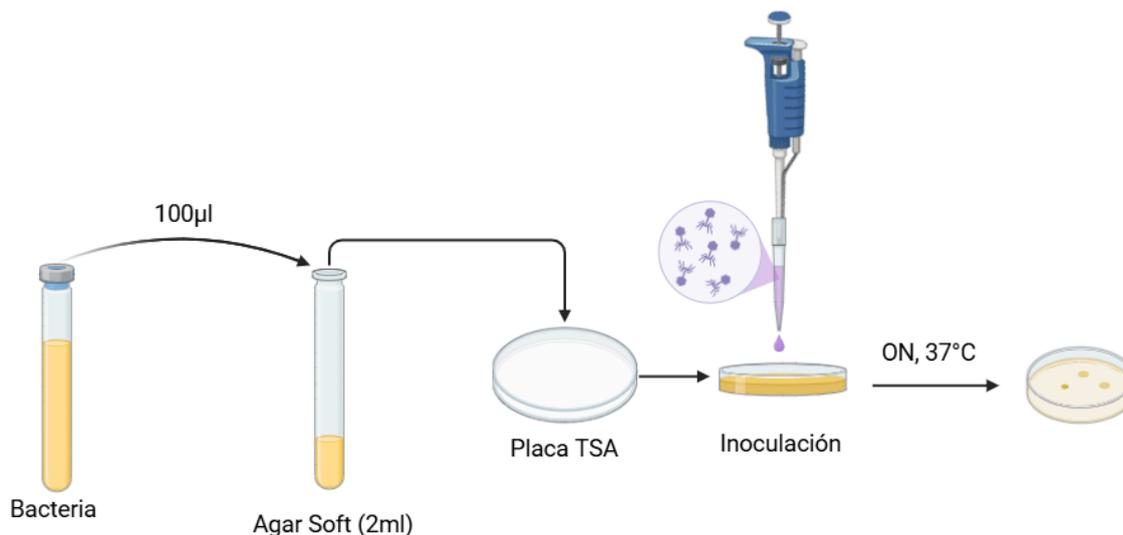


Figura 7: Esquema de ensayo de rango de hospedero por ensayo de spot test. Se prepararon céspedes bacterianos mezclando 100 µL de cultivo en fase exponencial con 2 mL de agar *soft* al 0.5% (p/v), vertidos sobre placas de TSA divididas para obtener dos réplicas técnicas por ensayo. Se sembraron 4 µL de stocks virales sobre cada mitad del césped bacteriano, utilizando dos réplicas biológicas por fago (excepto Roth 66 y Roth 17). Tras incubación *overnight* a 37 °C, se evaluó la capacidad lítica de cada fago sobre las cepas bacterianas ensayadas. Imagen creada con [BioRender.com](https://www.biorender.com).

3.7 Eficiencia de plaqueo (EOP)

La eficiencia de plaqueo (EOP, del inglés: *Efficiency of Plating*) es una comparación entre recuentos de placas de lisis utilizando un hospedero como bacteria indicadora (de producción) *versus* aquellas bacterias que sean lisadas con el ensayo anterior. La EOP en principio podría representarse como un número que es mayor o menor que 1.0, aunque típicamente se muestra como menor a uno. Una EOP más alta en un determinado hospedero se toma como indicación de un mayor potencial por parte de un determinado fago para propagarse en ese hospedero (Kutter 2009). La EOP se suele clasificar en tres niveles: alta virulencia, virulencia media/moderada, no virulento (Gibson *et al.*, 2019):

- Alta virulencia: $EOP \geq 0,1$
- Virulencia media/moderada: EOP entre 0,001 y 0,1
- No virulento: $EOP < 0,001$

El ensayo de EOP se realizó únicamente con los fagos para los cuales se observó lisis clara en el ensayo anterior. Este ensayo es la confirmación del rango de hospedero. En donde, únicamente si observamos placas aisladas, se confirma que la lisis observada en el rango de hospedero se debe a un ciclo viral productivo del fago y no a una lisis incompleta (detallada más adelante en resultados y discusión). Aunque también puede ocurrir que veamos placas aisladas en el spot test del rango de hospedero, ese caso también es confirmativo. Para llevar a cabo este ensayo, se realizó una titulación viral a partir de 8 diluciones seriadas en base diez mediante la técnica DLA por *spot assay* (Kutter, 2009). Se realizó por duplicado en placas de TSA divididas al medio (2 réplicas técnicas para cada titulación). El volumen sembrado de cada dilución fue de 4 μ L, utilizando dos réplicas biológicas de cada fago (es decir, dos stocks de distintas propagaciones). Al sembrar 4 μ L, el límite de detección es de 250 UFP/mL. Por ello, todas las placas de Petri en las que no se observaron placas de lisis se catalogan como bajo el límite de detección (BLD). Se tituló cada fago en su bacteria de producción y en las cepas de prueba. Con los títulos obtenidos se calculó la EOP según la siguiente fórmula:

$$EOP = (UFP/ml \text{ en cepa de prueba}) / (UFP/ml \text{ en cepa de producción})$$

3.8 Selección de bacteriófagos y cepa bacteriana para caracterización adicional

Dado que uno de los objetivos de la tesis comprendía caracterizar fagos con características prometedoras para biocontrol de *K. pneumoniae*, a los 2 fagos que presentaron rangos de hospedero más amplios y/o mayores valores de EOP, se les caracterizó su estabilidad térmica y a diferentes valores de pH. A aquél que evidenció una mayor estabilidad se le realizó curvas de infección (Sección 3.10) y fue evaluado respecto a su actividad para erradicar biofilms (Sección 3.12).

Para seleccionar la cepa bacteriana a utilizar en los ensayos de disgregación de biofilms y curvas de infección, se tomó en cuenta que fuera susceptible a ser lisada por el/los fagos de interés, y que a la vez fuera fuertemente formadora de biofilms (sección 3.11).

3.9 Ensayos de estabilidad térmica y a diferentes valores de pH

3.9.1 Ensayos de estabilidad térmica

La estabilidad térmica de los virus se evaluó mediante la incubación de 250 μL de cada stock viral a 4, 25, 37, 42 y 60 °C durante 1 hora. La elección de estos valores se basó en temperaturas que podrían ser encontradas en diferentes condiciones:

- a 4°C se conservan los stocks virales, por lo cual esta temperatura fue nuestra condición control;
- 25°C representa la temperatura ambiente;
- 37°C la temperatura del cuerpo humano;
- 42°C condiciones de estrés y escenarios en los que los fagos podrían estar expuestos a temperaturas superiores a las normales sin causar una destrucción inmediata;
- 60°C permite explorar la robustez de los fagos frente a procesos de inactivación térmica y/o condiciones ambientales severas.

Luego de la incubación, los títulos virales fueron determinados utilizando la técnica de *spot assay* por triplicado en placas de TSA divididas en tercios, resultando en un total de 3 réplicas técnicas para cada condición de temperatura. Asimismo, se realizaron 2 réplicas biológicas de cada experimento.

Para el análisis de estabilidad térmica, se graficó la media de las dos réplicas biológicas de cada fago \pm el error estándar de la media (SEM, del inglés: *Standard Error Mean*), en función de la temperatura. Las diferencias entre las medias de los títulos fueron evaluadas por Kruskal-Wallis *test* usando GraphPad Prism versión 10.3.0 para Windows, GraphPad Software, Boston, Massachusetts USA, www.graphpad.com. Aquellos valores de $p < 0.05$ fueron considerados como significativos.

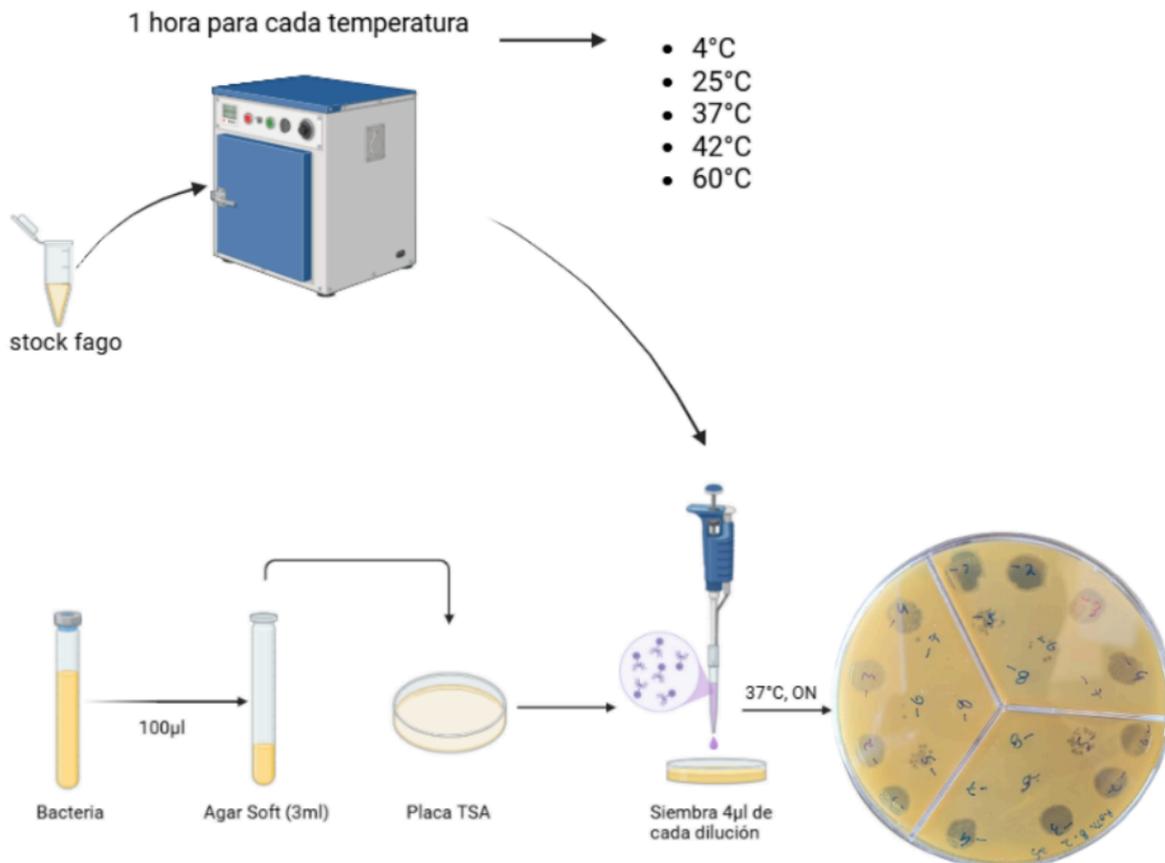


Figura 8: Esquema de ensayo de estabilidad térmica. Se incubaron 250 µL de cada stock viral a 4, 25, 37, 42 y 60 °C durante 1 hora. Posteriormente, los títulos virales fueron determinados por *spot assay* en placas con TSA divididas en tercios, realizando 3 réplicas técnicas por condición de temperatura y 2 réplicas biológicas por fago. Imagen creada con [BioRender.com](https://www.biorender.com).

3.9.2 Ensayos de estabilidad a diferentes valores de pH

La estabilidad de cada fago se evaluó a pH 3, 5, 7, 9 y 11 mediante su incubación a 37 °C durante 1 hora. Se eligió esta temperatura (temperatura corporal humana) pensando en una posible futura aplicación en terapia fágica. Para el ajuste de pH, se emplearon soluciones de ácido clorhídrico (HCl) e hidróxido de sodio (NaOH), ajustando el valor deseado en alícuotas de 250 µL de cada stock viral. La confirmación del pH se realizó utilizando tiras indicadoras de pH (MColorpHast). La elección de estos valores de pH pretendió abarcar un rango amplio, desde valores de pH ácidos hasta básicos, que puedan encontrarse en diferentes ambientes a los

cuales pueda exponerse cada fago, ya sea naturalmente, o si fuera a vehiculizarse para terapia fágica o como descontaminante de superficies:

- pH 3 es el máximo valor a nivel estomacal (Fallingborg, 1999) así como en algunos desinfectantes a base de ácido peracético (Costa *et al.*, 2015) o ácido clorhídrico;
- pH 5 o cercano puede encontrarse en diferentes fluidos y órganos en condiciones específicas (Owen and Katz, 1999), así como en desinfectantes diluídos a base de peróxido de hidrógeno (Trautmann *et al.*, 2021);
- valores cercanos a pH 7 son habituales en diferentes fluidos corporales como la sangre (Kellum, 2000), la saliva (Humphrey and Williamson, 2001) y el líquido sinovial (que rodea las articulaciones) (Jebens and Monk-Jones, 1959) así como en desinfectantes a base de amonios cuaternarios (Wang and Peery, 1975);
- pH 9 es el valor de los stocks virales por lo cual se considera la condición control;
- pH 11 representa desinfectantes alcalinos que contienen hipoclorito de sodio (Pişkin and Türkün, 1995).

A nivel intestinal, el pH varía a lo largo del tracto: en el duodeno se encuentra alrededor de 6,4, aumentando a 7,3 en la parte distal del intestino delgado, luego disminuye a aproximadamente 5,7 en el ciego y vuelve a subir a 6,6 en el recto (Fallingborg, 1989). *Klebsiella pneumoniae* es una colonizadora de la microbiota intestinal, por tanto, es fundamental disponer de fagos que sean capaces de mantener su estabilidad en estas condiciones de pH.

Una vez finalizado el tiempo de incubación, los títulos virales fueron determinados de igual manera que para la estabilidad térmica. Para el análisis de estabilidad, se graficó la media de las dos réplicas biológicas de cada fago \pm el SEM, en función del pH. Las diferencias entre las medias de los títulos fueron evaluadas por Kruskal-Wallis *test* usando GraphPad Prism versión 10.3.0 para Windows, GraphPad Software, Boston, Massachusetts USA, www.graphpad.com. Aquellos valores de $p < 0.05$ fueron considerados como significativos.

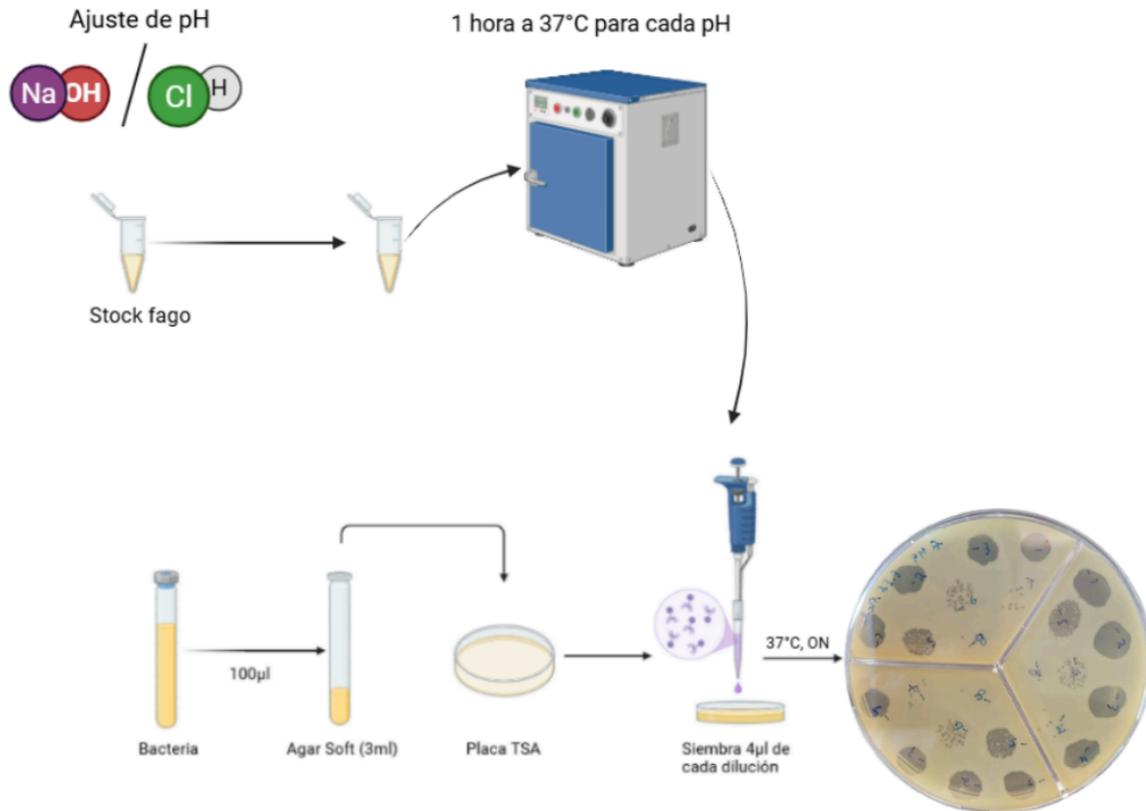


Figura 9: Esquema de ensayo de estabilidad a diferentes valores de pH. Se incubaron alícuotas de 250 µL de cada stock viral a 37 °C durante 1 hora, ajustando el pH a 3, 5, 7, 9 y 11 mediante soluciones de ácido clorhídrico (HCl) o hidróxido de sodio (NaOH). Posteriormente, los títulos virales fueron determinados por *spot assay* en placas con TSA divididas en tercios, realizando 3 réplicas técnicas por condición de temperatura y 2 réplicas biológicas por fago. Imagen creada con [BioRender.com](https://www.biorender.com).

3.10 Curvas de infección de los fagos seleccionados

3.10.1 Curva de crecimiento en placa de 96 pocillos

Para la realización de este ensayo, fue necesario en primera instancia construir una curva de crecimiento de la cepa bacteriana seleccionada en la Sección 3.8. Esto permitió determinar a qué valor de OD600 el cultivo se encontraba en fase exponencial de crecimiento. La curva de crecimiento se realizó en una placa de 96 pocillos, y se evaluaron distintas condiciones de siembra, utilizando diluciones bacterianas de cultivos *overnight* (1/100, 1/200 y 1/300), así como dos volúmenes de inóculo (75 µL y 100 µL). La incubación se realizó *overnight* en un lector de microplacas (Varioskan LUX Multimode Microplate Reader).

Para evitar la contaminación del equipo con bacterias, se cubrió la placa con un film no respirable, lo que restringió el intercambio gaseoso y, por ende, redujo la disponibilidad de oxígeno en los pocillos. Aunque *K. pneumoniae* es una bacteria anaerobia facultativa, su crecimiento exponencial resulta más eficiente en condiciones aerobias (Chen *et al.*, 2009). Por tal motivo, se probaron distintas combinaciones de diluciones y volúmenes de siembra, con el fin de identificar las condiciones que permitieran un crecimiento óptimo en presencia de oxígeno.

3.10.1 Curva de crecimiento en matraz, para recuento bacteriano

Se eligieron 3 puntos dentro del período de crecimiento exponencial detectado a partir de la curva en placa (OD600 0,10, 0,15 y 0,25), para repetirlos en matraces y poder realizar el recuento bacteriano. Se realizaron 2 réplicas biológicas, creciendo dos colonias diferentes en 5 mL medio LB *overnight*, a 37°C y 100 rpm. Al día siguiente se agregó 4,5 mL de cada cultivo a diferentes matraces con 200 mL de LB y continuamos la incubación hasta que se obtuvo los valores de OD600 deseados. En esos tiempos, se realizó el recuento bacteriano mediante siembra incorporada en placas de petri con TSA a partir de las diluciones seriadas en base diez -5, -6 y -7 para cada cultivo. Cada siembra se realizó por triplicado. A partir de este ensayo, se pudo establecer la correspondencia entre la densidad óptica (OD600) y la concentración en unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL), con el objetivo de calcular las diferentes MOI requeridas para la curva de infección.

3.10.2 Curva de infección

Se realizaron 2 réplicas biológicas, creciendo dos colonias diferentes en 5 mL medio LB *overnight*, a 37°C y 100 rpm. Al día siguiente se agregó 4,5 mL de cada cultivo a diferentes matraces con 200 mL de LB. Se midió la densidad óptica hasta alcanzar uno de los puntos de los seleccionados previamente, momento en el cual se sembraron 100 uL de cultivo bacteriano en cada pocillo de una placa de 96 pocillos. Los cultivos se infectaron con 3 MOIs diferentes (0.01, 0.1 y 1) y luego se incubó con agitación a 37°C en el lector de placas por 18hs, período en el cual se registraron las medidas de OD600 cada 5 minutos (Figura 10). Este ensayo fue realizado para ambas propagaciones del fago seleccionado, a partir de 3 colonias bacterianas diferentes para cada caso, e incluyendo tres réplicas técnicas para cada

condición. Por tanto, para cada propagación viral, el ensayo constó de 3 experimentos independientes con 3 réplicas técnicas cada uno. Además se agregó una única réplica biológica a MOI 10 para ambas propagaciones.



Figura 10: Diagrama del ensayo de curva de infección Se realizaron dos réplicas biológicas iniciales, cultivando colonias independientes en medio LB *overnight*, y al día siguiente se agregó 4,5 ml de los cultivos a un matraz con 200 mL de LB. Al alcanzar la densidad óptica deseada, se sembraron 100 μ L de cultivo bacteriano en placas de 96 pocillos. Los cultivos se infectaron con las dos propagaciones del fago seleccionado a MOI 0,01, 0,1 y 1, y se incubaron a 37 °C durante 18 h en un lector de placas, registrando OD600 cada 5 min. Para cada propagación viral se realizaron tres experimentos independientes (réplicas biológicas), cada uno con tres réplicas técnicas por condición. Adicionalmente, se incluyó una única réplica biológica infectada a MOI 10 para ambas propagaciones. Imagen creada con [BioRender.com](https://www.biorender.com).

Se calculó el índice de centroide (IC) del área bajo la curva. Este punto conceptual, definido por sus coordenadas X (tiempo promedio del crecimiento) e Y (magnitud promedio del crecimiento), resume la distribución temporal de la densidad poblacional. El IC permite capturar con mayor precisión la localización y la magnitud del crecimiento o re crecimiento bacteriano (detallado más adelante en resultados y discusión). Fue calculado mediante la introducción de los valores OD600 medios de las tres repeticiones en el software Centroid Index Calculator según Hosseini et al., (2024).

3.11 Ensayo de formación de biofilms en placa en condiciones estáticas

Mediante este ensayo procuramos determinar la capacidad de formar biofilms de aquellas cepas susceptibles a los fagos de interés siguiendo un protocolo ya

reportado (Jorge *et al.*, 2023), con modificaciones. Para ello, el primer día se inoculó una colonia de cada cepa bacteriana en 200 μL de LB en una placa de 96 pocillos, por triplicado. Se incubó *overnight* a 37 °C en condiciones estáticas. Al día siguiente se tomaron 100 μL de cada cultivo, se realizaron diluciones al décimo en 900 μL de LB, y se midió la OD600 en un espectrofotómetro (BioPhotometer D30, Eppendorf). Con el fin de asegurar una concentración bacteriana homogénea, se realizaron diluciones en caso de que los cultivos presentaran diferencias en OD, ajustándolos al valor más bajo registrado. Posteriormente, también en placas de 96 pocillos, se sembraron 180 μL de LB y se añadieron 20 μL del cultivo ajustado. Se utilizaron 3 placas de 96 pocillos, una para cada réplica biológica y se sembraron 3 pocillos de cada cepa, a modo de contar con 3 réplicas técnicas de cada experimento. Finalmente se incubó 24 hs a 37 °C en condiciones estáticas.

Finalizado el período de incubación, las bacterias planctónicas de cada pocillo fueron removidas cuidadosamente y se realizaron tres lavados con 250 μL de *buffer* fosfato salino 1X (PBS, del inglés: *phosphate-buffered saline*), manipulando las placas meticulosamente para evitar la disrupción del biofilm formado. Posteriormente, se adicionaron 200 μL de cristal violeta al 0.1% (previamente diluido en agua destilada a partir de la solución comercial al 1 %) y se incubó la placa a temperatura ambiente durante 15 minutos.

El exceso de cristal violeta fue removido mediante, al menos, tres lavados con 250 μL de PBS 1X, y la placa se dejó secar boca abajo sobre papel absorbente. Finalmente, para la cuantificación del biofilm, se añadieron 200 μL de etanol al 95 % en cada pocillo para solubilizar el cristal violeta, asegurando también la solubilización del biofilm adherido a los bordes mediante pipeteo. La placa fue incubada a temperatura ambiente durante 2 minutos con agitación, y la densidad óptica fue medida a OD590 nm en un lector de placas (Varioskan LUX Multimode Microplate Reader). Un diagrama del protocolo se esquematiza en la Figura 11. La habilidad de cada cepa de formar biofilms se categorizó como no formadora, formadora débil, formadora moderada o fuertemente formadora de acuerdo a los criterios de (Stepanović *et al.*, 2007), que se basan en valores de OD de corte (ODcut) calculados de la siguiente manera:

$$OD_{cut} = \text{promedio de OD de los blancos} + 3 \text{ SD del OD promedio de los blancos}$$

donde SD corresponde a la desviación estándar y los blancos son los controles negativos (pocillos con LB sin bacterias).

A partir de ese valor de OD_{cut} y del promedio de los valores de OD para cada cepa ensayada, se determinaron las categorías:

- $OD \text{ cepa} \leq OD_{cut}$ = No formadora de biofilms (NFB)
- $OD_{cut} < OD \text{ cepa} \leq 2 \times OD_{cut}$ = Formadora débil (FD)
- $2 \times OD_{cut} < OD \text{ cepa} \leq 4 \times OD_{cut}$ = Formadora moderada (FM)
- $OD \text{ cepa} > 4 \times OD_{cut}$ = Formadora fuerte (FF)

Asimismo, se graficaron estos valores de OD en función de la cepa ensayada, y se compararon con una cepa clínica previamente categorizada como formadora fuerte (Kp19/2) (Echeverría 2014). La normalidad de los datos se determinó con el test de Shapiro-Wilk. La diferencia en la capacidad para formar biofilms se analizó estadísticamente mediante test de ANOVA de una vía, no pareado con test de comparaciones múltiples de Dunnett usando GraphPad Prism versión 10.3.0 para Windows, GraphPad Software, Boston, Massachusetts USA, www.graphpad.com. Aquellos valores de $p < 0.05$ fueron considerados como estadísticamente significativos.

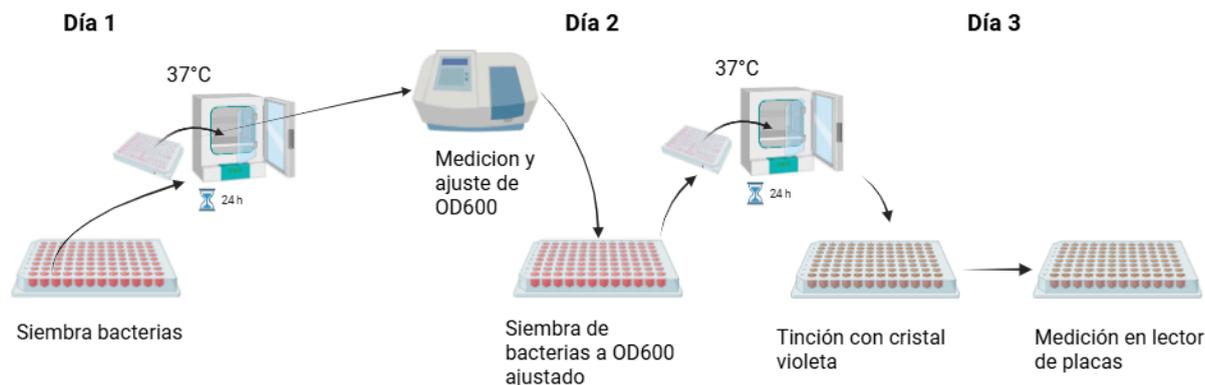


Figura 11: Diagrama del ensayo de formación de biofilms. El día 1, se inocularon cepas bacterianas en placas de 96 pocillos y se incubaron *overnight* a 37 °C en condiciones estáticas. El día 2, se midió la densidad óptica de los cultivos, se ajustaron las concentraciones bacterianas para homogeneizarlas y se sembraron en nuevas placas de 96 pocillos, que fueron incubadas durante 24 h a 37 °C. En el día 3, finalizada la incubación, se removieron las bacterias planctónicas y se realizaron lavados con PBS 1X. Luego, se tiñó el biofilm con cristal violeta al 0,1 %, se eliminó el exceso de colorante, y la placa se secó. Finalmente, se añadió etanol al 95 % para solubilizar el cristal violeta retenido, y la absorbancia se midió a OD 590 nm. Imagen creada con BioRender.com.

3.12 Ensayo de erradicación de biofilms preformados

Se seleccionó la cepa bacteriana que fuera más fuertemente formadora de biofilms y que a la vez fuera lisada por al menos un fago de los estudiados. Para preparar la suspensión bacteriana fresca, se inoculó una colonia bacteriana en 2 mL de LB y se incubó a 37 °C en agitación (100 rpm) *overnight*. Se realizaron 4 réplicas biológicas del experimento con 3 réplicas técnicas cada una. Los cultivos obtenidos se ajustaron a una OD600 promedio = 1,4 (para partir de un OD600 en común), utilizando un espectrofotómetro (BioPhotometer D30, Eppendorf) y luego se diluyeron 1:10 con medio fresco. El ensayo se realizó en placas de 96 pocillos de fondo plano, manteniendo siempre la misma marca de placa (Costar) para garantizar la reproducibilidad de los resultados. Se sembraron 200 µL de los cultivos diluidos por triplicado para cada fago y condición, y se incubaron a 37 °C durante 20 hs en condiciones estáticas en un ambiente con humedad para minimizar la

evaporación de los bordes. Con este mismo fin, además se agregó agua en los bordes de las placas. Se incluyó un control positivo (sin fago) y un control negativo de LB sin bacterias. Además se agregó un control sin bacterias donde únicamente se sembró stock viral de cada fago, con el objetivo de determinar si nuestros stocks podían influir en el resultado, en caso de retener cristal violeta. Tras la incubación, se aspiró el medio líquido y los pocillos se lavaron dos veces con PBS 1X para eliminar cualquier célula planctónica, tras lo cual se añadieron 200 μ L de stock viral a la mayor concentración posible y con diluciones seriadas al décimo de la misma: $4,00 \times 10^8$ UFP/mL, $4,00 \times 10^7$ UFP/mL, $4,00 \times 10^6$ UFP/mL (equivalentes a 8×10^7 UFP, 8×10^6 UFP y 8×10^5 UFP por pocillo) y se incubaron durante 24 hs. El lisado de fago se eliminó tras la incubación y los pocillos se lavaron, se tiñeron y se determinó la OD590 del biofilm remanente siguiendo los pasos descritos en la sección 3.11. Un diagrama del protocolo realizado se esquematiza en la Figura 12.

Asimismo, se graficaron los porcentajes de biomasa de biofilm para cada condición tomando como 100% al control positivo sin tratamiento con fagos. Se utilizó la siguiente fórmula para los cálculos de biomasa de cada condición, siempre empleando los promedios de las réplicas biológicas:

$$\% \text{ Biomasa del biofilm} = A590 \text{ biofilm tratado} \div A590 \text{ biofilm control} \times 100$$

La normalidad de los datos se determinó con el test de Shapiro-Wilk. Las diferencias en la capacidad de los fagos para erradicar el biofilm se analizó estadísticamente mediante test de Anova de una vía, no pareado con test de comparaciones múltiples de Dunnett usando GraphPad Prism versión 10.3.0 para Windows, GraphPad Software, Boston, Massachusetts USA, www.graphpad.com. Aquellos valores de $p < 0.05$ fueron considerados como estadísticamente significativos.

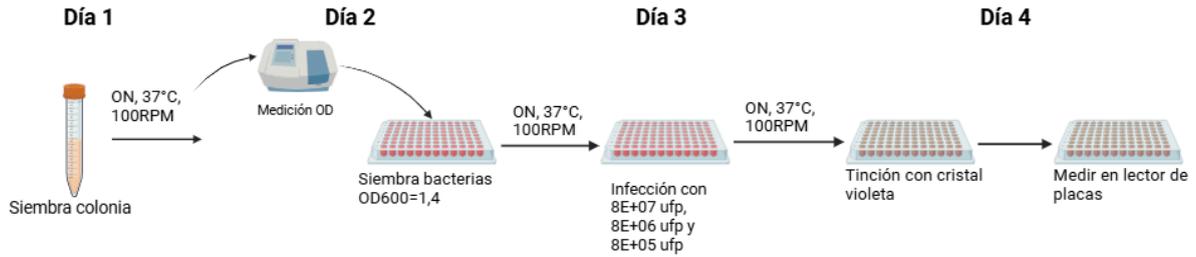


Figura 12: Diagrama del ensayo de erradicación de biofilms preformados. En el día 1 se crecieron cepas bacterianas *overnight* a 37 °C en LB con agitación. En el día 2 los cultivos obtenidos fueron ajustados a una OD600 promedio de 1,4 y posteriormente diluidos 1:10. Se sembraron 200 µL por pocillo en placas de 96 pocillos y se incubaron 20 h a 37 °C en condiciones estáticas. En el día 3 se removieron las bacterias planctónicas, se lavó con PBS 1X y se trataron los biofilms con stocks virales a tres cantidades de fago (8×10^7 UFP, 8×10^6 UFP y 8×10^5 UFP por pocillo), y se incubaron durante 24 h. En el día 4 se removió el lisado y realizaron lavados, los biofilms remanentes se tiñeron con cristal violeta, se lavó y solubilizó con etanol 95% y posteriormente se cuantificó mediante la medición de OD590. Se incluyeron controles positivos, negativos y de fagos sin bacterias. Imagen creada con BioRender.com.

3.13 Secuenciación de Roth 23.2 y Roth 23.3

La extracción de ácidos nucleicos de los fagos se llevó a cabo utilizando el kit comercial *Phage DNA Isolation Kit* (Norgen Biotek), siguiendo las instrucciones del fabricante. Previo a la extracción se le hizo un tratamiento con Turbo DNAsa (Invitrogen) por 30 min a 37° C para remover ADN del hospedero. La DNAsa se inactivó a 75° C por 5 min previo al agregado del buffer de lisis. Además se añadieron 4 µL de Proteinasas K (20 mg/mL) y se incubó a 55°C durante 30 min para aumentar el rendimiento de la extracción. La concentración del ADN obtenido se determinó por fluorimetría mediante el equipo Qubit 4 Fluorometer (Invitrogen), con el kit *Qubit™ dsDNA Quantification Assay Kit* (Invitrogen). La integridad del material genético se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,7% (p/v), empleando SYBR Safe DNA Gel Stain (Invitrogen) como colorante fluorescente, junto con el marcador de peso molecular *1 Kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen). Finalmente, los ácidos nucleicos fueron almacenados a -80 °C hasta su utilización.

Este ADN se fragmentó a tamaños de 8Kb aproximadamente mediante el uso de Covaris gTUBEs, siguiendo las indicaciones del fabricante y la calidad de la fragmentación fue evaluada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v), empleando el mismo colorante fluorescente y marcador de peso molecular mencionados anteriormente.

La secuenciación se realizó mediante la tecnología Oxford Nanopore Technologies utilizando un secuenciador GridION y una celda de flujo R9 (FLO-MIN106). La librería fue preparada empleando el kit *Rapid Barcoding Kit 96* (SQK-RBK110.96). Tanto la preparación de las librerías como la ejecución de la secuenciación fueron llevadas a cabo por mi, con la colaboración de la MSc. Paula Perbolianachis y mi co-orientadora.

Las lecturas obtenidas por secuenciación fueron filtradas utilizando Filtlong v0.2.1 (Wick) para remover secuencias de baja calidad. El ensamblaje de novo se realizó con Flye v2.9 (Kolmogorov *et al.*, 2019), y posteriormente se aplicó una corrección de errores mediante Medaka v1.7.3 (Oxford Nanopore Technologies). La calidad del ensamblado se evaluó utilizando QUAST v5.2.0 (Gurevich *et al.*, 2013). Para la comparación entre el fago ensamblado y el genoma de referencia se empleó el paquete MUMmer v4.0.0beta2 (Marçais *et al.*, 2018), utilizando nucmer para la alineación, dnadiff para el cálculo de identidad, y mummerplot para la visualización de los resultados. Finalmente, para calcular la cobertura promedio del ensamblado, se alinearon las lecturas al genoma consenso con Minimap2 v2.24 (Li, 2018), los alineamientos se convirtieron a formato BAM, y se utilizó Samtools v1.17 (Li *et al.*, 2009) con la función *coverage* para estimar la profundidad de cobertura.

3.14 Secuenciación de bacterias empleadas para el rango de hospedero

Las cepas Kp1102, Kp1111, M1443, FQ40565, F312B, F327B, Kp19/2, 04Kp29 y 04Kp27 fueron subcultivadas a partir de criostocks y se sometieron a cultivo *overnight* en caldo LB a 37 °C y 200 rpm. Posteriormente, se extrajo el ADN genómico mediante el uso del Quick-DNA Miniprep Plus Kit (Zymo Research). Este ADN se fragmentó a tamaños de 10 Kb aproximadamente mediante el uso de

Covaris gTUBEs, siguiendo las indicaciones del fabricante. La concentración de ADN pre y post librerías fue cuantificada mediante fluorimetría, empleando el equipo QUBIT 2.0 y el reactivo dsDNA Quantitation, HS (Thermo Fisher Scientific). La evaluación de la integridad y calidad de fragmentación de los ADNs fue evaluada de forma análoga a los ADNs fágicos.

La secuenciación de lecturas largas de Oxford Nanopore Technologies se llevó a cabo mediante la utilización de un secuenciador GridION en una celda de flujo R10.4.1 (FLO-MIN112), con una librería sintetizada mediante el Ligation sequencing gDNA - Native Barcoding Kit 24 V14 (SQK-NBD114.24). Las librerías y la secuenciación fueron realizadas por mi orientadora con asistencia técnica de Cecilia Portela, y de los estudiantes Felipe Victorica y Julieta Gurméndez.

Las lecturas obtenidas por secuenciación fueron filtradas utilizando Filtrlong v0.2.1 (Wick) para remover secuencias de baja calidad. El ensamblaje de novo se realizó con Flye v2.9 (Kolmogorov *et al.*, 2019), y posteriormente se aplicó una corrección de errores mediante Medaka v1.7.3 (Oxford Nanopore Technologies). El ensamblado final fue anotado con Prokka (Seemann, 2014) La calidad del ensamblado se evaluó utilizando QUAST v5.2.0 (Gurevich *et al.*, 2013). Para calcular la cobertura promedio del ensamblado, se alinearon las lecturas al genoma consenso con Minimap2 v2.24 (Li, 2018), los alineamientos se convirtieron a formato BAM, y se utilizó Samtools v1.17 (Li *et al.*, 2009) con la función *coverage* para estimar la profundidad de cobertura. Para determinar los grupos de incompatibilidad plasmídica se utilizó PlasmidFinder (Carattoli *et al.*, 2014). Para determinar los genes de resistencia a antibióticos se utilizó ABRicate usando la base de datos de NCBI (Seemann, ABRicate). Los secuenciotipos y los tipos capsulares se determinaron en la plataforma web Pathogenwatch v23.4.0 (<https://pathogen.watch>).

Los análisis bioinformáticos fueron realizados por mi, con la asistencia de la Dra. Daniela Megrián (Unidad de Bioinformática, Institut Pasteur de Montevideo).

4. Resultados y discusión

4.1 Generación de ministocks

Con el objetivo de tener mayor cantidad de material de partida para los ensayos a realizar en este trabajo, ya que contamos con solo 50-100 μL de cada stock proveniente de U.K. se realizaron 6 minipropagaciones de los fagos de interés y se titularon mediante *spot assay*.

Tabla 2: Resultado de la titulación viral mediante *spot assay* de las 6 minipropagaciones.

Fago	Roth 23		Roth 76		Roth 08	Roth G
Cepa de producción	164413 U/2	164125 A	164413 U/2	164125 A	164125 A	L0240
Título (UFP/mL)	2.10×10^9	1.10×10^9	2.60×10^9	1.20×10^9	1.60×10^9	-

Roth 23 y Roth 76 tenían cepas de producción alternativas (164413 U/2 y 164125 A), por lo que se realizaron minipropagaciones en cada una. En ambos casos se obtuvieron títulos del mismo orden, independientemente de la cepa, pero decidimos utilizar 164413 U/2 para ambos, ya que alcanzó títulos ligeramente más elevados.

La titulación de la minipropagación del fago Roth 76 en la cepa 164125 A evidenció dos morfologías de placa de lisis diferentes (Figura 13). Para determinar si se trataba de una contaminación y su origen, realizamos DLA de la minipropagación y del stock original de UK en 164413 U/2 (Figura 14a y 14b, respectivamente). En ambos casos se observaron dos morfologías distintas, lo que llevó a concluir que el stock original estaba contaminado, o se contaminó durante la manipulación.

Otra posible explicación para la aparición de diferentes morfologías de placa sería la inducción de profagos de la bacteria de producción tras la infección por otro fago (Bondy-Denomy *et al.*, 2016). Sin embargo, como observamos morfologías diferentes en cepas bacterianas diferentes (164125 A y 164413 U/2), eso nos lleva a pensar que estamos ante una contaminación con otro fago. Por ello decidimos dejar de trabajar con este fago.

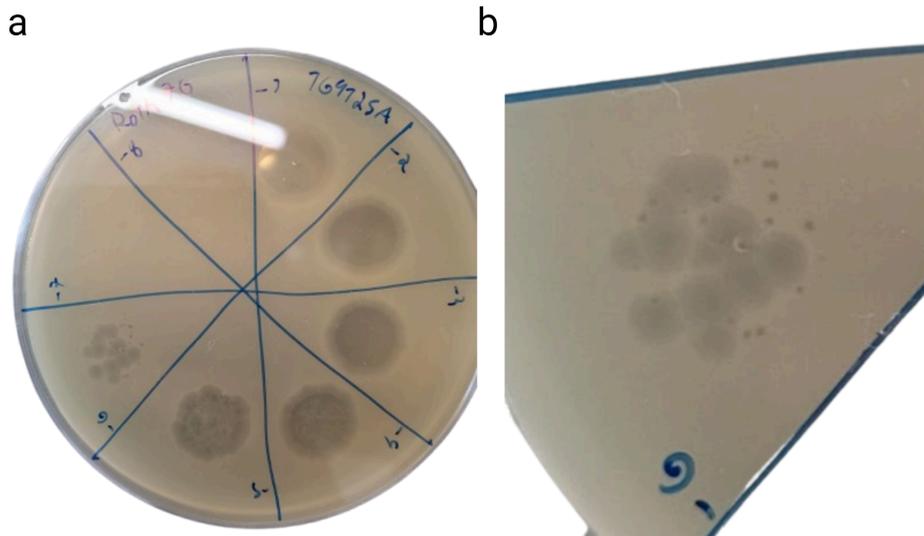


Figura 13: Dos morfologías de placa de lisis diferentes para ministock de Roth 76 en la cepa 164125A. (a) Spot assay de Roth 76 en 164125 A. (b) Ampliación de la dilución -6 donde pueden observarse claramente dos morfologías de placas de lisis: una pequeña puntiforme, y otra grande, con halo de turbidez.

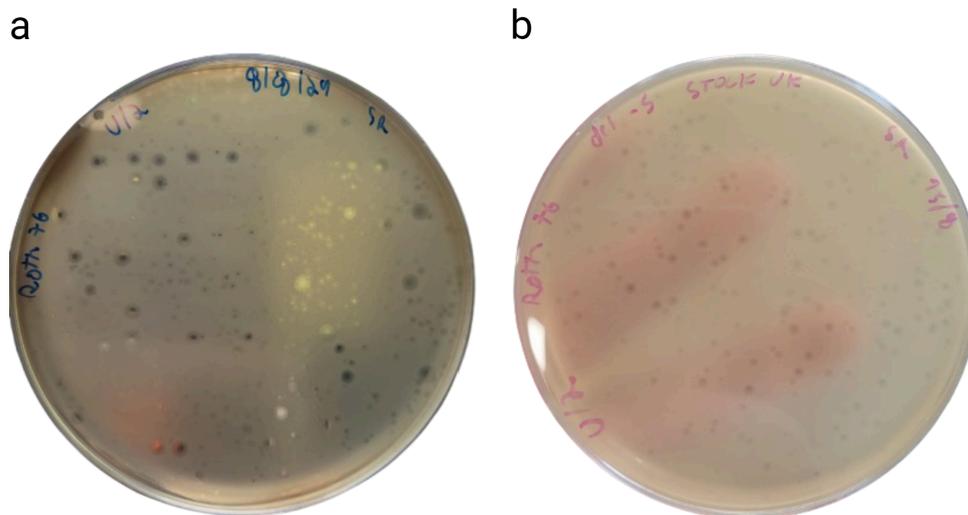


Figura 14: Ensayo de doble capa de agar (DLA) en placa completa mostrando doble morfología de placa a partir de dos stocks diferentes de Roth 76. (a) DLA de ministock en 164413 U/2. (b) DLA de stock de UK en 164413 U/2 .

En la titulación del ensayo de minipropagación de Roth G sobre la cepa L0240, no se detectó formación de placas de lisis. Debido a esto, se realizó un *spot test* utilizando el stock original de UK sin diluir en la cepa de producción L0240, para evaluar si dicho stock contenía fagos activos. En dicho ensayo se observó una lisis

clara, lo que sugería que el stock de UK contenía fagos activos y por lo tanto, las minipropagaciones no fueron realizadas con la proporción adecuada de virus y bacterias. A partir de este resultado, se realizaron dos minipropagaciones, variando el inóculo inicial de fago a 2 μL y 10 μL , en lugar de los 20 μL utilizados previamente, lo cual permitió generar ministocks con títulos de 2.00×10^5 y 9.00×10^3 respectivamente (Tabla 3). Si bien estas minipropagaciones fueron realizadas “en ciego” (no se utilizó una MOI específica), en base a los resultados podemos decir que una mayor cantidad de fagos no necesariamente genera títulos virales elevados para Roth G, debido a que al bajar el volumen de stock agregado, el título mejoró considerablemente. Estas observaciones coinciden con estudios previos, donde se reportó que a MOIs más bajas, los títulos pueden mejorar significativamente (Baquer *et al.*, 2023),(Mourali *et al.*, 2024).

Tabla 3: Resultado de la titulación viral mediante Spot Assay de las 2 minipropagaciones de Roth G.

Fago	Roth G 2 μL	Roth G 10 μL
Título (UFP/mL)	2.00×10^5	9.00×10^3

4.2 Determinación de la MOI óptima para cada fago y preparación de stocks virales

Con el objetivo de obtener títulos iguales o superiores a 10^9 UFP/mL que permitieran su uso amplio en los experimentos planteados en este trabajo, se decidió realizar las propagaciones a diferentes MOIs.

La determinación de la MOI óptima y generación de stocks virales para los fagos Roth 66 y Roth 17 fue realizada previamente por mi co-tutora en el marco de su investigación, por lo cual en el marco de esta tesina, se realizó la optimización de los fagos Roth G, Roth 8, Roth 23 y Roth 76.

El principal inconveniente para seleccionar la MOI adecuada fue la falta de una curva de crecimiento específica para cada cepa productora de fago. Por ello, se empleó una curva previamente realizada en el laboratorio para la cepa Kp1102, en

la que se determinó la fase exponencial tardía a un OD600 de 0,5, con una concentración de $3,00 \times 10^8$ UFC/mL. Si bien el crecimiento bacteriano varía entre las cepas analizadas, todas pertenecen al mismo género (*Klebsiella*) y la mayoría a la misma especie (*K. pneumoniae*); por tanto, asumimos que las cepas utilizadas presentan un crecimiento similar al de Kp1102.

4.2.1 Roth 23

Inicialmente realizamos cuatro propagaciones en la cepa de producción 164413 U/2, empleando diferentes MOI y tiempos de incubación. Durante el transcurso de los experimentos, los stocks seleccionados se agotaron, por lo que realizamos una propagación adicional para cada uno: Roth 23.3 (nuevo) y Roth 23.2 (nuevo). Como se muestra en la Tabla 4, para este fago las condiciones óptimas de propagación se dan a MOIs de 0,1 o 0,01, ya sea tras 6 h de infección o bien *overnight*.

Tabla 4: Resultado de la titulación viral mediante DLA de las 6 propagaciones de Roth23.

Fago	MOI	Título	Tiempo de infección	Generación	Propagación
Roth 23	0.1	9.70×10^8	ON	2	1
Roth 23.3	0.01	1.60×10^9	ON	2	2
Roth 23.2	0.1	2.20×10^9	6 hs	3	1
Roth 23	0.01	1.00×10^9	6 hs	3	2
Roth 23.2 (nuevo)	0.01	2.50×10^{10}	ON	3	1
Roth 23.3 (nuevo)	0.1	6.25×10^{10}	ON	4	1

En gris se resaltan las propagaciones de alto título empleadas a lo largo de este trabajo.

4.2.2 Roth 8

Realizamos un total de cuatro propagaciones en la cepa de producción 164125 A, todas *overnight*, y a partir de 4 MOIs diferentes (Tabla 5). Para este fago, las condiciones óptimas de propagación se dan a MOIs más bajas que para Roth23 (0.001 y 0.0001).

Tabla 5: Resultado de la titulación viral mediante DLA de las 4 propagaciones de Roth 8.

Fago	MOI	Título	Tiempo de infección	Generación	Propagación
Roth 8	0.1	3.00x10 ⁸	ON	2	1
Roth 8	0.01	5.00x10 ⁸	ON	2	2
Roth 8.1	0.001	2.20x10 ¹⁰	ON	3	1
Roth 8.2	0.0001	8.00x10 ⁹	ON	3	2

En gris se resaltan las propagaciones de alto título empleadas a lo largo de este trabajo.

4.2.3 Roth G

En este caso, sabíamos de las minipropagaciones en ciego que MOIs más bajas eran más favorables para la replicación de este fago (Tabla 3), por lo cual se utilizó un rango de MOI de 0.01, 0.001, 0.0001 y 0.00001, en algunos casos *overnight* y en otros durante 6 horas de infección (Tabla 6). A pesar de la variedad MOI y tiempos testeados, no se logró encontrar una MOI y tiempo de incubación apropiados para generar una propagación con un título viral deseable (mayor o igual a 10⁹ UFP/mL). Por tanto, para este fago, la mejor MOI resultó ser 0.0001 durante una infección *overnight*. Se podría llegar a optimizar más en el futuro, de ser necesario, ya que solo se alcanzaron títulos de 10⁸ UFP/mL.

Tabla 6: Resultado de la titulación viral mediante DLA de las 5 propagaciones para RothG.

Fago	MOI	Título	Tiempo de infección	Generación	Propagación
RothG.1	0.0001	1.30x10 ⁸	ON	2	1
RothG	0.00001	1.30x10 ⁶	ON	2	2
RothG.2	0.001	6.00x10 ⁷	6 hs	3	1
Roth G	0.01	2.40x10 ⁶	ON	4	1
Roth G	0.001	2.20x10 ⁷	ON	4	2

En gris se resaltan las propagaciones de mayor título empleadas a lo largo de este trabajo.

De los resultados obtenidos, podemos concluir que cada fago analizado tiene sus condiciones óptimas de infección y replicación, las que pueden estar influenciadas tanto por la cepa de producción así como por las propias características de cada ciclo viral. Por ejemplo, los tamaños de progenie o los tiempos de latencia pueden influir enormemente en la optimización de los parámetros de propagación. Progenies grandes y tiempos cortos de latencia implican que el fago es más virulento, y por tanto, de usar MOIs muy altas, el efecto bactericida sería completo y no permitiría generar stocks virales de alto título (Kim *et al.*, 2021). Para poder tener una idea previa de estas características y así abordar una optimización más racional, sería necesario realizar curvas de crecimiento *one-step* (Kropinski, 2018), que por ser muy laboriosas no se incluyeron en este trabajo de fin de carrera. Pero dentro de los ensayos realizados en la colección Klebphacol se incluyen estas curvas para Roth 8 y Roth G (Rothschild-Rodriguez *et al.*, 2024). En la curva de crecimiento *one-step* de Roth G se puede observar un tamaño de progenie elevado (184 viriones liberados por célula bacteriana lisada), lo cual puede explicar por qué a valores de MOI más bajos el título viral haya mejorado notablemente. Esta tendencia se observa hasta una MOI de 0.0001, mientras que a una MOI de 0.00001 el título viral disminuye, lo cual sugiere que nuestra MOI óptima se encuentra en algún punto intermedio entre ambos valores de MOI. Al comparar la curva de Roth G con la de Roth 8, podemos observar que este último tiene un tamaño de progenie viral menor que Roth G (17 viriones por bacteria), lo cual puede explicar por qué este fago requiere de una MOI más elevada para obtener un título viral deseable. Por otro lado, ambos fagos se diferencian en un período de latencia de 5 minutos, y si bien este parámetro podría influir en caso de realizar propagaciones a pocas horas, no nos es posible compararlos en nuestro caso, ya que de, ambos fagos solamente se evaluó a Roth G al cabo de 6 horas.

4.3 Ensayos de rango de hospedero y EOP

El rango de hospedero (RH) puede proporcionar tres resultados diferentes: ausencia de lisis, lisis “completa/clara” (zona transparente donde se sembró la gota del stock viral) o lisis indeterminada donde la lisis es turbia. Al realizar el ensayo para calcular la EOP, puede ocurrir que se observe lisis en las primeras diluciones del fago, pero

que en diluciones posteriores no hayan placas de lisis (Figura 15b). Esto lo llamamos “lisis indeterminada” y se debe principalmente a que el fago pudo causar la muerte bacteriana, a través de una infección abortiva y/o *lysis from without*, pero no pudo producir progenie viral para generar placas de lisis en esa cepa (Kutter, 2009). La *lysis from without* (lisis indeterminada) ocurre sin necesidad de infección, ya que es inducida por agentes extracelulares. La adsorción de grandes cantidades de fagos puede dañar la pared celular, provocando lisis, especialmente en los puntos débiles de la envoltura bacteriana (Abedon, 2011). Por otra parte, la infección abortiva consiste en el “suicidio” de la célula tras detectar la infección, evitando que el fago complete su ciclo y se propague. Este rasgo altruista protege principalmente a bacterias estrechamente relacionadas dentro de la colonia (Lopatina, Tal and Sorek, 2020).

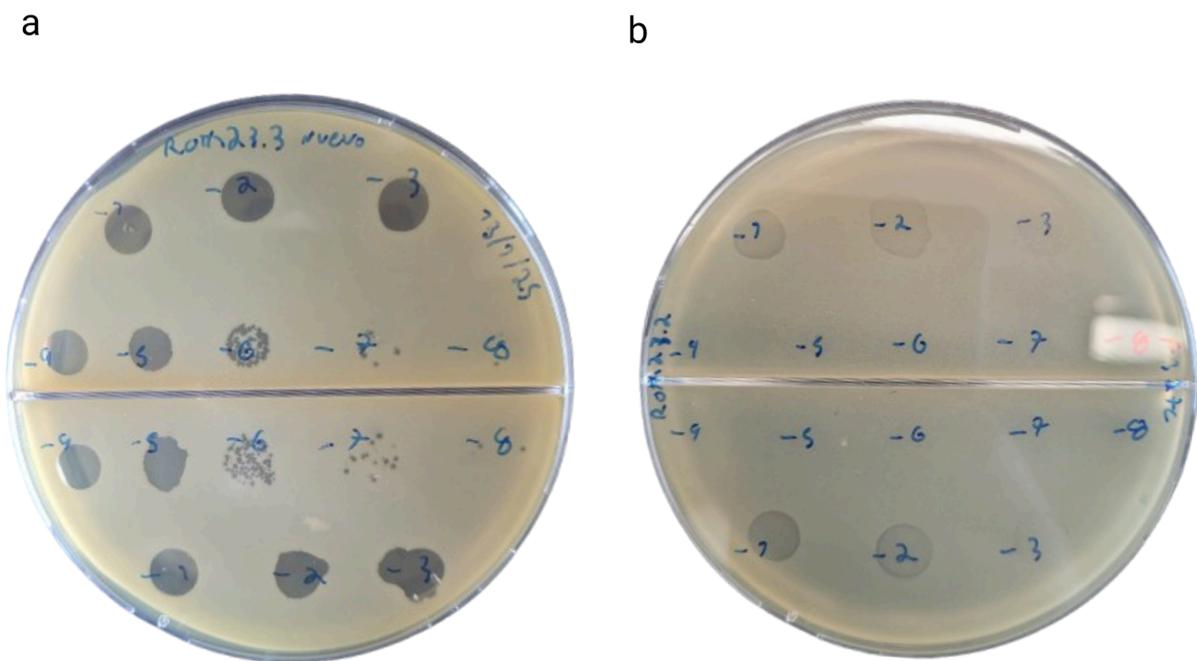


Figura 15: Spot assay evidenciando los distintos tipos de lisis. (a) Lisis completa donde se pueden ver placas de lisis aisladas en las diluciones -6 y -7. (b) “Lisis indeterminada” donde no se evidencian placas de lisis aisladas, sino únicamente una zona de lisis turbia en las diluciones más concentradas (en este caso en las diluciones -1 y -2).

Tabla 7: Rango de hospedero y valores de EOP de los fagos de este trabajo.

Especie		Roth 66	Roth 17	Roth 8.1	Roth 8.2	Roth 23.2	Roth 23.3	Roth G.1	Roth G.2
<i>K. oxytoca</i>	164413U/2			0,53	0,66	h	h		
<i>K. pneumoniae</i>	ATCC 700603	h	h						
	Kp1102								
	Kp1111					5,3	16,6	2x10 ⁻⁴	8.3x10 ⁻⁶
	Kp666			0,055	0,054				
	KpPOST								
	FQ38879								
	M1366								
	19/2								
	Kp1124								
	M1443					1,4	5		
	FQ40565					0,33	2,9		
	54/2								
	KpPRE								
	04Kp21								
	L0240							h	h
	164125A	0,28	2,4	h	h				
	F305								
	F320								
	F322								
	F312B								
	F312C			2.6x10 ⁻⁵	1.6x10 ⁻⁵				
	F327B								
	F327C			0,014	0,023				
F330									
04kp27									
04kp29									
<i>E. cloacae</i>	04ecc32								
<i>C. freundii</i>	04cf30								

Referencias (Gibson et al., 2019):

Celda verde - lisis con valor de EOP ≥ 0.1 (altamente virulento)

Celda anaranjada - lisis con valor de $0.001 \geq \text{EOP} > 0.1$ (moderadamente virulento)

Celda amarilla - lisis con valor de EOP < 0.001 (no virulento)

Celda gris - lisis indeterminada

Celda negra - ausencia de lisis

h = Cepa de producción (*host*). Con excepción de la ATCC 700603, las restantes corresponden a cepas clínicas aisladas en Reino Unido.

Primero se determinó el rango de hospedero de cada fago (Tabla 7) y a partir de los resultados, se procedió a realizar el ensayo para calcular la EOP, en donde sólo se incluyeron las cepas que mostraron lisis clara, lo que redujo la cantidad total de cepas de un total de 28 utilizadas para el RH, a 9. Además, se verificó aquellas cepas que exhibían lisis “indeterminada” mediante el mismo ensayo, y no se observaron placas aisladas, lo cual refleja que no hubo infección productiva.

Para los fagos Roth 66 y Roth 17, sólo se observó lisis en la cepa 164125A, con un EOP de 0.28 y 2.4, respectivamente. Aunque Roth 17 mostró un EOP elevado en 164125A, ninguno de los dos fagos presentó un rango de hospedero amplio ni se observó lisis en cepas clínicas de Uruguay, por lo que no se consideraron para análisis posteriores.

Roth G es capaz de lisar únicamente la cepa clínica Kp1111, pero los valores de EOP son muy bajos (menor a 0.001). Es importante destacar que la diferencia en los EOPs obtenidos a partir de los diferentes stocks puede deberse a que el de Roth G.2 tenía menor título viral que Roth G.1. Dado el estrecho RH y la baja eficiencia de plaqueo, no continuamos usando este fago para análisis posteriores.

En cuanto a Roth 8, se observó lisis en la cepa clínica de Reino Unido 164413 U/2, siendo altamente virulento ($EOP > 0.1$). Este resultado, demuestra que un fago de *K. pneumoniae*, también puede infectar otra especie dentro del mismo género (*K. oxytoca*). Por otra parte, si bien demostró un rango de hospedero más amplio en cepas locales, siendo capaz de lisar Kp666, F327C y F312C, las EOPs reflejan que el fago tiene una virulencia moderada en Kp666 y F327C o que no es virulento en F312C. A pesar de que las eficiencias de plaqueo no mostraron que el fago sea altamente virulento en la mayoría de las cepas que se observó lisis, por abarcar un RH que representa el 14% de las cepas analizadas aproximadamente, Roth 8 fue preseleccionado para ensayos posteriores.

Para el fago Roth 23 se observó lisis en las cepas locales Kp1111, M1443 y FQ40565 (aproximadamente el 10% de las cepas analizadas), con EOPs superiores a 0.1, por lo cual se considera a este fago como altamente virulento para esas tres cepas bacterianas. Debido a que posee uno de los mayores rangos de hospedero y una EOP deseable, este fago también fue preseleccionado para los análisis

posteriores. Curiosamente, y a pesar de que ambas propagaciones empleadas presentan títulos virales similares, Roth 23.2 muestra un EOP apreciablemente mayor en comparación con Roth 23.3. Esto sugiere la posible existencia de alguna diferencia entre ambos fagos que podría estar influyendo en la mayor capacidad lítica de Roth 23.2.

Con excepción de Roth G, todos los otros fagos analizados fueron capaces de generar lisis indeterminada en algunas cepas.

Por otro lado, ninguno de los fagos logró lisar bacterias fuera del género *Klebsiella*. En consecuencia, *E. cloacae* y *C. freundii* no fueron afectadas por ninguno de ellos. Normalmente un fago solo infecta un subconjunto de cepas dentro de una especie bacteriana (de Jonge *et al.*, 2019). Si bien también está reportado que los fagos pueden infectar diferentes especies de bacterias (Kauffman *et al.*, 2022) y géneros (Hamdi *et al.*, 2017), en este caso parece ser que los fagos de *Klebsiella* ensayados son altamente especializados y están adaptados para infectar cepas de este género.

En conclusión, se puede inferir que estos fagos poseen en promedio un rango de hospedero estrecho, donde cada uno es capaz de lisar 0-14% de las 29 cepas ensayadas. Sin embargo, entre todos cubren aproximadamente el 30% de las cepas. En la colección de KlebPhaCol el rango de hospedero de cada uno de los fagos utilizados en esta tesis, abarca un 4-30% de las 74 cepas que testearon y aproximadamente un 60% entre todos los fagos. A su vez se destaca que los fagos del género *Slopekvirus* (género al que pertenece Roth 23) fueron los más eficientes, y exhibieron un rango de hospedero más amplio que otros géneros (Rothschild-Rodriguez *et al.*, 2024). Es interesante destacar que los fagos que presentaron un rango de hospedero más amplio frente a cepas locales de Uruguay, no son los mismos que en la colección frente a cepas provenientes principalmente de UK y Holanda. Esto sugiere la relevancia de obtener fagos en contexto a las cepas que predominan en las diferentes zonas geográficas. En otro estudio se analizaron 46 fagos frente a 138 cepas clínicas de *K. pneumoniae*, y se observó que menos del 2% de las 6.319 combinaciones resultaron en infección detectable, lo que evidencia un rango de hospedero muy estrecho. La principal barrera identificada fue la diversidad capsular de la bacteria, siendo las depolimerasas fágicas los

principales determinantes del tropismo, al correlacionarse con tipos capsulares específicos. No obstante, los fagos con rango más amplio carecían de depolimerasas canónicas, lo que sugiere mecanismos de entrada alternativos (Beamud *et al.*, 2023).

4.4 Ensayos de estabilidad térmica y diferentes valores de pH

Debido a la alta eficiencia de lisis y/o a su mejor rango de hospedero, se seleccionaron los fagos Roth 8 y Roth 23 para los estudios de estabilidad térmica y a diferentes valores de pH.

4.4.1 Ensayos de estabilidad térmica

Se evaluó la estabilidad térmica de los fagos seleccionados exponiéndolos a distintas temperaturas (4 °C, 25 °C, 37 °C, 42 °C y 60 °C), y determinando su viabilidad mediante la cuantificación del título viral (UFP/mL). En ambos casos, las diferencias entre las medias de los títulos obtenidos a las distintas temperaturas no resultaron estadísticamente significativas (test de Kruskal-Wallis: Roth 8, $p = 0,1968$; Roth 23, $p = 0,3661$) (Figura 16).

En el caso del fago Roth 8, se mantuvo estable entre 4 °C y 42 °C, con títulos dentro de un rango estrecho ($1,6 \times 10^9$ a $2,9 \times 10^9$ UFP/mL) y variaciones mínimas entre réplicas. No obstante, al exponerse a 60 °C, se observó una drástica disminución en la viabilidad viral, alcanzando valores cercanos a $3,9 \times 10^6$ UFP/mL, lo que representa una caída de aproximadamente tres órdenes de magnitud respecto a las temperaturas inferiores.

Por otro lado, el fago Roth 23 mostró una tendencia similar con diferencias específicas. Si bien el título promedio también se mantuvo relativamente alto entre 4 °C y 42 °C, con valores entre $1,1 \times 10^9$ y $2,6 \times 10^9$ UFP/mL, se registró una mayor dispersión entre las réplicas, reflejada en las amplias barras de error. Esta variabilidad es consecuencia directa de haber empleado dos propagaciones virales con diferente título inicial. Sin embargo, la tendencia de estabilidad es idéntica entre ambas réplicas biológicas. A 60 °C, se produjo una disminución en el título, alcanzando un valor promedio cercano a los $1,4 \times 10^8$ UFP/mL. No obstante, la

pérdida de viabilidad fue menos pronunciada que en Roth 8 (1 orden de magnitud menor). Roth 23 mostró una mayor tolerancia al incremento de temperaturas, ya que su título disminuyó de manera más gradual incluso a 60 °C. Esta característica podría resultar ventajosa en contextos de variaciones térmicas más extremas, como biocontrol alimentario o aplicaciones ambientales.

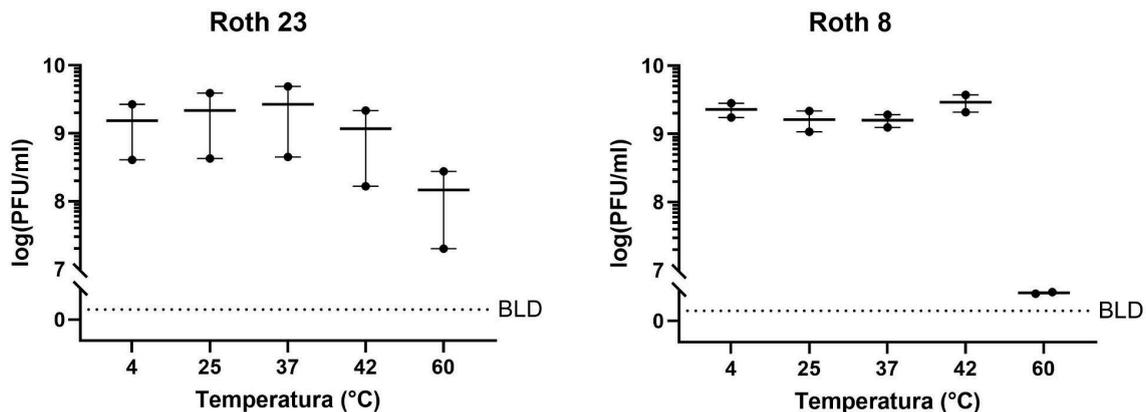


Figura 16: Estabilidad térmica de los fagos seleccionados tras 1 hora de incubación a distintas temperaturas. Suspensiones de cada fago fueron incubadas durante 1 hora a 4 °C, 25 °C, 37 °C, 42 °C y 60 °C, y luego se determinó el título viral mediante *spot assay*. En el eje Y se representa el título viral en escala logarítmica (log UFP/mL). Se grafica el promedio de dos réplicas biológicas independientes, cada una por triplicado. Las barras de error indican el SEM. BLD indica el umbral del límite de detección de la técnica.

Los resultados obtenidos evidencian que Roth 8 y Roth 23 mantienen su estabilidad en un rango de temperaturas de entre 4 °C y 42 °C, lo cual significa que ambos fagos podrían mantenerse viables en entornos fisiológicos o ambientales comunes sin pérdida significativa de infectividad. Sin embargo, la disminución de estabilidad a 60 °C indica que estos fagos presentan un umbral térmico claro por sobre el cual se compromete su estructura o función. Cabe resaltar que a pesar de que ambos fagos disminuyen su título a 60 °C, Roth 8 disminuye abruptamente y esto refleja una menor estabilidad térmica. Si bien no sabemos por qué ocurre esta caída del título a esta temperatura, se ha reportado que el bacteriófago T7 (podovirus), expuesto a estrés térmico (65°C) libera el ADN genómico y pierde la cola de la cápside, lo que indica una desestabilización de la partícula viral (Vörös *et al.*, 2018). En otro estudio,

se sometieron fagos de morfologías podovirus y myovirus, a 5 ciclos de adaptación frente a temperatura de 60 °C, y observaron que los fagos adaptados mostraron una mejor estabilidad que los fagos ancestrales *wild type* cuando se sometieron al tratamiento térmico a 60 °C durante 1 h y después de 60 días de almacenamiento a 37 °C. La secuenciación del genoma completo reveló que las sustituciones individuales en las proteínas del túbulo de la cola fueron los únicos cambios observados en los genomas de los fagos adaptados, lo cual sugiere que en estas morfologías virales, la estabilidad a 60 °C depende fundamentalmente de estas proteínas estructurales (Kering *et al.*, 2020). En otro estudio, analizan la estabilidad de los fagos λ (siphovirus) y T4 (myovirus), que poseen la misma morfología que Roth 8 y Roth 23 respectivamente, a un rango de temperaturas de 55 a 75 °C, donde a 65 °C el fago λ es más inestable que el fago T4 y proponen que la exposición del fago λ al calor puede inducir una expansión del ADN empaquetado, lo que genera rupturas en la cápside proteica y deja el genoma expuesto, volviendo al fago vulnerable a la degradación por nucleasas como la DNasa, sin embargo, un enfriamiento lento posterior al tratamiento térmico permite una reestructuración parcial de la cápside, disminuyendo así la pérdida de infectividad (Pollard and Solosko, 1971). En conclusión la estabilidad de las partículas virales de las diferentes morfologías frente a temperaturas elevadas puede depender de varios factores, como las proteínas estructurales o la propia naturaleza del ADN, por lo cual es importante conocer estas características para poder saber con certeza por qué algunos fagos como Roth 23 son más estables que otros fagos como Roth 8. Sin embargo, considerando que Roth 8 tiene morfología de siphovirus podemos inferir que algo similar a lo que ocurre con el fago λ sería lo que estaría ocurriendo con Roth 8.

4.4.2 Ensayos de estabilidad a diferentes valores de pH

Se evaluó la estabilidad de los fagos seleccionados frente a diferentes condiciones de pH mediante la cuantificación de su título viral (UFP/mL) tras la exposición a medios con pH 3, 5, 7, 9 y 11.

La variación en los títulos virales entre los distintos valores de pH fue significativa para Roth 8 (Kruskal-Wallis test, $p = 0,0138$) (Figura 17). En contraste, Roth 23

mostró una viabilidad constante desde pH 5 hasta pH 11, con títulos comprendidos entre $1,6 \times 10^{10}$ y $3,3 \times 10^{10}$ UFP/mL, y escasa variabilidad entre réplicas (con títulos normalizados), lo que indica una notable tolerancia a condiciones ligeramente ácidas y alcalinas.

Para Roth 8, la viabilidad se mantuvo estable entre pH 7 y 11, con títulos entre $1,3 \times 10^9$ y $2,5 \times 10^9$ UFP/mL. Sin embargo, a pH 5 se observó una disminución de un orden de magnitud ($3,6 \times 10^8$ UFP/mL), lo que sugiere una mayor sensibilidad a condiciones ácidas en comparación con Roth 23.

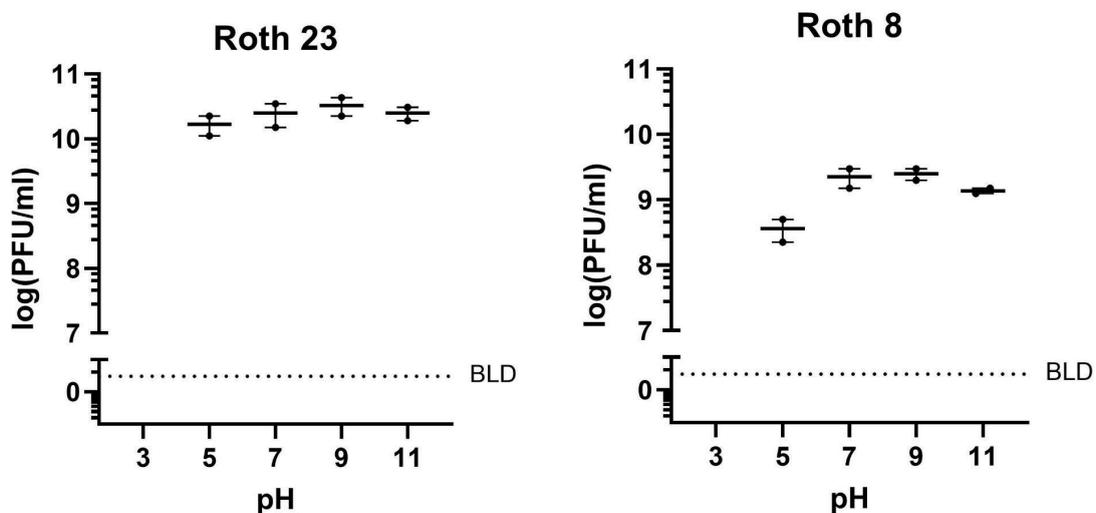


Figura 17. Estabilidad de los fagos seleccionados frente a diferentes pH tras una hora de incubación. Suspensiones de cada fago fueron incubadas durante 1 hora en medios con pH 3, 5, 7, 9 y 11, tras lo cual se determinó el título viral mediante *spot assay*, representado en el eje Y en escala logarítmica (log UFP/mL). Cada punto representa una réplica biológica realizada por triplicado; se grafica la media de ambas réplicas. Las barras de error indican el SEM. BLD corresponde al umbral del límite de detección de la técnica. Las medias de Roth 8 difieren significativamente entre los valores de pH (Kruskal-Wallis test, $p = 0,0138$).

En ambos casos, se observó que el pH 3 resultó en una pérdida total de viabilidad, ya que no se detectaron unidades formadoras de placa (BLD, bajo límite de detección), lo cual indica que este entorno altamente ácido induce una inactivación de las partículas virales.

Los datos obtenidos revelan que ambos fagos se mantienen relativamente estables en un rango de pH de 5 a 11, lo cual puede tener implicancias importantes en su aplicación en distintos entornos. Ambos fagos fueron completamente inactivados en condiciones fuertemente ácidas (pH 3), lo que concuerda con estudios previos que indican que el entorno ácido (pH menor 4) resulta en una pérdida de infectividad viral (Kerby and Gowdy, 1949). Esta sensibilidad ácida sugiere que el uso potencial de estos fagos en ambientes donde el pH pueda caer por debajo de 4, como el tracto gastrointestinal, pueda necesitar explorar opciones de administración de los fagos, para maximizar su eficacia.

No obstante, mientras que Roth 23 mantuvo su estabilidad desde pH 5 hasta pH 11, sin grandes reducciones en su título, Roth 8 mostró una menor tolerancia, evidenciando una caída en la viabilidad viral tanto en el rango ácido (pH 5) como en el alcalino (pH 11). Esta diferencia sugiere que el fago Roth 23 podría presentar una mayor resistencia a los cambios de pH, confiriéndole una ventaja funcional para aplicaciones en entornos con diferentes valores de pH.

En conjunto, los resultados posicionan a Roth 23 como un candidato más robusto en términos de variaciones de pH, mientras que Roth 8, aunque estable a pH neutro, podría requerir estrategias adicionales de formulación para proteger su integridad en condiciones extremas de pH. A este respecto, se ha reportado una formulación basada en microencapsulación de fagos contra *Escherichia coli* mediante un proceso de emulsificación de membrana. Las cápsulas, presentaron una liberación dirigida al intestino gracias a su sensibilidad al pH, protegiendo eficazmente a los fagos durante la exposición prolongada a condiciones gástricas simuladas. Además, los fagos utilizados demostraron capacidad bactericida frente a *E. coli* de crecimiento activo incluso tras dicha exposición, tanto en cultivos bacterianos como en presencia de células epiteliales humanas, sin afectar la morfología celular (Vinner *et al.*, 2019). Esta estrategia podría resultar útil para vehicular y dirigir al intestino fagos sensibles a valores de pH ácidos.

4.5 Ensayos de actividad antibiofilms

4.5.1 Ensayo de formación de biofilms

En el presente estudio, se evaluó la capacidad de formación de biofilms de las cepas bacterianas previamente identificadas como susceptibles a la lisis por los fagos Roth 8 y Roth 23, y como control de formación de biofilms se utilizó la cepa Kp 19/2, previamente caracterizada (Echeverría 2014). A partir de los valores obtenidos, fue posible clasificar a las cepas según su nivel de producción de biofilm, observando dos categorías: formadoras moderadas y formadoras fuertes (Figura 18).

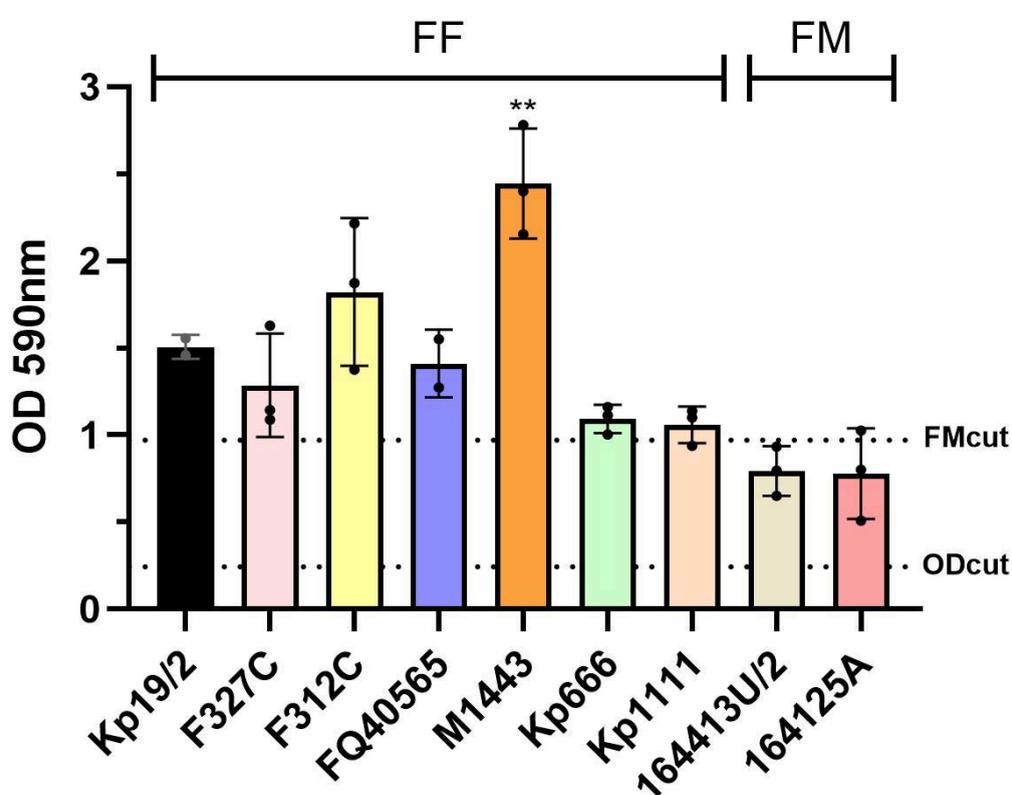


Figura 18: Evaluación de la capacidad de formación de biofilms de diferentes cepas bacterianas. Los valores representan el promedio de tres réplicas biológicas con tres réplicas técnicas, con barras de error correspondientes a la desviación estándar. Las cepas se clasificaron en formadoras moderadas (FM) y formadoras fuertes (FF) teniendo en cuenta el valor de ODcut observado. M1443 difiere significativamente (**) del control positivo Kp 19/2 (test de ANOVA, no pareado, con test de comparaciones múltiples de Dunnet, $p = 0,0021$). FMcut representa el umbral superior de OD590 de una cepa formadora moderada.

Las cepas 164125A y 164413 U/2 fueron las que presentaron los valores de absorbancia más bajos dentro del grupo analizado, y además fueron clasificadas como formadoras moderadas de biofilms. Su perfil indica una capacidad de formación suficiente para ser detectada en las condiciones experimentales empleadas, pero claramente inferior en comparación con el resto del grupo.

Por el contrario, las cepas Kp1111, Kp666, M1443, FQ40565, F312C y F327C mostraron valores de absorbancia notablemente más elevados, de magnitud comparable o superior al control positivo (Kp19/2), lo que indica una mayor formación de biofilms. Estas cepas fueron clasificadas como formadoras fuertes de biofilms. Esta elevada capacidad de formación representa una característica relevante en contextos clínicos, especialmente en relación con la persistencia en superficies inertes, tales como dispositivos médicos, y la resistencia a tratamientos antimicrobianos (Hall-Stoodley, Costerton and Stoodley, 2004).

En particular, la cepa M1443 destacó entre todas las analizadas, al presentar el valor de absorbancia más alto del grupo. Debido a esta propiedad, se seleccionó esta cepa como modelo para los ensayos posteriores de erradicación de biofilms, ya que su alta capacidad de formación de biofilms, la convierte en una cepa clave para evaluar la actividad del fago para infectarla y erradicar el biofilm generado. Dado que el biofilm constituye uno de los principales factores de virulencia en numerosas bacterias, la identificación de un fago con capacidad para erradicarlo podría tener aplicaciones potenciales tanto en el uso directo del fago como agente terapéutico, como también en la elucidación de los mecanismos moleculares implicados en su erradicación. Comprender estos procesos podría contribuir al desarrollo de nuevas estrategias antimicrobianas dirigidas a combatir infecciones persistentes asociadas a la formación de biofilms.

4.5.2 Ensayo de erradicación de biofilms

Con el objetivo de evaluar la capacidad del fago Roth 23 para erradicar biofilms, se realizaron ensayos empleando la cepa M1443, previamente identificada como fuerte formadora de biofilm y susceptible a la lisis por dicho fago. Se utilizaron dos stocks virales distintos del mismo fago (Roth 23.2 y Roth 23.3). Antes del inicio del ensayo,

se realizó una titulación mediante *spot assay* de ambas propagaciones, para verificar que el título viral no había disminuido tras su almacenamiento. Los resultados de la titulación revelaron una diferencia en los títulos de ambas propagaciones, Roth 23.2 presentó un valor de 4.0×10^9 UFP/mL, mientras que Roth 23.3 presentó un valor de 6.0×10^8 UFP/mL. Para evitar sesgos experimentales debido a estas diferencias, se ajustó la concentración de Roth 23.2 mediante una dilución para igualar el punto de partida de ambos tratamientos, normalizando las condiciones experimentales a un mismo título inicial.

El ensayo de erradicación de biofilm de la cepa M1443 utilizando el fago Roth 23, reveló una disminución significativa ($p = 0,0378$) en el porcentaje de biomasa del biofilm en la condición de mayor cantidad de fago (8×10^7 UFP/pocillo) con respecto al control de crecimiento (30% de remoción de biofilm aproximadamente) (Figura 19).

Al momento de evaluar los stocks por separado, se constató que ambas propagaciones mostraban un porcentaje de erradicación diferente (Apéndice figura suplementaria 1). En el caso de Roth 23.2 las cantidades de fago de 8×10^7 , 8×10^6 UFP/mL y 8×10^5 UFP/mL no mostraron diferencias significativas con respecto al control. Esta observación indica que Roth 23.2 no fué capaz de erradicar el biofilm preformado por M1443. Por otra parte, con Roth 23.3 se observó un comportamiento diferente, en el cual, únicamente en la condición de mayor cantidad de fago, se alcanzó una reducción estadísticamente significativa en el porcentaje de la biomasa del biofilm ($p = 0,0214$) en aproximadamente un 35%. Esta diferencia en la capacidad de erradicar biofilms podría atribuirse a múltiples factores, incluyendo variaciones en la infectividad entre propagaciones o posibles diferencias en la expresión de genes relacionados con la lisis bacteriana. En conjunto, los datos sugieren que la eficacia del fago Roth 23 en la erradicación del biofilm de M1443 depende tanto de la cantidad utilizada como de la propagación empleada, siendo Roth 23.3 en gran cantidad el único tratamiento capaz de disminuir significativamente la biomasa del biofilm.

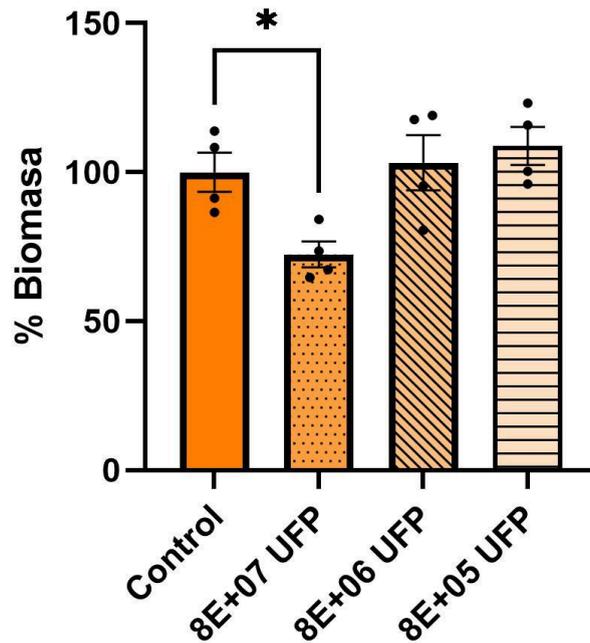


Figura 19: Evaluación de la capacidad del fago Roth 23 para erradicar biofilms formados por la cepa M1443. Se utilizaron diferentes cantidades de fago de dos propagaciones independientes (Roth 23.2 y Roth 23.3). La formación de biofilm fue cuantificada mediante medición de absorbancia a 590 nm, y los resultados se expresan como porcentaje de biomasa relativo respecto al control sin tratamiento. Cada barra representa el promedio de cuatro réplicas independientes con barras de error que indican la SEM para cantidades de fago de 8.0×10^7 UFP, 8×10^6 UFP y 8×10^5 UFP. La diferencia significativa fue evaluada con test de Anova de una vía, no pareado, $p = 0,0378$.

Las diferencias observadas en los resultados de propagación, junto con las discrepancias previamente detectadas en los valores de EOP, sugieren que Roth 23.2 y Roth 23.3 podrían presentar alguna variación, posiblemente a nivel genómico y originada por eventos mutacionales, a pesar de que ambos poseen la misma morfología de placa de lisis. Con el fin de explorar esta hipótesis, se procedió a la secuenciación de ambas propagaciones, cuyos resultados se discuten en la sección 4.8.

La capacidad de erradicar biofilms por parte de fagos ha sido demostrada en múltiples casos, sin embargo, muchos reportes indican que se alcanzan mayores disminuciones de biomasa al co-tratar los biofilms conjuntamente con antibióticos (Łusiak-Szelachowska *et al.*, 2022; Erol *et al.*, 2023). Asimismo, varios estudios

indican que la capacidad de los fagos de inhibir la formación de biofilm es mayor que la de erradicarlas una vez formadas (Gliźniewicz *et al.*, 2024). Por tanto, a futuro sería interesante evaluar la erradicación de biofilm de este fago en conjunto con algún antibiótico carbapenémico (ya que esta cepa es productora de carbapenemasa) o con *phage cocktails*, así como también evaluar la capacidad de este fago de inhibir la formación de biofilms.

4.6 Curva de crecimiento

Con el fin de caracterizar el comportamiento cinético de crecimiento de la cepa M1443, se llevó a cabo un ensayo de crecimiento en medio líquido, monitorizado mediante mediciones de OD600nm durante 16 horas (Figura 20).

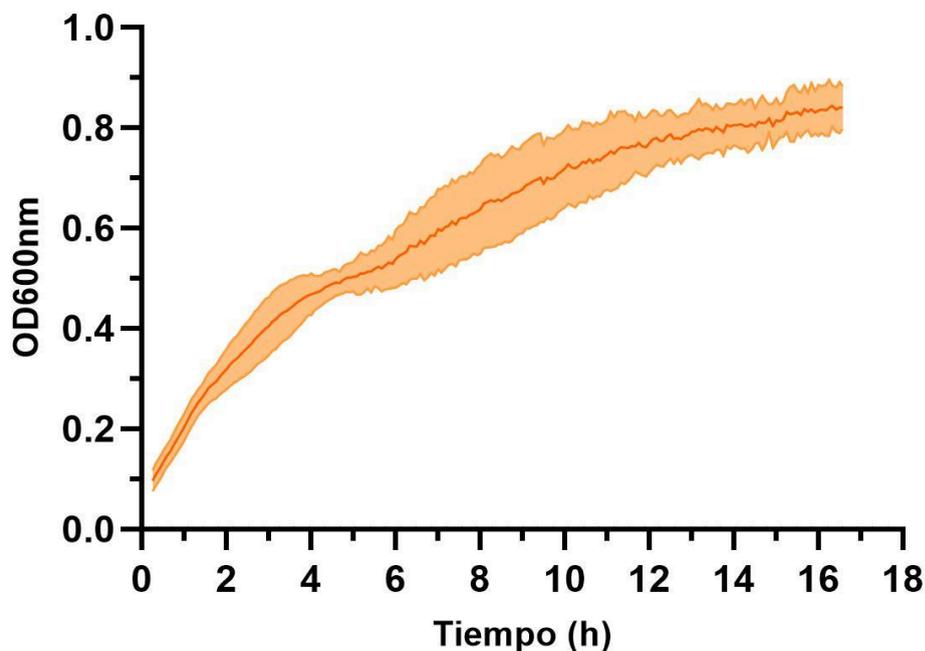


Figura 20. Curva de crecimiento de la cepa M1443 en placa de 96 wells. Los valores fueron medidos en intervalos de 5 minutos durante 16 horas. La línea naranja representa la media de 3 réplicas biológicas y el área sombreada representa los valores de SEM.

La curva obtenida muestra una fase exponencial claramente definida, que se extiende aproximadamente hasta las 3-4 horas de incubación. Durante esta etapa, se observa un incremento sostenido de la densidad óptica, indicando una alta tasa

de multiplicación celular. Posteriormente, la curva comienza a estabilizarse, evidenciando la entrada en la fase estacionaria, donde la tasa de división celular se equilibra con la tasa de muerte, y la densidad óptica se mantiene constante.

Este perfil de crecimiento sugiere que la cepa M1443 posee una cinética de crecimiento rápida y eficiente en condiciones óptimas de laboratorio. Estos datos resultaron relevantes para los ensayos posteriores, ya que permitieron determinar con precisión el momento adecuado para la infección con fagos, particularmente durante la fase exponencial, etapa en la cual la replicación de los fagos es más eficiente (Nabergoj, Modic and Podgornik, 2017).

A partir de los resultados correspondientes a la curva de crecimiento se identificaron 3 valores de OD600 representativos y aproximados dentro de la fase exponencial de crecimiento de la cepa M1443: 0.10, 0.15 y 0.25.

A continuación se procedió a realizar una curva de crecimiento en matraz y recuento bacteriano, utilizando esos tres valores de OD600, con el fin de determinar a qué concentración bacteriana equivalen dichos valores y así poder calcular las diferentes MOIs a testear en el ensayo de curva de infección.

Tabla 8: Equivalencia entre valores de OD600 de la fase exponencial de crecimiento de M1443 y unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL).

OD promedio	Recuento Bacteriano (UFC/ml)
0.106	2.23×10^7
0.169	2.73×10^7
0.250	5.23×10^7

Finalmente se seleccionó el punto intermedio de 0.169 que equivale a 2.73×10^7 UFC/ml. A esta OD600 se realizó el ensayo posterior de curva de infección.

4.7 Curva de infección

Se evaluó la capacidad lítica del fago Roth 23 frente a la cepa M1443 mediante una curva de infección en cultivo líquido, monitorizado durante aproximadamente 16 horas (Figura 21). Para ello, se emplearon diferentes MOI (0.01, 0.1, 1 y 10), y se compararon con un control positivo sin exposición al fago. La evolución del crecimiento bacteriano se midió mediante densidad óptica a 600 nm (OD600).

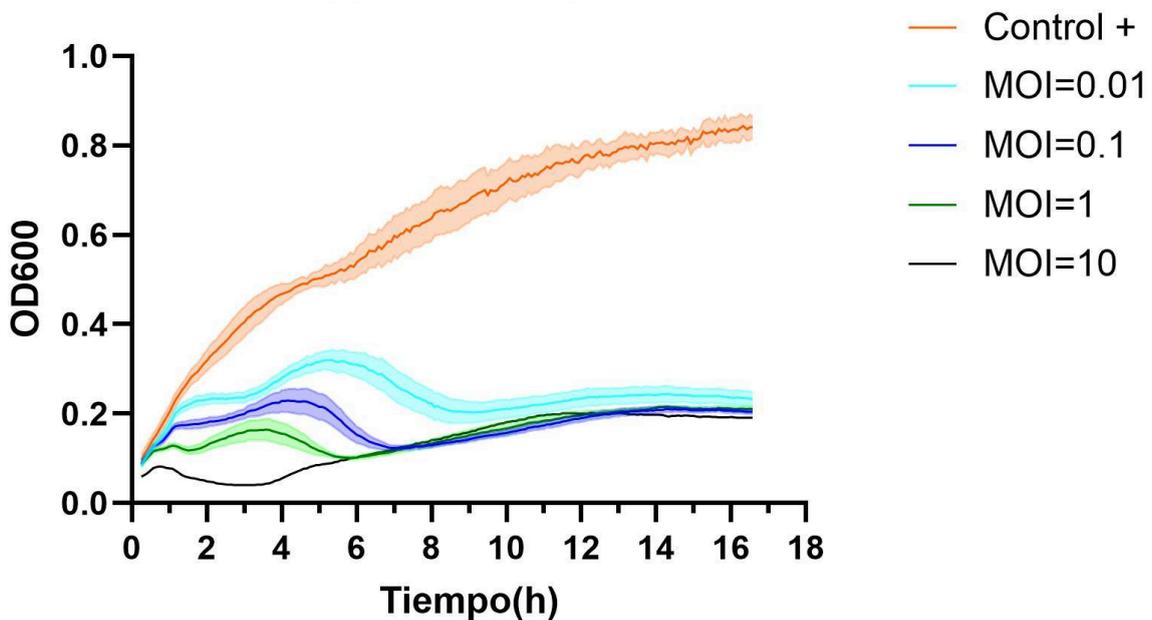


Figura 21: Curva de infección de la cepa M1443 con el fago Roth 23 a diferentes multiplicidades de infección. La densidad óptica a 600 nm (OD600) fue medida cada 5 minutos durante 18 horas. Se incluyó un control positivo sin adición de fago y pocillos blancos sin bacteria. Cada línea representa el promedio de tres réplicas biológicas (habiendo sustraído los valores promedios de los pocillos blanco), y las zonas sombreadas corresponden al SEM. Para MOI 10 solamente se realizó una réplica biológica.

El control positivo mostró un crecimiento sostenido a lo largo del tiempo, alcanzando un valor cercano a $OD_{600} \approx 0.84$ hacia las 16 horas, lo cual refleja un desarrollo bacteriano sin interferencia de agentes líticos. Interesantemente, mostró un tipo de perfil bifásico (curvas diaúxicas), con una segunda fase lag, y luego una segunda fase exponencial con menor pendiente (Monod, 1949). Este perfil puede originarse

por diferentes motivos, entre ellos: el uso secuencial de diferentes fuentes de carbono (Narang and Pilyugin, 2007),(Wang *et al.*, 2015), o cambios en las condiciones de oxigenación, incluyendo transiciones del metabolismo aerobio a anaerobio (Lisbon *et al.*, 2002). Dado que nuestro ensayo se realizó en condiciones con limitación de oxigenación (por emplear sellantes de placas no respirables), el perfil bifásico observado podría ser resultado de un cambio a un metabolismo anaerobio. Sorprendentemente, todos los tratamientos con fago mostraron una reducción en el crecimiento bacteriano, cuya magnitud fue mayormente dependiente del MOI empleado, pero reflejando también curvas diáuxicas en las primeras 6 horas post infección, y más pronunciadas que el control sin infectar. Esto último podría ser consecuencia de las interacciones patógeno-hospedero así como de la dinámica evolutiva de ambos.

A MOI = 10, se observó una rápida caída de la OD600 dentro de las primeras 2–4 horas. Esto indica una lisis inicial eficiente, con una fuerte inhibición del crecimiento bacteriano desde etapas tempranas. A MOIs = 0.1, 0.01 y 1, se detectó una fase inicial de crecimiento, seguida por una disminución moderada en la OD600, que luego se estabiliza en niveles inferiores al control. Esta dinámica es coherente con un efecto lítico más retardado y presuntamente menos eficiente, probablemente debido a una menor proporción inicial de bacterias infectadas.

Es importante destacar, que sin importar la MOI empleada, el control del crecimiento bacteriano es seguido por una posible emergencia de bacterias sobrevivientes o fenómenos de tolerancia/resistencia a partir de las 4 a 8 hs post infección. Sin embargo, la potencial emergencia de bacterias resistentes parece ser más temprana a MOIs más altos, lo cual sugiere que se debe tener en cuenta un balance en el efecto de inhibición deseado, versus la posible emergencia de resistencia a fagos al momento de seleccionar una MOI para tratamientos de biocontrol.

Actualmente una forma común de analizar las curvas de infección con fagos es el uso del Índice de Virulencia, es un método que considera la relación entre el área bajo la curva de la bacteria control y el área bajo la curva de la bacteria infectada con fagos, pero este método presenta limitaciones importantes. Entre ellas, destaca la dificultad de seleccionar un tiempo final adecuado para la integración,

especialmente en curvas de crecimiento no canónicas, como aquellas con recrecimiento bacteriano o variaciones impredecibles de la densidad óptica. Además, otros enfoques utilizados para analizar las curvas de infección como μ_{max} o la asíntota de crecimiento también enfrentan desafíos cuando no se alcanza una fase estacionaria clara. Dadas estas limitaciones, recientemente Hosseini et al., (2024) propusieron un nuevo método basado en el índice de centroide (IC) del área bajo la curva. Este punto conceptual, definido por sus coordenadas X (tiempo promedio del crecimiento) e Y (magnitud promedio del crecimiento), resume la distribución temporal de la densidad poblacional. El IC permite capturar con mayor precisión la localización y la magnitud del crecimiento o recrecimiento bacteriano, aspectos que suelen pasarse por alto. Un IC cercano a 1 indica una alta eficiencia del fago en lisar la bacteria, mientras que un valor cercano a 0 sugiere una baja eficiencia (Hosseini *et al.*, 2024).

Como se evidencia en la Tabla 9, se procedió al cálculo de los valores de IC para cada MOI testada, observando un incremento en el valor del IC desde 0.686 a MOI 0.01 hasta un máximo de 0.761 a MOI 1, seguido de una leve disminución a 0.747 en MOI 10. Se puede inferir que la eficiencia de infección del fago aumenta desde MOI 0.01 hasta MOI 1. La disminución observada a MOI 10 sugiere una leve pérdida de esta eficiencia, lo cual podría deberse a la emergencia de bacterias resistentes de forma más temprana. Sin embargo, dada la estrecha diferencia entre los valores del IC a MOIs 0.1, 1 y 10 (0.758 – 0.761 – 0.747), y considerando que este valor no incorpora márgenes de error, se podría decir que a cualquiera de estas MOIs, Roth 23 tiene una eficiencia de infección similar. De todos modos es importante mencionar que ninguno de estos valores es cercano a 1, valor que indicaría una lisis 100% eficiente, en la cual se controla el crecimiento bacteriano de manera temprana, y no se registra recrecimiento hacia el final de la incubación.

Tabla 9: Equivalencia entre Índice de centroide (IC) y MOI.

MOI	IC
0.01	0,686
0.1	0,758
1	0,761
10	0,747

En conjunto, estos resultados sugieren que Roth 23 presenta una capacidad lítica moderadamente efectiva frente a M1443, con un efecto mayormente dependiente de la MOI, donde concentraciones más altas del fago generan una lisis más rápida. Este comportamiento es consistente con lo reportado en la literatura, donde el MOI se reconoce como un parámetro clave en la cinética de infección y en la eficacia de los fagos como agentes antimicrobianos (Abedon, 2016). Sin embargo, es importante tener en cuenta la generación de presuntas bacterias resistentes a tiempos tempranos post infección (4-8 hs), lo cual sugiere que este fago debería de emplearse en combinación con otro en una formulación de *cocktail*, de manera de prevenir la emergencia de subpoblaciones bacterianas resistentes.

4.8 Secuenciación

4.8.1 Fago Roth 23.2

Por las diferencias observadas entre las propagaciones de Roth 23 en cuanto a la magnitud de las EOPs así como para erradicar biofilms preformados, se decidió secuenciar ambas para poder compararlas entre sí y con la secuencia de Roth 23 ya reportada (Rothschild-Rodriguez et al 2025). Desafortunadamente, en el proceso de fragmentación de los ADNs previo a la generación de las librerías, el ADN de Roth 23.3 pareció haberse degradado completamente (Apéndice: Figura suplementaria 2), por lo cual no se sometió a secuenciación.

Para Roth 23.2 fue posible secuenciar su genoma y se obtuvieron 4 contigs (Tabla 10). El ensamblaje realizado se comparó con el genoma de referencia de Roth 23 (Nro de acceso al NCBI: PQ657796.1). Éste mostró una cobertura superior al 98%, con una identidad promedio del 98.78%. Se detectaron 560 SNPs y 1219 indels, además de algunos eventos estructurales como translocaciones.

El gráfico generado mediante *mummerplot*, que compara el ensamblado del fago Roth23.2 con su genoma de referencia (PQ657796.1), revela una alta colinearidad entre ambas secuencias, evidenciada por la presencia de varias diagonales alineadas en sentido ascendente, correspondientes a los cuatro contigs del

ensamblado (Figura 22). Estas diagonales, aunque separadas, mantienen una orientación coherente con la referencia, lo que indica una representación fiel del genoma, a pesar de la fragmentación. No se detectaron grandes inversiones, mientras que los pequeños desplazamientos entre fragmentos son consistentes con las variantes identificadas previamente (560 SNPs y 1219 indels). Este patrón visual respalda los valores de cobertura e identidad obtenidos (>98%) (Tabla 10), y sugiere que las diferencias observadas podrían deberse tanto a variaciones biológicas propias de la cepa como a limitaciones técnicas inherentes al ensamblado o a la corrección de errores. Un factor importante a destacar, es que nuestros fagos fueron generados en una cepa bacteriana diferente a la cepa que utilizaron en UK para propagarlos, y esto podría dar cuenta de los SNPs observados.

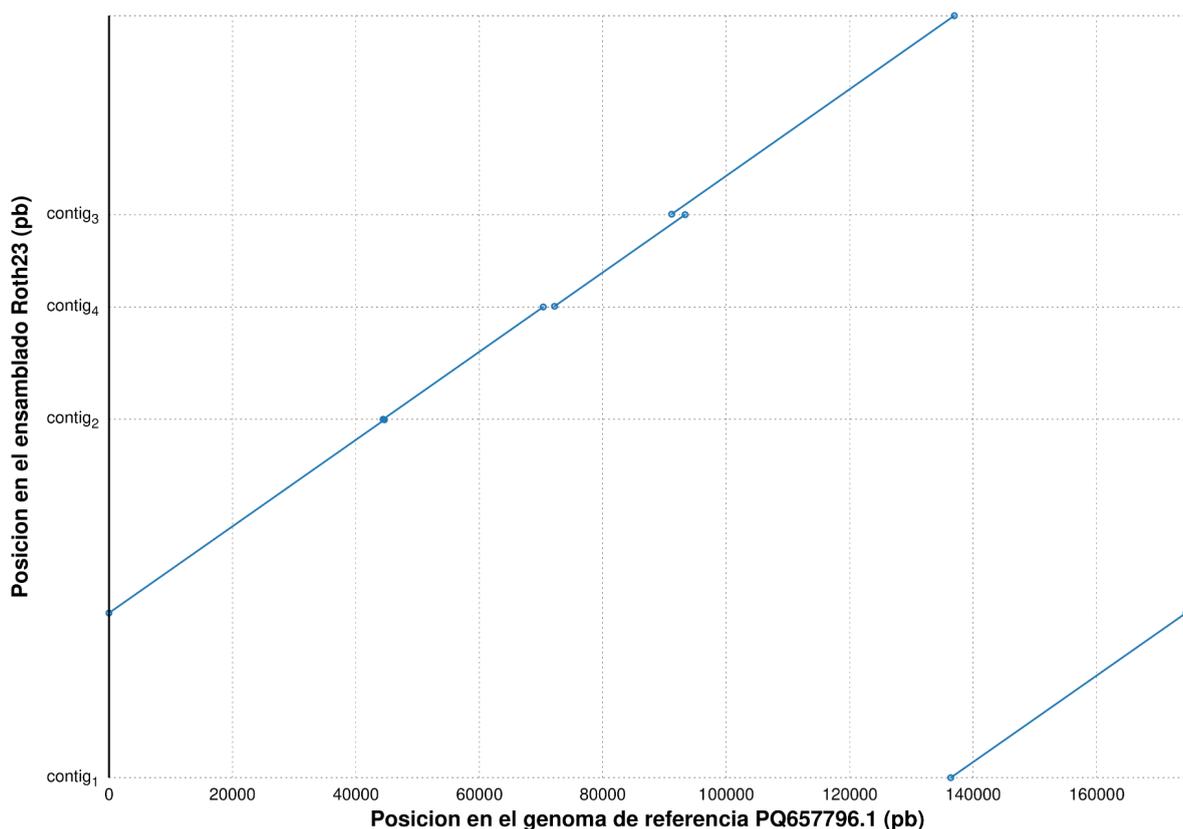


Figura 22: Comparación genómica entre Roth23.2 y la secuencia de referencia. En el eje Y se representa la posición en el ensamblado de Roth 23 (contigs) y en el eje X se representa la posición en el genoma de referencia PQ657796.1 (pb).

Aún son necesarios más análisis bioinformáticos para determinar si algunos de esos cambios podrían dar cuenta de los comportamientos diferenciales observados. Asimismo, queda pendiente la secuenciación de Roth 23.3 para poder comparar entre ambas propagaciones.

Tabla 10: Resultados de la secuenciación de Roth23.2 y características genómicas.

Número de Contigs	4
GC%	42
Largo total (pb)	176346
Identidad de secuencia con referencia PQ657796.1	98.78%

Contig	Largo (pb)	Cobertura (%)	Profundidad media (X)	Calidad promedio (Q)
1	82.950	100.00	11.07	37.5
2	25.989	100.00	9.69	50.5
3	46.052	99.88	12.65	26.2
4	21.355	100.00	11.06	49.9

4.8.2 Cepa *K. pneumoniae* M1443

En la cepa M1443 se identificaron múltiples genes asociados a resistencia antimicrobiana (Tabla 11). Entre los genes de resistencia a β -lactámicos se detectaron SHV-182, TEM-1A, OXA-18 y KPC-2. Esta última, es una carbapenemasa de clase A, que ha sido identificada como una de las enzimas clínicamente más importantes debido a su prevalencia en bacterias entéricas (Mehta, Rice and Palzkill, 2015).

Respecto a los aminoglucósidos, se identificaron los genes *aac(3)-IV*, *aadA1*, *aac(6')-Ib* y *aph(4)-Ia*. En particular, el gen de resistencia *aac(6')-Ib* codifica para una enzima que es de importancia clínica y se encuentra en una amplia variedad de patógenos Gram-negativos. Es una enzima de interés no solo por su ubicuidad sino

también por presentar microheterogeneidad significativa en los extremos N-terminales lo que tiene implicancias en la evolución de variantes con diferentes especificidades y niveles de resistencia. Además este gen de resistencia se encuentra en elementos móviles (integrones, transposones, plásmidos) facilitando su diseminación horizontal entre bacterias y acelerando la expansión de cepas multirresistentes en ambientes clínicos (Ramirez, Nikolaidis and Tolmasky, 2013).

Por otro lado, OqxB es una bomba de eflujo perteneciente a la familia RND que confiere resistencia a diversos antimicrobianos, incluidos quinolonas, nitrofurantoína, quinoxalinas, tigeciclina, cloranfenicol, así como a detergentes y desinfectantes. Además de localizarse en el cromosoma bacteriano, este gen de resistencia también se encuentra en elementos móviles como plásmidos, lo que indica su potencial de diseminación horizontal (Bharatham *et al.*, 2021).

Asimismo, se observaron otros genes de resistencia, como *sul3*, que le confiere a la bacteria resistencia a sulfonamidas. Este gen de resistencia fue originalmente descrito en *E. coli* de origen porcino en Suiza y posteriormente identificado en aislamientos clínicos humanos (Grape, 2003). Por otra parte, *fosA6*, codifica una enzima del tipo FosA que inactiva la fosfomicina (Guo *et al.*, 2016) y *cmlA1*, asociado a bombas de eflujo que median resistencia a fenicoles como el cloranfenicol (George and Hall, 2002).

El secuenciotipo ST11 representa el clon predominante de *K. pneumoniae* resistente a carbapenémicos en China. Este secuenciotipo se caracteriza por su falta de sistemas de restricción-modificación y CRISPR-Cas, lo que facilita la adquisición de plásmidos que codifican múltiples genes de resistencia y virulencia. Como resultado, las cepas ST11 pueden presentar resistencia prácticamente frente a todos los antibióticos clínicamente relevantes, incluidos carbapenémicos, colistina y ceftazidima/avibactam. Además existe una asociación estrecha entre ST11, plásmidos del tipo IncF y elementos genéticos como *blaKPC-2* (Liao, Liu and Zhang, 2020). Estos hallazgos coinciden con lo observado en la cepa M1443, en la cual se identificó la presencia del gen *blaKPC-2* y un plásmido con grupos de incompatibilidad plasmídica IncFIB(K) e IncFII(K) (Tabla 11).

Tabla 11: Resultados de la secuenciación de *K. pneumoniae* M1443 y características genómicas.

Número de Contigs	3
GC%	57,32
Largo total	5467406
Secuenciotipo	ST11
Tipo capsular	KL127
Genes resistencia beta lactámicos	<i>blaSHV-182; blaTEM-1A; blaOXA-18; blaKPC-2</i>
Genes resistencia aminoglucósidos	<i>aac(3)-IV; aadA1; aac(6')-Ib; aph(4)-Ia</i>
Genes resistencia quinolonas	<i>oqxB</i>
Otros genes de resistencia	<i>sul3; fosA6; cmlA1</i>

Contig	Largo (pb)	Localización	Profundidad media (X)	Grupo de Incompatibilidad plasmídica
1	5208168	cromosoma	94,2	-
2	72092	plásmido	51,6	IncR
3	187146	plásmido	83,8	IncFIB(K) e IncFII(K)

Si bien este es un secuenciotipo predominante en China, en la región se ha reportado la circulación de clones de *K. pneumoniae* multirresistentes ST11 en diferentes regiones de Brasil (Lobato et al., 2023). (Andrade et al., 2018). Por otro lado, los primeros aislamientos clínicos de *K. pneumoniae* ST11 que portan el gen *blaKPC-3* en Latinoamérica fueron detectados en Colombia (García-Fulgueiras et al., 2020). Interesantemente, dos aislamientos de Brasil, pertenecientes a este secuenciotipo, portan el mismo tipo capsular que la cepa M1443 (KL127) y son también productores de carbapenemasa KPC-2, lo cual podría argumentar a favor de un posible origen de este clon epidémico desde nuestro país vecino (Andrade et al., 2018).

En conjunto, la presencia de múltiples determinantes de resistencia a distintas familias de antimicrobianos, entre ellos genes de alto impacto clínico como KPC-2, resalta el perfil multirresistente de la cepa M1443 y destaca su relevancia como una amenaza potencial en entornos clínicos, tanto por su resistencia extendida como por su capacidad de diseminación de genes de resistencia vía transferencia horizontal.

5. Conclusiones

- Los fagos evaluados revelaron estrechos rangos de hospedero y valores de EOP variables.
- Roth 23 presenta los valores de EOP más elevados, siendo por tanto un fago altamente virulento para las cepas Kp1111, M1443 y FQ40565. Por otro lado, Roth 8 presenta el rango de hospedero más amplio, siendo capaz de lisar las cepas 164413U/2, Kp666, F312C.
- Ambos fagos son estables en un rango de 4°C a 42°C y valores de pH de 7 a 11, sin embargo Roth 23 mantiene también su estabilidad a pH 5, mientras que Roth 8 es más lábil.
- M1443, perteneciente al secuenciotipo ST11, es la cepa bacteriana con mayor capacidad de formar biofilms y porta numerosos genes de resistencia a antibióticos.
- Roth 23 es capaz de controlar la carga bacteriana de manera dosis dependiente hasta una MOI de 1 en cultivos planctónicos, y también logra erradicar aproximadamente el 30 % de biomasa del biofilm de M1443 a altas cantidades de fago.
- Roth 23.2 no posee grandes diferencias genómicas respecto a la secuencia de referencia.

6. Perspectivas

En un futuro sería interesante, secuenciar la cepa Roth 23.3 con el fin de compararla tanto con el genoma de referencia como con la cepa Roth 23.2, lo que permitirá identificar posibles diferencias genómicas relevantes e intentar comprender si existe alguna que explique las diferencias observadas en la capacidad de erradicar biofilm, o en las diferencias entre las eficiencias de plaqueo en ambas propagaciones.

Asimismo poder realizar la secuenciación de las cepas resistentes a Roth 23, obtenidas como resultado de las curvas de infección a diferentes MOI, con el objetivo de analizar los mecanismos de resistencia a fagos que hayan emergido en estas bacterias como resultado de la presión selectiva causada por la infección de Roth 23.

Además, determinar los ST, tipos capsulares y posibles receptores de las bacterias de la colección usada para el rango de hospedero con el fin de evaluar una posible asociación entre la susceptibilidad a los fagos y estas características.

7. Bibliografía:

Abdel-Aal, M.H. et al. (2024) 'Influence of some chemicals and solvents on the lytic activity and the adsorption of bacteriophages on *Pectobacterium carotovorum* Subsp. *carotovorum*', *Plant Science Today* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.14719/pst.2998>.

Abedon, S.T. (2011) 'Lysis from without', *Bacteriophage* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.4161/bact.1.1.13980>.

Abedon, S.T. (2016) 'Phage therapy dosing: The problem(s) with multiplicity of infection (MOI)', *Bacteriophage*, 6(3), p. e1220348. Available at: <https://doi.org/10.1080/21597081.2016.1220348>.

Alfonso, A.; Seijas, C.; Alegretti, M.; Albornoz, H.; Echagüe, M.; Ferreiro, M. del C.; Flores, J.; Silvera, E.; Tritten, D (2024). Infecciones Asociadas a La Atención En Salud -Resistencia Antimicrobiana - Resultados de La Vigilancia, Informe Anual.

Alós, J. I. (2015). Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 33(10), 692-699. doi:10.1016/j.eimc.2014.10.004

Aminov, R. I. (2010). A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. *Frontiers in microbiology*, 1, 134. doi:10.3389/fmicb.2010.00134

Anderson, G.G. and O'Toole, G.A. (2008) 'Innate and Induced Resistance Mechanisms of Bacterial Biofilms', in T. Romeo (ed.) *Bacterial Biofilms*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg (Current Topics in Microbiology and Immunology), pp. 85–105. Available at: https://doi.org/10.1007/978-3-540-75418-3_5.

Andrade, L.N. et al. (2018) 'Virulence genes, capsular and plasmid types of multidrug-resistant CTX-M(-2, -8, -15) and KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae*

isolates from four major hospitals in Brazil', *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 91(2), pp. 164–168. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2018.01.007>.

Baqer, A.A. et al. (2023) 'In Vitro Activity, Stability and Molecular Characterization of Eight Potent Bacteriophages Infecting Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*', *Viruses*, 15(1), p. 117. Available at: <https://doi.org/10.3390/v15010117>.

Beamud, B. et al. (2023) 'Genetic determinants of host tropism in *Klebsiella* phages', *Cell Reports*, 42(2), p. 112048. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.112048>.

Bharatham, N. et al. (2021) 'Structure and function relationship of Oqx_B efflux pump from *Klebsiella pneumoniae*', *Nature Communications*, 12(1), p. 5400. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25679-0>.

Bondy-Denomy, J. et al. (2016) 'Prophages mediate defense against phage infection through diverse mechanisms', *The ISME Journal*, 10(12), pp. 2854–2866. Available at: <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.79>.

Brüssow, H. (2024) 'The antibiotic resistance crisis and the development of new antibiotics', *Microbial Biotechnology*, 17(7), p. e14510. Available at: <https://doi.org/10.1111/1751-7915.14510>.

Cano, E.J. et al. (2021) 'Phage Therapy for Limb-threatening Prosthetic Knee *Klebsiella pneumoniae* Infection: Case Report and In Vitro Characterization of Anti-biofilm Activity', *Clinical Infectious Diseases*, 73(1), pp. e144–e151. Available at: <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa705>.

Carattoli, A. et al. (2014) 'In Silico Detection and Typing of Plasmids using PlasmidFinder and Plasmid Multilocus Sequence Typing', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(7), pp. 3895–3903. Available at: <https://doi.org/10.1128/aac.02412-14>.

Chen, Z. et al. (2009) 'Fisiología celular y respuesta del flujo metabólico de *Klebsiella pneumoniae* a condiciones aeróbicas', *Process Biochemistry*, 44(8), pp. 862–868. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2009.04.004>.

Chhibber, S., Kaur, S. and Kumari, S. (2008) 'Therapeutic potential of bacteriophage in treating *Klebsiella pneumoniae* B5055-mediated lobar pneumonia in mice', *Journal of Medical Microbiology*, 57(12), pp. 1508–1513. Available at: <https://doi.org/10.1099/jmm.0.2008/002873-0>.

Chibeu, A., Lingohr, E. J., Masson, L., Manges, A., Harel, J., Ackermann, H. W., ... & Boerlin, P. (2012). Bacteriophages with the ability to degrade uropathogenic *Escherichia coli* biofilms. *Viruses*, 4(4), 471-487. doi:10.3390/v4040471.

Clokic, M. R., Millard, A. D., Letarov, A. V., & Heaphy, S. (2011). Phages in nature. *Bacteriophage*, 1(1), 31-45. doi:10.4161/bact.1.1.14942

Corbellino, M. et al. (2020) 'Eradication of a Multidrug-Resistant, Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolate Following Oral and Intra-rectal Therapy With a Custom Made, Lytic Bacteriophage Preparation', *Clinical Infectious Diseases*, 70(9), pp. 1998–2001. Available at: <https://doi.org/10.1093/cid/ciz782>.

Costa, S.A. da S. et al. (2015) 'Stability of antimicrobial activity of peracetic acid solutions used in the final disinfection process', *Brazilian Oral Research*, 29, pp. 1–6. Available at: <https://doi.org/10.1590/1807-3107BOR-2015.vol29.0038>.

Dong, C. et al. (2024) 'Dietary Bacteriophage Administration Alleviates Enterotoxigenic *Escherichia coli*-Induced Diarrhea and Intestinal Impairment through Regulating Intestinal Inflammation and Gut Microbiota in a Newly Weaned Mouse Model', *International Journal of Molecular Sciences*, 25(19), p. 10736. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms251910736>.

Durand, G.A., Raoult, D. and Dubourg, G. (2019) 'Antibiotic discovery: history, methods and perspectives', *International Journal of Antimicrobial Agents*, 53(4), pp. 371–382. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.11.010>.

Echeverría N. (2014) Plataformas genéticas involucradas en la adquisición y transferencia de la multirresistencia a antibióticos en *Klebsiella pneumoniae*. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. PEDECIBA Biología

Erol, H.B. et al. (2023) 'The effect of phage-antibiotic combination strategy on multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* biofilms', *Journal of Microbiological Methods*, 210, p. 106752. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2023.106752>.

Fallingborg, J., Christensen, L.A., Ingeman-Nielsen, M., Jacobsen, B.A., Abildgaard, K. and Rasmussen, H.H. (1989) 'Regional intestinal pH and transit times in normal subjects measured by a radiotelemetry device', *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 3(6), pp. 605–613. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.1989.tb00254.x>.

Fallingborg, J. (1999) 'Intraluminal pH of the human gastrointestinal tract', *Danish Medical Bulletin*, 46(3), pp. 183–196.

Federici, S. et al. (2022) 'Targeted suppression of human IBD-associated gut microbiota commensals by phage consortia for treatment of intestinal inflammation', *Cell*, 185(16), pp. 2879–2898.e24. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.07.003>

Fujimura, R. and Kaesberg, P. (1962) 'THE ADSORPTION OF BACTERIOPHAGE bX174 TO ITS HOST'.

Ganegama Arachchi, G.J. et al. (2013) 'Effectiveness of phages in the decontamination of *Listeria monocytogenes* adhered to clean stainless steel, stainless steel coated with fish protein, and as a biofilm', *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 40(10), pp. 1105–1116. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10295-013-1313-3>.

Garcia-Fulgueiras, V. et al. (2020) 'First characterization of *K. pneumoniae* ST11 clinical isolates harboring blaKPC-3 in Latin America', *Revista Argentina de Microbiología*, 52(3), pp. 211–216. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ram.2019.10.003>.

Gaub, A. and Rahman, K.M. (2023) 'Evaluation of Antibiotic Resistance Mechanisms in Gram-Negative Bacteria', *Antibiotics*, 12(11), p. 1590. Available at: <https://doi.org/10.3390/antibiotics12111590>.

George, A.M. and Hall, R.M. (2002) 'Efflux of chloramphenicol by the CmlA1 protein', *FEMS Microbiology Letters*, 209(2), pp. 209–213. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2002.tb11133.x>.

Gibson, S.B. et al. (2019) 'Constructing and Characterizing Bacteriophage Libraries for Phage Therapy of Human Infections', *Frontiers in Microbiology*, 10, p. 2537. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02537>.

Gliźniewicz, M. et al. (2024) 'Advances in bacteriophage-mediated strategies for combating polymicrobial biofilms', *Frontiers in Microbiology*, 14. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1320345>.

Gobernado, M. (2005) 'Betalactamasas de espectro extendido en aumento'.

Gordillo Altamirano, F. L., & Barr, J. J. (2019). Phage therapy in the postantibiotic era. *Clinical microbiology reviews*, 32(2), 10-1128. doi:10.1128/CMR.00066-18.

Górski, A., Międzybrodzki, R. and Borysowski, J. (eds) (2019) *Phage Therapy: A Practical Approach*. Cham: Springer International Publishing. Available at: <https://doi.org/10.1007/978-3-030-26736-0>.

Grape, M. (2003) 'Sulphonamide resistance gene sul3 found in *Escherichia coli* isolates from human sources', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52(6), pp. 1022–1024. Available at: <https://doi.org/10.1093/jac/dkg473>.

Guerra, M. E. S., Destro, G., Vieira, B., Lima, A. S., Ferraz, L. F. C., Hakansson, A. P., ... & Converso, T. R. (2022). *Klebsiella pneumoniae* biofilms and their role in disease pathogenesis. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 12, 877995. doi:10.3389/fcimb.2022.877995

Guo, Q. et al. (2016) 'Glutathione-S-transferase FosA6 of *Klebsiella pneumoniae* origin conferring fosfomicin resistance in ESBL-producing *Escherichia coli*', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71(9), pp. 2460–2465. Available at: <https://doi.org/10.1093/jac/dkw177>.

Gurevich, A. et al. (2013) 'QUAST: quality assessment tool for genome assemblies', *Bioinformatics*, 29(8), pp. 1072–1075. Available at: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt086>.

Hacia un plan de acción nacional único contra la resistencia antimicrobiana (RAM) en Uruguay (2023) Ministerio de Salud Pública. Available at: <https://www.gub.uy/ministerio-salud-publica/comunicacion/noticias/hacia-plan-accion-nacional-unico-contra-resistencia-antimicrobiana-ram> (Accessed: 23 May 2025).

Hall-Stoodley, L., Costerton, J.W. and Stoodley, P. (2004) 'Bacterial biofilms: from the Natural environment to infectious diseases', *Nature Reviews Microbiology*, 2(2), pp. 95–108. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrmicro821>.

Hall-Stoodley, L. and Stoodley, P. (2009) 'Evolving concepts in biofilm infections', *Cellular Microbiology*, 11(7), pp. 1034–1043. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2009.01323.x>.

Hamdi, S. et al. (2017) 'Characterization of two polyvalent phages infecting *Enterobacteriaceae*', *Scientific Reports*, 7(1), p. 40349. Available at: <https://doi.org/10.1038/srep40349>.

Holá, V., Opazo-Capurro, A., & Scavone, P. (2021). The Biofilm Lifestyle of Uropathogens. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 11, 763415. doi:10.3389/fcimb.2021.763415

Hosseini, N. et al. (2024) 'Centroid of the bacterial growth curves: a metric to assess phage efficiency', *Communications Biology*, 7(1), pp. 1–9. Available at: <https://doi.org/10.1038/s42003-024-06379-z>.

Humphrey, S.P. and Williamson, R.T. (2001) 'A review of saliva: Normal composition, flow, and function', *The Journal of Prosthetic Dentistry*, 85(2), pp. 162–169. Available at: <https://doi.org/10.1067/mpr.2001.113778>.

Informe anual - Infecciones asociadas a la atención en salud y de resistencia antimicrobiana (2024) Ministerio de Salud Pública. Available at: <https://www.gub.uy/ministerio-salud-publica/comunicacion/publicaciones/informe-anual-infecciones-asociadas-atencion-salud-resistencia> (Accessed: 23 May 2025).

Jebens, E.H. and Monk-Jones, M.E. (1959) 'ON THE VISCOSITY AND pH OF SYNOVIAL FLUID AND THE pH OF BLOOD', *The Journal of Bone and Joint Surgery. British volume*, 41-B(2), pp. 388–400. Available at: <https://doi.org/10.1302/0301-620X.41B2.388>.

de Jonge, P.A. et al. (2019) 'Molecular and Evolutionary Determinants of Bacteriophage Host Range', *Trends in Microbiology*, 27(1), pp. 51–63. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.08.006>.

Jorge, E.C. et al. (2023) 'Gold-, Silver- and Magnesium-Doped Zinc Oxide Nanoparticles Prevents The Formation of and Eradicates Bacterial Biofilms', *Nanomedicine*, 18(10), pp. 803–818. Available at: <https://doi.org/10.2217/nnm-2022-0239>.

Juan, C. (2018) 'A propósito de las bacterias multirresistentes y la situación en nuestro país', *SMU*, 8 February. Available at: <https://www.smu.org.uy/proposito-las-bacterias-multirresistentes-la-situacion-pais/> (Accessed: 23 May 2025).

Kauffman, K.M. et al. (2022) 'Resolving the structure of phage–bacteria interactions in the context of natural diversity', *Nature Communications*, 13(1), p. 372. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-021-27583-z>.

Kellum, J.A. (2000) 'Determinants of blood pH in health and disease', *Critical Care*, 4(1), p. 6. Available at: <https://doi.org/10.1186/cc644>.

Kerby, G.P. and Gowdy, R.A. (1949) 'Purification pH stability and sedimentation properties of the T7 bacteriophage of *Escherichia coli*', *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 63(1), pp. 93–107.

Kering, K.K. et al. (2020) 'Application of Adaptive Evolution to Improve the Stability of Bacteriophages during Storage', *Viruses*, 12(4), p. 423. Available at: <https://doi.org/10.3390/v12040423>.

Khadka, C. et al. (2023) 'Extended-spectrum β -lactamases producing Enterobacteriaceae (ESBL-PE) prevalence in Nepal: A systematic review and meta-analysis', *Science of The Total Environment*, 901, p. 166164. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.166164>.

Kim, S.G. et al. (2021) 'Strategy for mass production of lytic *Staphylococcus aureus* bacteriophage pSa-3: contribution of multiplicity of infection and response surface methodology', *Microbial Cell Factories*, 20(1), p. 56. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01549-8>.

Kolmogorov, M. et al. (2019) 'Assembly of long, error-prone reads using repeat graphs', *Nature Biotechnology*, 37(5), pp. 540–546. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0072-8>.

Kropinski, A. M., Mazzocco, A., Waddell, T. E., Lingohr, E., & Johnson, R. P. (2009). Enumeration of bacteriophages by double agar overlay plaque assay. In: Clokie, M.R., Kropinski, A.M. (eds) *Bacteriophages* (69–76) Ciudad: Totowa, NJ Humana Press. doi:10.1007/978-1-60327-164-6_7

Kropinski, A.M. (2018) 'Practical Advice on the One-Step Growth Curve', in M.R.J. Clokie, A.M. Kropinski, and R. Lavigne (eds) *Bacteriophages*. New York, NY: Springer New York (Methods in Molecular Biology), pp. 41–47. Available at: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7343-9_3.

Kuipers, S. et al. (2019) 'A Dutch Case Report of Successful Treatment of Chronic Relapsing Urinary Tract Infection with Bacteriophages in a Renal Transplant Patient', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 64(1), p. 10.1128/aac.01281-19. Available at: <https://doi.org/10.1128/aac.01281-19>.

Kutter, E. (2009) 'Phage Host Range and Efficiency of Plating', in M.R.J. Clokie and A.M. Kropinski (eds) *Bacteriophages*. Totowa, NJ: Humana Press (Methods in Molecular Biology), pp. 141–149. Available at: https://doi.org/10.1007/978-1-60327-164-6_14.

Lewis, K. (2005) 'Persister cells and the riddle of biofilm survival', *Biochemistry (Moscow)*, 70(2), pp. 267–274. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10541-005-0111-6>.

Lewis, K. (2020) 'The Science of Antibiotic Discovery', *Cell*, 181(1), pp. 29–45. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.056>.

Li, H. et al. (2009) 'The Sequence Alignment/Map format and SAMtools', *Bioinformatics*, 25(16), pp. 2078–2079. Available at: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352>.

Li, H. (2018) 'Minimap2: pairwise alignment for nucleotide sequences', *Bioinformatics*. Edited by I. Birol, 34(18), pp. 3094–3100. Available at: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty191>.

Li, Y. et al. (2023) 'Characteristics of antibiotic resistance mechanisms and genes of *Klebsiella pneumoniae*', *Open Medicine*, 18(1). Available at: <https://doi.org/10.1515/med-2023-0707>.

Liao, W., Liu, Y. and Zhang, W. (2020) 'Virulence evolution, molecular mechanisms of resistance and prevalence of ST11 carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in China: A review over the last 10 years', *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 23, pp. 174–180. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2020.09.004>.

Lima, L.M. et al. (2020) ' β -lactam antibiotics: An overview from a medicinal chemistry perspective', *European Journal of Medicinal Chemistry*, 208, p. 112829. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112829>.

Lisbon, K. et al. (2002) 'Effect of Dissolved Oxygen on Oxidic/Anoxic Diauxic Lag of *P. denitrificans*', *Journal of Environmental Engineering*, 128(4), pp. 391–394. Available at: [https://doi.org/10.1061/\(ASCE\)0733-9372\(2002\)128:4\(391\)](https://doi.org/10.1061/(ASCE)0733-9372(2002)128:4(391)).

Lobato, A.R.F. et al. (2023) 'Genomic analysis of *Klebsiella pneumoniae* high-risk clone ST11 co-harboring MCR-1.27 and KPC-2 recovered at a paediatric oncologic hospital in the Brazilian Amazon region', *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 33, pp. 279–282. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2023.04.009>.

Lopatina, A., Tal, N. and Sorek, R. (2020) 'Abortive Infection: Bacterial Suicide as an Antiviral Immune Strategy', *Annual Review of Virology*, 7(Volume 7, 2020), pp. 371–384. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-011620-040628>.

Loponte, R. et al. (2021) 'Phage Therapy in Veterinary Medicine', *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 10(4), p. 421. Available at: <https://doi.org/10.3390/antibiotics10040421>.

Łusiak-Szelachowska, M. et al. (2022) 'Bacteriophages and antibiotic interactions in clinical practice: what we have learned so far', *Journal of Biomedical Science*, 29(1), p. 23. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12929-022-00806-1>.

Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., ... & Monnet, D. L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard

definitions for acquired resistance. *Clinical microbiology and infection*, 18(3), 268-281. doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x.

Mah, T.-F.C. and O'Toole, G.A. (2001) 'Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents', *Trends in Microbiology*, 9(1), pp. 34–39. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(00\)01913-2](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(00)01913-2).

Malik, S., Sidhu, P. K., Rana, J. S., & Nehra, K. (2020). Managing urinary tract infections through phage therapy: A novel approach. *Folia Microbiologica*, 65(2), 217-231. doi: 10.1007/s12223-019-00750-y

Marçais, G. et al. (2018) 'MUMmer4: A fast and versatile genome alignment system', *PLOS Computational Biology*, 14(1), p. e1005944. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005944>.

Mehta, S.C., Rice, K. and Palzkill, T. (2015) 'Natural Variants of the KPC-2 Carbapenemase have Evolved Increased Catalytic Efficiency for Ceftazidime Hydrolysis at the Cost of Enzyme Stability', *PLoS Pathogens*, 11(6), p. e1004949. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004949>.

Monod, J. (1949) 'The Growth of Bacterial Cultures'. *Annu Rev Microbiol* 3:371–394

Mourali, D. et al. (2024) 'Isolation and Characterization of Lytic Phages Infecting Clinical *Klebsiella pneumoniae* from Tunisia', *Antibiotics*, 13(12), p. 1154. Available at: <https://doi.org/10.3390/antibiotics13121154>.

Murray, C.J.L.; Ikuta, K.S.; Sharara, F.; Swetschinski, L.; Robles Aguilar, G.; Gray, A.; Han, C.; Bisignano, C.; Rao, P.; Wool, E.; et al. Global Burden of Bacterial Antimicrobial Resistance in 2019: A Systematic Analysis. *Lancet* 2022, 399, 629–655, doi:10.1016/S0140-6736(21)02724-0.

Murray, C.J.L. et al. (2022) 'Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis', *The Lancet*, 399(10325), pp. 629–655. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0).

Nabergoj, D., Modic, P. and Podgornik, A. (2017) 'Effect of bacterial growth rate on bacteriophage population growth rate', *MicrobiologyOpen*, 7(2), p. e00558. Available at: <https://doi.org/10.1002/mbo3.558>.

'nanoporetech/medaka' (2025). Oxford Nanopore Technologies. Available at: <https://github.com/nanoporetech/medaka> (Accessed: 1 June 2025).

Narang, A. and Pilyugin, S.S. (2007) 'Bacterial gene regulation in diauxic and non-diauxic growth', *Journal of Theoretical Biology*, 244(2), pp. 326–348. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2006.08.007>.

Ordenanza N° 1.162/024 Autorización para práctica de terapia personalizada con bacteriófagos (2024) Ministerio de Salud Pública. Available at: <https://www.gub.uy/ministerio-salud-publica/institucional/normativa/ordenanza-n-116-2024-autorizacion-para-practica-terapia-personalizada> (Accessed: 6 June 2025).

Owen, D.H. and Katz, D.F. (1999) 'A vaginal fluid simulant', *Contraception*, 59(2), pp. 91–95. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0010-7824\(99\)00010-4](https://doi.org/10.1016/S0010-7824(99)00010-4).

Öztürk, H., Ozkirimli, E. and Özgür, A. (2015) 'Classification of Beta-Lactamases and Penicillin Binding Proteins Using Ligand-Centric Network Models', *PLoS ONE*, 10(2), p. e0117874. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117874>.

Paczosa, M. K., & Mecsas, J. (2016). *Klebsiella pneumoniae*: going on the offense with a strong defense. *Microbiology and molecular biology reviews*, 80(3), 629-661. doi:10.1128/membr.00078-15

Pendleton, J.N., Gorman, Sean P and and Gilmore, B.F. (2013) 'Clinical relevance of the ESKAPE pathogens', *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 11(3), pp. 297–308. Available at: <https://doi.org/10.1586/eri.13.12>.

Pirnay, J.-P. et al. (2024) 'Personalized bacteriophage therapy outcomes for 100 consecutive cases: a multicentre, multinational, retrospective observational study',

Nature Microbiology, 9(6), pp. 1434–1453. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41564-024-01705-x>.

Pişkin, B. and Türkün, M. (1995) 'Stability of various sodium hypochlorite solutions', Journal of Endodontics, 21(5), pp. 253–255. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0099-2399\(06\)80991-X](https://doi.org/10.1016/S0099-2399(06)80991-X).

Pollard, E.C. and Solosko, W. (1971) 'The thermal inactivation of T4 and lambda bacteriophage', Biophysical Journal, 11(1), pp. 66–74. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(71\)86195-7](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(71)86195-7).

Primera Jornada Médica sobre Avances de la Fagoterapia en Uruguay (2025). Available at: <https://www.youtube.com/watch?v=ct6XcyteDIU> (Accessed: 6 June 2025).

Ramirez, M.S., Nikolaidis, N. and Tolmasky, M. (2013) 'Rise and dissemination of aminoglycoside resistance: the aac(6')-Ib paradigm', Frontiers in Microbiology, 4. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00121>.

Rothschild-Rodriguez, D. et al. (2024) 'KlebPhaCol: A community-driven resource for Klebsiella research identified a novel gut phage order associated with the human gut'. bioRxiv, p. 2024.12.02.626457. Available at: <https://doi.org/10.1101/2024.12.02.626457>.

Sauer, K. et al. (2022) 'The biofilm life cycle—expanding the conceptual model of biofilm formation', Nature reviews. Microbiology, 20(10), pp. 608–620. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00767-0>.

Schembri, M.A. et al. (2005) 'Capsule and Fimbria Interaction in Klebsiella pneumoniae', Infection and Immunity, 73(8), pp. 4626–4633. Available at: <https://doi.org/10.1128/iai.73.8.4626-4633.2005>.

Seemann, T. (2014) 'Prokka: rapid prokaryotic genome annotation', Bioinformatics, 30(14), pp. 2068–2069. Available at: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153>.

Seemann, T. (2025) 'tseemann/abricate'. Available at: <https://github.com/tseemann/abricate> (Accessed: 10 June 2025).

Segundo, N., Hernández, E., López, O., & Torres, O. (2010). Los bacteriófagos como una alternativa en el tratamiento de enfermedades infecciosas Bacterianas (Fagoterapia). *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 41(3), 17-26.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.04.002>

Stepanović, S. et al. (2007) 'Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci', *APMIS: acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*, 115(8), pp. 891–899. Available at: https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x.

Stewart, P.S. and Franklin, M.J. (2008) 'Physiological heterogeneity in biofilms', *Nature Reviews Microbiology*, 6(3), pp. 199–210. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrmicro1838>.

Suh, G.A. et al. (2022) 'Considerations for the Use of Phage Therapy in Clinical Practice', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 66(3), pp. e02071-21. Available at: <https://doi.org/10.1128/aac.02071-21>.

Townsend, E. M., Moat, J., & Jameson, E. (2020). CAUTI's next top model—Model dependent *Klebsiella* biofilm inhibition by bacteriophages and antimicrobials. *Biofilm*, 2, 100038. doi:10.1016/j.biofilm.2020.100038

Tooke, C.L. et al. (2019) 'β-Lactamases and β-Lactamase Inhibitors in the 21st Century', *Journal of Molecular Biology*, 431(18), pp. 3472–3500. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.04.002>.

Trautmann, E. et al. (2021) 'Hydrogen Peroxide Versus Sodium Hypochlorite: All a Matter of pH?', *Journal of Endodontics*, 47(2), pp. 297–302. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.joen.2020.10.016>.

Turner, D. et al. (2023) 'Abolishment of morphology-based taxa and change to binomial species names: 2022 taxonomy update of the ICTV bacterial viruses subcommittee', *Archives of Virology*, 168(2), p. 74. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00705-022-05694-2>.

Valencia-Toxqui, G. and Ramsey, J. (2024) 'How to introduce a new bacteriophage on the block: a short guide to phage classification', *Journal of Virology*, 98(10), p. e0182123. Available at: <https://doi.org/10.1128/jvi.01821-23>.

Van Goethem, M.W. et al. (2018) 'A reservoir of "historical" antibiotic resistance genes in remote pristine Antarctic soils', *Microbiome*, 6(1), p. 40. Available at: <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0424-5>.

Venturini, C. et al. (2022) 'Biological foundations of successful bacteriophage therapy', *EMBO molecular medicine*, 14(7), p. e12435. Available at: <https://doi.org/10.15252/emmm.202012435>.

Viertel, T.M., Ritter, K. and Horz, H.-P. (2014) 'Viruses versus bacteria--novel approaches to phage therapy as a tool against multidrug-resistant pathogens', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69(9), pp. 2326–2336. Available at: <https://doi.org/10.1093/jac/dku173>.

Vinner, G.K. et al. (2019) 'Microencapsulation of Enteric Bacteriophages in a pH-Responsive Solid Oral Dosage Formulation Using a Scalable Membrane Emulsification Process', *Pharmaceutics*, 11(9), p. 475. Available at: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11090475>.

Vörös, Z. et al. (2018) 'Temperature-Dependent Nanomechanics and Topography of Bacteriophage T7', *Journal of Virology*, 92(20), p. 10.1128/jvi.01236-18. Available at: <https://doi.org/10.1128/jvi.01236-18>.

Waldor, M.K. (1998) 'Bacteriophage biology and bacterial virulence', *Trends in Microbiology*, 6(8), pp. 295–297. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(98\)01320-1](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(98)01320-1).

Wang, J. et al. (2015) 'Natural Variation in Preparation for Nutrient Depletion Reveals a Cost–Benefit Tradeoff', *PLOS Biology*, 13(1), p. e1002041. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002041>.

Wang, L.K. and Peery, G.G. (1975) 'DISINFECTION WITH QUATERNARY AMMONIUM COMPOUNDS¹', *JAWRA Journal of the American Water Resources Association*, 11(5), pp. 919–932. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1752-1688.1975.tb01813.x>.

Wick, R. (2025) 'rrwick/Filtlong'. Available at: <https://github.com/rrwick/Filtlong> (Accessed: 1 June 2025).

Wittebole, X., De Roock, S. and Opal, S.M. (2014) 'A historical overview of bacteriophage therapy as an alternative to antibiotics for the treatment of bacterial pathogens', *Virulence*, 5(1), pp. 226–235. Available at: <https://doi.org/10.4161/viru.25991>.

Yang, Q. et al. (2023) 'Regulations of phage therapy across the world', *Frontiers in Microbiology*, 14. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1250848>.

Yarahmadi, A. et al. (2025) 'Beyond antibiotics: exploring multifaceted approaches to combat bacterial resistance in the modern era: a comprehensive review', *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 15. Available at: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2025.1493915>.

Zeng, Y. et al. (2021) 'Bacteriophage as an Alternative to Antibiotics Promotes Growth Performance by Regulating Intestinal Inflammation, Intestinal Barrier Function and Gut Microbiota in Weaned Piglets', *Frontiers in Veterinary Science*, 8, p. 623899. Available at: <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.623899>.

APÉNDICE:

Tabla suplementaria 1: Listado de aislamientos de *Klebsiella spp* testados en los ensayos de rango de hospedero y EOP

						Genes de resistencia a antibióticos					
Aislamiento	Especie	Secuencio-tipo	Cápsula	Muestra / origen	Año de aislamiento	beta lactámicos	aminoglucósidos	quinolonas	macrólidos	tetraciclinas	otros
ATCC 700603	<i>K. pneumoniae</i>	ST489	KL53	Urinario	1994	<i>blaOKP-B-14; blaSHV-18; blaOXA-2</i>	<i>ant(2'')-Ia</i>	<i>OqxB, OqxA</i>	-	-	<i>sul1; fosA6</i>
Kp1102	<i>K. pneumoniae</i>	ST48	ND	Secr. respiratoria	2011	<i>blaSHV-172; blaTEM-1; blaOXA-1; blaCTX-M-15</i>	<i>aac(6)-Ib-D181Y; aph(3'')-Ib; aph(6)-Id</i>	<i>qnrB1; oqxB10; oqxA6</i>	-	<i>tet(A)</i>	<i>fosA_gen; dfrA14; sul2</i>
Kp1111	<i>K. pneumoniae</i>	ST48	ND	Catéter urinario	2011	<i>blaSHV-172; blaTEM-1; blaCTX-M-15; blaOXA-1</i>	<i>aac(6)-Ib-D181Y; aph(6)-Id; aph(3'')-Ib</i>	<i>oqxB10; oqxA6; qnrB1</i>	-	<i>tet(A)</i>	<i>fosA_gen; dfrA14; sul2</i>
Kp666	<i>K. pneumoniae</i>	ND	KL41	Urocultivo	2011	<i>blaKPC-2</i>	ND	ND	ND	ND	ND
KpPOST	<i>K. pneumoniae</i>	ST258	KL41	Aspirado traqueal	2011	<i>blaKPC-2</i>	ND	ND	ND	ND	ND
FQ38879	<i>K. pneumoniae</i>	ST258	KL107 / KL64	Desconocido	2017	<i>blaKPC-2</i>	ND	ND	ND	ND	ND
M1366	<i>K. pneumoniae</i>	ST258	KL107 / KL64	Urinario	2016	ND	ND	ND	ND	ND	ND
19/2	<i>K. pneumoniae</i>	ST437	ND	Herida quirúrgica	2011	<i>blaSHV-158; blaCTX-M-15; blaOXA-1; blaTEM-1; blaKPC-2</i>	<i>aac(6)-Ib-D181Y; aph(3'')-Ia; aac(3)-IId</i>	<i>qnrB1; oqxB; oqxA</i>	<i>mph(A)</i>	<i>tet(D); tet(A)</i>	<i>fosA6; sul1; dfrA30</i>
Kp1124	<i>K. pneumoniae</i>	ST258	KL107	Urocultivo	2011	<i>BLEE (+)</i>	ND	ND	ND	ND	ND
M1443	<i>K. pneumoniae</i>	ST11	KL127	Urocultivo	2017	<i>blaSHV-182; blaTEM-1A; blaOXA-18; blaKPC-2</i>	<i>aac(3)-IV; aadA1; aac(6)-Ib; aph(4)-Ia</i>	<i>OqxB</i>	-	-	<i>sul3; fosA6; cmlA1</i>
FQ40565	<i>K. pneumoniae</i>	ST11	ND	Desconocido	2017	<i>blaSHV-158; blaNDM-1; blaKPC-2</i>	<i>aadA2; aph(3'')-Ia; aac(6)-Ib-AKT</i>	<i>qnrA1; qnrB2; oqxA; oqxB</i>	<i>mph(A)</i>	<i>tet(A)</i>	<i>fosA6; ble-MBL; dfrA12; dfrA25; catA1; cmlA5; sul1; sul2</i>
54/2	<i>K. pneumoniae</i>	ST437	ND	Herida quirúrgica	2011	<i>BLEE (+)</i>	ND	ND	ND	ND	ND
KpPRE	<i>K. pneumoniae</i>	ST258	ND	Aspirado traqueal	2011	<i>blaKPC-2</i>	ND	ND	ND	ND	ND
04Kp21	<i>K. pneumoniae</i>	ST307	KL102	Hueso	2023	ND	ND	ND	ND	ND	ND
L0240	<i>K. pneumoniae</i>	ST635	K21	Desconocido	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
164125A	<i>K. pneumoniae</i>	ST35	K22	Desconocido	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
164413U/2	<i>K. oxytoca</i>	ST37	K68	Desconocido	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
F305	<i>K. pneumoniae</i>	ND	ND	Urocultivo	ND	<i>blaNDM</i>	ND	ND	ND	ND	ND

F320	<i>K. pneumoniae</i>	ND	ND	Urocultivo	ND	<i>blaNDM</i>	ND	ND	ND	ND	ND
F322	<i>K. pneumoniae</i>	ND	ND	Secr. respiratoria	ND	<i>blaNDM</i>	ND	ND	ND	ND	ND
F312	<i>K. pneumoniae</i>	ND	ND	Cateter	ND	<i>blaNDM</i>	ND	ND	ND	ND	ND
F312B	<i>K. pneumoniae</i>	ST716	ND	NC	ND	<i>blaSHV-27; blaOXA-1; blaCTX-M-15; blaTEM-1; blaTEM-150; blaNDM-1</i>	<i>aac(6)-Ib-D181Y; aph(6)-Ic; aph(3'')-Ib; aadA2</i>	<i>oqxA6; oqxB26; qnrB1; qnrE1; qnrA1</i>	-	<i>tet(A)</i>	<i>sul1; sul2; dfrA12; dfrA14; catA1; cmlA5; fosA_gen; ble-MBL</i>
F312C	<i>K. pneumoniae</i>	ND	ND	NC	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
F327	<i>K. pneumoniae</i>	ND	ND	Urocultivo	ND	<i>blaNDM</i>	ND	ND	ND	ND	ND
F327B	<i>Klebsiella spp</i>	ST483	ND	NC	ND	<i>blaSHV-27; blaNDM-1; blaOXA-9; blaTEM-150</i>	<i>aadA1; aadA2; aph(3)-Ia; aac(6)-Ib-AGKT; aac(6)-Ib-AKT</i>	<i>qnrA1; qnrE1; oqxA10; oqxB25</i>	<i>mph(A)</i>	-	<i>fosA6; ble-MBL; dfrA12; catA1; cmlA5; sul1; sul2</i>
F327C	<i>K. pneumoniae</i>	ND	ND	NC	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
F330	<i>K. pneumoniae</i>	ND	ND	Cateter	ND	<i>blaNDM</i>	ND	ND	ND	ND	ND
04Kp27	<i>K. pneumoniae</i>	ST307	ND	Desconocido	ND	<i>blaSHV-106; blaNDM-5; blaTEM-1</i>	<i>aadA2; aph(3'')-Ib; aph(6)-Ic; rmtB1</i>	<i>oqxA5; oqxB19</i>	<i>mph(A); erm(B)</i>	-	<i>fosA6; ble-MBL; sul1; sul2; dfrA12; dfrA14</i>
04Kp29	<i>K. pneumoniae</i>	ST278	ND	Desconocido	ND	<i>blaSHV-27</i>	-	<i>oqxA6; oqxB32</i>	-	-	<i>fosA6</i>

ND = No determinado (genomas secuenciados, aún sin analizar)

NC = No corresponde

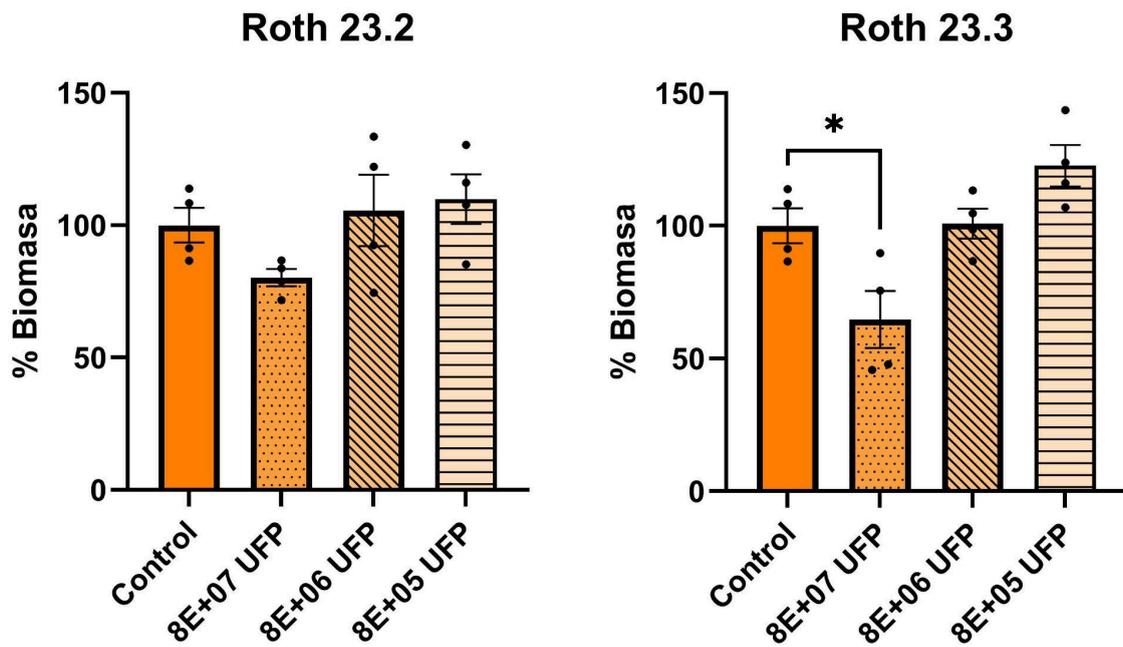


Figura Suplementaria 1: Evaluación de la capacidad del fago Roth 23 para erradicar biofilms formados por la cepa M1443. Se utilizaron diferentes concentraciones de dos propagaciones independientes del fago (Roth 23.2 y Roth 23.3). La formación de biofilms fue cuantificada mediante medición de absorbancia, y los resultados se expresan como porcentaje de biomasa relativo respecto al control sin tratamiento. Cada barra representa el promedio de cuatro réplicas independientes con barras de error que indican la SEM para cantidades de fago de 8×10^7 UFP, 8×10^6 UFP y 8×10^5 UFP. La diferencia significativa fue evaluada con test de ANOVA de una vía y test de Dunnet de comparaciones múltiples, Roth 23.3 $p = 0,0214$.

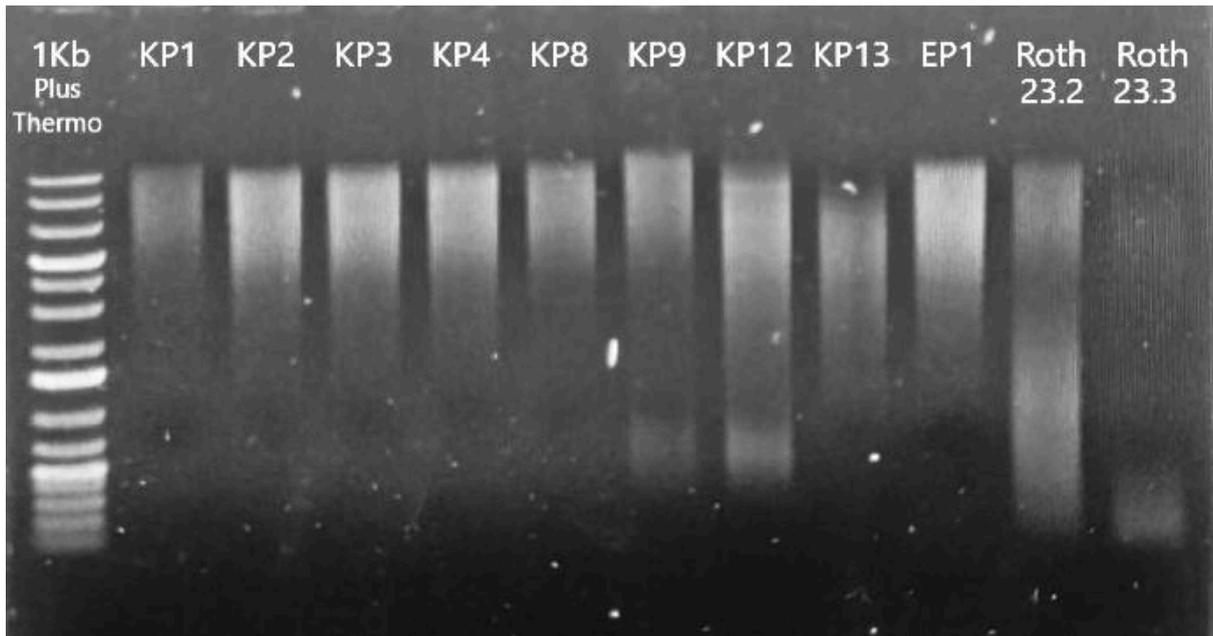


Figura suplementaria 2: Electroforesis en gel de agarosa de ADN de fagos fragmentado a 8Kb para secuenciación por Oxford Nanopore Technologies. El primer carril es el marcador de peso molecular de 1 Kb plus (Thermo). El último carril corresponde al ADN de Roth 23.3 que se observa de muy bajo peso molecular, sugiriendo haberse degradado post fragmentación. Se incluyen otros ADNs de fagos fragmentados correctamente como referencia.